

Tesis de Posgrado

Prenol-fosfo-azúcares : Su participación en la biosíntesis de polisacáridos bacterianos

Ielpi, Luis

1982

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

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

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

Cita tipo APA:

Ielpi, Luis. (1982). Prenol-fosfo-azúcares : Su participación en la biosíntesis de polisacáridos bacterianos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1750_Ielpi.pdf

Cita tipo Chicago:

Ielpi, Luis. "Prenol-fosfo-azúcares : Su participación en la biosíntesis de polisacáridos bacterianos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1750_Ielpi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"PRENOL-FOSFO-AZUCARES"

SU PARTICIPACION EN LA BIOSINTESIS DE
POLISACARIDOS BACTERIANOS

Autor: LUIS IELPI

Director: MARCELO ALBERTO DANKERT

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

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1750

AÑO 1982

1750

31

1

a Laura,

Pedro, José y M. Aurora

a mi madre

a la memoria de mi padre

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J.L.A. Brioux por haber participado en mi formación en los comienzos de esta actividad.

A los miembros del Consejo Directivo del Instituto, Israel D. Algranati, Carlos E. Cardini, Héctor Carminatti, Marcelo A. Dankert, Luis F. Leloir, José M. Olavarría y Héctor N. Torres, por haberme permitido realizar este trabajo.

Al Dr. Dankert, director de esta tesis. Sus ideas, estímulo e importantes enseñanzas han sido de gran valor para la concreción del trabajo.

A Nora Iñon y Roberto O. Couso, compañeros de laboratorio y a todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por su cooperación, amistad y gratos momentos.

A los profesores, a los compañeros y a los colegas del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme ayudado en mis tareas docentes ejercidas durante el desarrollo de esta tesis.

A Soledad Gimenez, F. Irusta y J. Pinto por su eficiente colaboración.

Finalmente deseo expresar mi agradecimiento a Norberto Malarini y a Liliana Botana por su tiempo y dedicación durante la preparación final de esta tesis.

ABREVIATURAS

A. xylinum	Acetobacter xylinum
Abe	abecuada
Ac	acetil
CoA	Coenzima A
ADP	5' adenosina difosfato
AMP	5' adenosina monofosfato
ATP	5' adenosina trifosfato
AX ₃	β -manosil-1,3- β -glucosil-1,4-glucosa
AX ₃ Pc	β -manosil-1,3- β -glucosil-1,4- α - -glucosa-1,2-fosfato cíclico
AX ₄	β -glucuronil-1,6- β -manosil-1,3- β - -glucosil-1,4-glucosa
AX ₄ Pc	β -glucuronil-1,6- β -manosil-1,3- β - -glucosil-1,4- α -glucosa-1,2-fosfato cíclico
AX ₆	β -glucosil-1,6- α -glucosil- β -glucu- ronil-1,6- β -manosil-1,3- β -glucosil- -1,4-glucosa
AX ₆ Pc	β -glucosil-1,6- α -glucosil- β -glucu- ronil-1,6- β -manosil-1,3- β -glucosil- -1,4- α -glucosa-1,2-fosfato cíclico
AX ₇	ramnosil-1,6- β -glucosil-1,6- α -glu- cosil- β -glucuronil-1,6- β -manosil- 1,3- β -glucosil-1,4-glucosa

BD	azul dextrano
C ₂ , cel	celobiosa
C ₂ ol	celobitol
C ₂ Pc	celobiosa-1,2-fosfato cíclico
C ₂ -2-P	celobiosa-2-fosfato
cpm	cuentas por minuto
DEAE-cel	dietilaminoetil celulosa
D.O.	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
F	frente del solvente
FMP	ficaprenol monofosfato
Fracc.	fracción
Fuc	fucosa
G ₂	genciobiosa
gal	galactosa
GDP	5' guanosina difosfato
GDP-Man	5' guanosina difosfato manosa
GDP-Ram	5' guanosina difosfato ramnosa
Glc	glucosa
GlcPc	glucosa-1,2-fosfato cíclico
Glc-PP-Fic	glucosa difosfato ficaprenol
GlcUA	ácido glucurónico
GlcUAPc	glucurónico-1,2-fosfato cíclico
gli	glicerol

M ₂	maltosa
M ₂₀₁	maltitol
M ₃	maltotriosa
M ₄	maltotetraosa
M ₅	maltopentaosa
M ₆	maltohexaosa
Man	manosa
Me	metil
NAcGal	N-acetil galactosamina
NAcGlc	N-acetil glucosamina
NAcManUA	ácido N-acetil manurónico
NAcMur	N-acetil murámico
NAcNeu	N-acetil neuramínico
PEP	ácido fosfoenolpirúvico
Pi	fósforo inorgánico
Pir	piruvato
PPi	pirofosfato inorgánico
PS	β -manosil-1,4- β -glucuronil-1,2- - α -manosil-1,3- β -glucosil-1,4- -glucosa
PSPc	β -manosil-1,4- β -glucuronil-1,2- - α -manosil-1,3- β -glucosil-1,4-glu- cosa-1,2-fosfato cíclico
Pir-PS-Pc	4,6-piruvil- β -manosil-1,4- β -glucuro- nil-1,2- α -manosil-1,3- β -glucosil- -1,4-glucosa-1,2-fosfato cíclico

prot	proteína
Ram	ramnosa
RamPc	ramnosa-1,2-fosfato cíclico
Rf	relación de movilidad del compuesto respecto del frente del solvente
R _{Glc}	relación de movilidad del compuesto respecto de la glucosa
R _{UMP}	relación de migración del compuesto respecto del UMP
S ₂₀₁	soforitol
Sorb	sorbitol
TDP	5' deoxitimidina difosfato
TDP-Ram	5' deoxitimidina difosfato ramnosa
Tris	tri (hidroxiaminometil) metano
UDP	5' uridina difosfato
UDP-Glc	5' uridina difosfato glucosa
UDP-GlcUA	5' uridina difosfato glucurónico
UMP	5' uridina monofosfato
X. campestris	Xanthomonas campestris

<u>INDICE</u>	Pag.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	
1.1. La pared bacteriana	6
1.1.2. Morfología y componentes de la pared bacteriana	6
1.1.3. Efecto del EDTA sobre la pared de bacterias Gram-negativas	9
1.2. Estructura de los principales polisacáridos de pared	10
1.2.1. La mureina	10
1.2.2. El lipopolisacárido	14
1.2.3. Ácidos teicoicos y teicurónicos	16
1.3. Exopolisacáridos bacterianos	17
1.3.1. Composición	18
1.3.2. Homopolisacáridos	19
1.3.3. Heteropolisacáridos	21
1.3.4. Unidades repetitivas propuestas para exopolisacáridos	23
1.4. Lípidos intermediarios en la síntesis de polisacáridos de pared	27
1.4.1. La estructura del lípido	28
1.4.2. Lípido-fosfo-azúcares descritos hasta el momento en bacterias	30
1.4.3. Síntesis de prenol-azúcares	35
1.4.4. Síntesis del polisacárido-O de Salmonella	38
1.4.4.1. Formación de la unidad repetitiva	38
1.4.4.2. Polimerización de las unidades repetitivas	40

1.4.4.3. Formación de ramas laterales	41
1.4.4.4. Acetilación del polisacárido-0	43
1.4.5. Síntesis de exopolisacáridos	44
1.4.5.1. Incorporación de restos no glicosídicos	47
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	
2.1. Antecedentes	49
2.1.1. Lípidos intermediarios en la síntesis de exopolisacáridos de <i>Acetobacter xylinum</i>	51
2.1.2. El xantano	54
2.2. Objetivos	57
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Cultivo de <i>Acetobacter xylinum</i> y preparación de enzimas	59
3.1.1. Medio de cultivo	59
3.1.2. Condiciones de crecimiento	59
3.1.3. Obtención de células	60
3.1.4. Preparación de enzimas	61
3.2. Mantenimiento y cultivo de <i>Xanthomonas campestris</i> y preparación de enzimas	62
3.2.1. Medio de cultivo	62
3.2.2. Condiciones de mantenimiento	62
3.2.3. Condiciones de crecimiento y obtención de células	64
3.2.4. Preparación de enzimas	65
3.3. Sistemas de incubación con enzimas de <i>A. xylinum</i>	66

3.3.1. Incubación estandar-Método A	66
3.3.2. Incubación en dos etapas	68
3.3.2.1. Método B	68
3.3.3. Incubaciones utilizando lípido-glucosa como sustrato exógeno	69
3.3.3.1. Método C	69
3.4. Sistemas de incubación con enzimas de <i>X. campestris</i>	69
3.4.1. Incubación estandar	69
3.4.1.1. Método D	70
3.4.1.2. Método E	71
3.4.2. Incubaciones en dos etapas	72
3.4.2.1. Método F	72
3.5. Tratamientos degradativos	73
3.5.1. Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares	73
3.5.1.1. Compuestos cuya porción azúcar no contiene ácidos urónicos	73
3.5.1.2. Compuestos cuya porción azúcar contiene ácidos urónicos	74
3.5.2. Hidrólisis ácida parcial o total de oligo o polisacáridos	74
3.5.3. Reducción catalítica	75
3.5.4. Tratamiento con Fenol	76
3.5.5. Deacilación de oligosacáridos	76
3.5.6. Tratamiento alcalino del lípido glucurónico	77
3.5.7. Oxidación con periodato	78
3.5.8. Degradación de Smith	78

3.5.9.Reducción con borohidruro	79
3.5.9.1.Reducción con borohidruro de sodio	79
3.5.9.2.Reducción con borotrituro de sodio	79
3.5.10.Reducción del grupo carboxilo en oligosacáridos que contienen ácido glucurónico	80
3.5.11.Acetolisis	81
3.5.12.Permetilación	82
3.5.12.1.Permetilación de oligosacáridos	83
3.5.12.2.Permetilación de polisacáridos	84
3.6.Métodos analíticos	85
3.7.Tratamientos enzimáticos	85
3.7.1.Fosfatasa alcalina	85
3.7.2. α -Manosidasa	86
3.7.3. β -Glucuronidasa	86
3.7.4.Pirofosfatasa inorgánica	87
3.8.Cromatografías	87
3.8.1.Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	87
3.8.1.1.DEAE-celulosa para soluciones lipofílicas	87
3.8.1.2.DEAE-celulosa para soluciones acuosas	88
3.8.2.Cromatografía en columna de geles	88
3.8.3.Cromatografía y electroforesis en papel	89
3.8.4.Cromatografía en placa delgada	90
3.9.Medida de la radioactividad	91
3.10.Obtención de compuestos radioactivos	92
3.10.1.Preparación de nucleótido-azúcares	93

3.10.2.Otros compuestos radioactivos	93
3.11.Obtención de polisacáridos	94
3.11.1.Obtención de acetano	94
3.11.2.Obtención de xantano	95
4.RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE ACETOBACTER XYLINUM	
4.1.Glucano, propiedades y síntesis	96
4.1.1.Antecedentes	96
4.1.1.1.Síntesis del glucano	98
4.1.2.Resultados obtenidos	102
4.1.2.1.Efecto del UMP en la formación del glucano a partir de glucosa difosfato lípido	105
4.1.2.2.Efecto del UMP en la formación de glucosa difosfato lípido y de glucano a partir de UDP-glucosa	110
4.2.Análisis estructural del acetano	112
4.2.1.Generalidades	112
4.2.2.Composición	113
4.2.3.Determinación de la relación glucosa-manosa-ramnosa-ácido glucurónico	114
4.2.4.Productos obtenidos por métodos degradativos	116
4.2.4.1.Aislamiento y caracterización de β -glucuronil-manosa	118
4.2.4.2.Aislamiento y caracterización de genciobiosa	120
4.2.4.3.Aislamiento y caracterización de celobiosa	120
4.2.4.4.Aislamiento y caracterización de glucosil-	

-glucurónico	122
5.RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS	
5.1.Evidencias	125
5.1.1.Caracterización del producto obtenido	127
5.1.1.1.Filtración en columna de geles	127
5.1.1.2.Permetilación del polisacárido marcado en (¹⁴ C)glucosa	130
5.1.2.Evidencia sobre la participación de los lípidos intermediarios en la síntesis de xantano	131
5.2.Incorporación de glucosa a material liposoluble	131
5.2.1.Análisis del material liposoluble marcado con (¹⁴ C)glucosa	137
5.2.2.Estudio estructural del compuesto I	140
5.2.2.1.Hidrólisis ácida suave: caracterización de celobiosa	140
5.2.2.2.Confirmación de la unión difosfato entre la porción lipídica y la celobiosa	142
5.2.2.3.Tratamiento con fenol 50%	143
5.2.2.4.Reducción catalítica	146
5.3.Incorporación de manosa a material liposoluble	148
5.3.1.Análisis del material liposoluble marcado con (¹⁴ C)manosa	148
5.3.2.Estudio de la unión entre el trisacárido y la porción lipídica	152
5.3.3.Obtención de trisacárido difosfato lípido marcado con (¹⁴ C)glucosa	153

5.3.4.Celobiosa difosfato preno1 como precursor de trisacá- rido difosfato preno1	156
5.3.5.Estructura del trisacárido	156
5.3.5.1.Estudio de la unión manosa-celobiosa	156
5.3.5.2.Configuración anomérica de la manosa en manosil-celobiosa	160
5.4.Obtención de la unidad repetitiva asociada a un lípido difosfato	164
5.4.1.Generalidades	164
5.4.2.Análisis del material liposoluble obtenido	165
5.4.2.1.Hidrólisis ácida y alcalina suave	165
5.4.2.2.Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	168
5.4.3.Obtención de pentasacárido difosfato preno1 a partir de celobiosa difosfato preno1	170
5.4.4.Condiciones de obtención	174
5.4.4.1.Efecto de la temperatura de incubación	174
5.4.4.2.Curva de tiempo	175
5.4.4.3.Concentración de sustratos	177
5.4.4.4.Concentración de enzimas	178
5.4.4.5.Dependencia de la concentración de Mg ⁺⁺	179
5.4.5.Tamaño del oligosacárido	181
5.4.6.Estructura del pentasacárido	183
5.4.6.1.Generalidades	183
5.4.6.2.Aislamiento y caracterización de glucuronil- -manosa	184
5.4.6.3.Permetilación del pentasacárido marcado en	

(¹⁴ C)manosa	186
5.4.6.4.El ácido glucurónico del pentasacárido está sustituido en posición 4	188
5.4.6.5.Permetilación del pentasacárido marcado en (¹⁴ C)glucosa	188
5.5.Transferencia de glucosa-1-fosfato al fosfato-prenol endógeno	192
5.6.Síntesis de glucuronil-manosilcelobiosa difosfato preno1	198
5.6.1.Incorporación de ácido (¹⁴ C)glucurónico a manosilcelobiosa difosfato preno1	198
5.6.2.Análisis del material liposoluble obtenido en incubaciones en dos etapas con marca en ácido glucurónico	200
5.6.3.Obtención del tetrasacárido difosfato lípido marcado con glucosa o con manosa	203
5.6.4.El tetrasacárido difosfato preno1 como precursor del pentasacárido difosfato preno1	205
5.7.Biosíntesis del xantano "in vitro"	209
5.7.1.Generalidades	209
5.7.2.Pentasacárido difosfato lípido como precursor del polisacárido	209
5.7.2.1.Obtención	209
5.7.2.2.Requerimientos de la polimerización	211
5.8.Incorporación de restos no glicosídicos	218
5.8.1.Incorporación de piruvato a material liposoluble	219
5.8.1.1.Análisis del producto obtenido	220
5.8.1.2.Condiciones de incorporación de piruvato	222

5.8.1.2.1. Temperatura de incubación	222
5.8.1.2.2. El PEP como sustrato	224
5.8.1.3. Obtención del piruvil-pentasacárido difosfato prenoI marcado con glucosa, con manosa o con ácido glucurónico	225
5.8.1.4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	228
5.8.1.5. Posición del grupo piruvato	232
5.8.1.6. Incorporación del grupo piruvato al polisacárido	235
5.8.1.7. Efecto de la concentración de PEP	236
5.8.1.8. Polimerización del piruvil-pentasacárido difosfato prenoI	239
5.8.2. Incorporación del grupo acetilo a material liposoluble y a polisacárido	242
5.8.2.1. Generalidades	242
5.8.2.2. Manosilcelobiosa difosfato prenoI como aceptor del grupo acetilo	244
5.8.2.3. Caracterización del resto acetato en el trisacárido acetilado	247
5.8.2.4. El acetato está en la manosa del trisacárido acetilado	249
5.8.2.5. El Acetil-CoA como sustrato	250
5.8.2.6. Confirmación de que el pentasacárido difosfato prenoI está acetilado	250
5.8.2.7. Incorporación del grupo acetilo al polisacárido	253
5.9. Otros compuestos obtenidos con el sistema de <i>X. campestris</i>	255

5.9.1.Incubaciones con GDP-(¹⁴ C)manosa	255
5.9.2.Formación de GDP-D-ramnosa	256
5.9.3.Incubaciones con UDP-(¹⁴ C)glucurónico	259
5.9.3.1.Propiedades del lípido-glucurónico	261
5.9.3.1.1.Análisis cromatográfico	261
5.9.3.1.2.Tratamientos degradativos	263
6.DISCUSION Y CONCLUSIONES	
6.1.De los resultados encontrados con el sistema de Acetobacter xylinum	264
6.2.De los resultados encontrados con el sistema de Xanthomonas campestris	270
BIBLIOGRAFIA	290

RESUMEN

En nuestro laboratorio, trabajando con Acetobacter xylinum se había descripto la formación "in vitro" de varios lípido-azúcares. Los resultados encontrados se resumen en el diagrama I.

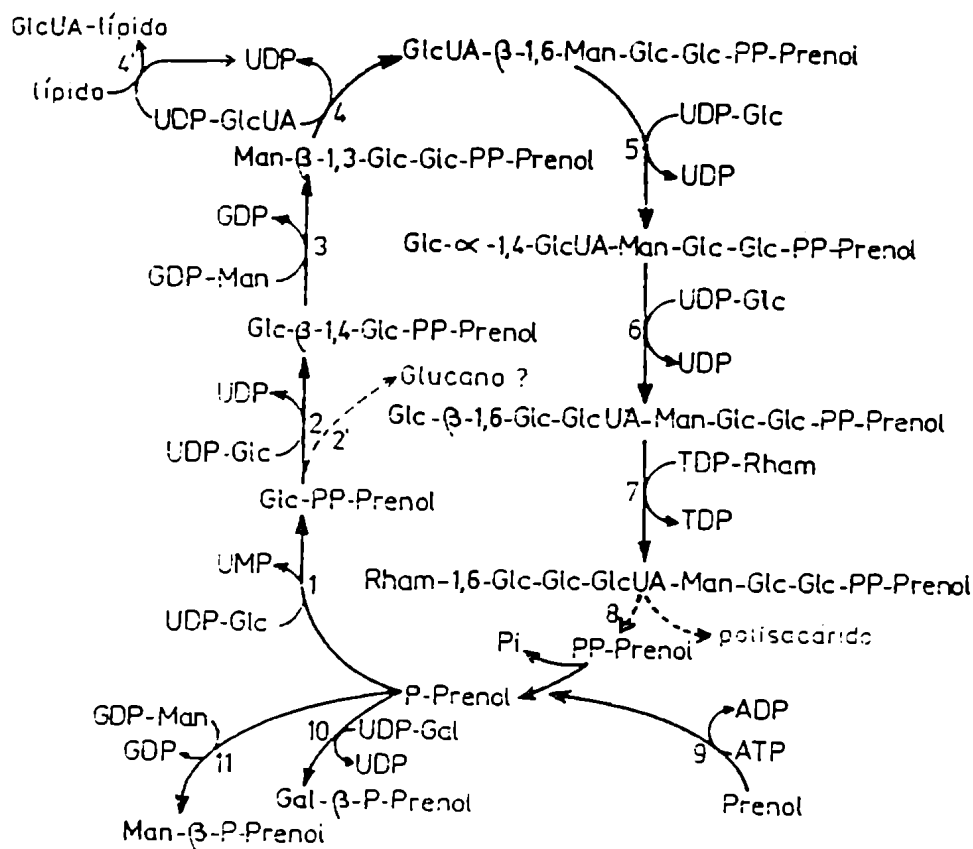
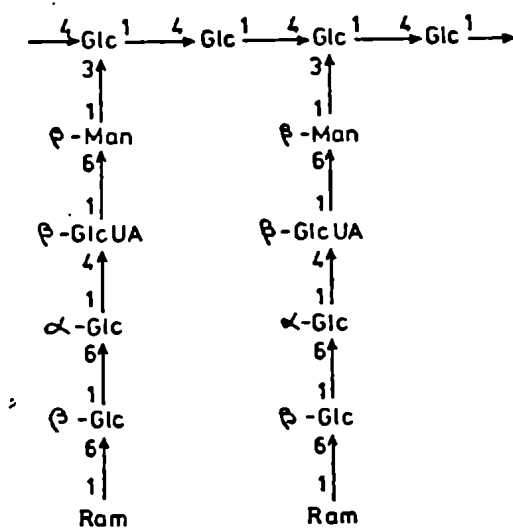


Diagrama I: Reacciones previamente caracterizadas en el sistema de Acetobacter xylinum. Las flechas de puntos indican reacciones probables pero no probadas.

Por otra parte además de celulosa (el principal polisacárido que sintetiza Acetobacter xylinum) se había aislado del sobrenadante de los medios de cultivo un polisacárido aniónico, que denominamos acetano, compuesto por glucosa, manosa, ramnosa y ácido glucurónico.

En esta Tesis, empleando preparados enzimáticos de A. xylinum y utilizando UDP-glucosa como dador de glucosa, se estudió la reacción 2', es decir la participación de glucosa difosfato preno1 en la biosíntesis del glucano. Los resultados obtenidos señalan que UDP-glucosa es un precursor directo del glucano, aunque no descartan la participación en alguna medida de glucosa difosfato preno1 en la biosíntesis del mismo.

Por otra parte se estudió la estructura del polisacárido, acetano, lo que permitió proponer para el mismo la unidad repetitiva siguiente:



Este resultado nos permitió reforzar suposiciones previas, es decir que el acetano es el destino final del heptasacárido difosfato preno1 (producto de la reacción 7, diagrama I).

El trabajo principal se centró en el estudio de la biosíntesis del exopolisacárido xantano de estructura similar a la del acetano, y producido por la bacteria Xanthomonas campestris. Empleando preparados enzimáticos de dicha bacteria y distintos nucleótido-azúcares se investigó la formación "in vitro" de lípido-azúcares y su relación con el polisacárido xantano. Se estudiaron además los compuestos que actuaban como dadores de los grupos acetato y piruvato (dos grupos que forman parte en la estructura del polisacárido), así como sus posibles aceptores.

Los resultados obtenidos se resumen en el diagrama II.

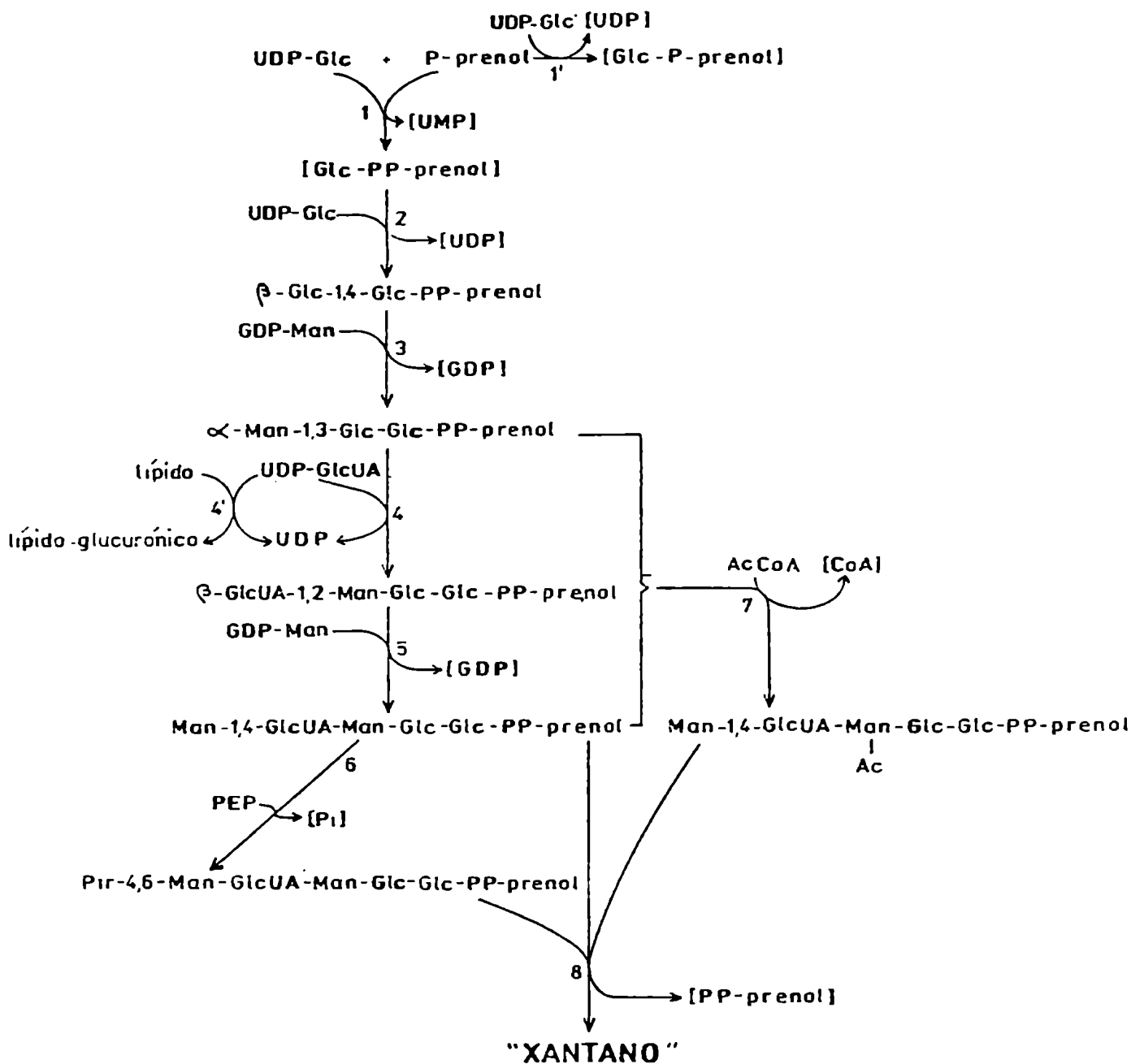


Diagrama II: Resultados obtenidos con el sistema de Xanthomonas campestris.

Se determinó la estructura de los lípido-oligosacáridos formados por las reacciones 2,3,4,5 y 6, así como la relación entre los distintos compuestos mostrados en el Diagrama II. La mayoría de los mismos se pudieron obtener a partir del precursor marcado obtenido "in situ" y los dadores necesarios no radioactivos.

Utilizando (β - ^{32}P)UDP-glucosa se obtuvieron los compuestos formados por las reacciones 2,3 y 5, con marca en ^{32}P , indicando la transferencia de P como P-glucosa.

Se estableció que el acetyl-CoA es el dador del grupo acetyl y que el ácido fosfoenolpirúvico lo es del grupo piruvato, siendo ésta la primera vez que se describen lípidos intermedios acetilados o piruvilados obtenidos "in vitro".

La relación entre el producto final, xantano, y los productos formados por las reacciones 5 y 6 se estableció por incubaciones realizadas a partir de dichos precursores radioactivos obtenidos "in situ".

Se encontró de esta manera, que el producto de la reacción 6 (la unidad repetitiva piruvilada asociada al lípido difosfato) solo puede ser polimerizado si en la reacción está presente el producto de la reacción 5 (la unidad repetitiva asociada al lípido difosfato).

No se determinaron las funciones de glucosa-P-prenol (producto de la reacción 1') y del lípido glucurónico (producto de la reacción 4'), pero no parecen estar involucrados en la formación de xantano.

1. INTRODUCCION

1.1. La pared bacteriana

La pared bacteriana puede ser definida de varias maneras (1,2). Una definición morfológica incluye aquellas estructuras capaces de ser teñidas y observarse por microscopía electrónica. Se puede definir, también, la pared celular bacteriana como todo aquel material exterior a la membrana citoplasmática, excluyendo flagelos y cápsula. Otra definición de la pared es operacional e incluye aquellos componentes de la célula bacteriana que pueden ser aislados por ruptura mecánica de las células y posterior centrifugación. Debido a la falta de precisión de este proceso debe tenerse especial cuidado para distinguir entre componentes verdaderos de la pared y fragmentos coprecipitados de membrana plasmática. De todas maneras las investigaciones realizadas hasta el presente son suficientes para permitir identificar sobre bases químicas seguras los principales componentes de la pared bacteriana.

1.1.2. Morfología y componentes de la pared bacteriana

Las paredes bacterianas observadas por microscopía electrónica muestran muy buena correlación con la clasificación de las bacterias de acuerdo a la coloración de Gram. Así las bacterias gram positivas poseen normalmente una pared relativamente gruesa.

sa y homogénea (Fig.1a) que normalmente está en estrecho contacto con la superficie externa de la membrana citoplasmática, lo cual dificulta la delineación de ambas estructuras (3). Químicamente consiste de moléculas de mureina (llamada también peptidoglicano o glicopéptido), el cual contribuye con el 50 al 95% de la masa de la pared purificada. A la mureina están unidos en forma covalente uno o más polisacáridos secundarios incluyendo a los ácidos teicoicos y teicurónicos.

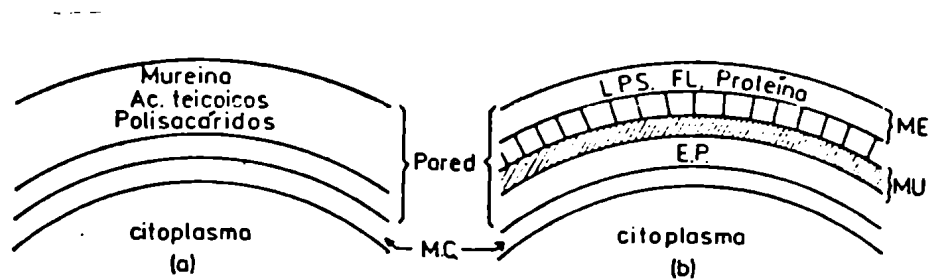


Figura 1: Estructura de la pared de bacterias gram positivas (a) y gram negativas (b). (M.C.: membrana citoplasmática, E.P.: espacio periplásmico, ME: membrana externa, MU: mureina, FL: fosfolípidos, LPS: lipopolisacárido)

En contraste las paredes de las bacterias gram negativas es normalmente más delgada y está compuesta de diferentes capas incluyendo la membrana externa, (Fig.1b), siendo esta una de las principales diferencias morfológicas entre ambos tipos de bacterias (4). La membrana externa en este tipo de bacterias sirve como una barrera osmótica entre el medio ambiente y la membrana plasmática. El espacio encerrado por estas dos membranas se conoce con el nombre de periplasma o espacio periplasmático (5) y con la probable excepción del DNA casi todo el material transportado desde y hacia el interior celular debe pasar por este espacio (1).

Además de los fosfolípidos, los principales componentes de la pared de bacterias gram negativas reconocidos son:

- 1) Lipopolisacárido (LPS), el cual puede interaccionar con moléculas específicas (anticuerpos, bacteriofagos, bacteriocina) y ocupando aproximadamente el 45% de la superficie de la membrana externa (6).
- 2) Lipoproteínas y
- 3) Mureina. Los dos últimos están covalentemente unidos, siendo la cantidad de mureina mucho menor que en la pared de bacterias gram positivas. Los tres componentes constituyen del 10 al 30% del peso seco de la bacteria.

1.1.3. Efecto del EDTA sobre la pared de bacterias gram negativas.

Un efecto importante sobre la estructura de la pared de bacterias gram negativas es causado por el EDTA. La superficie celular puede hacerse permeable a ciertas drogas y/o enzimas, a las cuales era antes impermeable, luego del tratamiento con agentes quelantes. La razón de este efecto es fácilmente comprendida con un conocimiento algo más detallado de la cubierta de las bacterias gram negativas (Fig.2).

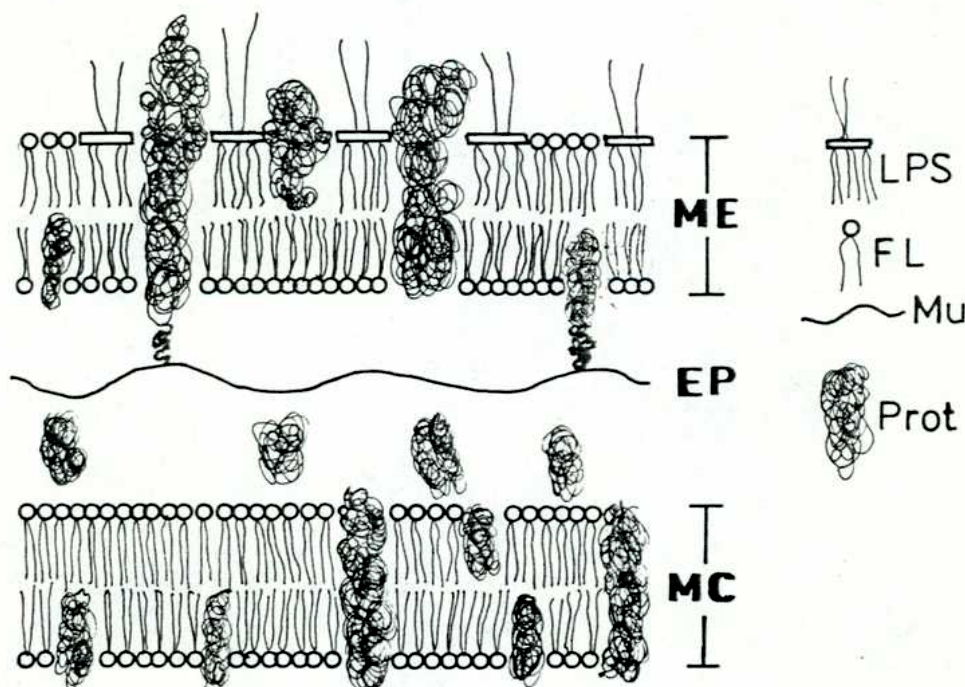


Figura 2: Diagrama esquemático de la cubierta celular de bacterias gram negativas. Tomado de (5). LPS: lipopolisacárido, FL: fosfolípidos, MU: mureína, Prot: proteína, MC: membrana citoplasmática, ME: membrana externa, EP: espacio periplásmico.

En la membrana externa, a diferencia de la membrana citoplasmática, la mayor parte de los fosfolípidos se encuentran en la cara interna de la bicapa. La cara externa consiste de LPS, y varias proteínas específicas están asociadas con él. Es la porción lípido A del LPS (ver estructura del LPS en la sección 1.2.2.) que reemplaza a los fosfolípidos en la cara externa. Las moléculas de LPS están además asociadas entre sí, siendo esta asociación estabilizada por cationes divalentes. Entonces el tratamiento de las células con agentes quelantes como el EDTA, rompe la integridad de la membrana externa, causando la liberación del LPS y varias de las proteínas que la forman (5,7).

1.2. Estructura de los principales polisacáridos de pared.

1.2.1. La mureína

La mureína está constituida por cadenas lineales de polisacárido unidas entre sí por cadenas cortas de péptidos. El polímero es una enorme, continua molécula que rodea la célula, llamada por Weidel y Pelzer (8) "macromolécula con forma de bolsa", y es el responsable primario del mantenimiento de la forma de la célula bacteriana. La estructura de la mureína de Staphylococcus aureus se muestra en la Fig.3 (9). El polisacárido está formado por residuos alternados de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidos en posición β -1-4. El carboxilo

del grupo láctico del N-acetilmurámico está unido a un tetrapéptido, el cual a su vez está unido a otro tetrapéptido de una cadena polisacárida vecina por un puente peptídico. En las bacterias gram positivas se ha encontrado polisacáridos (por ejemplo ácidos teicoicos) unidos al péptidoglicano a través del grupo OH del C₆ de algunos residuos N-acetilmurámico (58).

La secuencia del tetrapéptido (R₁-R₂-R₃-R₄) más estudiado consiste en L-alanil-γ-D-glutamil-L-R₃-D-alanil. Los aminoácidos en la posición R₂ y R₄ son invariables (D-glutamato y D-alanina respectivamente), mientras que R₁ (L-alanina) solo en ciertas corinebacterias es reemplazado por L-serina o glicina. En la posición R₃ se han descrito ocho aminoácidos diferentes (Fig.4) hallándose que meso-diaminopimélico es común a casi todas las bacterias gram negativas.

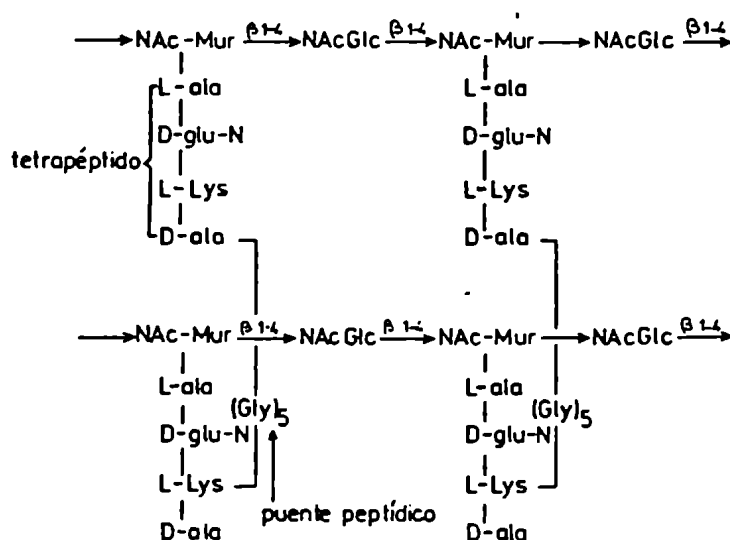
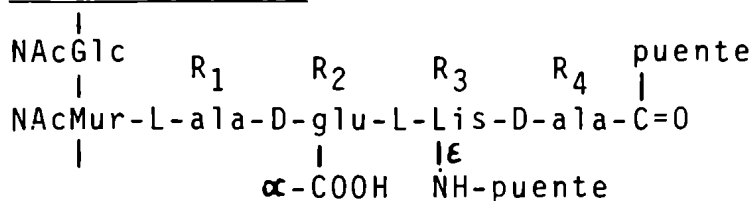


Figura 3: Estructura de la mureina de *S. aureus* (9).

En cuanto al puente peptídico se conocen dos tipos principales conocidos como A y B. En ambos está involucrado el grupo -COOH de la D-ala (R_4) terminal del tetrapéptido, estando en el tipo A unido al grupo $-NH_2$ del aminoácido ubicado en R_3 del tetrapéptido vecino. Esta unión puede ser directa como ocurre en casi todas las bacterias gram negativas o a través de uno o varios residuos de aminoácidos. En el tipo B el puente se establece por intermedio del grupo -COOH del aminoácido ubicado en R_2 del tetrapéptido vecino, y por lo tanto debe estar involucrado un diaminoácido.

Estructura tipo



Variaciones en el tetrapéptido

R₃ : meso-diaminopimélico (Bacterias gram negativas)
 L,L-diaminopimélico
 L-lisina
 L-Ornitina
 L-diaminobutirato
 L-glutamato
 L-homoserina
 L-alanina

Variaciones en el puente peptídico a partir del grupo -COOH de D-ala (R₄) de un tetrapéptido al grupo -NH₂ ó al grupo -COOH en otro tetrapéptido.

Tipo A: al ω -NH₂ de L-R₃ por:

- a) Unión directa (por ejemplo -COOH de D-ala al -NH₂ de meso-DAP)
- b) (Gly)₅
- c) D-Asp-D-ser
- d) D-Asp
- e) D-Glu
- f) L-Ala-Gly-Gly
- g) (L-Ala)₃-Treo

Tipo B: al α -COOH de D-R₂ por: (requiere un diaminoácido en el puente)

- a) D-Ornitina
- b) Acido D-diaminobutírico
- c) L-Lys-Gly
- d) D-Lys

Figura 4: Variaciones en la estructura de la mureina (Modificado de (1))

1.2.2. El lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS), ubicado en la membrana externa de las bacterias gram negativas (Fig.2) es una molécula compleja formada por tres regiones covalentemente unidas: el lípido A, la región Central y la región O ó polisacárido-O, cada una con una composición particular (Fig.5)

Aunque los estudios recientes, centran su atención en los LPS de bacterias pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae, se encuentran datos estructurales y de biosíntesis mucho más completos en bacterias del género Salmonella.

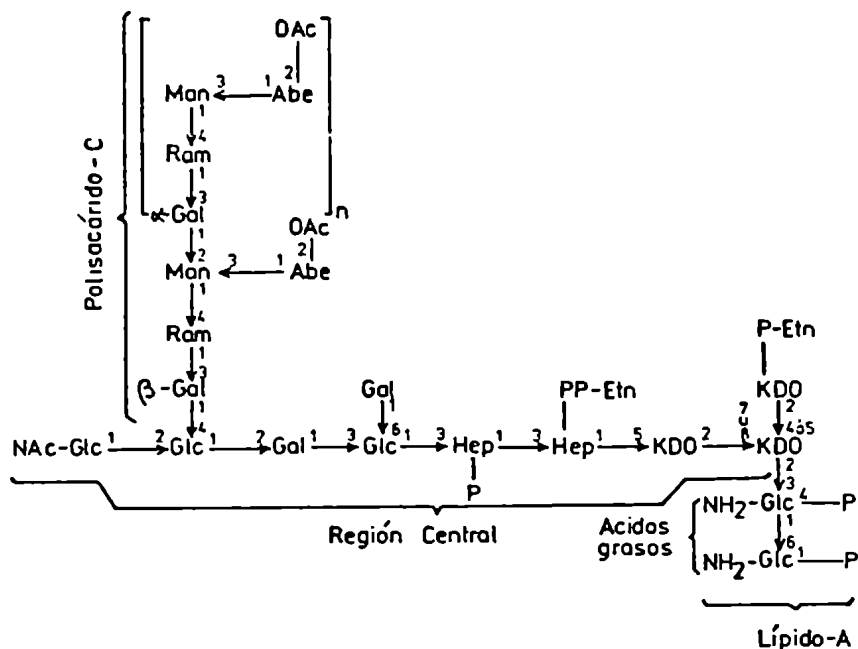


Figura 5: Estructura de la unidad repetitiva del LPS de Salmonella typhimurium. Tomado de (56)

La región Lípido-A es la parte hidrofóbica de la molécula, pues contiene seis ácidos grasos saturados que están unidos a dos residuos de glucosamina (Fig.6). Las unidades de Lípido-A están unidas entre sí por puentes difosfatos y están unidas a la región Central a través de la posición 3'.

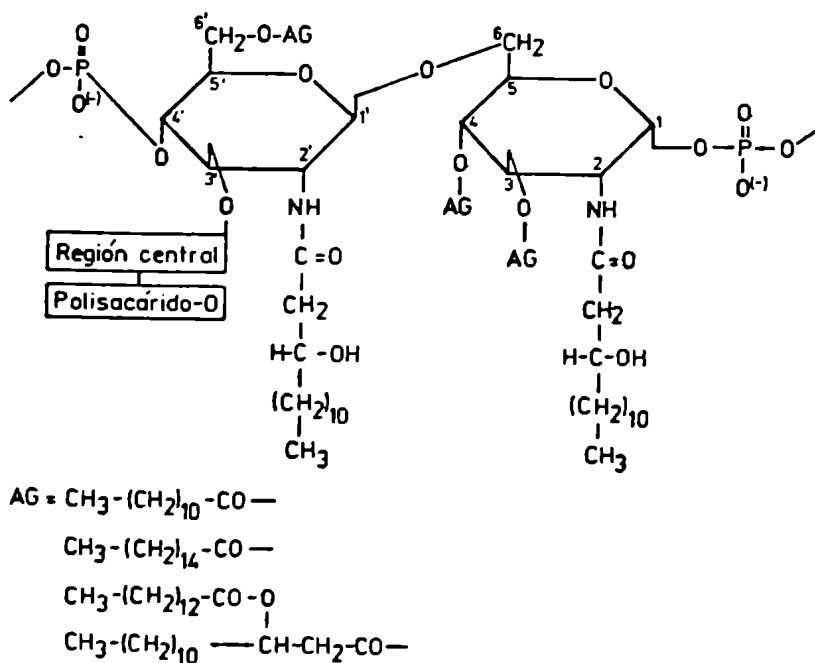


Figura 6: Estructura de la región Lípido-A del LPS de Salmonella minnesota (10).

La región Central contiene azúcares que raramente están presentes en la naturaleza, como el KDO: 2-ceto-3-deoxioctonato y la heptosa, y posee carga negativa por la presencia de grupos fosfato. A la región Central está unido el polisacárido-O, de estructura altamente variable, una de las cuales se muestra en la Fig.5.

1.2.3. Acidos teicoicos y teicurónicos

Los ácidos teicoicos son cadenas de poli-ol-fosfato, descubiertas por Baddiley (57), presentes en bacterias gram positivas, pudiendo estar unidas a la mureina a través de residuos NAcMur. El polímero puede ser una cadena de ribitol o de glicerol con uniones fosfodiester (11) (Fig.7).

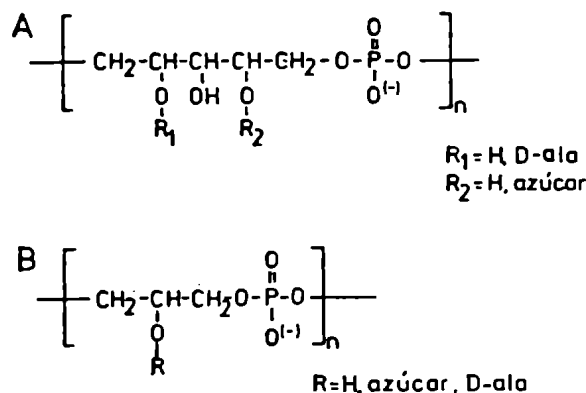
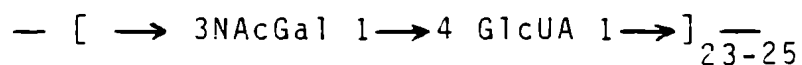


Figura 7: Estructuras representativas de ácidos teicoicos
 (A): 1,3-Poli(ribitol-fosfato). (B): 1,3-Poli(glicerol-fosfato)

Estos polímeros son los principales antígenos de superficie, comparables al LPS en bacterias gram negativas. La especificidad de los determinantes antígenos está dada por la presencia de varios sustituyentes, como azúcares, aminoazúcares, colina, D-alanina.

Variaciones en el medio ambiente, particularmente la concentración de Mg y fosfato, pueden detener la síntesis de ácidos teicoicos (12,13) comenzando en su lugar la síntesis de otro polímero ácido que no contiene grupos fosfato, denominado ácido teicurónico. El primer ácido teicurónico aislado fue a partir de paredes de Bacillus licheniformis (14) y fue caracterizado como un polímero conteniendo cantidades iguales de N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico, cuya estructura es:



1.3. Exopolisacáridos bacterianos

Muchos géneros de bacterias incluyen especies capaces de producir polisacáridos fuera de la pared celular. Estos exopolisacáridos pueden estar fuertemente unidos a la célula, formando una cápsula verdadera, discernible por el método de la tinta china, o pueden ser secretados libremente en el medio de cultivo (15). Las cápsulas son relativamente estables, pudiendo ser removidas de la superficie bacteriana por extracción con alcali o agitación vigorosa (15).

La naturaleza química de las uniones entre un polisacárido capsular y los componentes de la pared es poco conocida, pero estudios realizados sobre polisacáridos de E. coli K 12 y meningococos grupos A, B y C señalan que hay un grupo hidrofóbico covalentemente unido al extremo reductor de esos polisacáridos. La porción lipídica fué identificada como dipalmitoilglicerofosfato y su presencia causaría que las cadenas de polisacárido se agreguen en forma micelar (17).

1.3.1. Composición

Los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos pueden clasificarse según su composición en dos grupos principales: homopolisacáridos (contienen una sola clase de monosacárido) y heteropolisacáridos (contienen dos o más clases diferentes de monosacáridos). Ambos grupos de polisacáridos están compuestos principalmente de hexosas neutras (principalmente glucosa, manosa y galactosa), metil pentosas (fucosa, ramnosa), ácidos urónicos (fundamentalmente ácido glucurónico y en menor proporción ácidos galacturónico y manurónico) y aminoazúcares (N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y N-acetilneuramínico) (15,16).

Además de los monosacáridos, los exopolisacáridos contienen restos no glicosídicos. Muy frecuentes son los restos acilos, siendo el más importante el O-acetilo, pero también se

han descrito formato (18) y succinato (19). Otro grupo frecuente son los acetales, siendo el piruvato el más importante, aunque sustituyentes similares fueron identificados en preparaciones de ácido colánico de especies de Enterobacteriaceae (20). Glicerolfosfato y ribitolfosfato son grupos no muy frecuentemente encontrados en exopolisacáridos que se parecen a los ácidos teicoicos (21).

1.3.2. Homopolisacáridos

Homopolisacáridos incluyen dextranos, levanos, varios glucanos, celulosa bacteriana y polímeros de ácido N-acetilneuramínico (16,22).

Dextranos, es el nombre asignado a una importante clase de exopolisacáridos ramificados compuestos de residuos α -D-glucopiranoósidos. Estos polímeros son de alto PM (en el orden de varios millones), siendo la unión preponderante la $1 \rightarrow 6$ mientras que las ramificaciones pueden ocupar las posiciones restantes (2,3 ó 4). Los dextranos han sido aislados a partir de varias especies bacterianas, incluyendo Streptococcus viridans, Leuconostoc dextranicum y Leuconostoc mesenteroides, teniendo el producto de esta última importancia industrial (15).

Los levanos integran otro importante grupo de exopolisacáridos, constituidos por fructosa, donde la unión β -2 \rightarrow 6 es predominante (22,23), y su peso molecular está en el orden

del millón. Los levanos son sintetizados tanto por bacterias gram positivas (varias especies de Streptococcus y Bacillus) así como gram negativas (varias especies de Acetobacter, Aerobacter, Xanthomonas) (16).

Dentro de los glucanos, el producido por una mutante de Alcaligenes faecalis variedad myxogenes, descubierto por Hara-da y colaboradores adquirió importancia industrial (15). La cepa parental (10C3) producía un polímero compuesto principalmente de glucosa, con uniones $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$ y $1 \rightarrow 6$, conteniendo además restos succínicos (24). Ellos encontraron una mutante espontánea (10C3K) cuyo producto resultó ser un glucano compuesto casi exclusivamente por uniones $\beta -1 \rightarrow 3$ (25) y que no estaba succinilado. Este y glucanos similares son llamados curdulanos.

La existencia de celulosa bacteriana está limitada a varias especies de Acetobacter (xylinum, acetigenum, pasteurianus, racens). Su estructura, glucosas unidas por $\beta -1 \rightarrow 4$, es similar a la celulosa vegetal y es producido como fibras en medio líquido (22,26).

Los polisacáridos de N-acetilneuramínico, encontrados normalmente en tejidos de mamíferos, fueron descritos en una cepa de E. coli K1 (27) y en Neisseria meningitidis (28). Estos polisacáridos están firmemente unidos a la superficie bacteriana y están constituidos por ácido N-acetilneuramínico y ácido N-7-0-diacetilneuramínico.

1.3.3. Heteropolisacáridos

Los heteropolisacáridos son polímeros compuestos por unidades repetitivas de oligosacáridos (29), cuya complejidad varía de 2 a 8 residuos por unidad. Normalmente son polisacáridos ramificados, pero el hecho principal es su estructura regular, con excepción de los alginatos bacterianos. Existe una gran diversidad de estructuras de heteropolisacáridos que derivan de las diferentes combinaciones de azúcares y sus uniones, por lo cual no es posible predecir, para una determinada cepa, el tipo de composición o la estructura del polisacárido que produce. Sin embargo se han descrito casos donde la estructura de la porción carbohidratos es constante, aunque se encuentran frecuentes alteraciones en los sustituyentes (30), como ocurre por ejemplo con el ácido colánico. Este polisacárido (Fig.8) fué aislado de una preparación de E. coli (31). Posteriormente

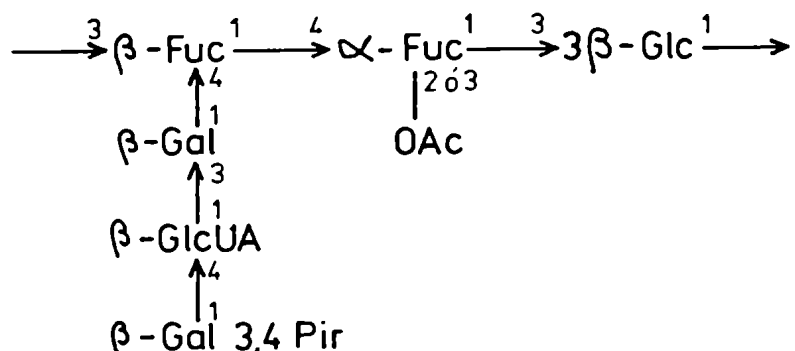


Figura 8: Estructura del ácido colánico de E. coli K 12 (33).

se demostró su presencia en mutantes mucoides de E. coli K 12 (32), de Salmonella y en Aerobacter cloacae (33). Estudios sobre la estructura de ácido colánico aislado de diferentes cepas bacterianas confirmaron la estructura, pero revelaron que los grupos O-acilos podían estar o no presentes y que existía considerable variación en los residuos acetales de la galactosa terminal (20,34).

Otro ejemplo de polisacárido con idéntica estructura y sintetizado por diferentes grupos de bacterias, es el caso del exopolisacárido producido por Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens (35), Alcaligenes faecalis var myxogenes (24,36) y Agrobacterium radiobacter (37). La estructura del mismo se observa en la Fig.9 y los estudios indican que las cuatro clases de bacterias producen idénticos polisacáridos, excepto por el modo de acilación (38).

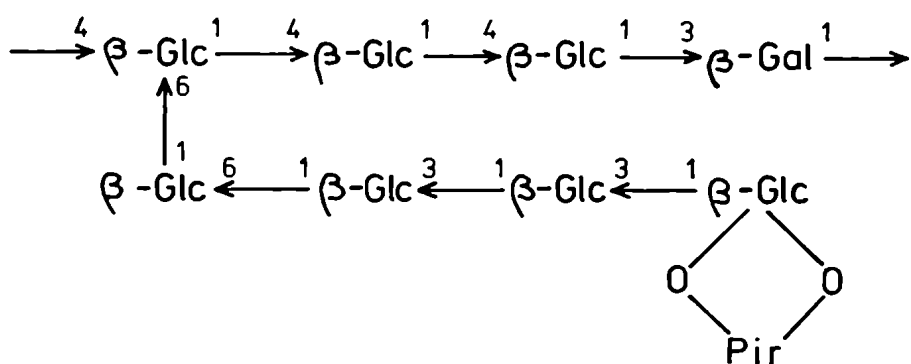


Figura 9: Estructura del polisacárido producido por Rhizobium meliloti (39).

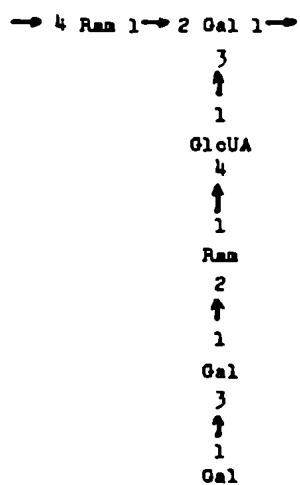
Como fué mencionado al principio de este capítulo los alginatos son polisacáridos que ofrecen la particularidad de no poseer estructuras regulares. Los alginatos son polímeros de ácido manurónico y ácido gulurónico, normalmente asociados con algas marinas. Son producidos además por dos grupos de bacterias, una de amplia distribución en el suelo, Azotobacter vinelandii y la otra asociada con infecciones del tracto urinario del hombre, Pseudomonas aeruginosa. En la estructura de los alginatos se observan bloques de ácido manurónico o bloques de ácido gulurónico, como así también bloques de ambos ácidos mezclados (40, 41), conteniendo además grupos acetilo aparentemente unidos al ácido manurónico (42).

Otro polisacárido, que como los alginatos es encontrado en células procariotas y eucariotas es el ácido hialurónico. Este polisacárido es un constituyente normal de tejido conectivo de animales y está formado por ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Es producido por diferentes serotipos de Streptococcus grupos A y C y posiblemente en ciertas cepas de P. aeruginosa (16).

1.3.4. Unidades repetitivas propuestas para exopolisacáridos.

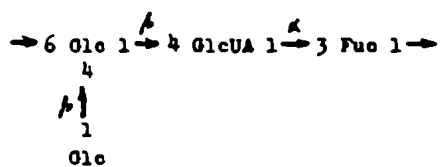
La complejidad de los heteropolisacáridos es muy grande. Debido a esto es muy difícil establecer la estructura completa de polisacáridos muy complejos, encontrándose en la literatura

52



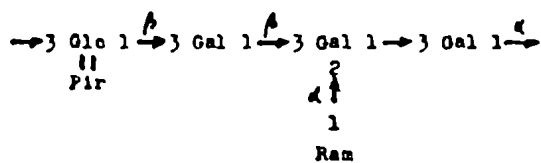
53

54



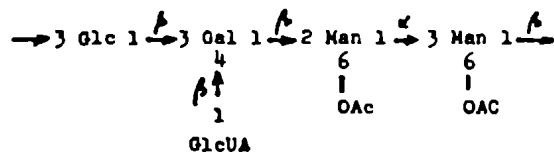
18,54

56



50

59



55

1.4. Lípidos intermediarios en la síntesis de polisacáridos de pared

Debido a que la pared bacteriana es extracelular la biosíntesis de polisacáridos que forman parte de ella debe realizarse por un proceso vectorial. Este proceso puede dividirse en tres etapas (Fig.10): la primera de ellas se desarrolla en el citoplasma donde los azúcares son activados al estado de nucleótido-azúcares. La segunda etapa es iniciada por la trans-

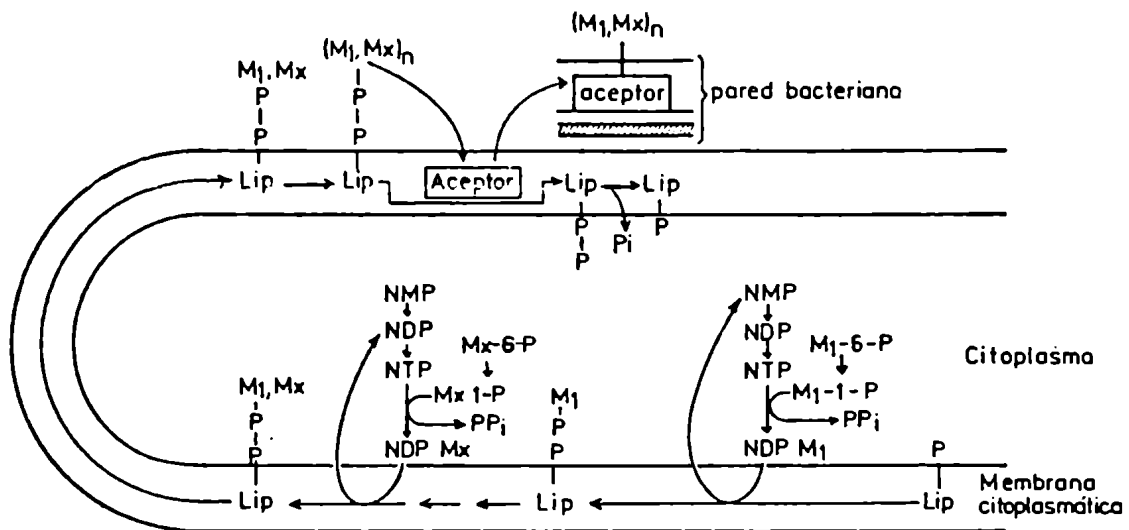


Figura 10: Biosíntesis de un polisacárido de pared
M: monosacárido, N: nucleótido, Lip-P: lípido fosfato, $x=2$ a 8 (Modificado de (56))

ferencia secuencial y específica de los monosacáridos a partir de los respectivos nucleótido-azúcares a un aceptor lipídico unido a la membrana, y conduce a la síntesis de la unidad repetitiva del polímero. El resultado es una clase especial de compuestos conocidos bajo el nombre genérico de "lípidos intermediarios". Esta etapa se desarrollaría en la cara interna de la membrana citoplasmática, puesto que los nucleótido-azúcares están presentes en el citoplasma. Luego la subunidad unida al lípido sería transportada a la cara externa de la membrana, iniciando la tercera etapa; en esta se produce la polimerización de las unidades y posterior transferencia a un aceptor final y/o liberación del lípido. Este tipo de síntesis ha sido descrita para el polisacárido-O del lipopolisacárido, para la mureina, para los ácidos teicoicos y en dos casos de exopolisacáridos capsulares (62,111). En cada uno de estos casos ha quedado aclarada la participación de lípidos intermediarios, habiéndose caracterizado al aceptor lipídico como poliprenil monofosfato. La estructura mixta de estos compuestos los hace ideales para actuar en un medio lipofílico como es la membrana citoplasmática, manteniendo a los azúcares en el estado activado necesario para su polimerización final.

1.4.1. La estructura del lípido

En los primeros años de la década de 60, Robbins y colaboradores (59,60) encontraron que se formaban glicolípidos en-

dógenos en preparaciones particuladas de Salmonella newington. Los glicolípidos participaban en la biosíntesis del polisacárido-0, reemplazando a los nucleótido-azúcares correspondientes. La estructura del lípido intermediario fué establecida definitivamente luego de su aislación y purificación (61). Un puente pirofosfato une el C-1 de la galactosa al lípido y los resultados de espectrometría de masas realizados sobre el lípido demostraron que era un undecaprenol, un alcohol formado por once unidades isopreno, teniendo cada una de ellas una doble ligadura (Fig.11).

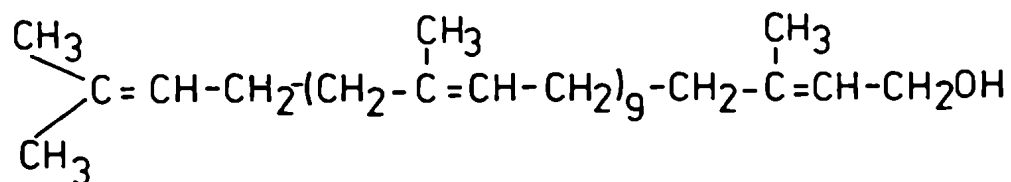


Figura 11: Estructura del lípido aislado de Salmonella newington (61).

El poliprenol ha sido purificado de otras bacterias (tabla 2) y en cada caso el análisis realizado por espectrometría de masas estableció la estructura como undecaprenol. Parecería que un único lípido está involucrado en la síntesis de mureina, lipopolisacárido, exopolisacárido y otros glicanos de la pared

bacteriana. Otros poliprenoides fueron hallados en micobacterias: octa y decaprenol en Mycobacterium smegmatis (71) y decaprenol en Mycobacterium tuberculosis (72).

Tabla 2: Undecaprenoles descritos en bacterias

Fuente	Referencia
Aerobacter aerogenes	(62)
Bacillus cereus	(63)
Bacillus stearothermophilus	(64)
Eschericchia coli	(65,96)
Lactobacillus plantarum	(66)
Micrococcus lysodeikticus	(67)
Salmonella anatum	(68)
Salmonella newington	(61)
Staphilococcus aureus	(69)
Streptococcus faecalis	(70)

En todos los casos la estructura ha sido dilucidada por espectrometría de masas.

1.4.2. Lípido-fosfo-azúcares descritos hasta el momento en bacterias.

Son muchos los lípido-azúcares descritos en la literatura y para dar una idea de la variedad y complejidad de estos compuestos en la tabla 3 se mencionan solamente los aislados

de bacterias.

No todos han sido estudiados con igual detalle por lo tanto la letra que figura al lado de cada compuesto significa lo siguiente:

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

Tabla 3: Lípido-fosfo-azúcares descritos en procariotes

Lípido	Fuente	Referencia
Man-P	Micrococcus lysodeikticus a)	(67)
	Mycobacterium tuberculosis a)	(72)
	Mycobacterium smegmatis a)	(71,73,74)
	Acetobacter xylinum b)	(75)
	Halobacterium salinarium c)	(76)
Glc-P	Salmonella a)	(68,77,78)
	Shigella flexneri b)	(79)
	Mycobacterium smegmatis b)	(74)
	Bacillus stearothermophilus b)	(64)
	Bacillus licheniformis c)	(80)

	Mutante de E. coli c)	(81)
	Halobacterium salinarium c)	(76)
Gal-P	Acetobacter xylinum	(82,83,117)
NAcGlc-P	Streptococcus sanguis c)	(84)
	Micrococcus lysodeikticus c)	(86)
	Bacillus cereus a)	(63)
NAcNeu-P	Eschericchia coli a)	(85)
Ram-NAcGlc-P	Streptococcus sanguis c)	(84)
Glc-Ram-NAcGlc-P	Streptococcus sanguis c)	(84)
NAcManUA-NAcGlc-P	Micrococcus lysodeikticus c)	(86)
(NAcManUA) ₂ - -NAcGlc-P	Micrococcus lysodeikticus c)	(86)
Glc(NAcManUA) ₂ - -NAcGlc-P	Micrococcus lysodeikticus c)	(99)
NAcManUA-Glc- -(NAcManUA) ₂ - -NAcGlc-P	Micrococcus lysodeikticus c)	(99)
gli-P-Glc-P	Bacillus licheniformis c)	(80)
Gal-PP	Salmonella newington a)	(61)
	Salmonella typhimurium c)	(100)
	Aerobacter aerogenes a)	(62)
	Rhizobium meliloti c)	(87)

Glc-PP	Klebsiella aerogenes b)	(89,88)
	Acetobacter xylinum b)	(82,117) †
gli-PP	Bacillus licheniformis c)	(80)
NAcGlc-PP	Staphylococcus lactis c)	(89,90)
	Bacillus subtilis c)	(91)
	Halobacterium salinarium a)	(76)
	Bacillus cereus a)	(63)
	Staphylococcus aureus c)	(90,92)
Celobiosa-PP	Acetobacter xylinum c)	(82)
Maltosa-PP	Acetobacter xylinum c)	(93)
(Man) ₂ -P ó -PP	Mycobacterium smegmatis a)	(74)
Glc-Gal-PP	Rhizobium meliloti c)	(87)
Ram-Gal-PP	Salmonella newington a)	(61)
	Salmonella typhimurium c)	(100)
Man-Gal-PP	Aerobacter aerogenes a)	(62)
Gal-Glc-PP	Klebsiella aerogenes b)	(88,89)
(gli-P)-NAcGlc-PP	Staphylococcus lactis c)	(89,90)
n:1	Staphylococcus aureus c)	(90,92)
:2		
:3		
Man-Ram-Gal-PP	Salmonella newington a)	(61)
	Salmonella typhimurium c)	(100)

Man-Cel-PP	Acetobacter xylinum c)	(76)
GlcUA-Man-Gal-PP	Aerobacter aerogenes a)	(62)
Abe-Man-Ram-Gal-PP	Salmonella typhimurium c)	(101)
Gal-(GlcUA)-Man-Gal-PP	Aerobacter aerogenes a)	(62)
GlcUA-Man-Cel-PP	Acetobacter xylinum c)	(94)
(NAcGlc) _{n:4} -PP :6	Bacillus subtilis c)	(91)
(Fuc ₃ -Glc ₂)-Glc-PP	Mutante de E. coli c)	(81)
(Glc) _{n:1} -GlcUA-Man-PP :2 -Cel-PP	Acetobacter xylinum c)	(94)
Ram-(Glc) ₂ -GlcUA-Man-Cel-PP	Acetobacter xylinum c)	(94)
(Glc) ₇ -Gal-PP	Rhizobium meliloti c)	(95)
(Ac)(Glc) ₇ -Gal-PP	Rhizobium meliloti c)	(95)
(Pir)(Glc) ₇ -Gal-PP	Rhizobium meliloti c)	(95)
(Ac,Pir)(Glc) ₇ -Gal-PP	Rhizobium meliloti c)	(95)

(Man-Ram-Gal) _n -PP	Salmonella newington a)	(61)
[(Abe)-Man-Ram-Gal]-PP	Salmonella typhimurium c)	(101)
NAcMur-pentapéptido-PP	Micrococcus luteus c)	(96)
	Staphylococcus aureus c)	(96)
NAcGlc-NAcMur-pentapéptido-PP	Micrococcus luteus c)	(96)
	Staphylococcus aureus c)	(96)
	E. coli a)	(65)
NAcGlc-NAcMur(hexapéptido)-PP	Micrococcus luteus c)	(97)
NAcGlc-NAcMur(decapéptido)-PP	Staphylococcus aureus c)	(98)

1.4.3. Síntesis de preno1-azúcares

Existen dos clases principales de reacciones que sintetizan preno1-azúcares. La primera involucra un nucleótido-azúcar y un preno1 fosforilado. La segunda clase de reacciones es a través de dos preno1-azúcares (Fig.12).

La primera clase puede dividirse a su vez en tres subclases (a,b y c) y la segunda clase en dos subclases (d y e).

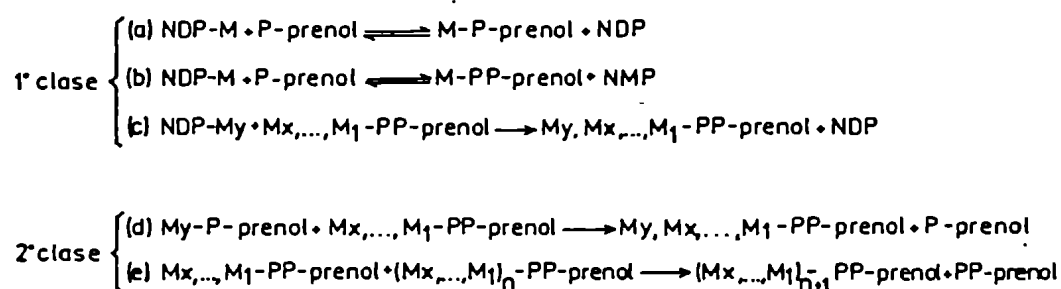


Figura 12: Síntesis de prenil-azúcares. NMP: nucleótido-monofosfato. NDP: nucleótido-difosfato. M: monosacárido. x: 2 a 8

En el caso de la reacción a), el nucleótido-azúcar cede su resto glicosilo al prenil fosfato para formar el prenil monofosfato azúcar, con liberación de nucleósido difosfato. La presencia de un exceso de nucleósido difosfato inhibe la síntesis del prenil azúcar, mientras que el nucleósido monofosfato lo hace en menor proporción. Esta reacción es reversible (67,68).

En la reacción b), el prenil fosfato acepta el azúcar fosfato del nucleótido-azúcar, obteniéndose el correspondiente azúcar difosfato prenil. El agregado de un exceso de nucleótido monofosfato revierte la reacción obteniéndose el nucleó-

tido-azúcar.

En la última de las reacciones de la primera clase (c) un prenoI oligosacárido es el aceptor del resto glicosilo del nucleótido-azúcar, para formar un nuevo prenoI azúcar, cuya cadena oligosacárida posee un azúcar más. Como en el caso a) se libera nucleótido difosfato y en algunos casos un exceso del mismo puede inhibir la reacción.

Como puede concluirse de lo expuesto, cadenas oligosacáridas de dos o más azúcares están unidas a prenoles por puentes difosfato únicamente, mientras que un monosacárido lo está por puentes mono o difosfato.

En la reacción d) un oligosacárido difosfato prenoI acepta otro monosacárido que cede un prenoI monofosfato azúcar, con liberación del prenoI fosfato.

Por intermedio de las reacciones a), b), c) y d) se va sintetizando el oligosacárido que constituye la unidad repetitiva, ya sea de un polisacárido-0, de un lipopolisacárido o de un exopolisacárido. Estas unidades se polimerizan unidas al lípido como se describe en la última de las reacciones (e). En ella intervienen dos moléculas de oligosacárido difosfato prenoI. Una de ellas, la que contiene unidades repetitivas, cede su oligosacárido a la restante, liberándose prenoI difosfato. Esta reacción será discutida con más detalle en la sección 1.4.3.2..

Para ejemplificar el rol de los lípidos intermediarios vamos a referirnos a los estudios realizados en la biosíntesis del polisacárido-O del lipopolisacárido de Salmonella, por ser un ejemplo claro y completo y luego nos referiremos a la biosíntesis del exopolisacárido capsular de Aerobacter aerogenes.

1.4.4. Síntesis del polisacárido-O de Salmonella

Las enzimas que catalizan las reacciones de síntesis del polisacárido-O están todas unidas a membranas. Además, dichas reacciones han sido estudiadas en sistemas "in vitro", utilizando fracciones particuladas como fuente de enzimas.

1.4.4.1. Formación de la unidad repetitiva

Los monosacáridos que componen el polisacárido-O son transferidos de los nucleótido difosfato correspondientes al undecaprenol fosfato presente en la membrana citoplasmática. Tres reacciones de transferencia forman la unidad repetitiva en el caso de Salmonella anatum (Fig.13, reacciones 1 a 3) (59), y cuatro reacciones en el caso de Salmonella typhimurium (100, 101), Salmonella newport (102) y Salmonella kentucky (102) (reacciones 1 a 4, Fig.13).

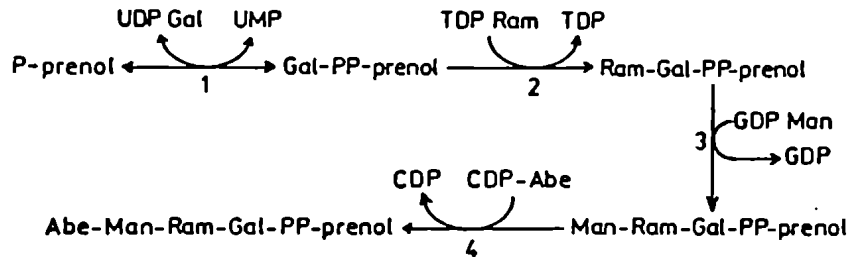


Figura 13: Formación de la unidad repetitiva del polisacárido-O en Salmonella (59,100,101)

Como se indica, el paso inicial en el camino biosintético es reversible. A partir de UDP-galactosa, normalmente un componente citoplasmático, se realiza en la membrana un derivado activado lipofílico. En el caso de Salmonella anatum las reacciones 2 y 3 involucran a dos transferasas que catalizan la adición secuencial de ramnosa y manosa al galactosil difosfato undecaprenol, existiendo una tercer transferasa en S. typhimurium (reacción 4) que cataliza la adición de abecuo-
sa. Kanegasaki y Wright (103) utilizando preparados de S. ana-
tum demostraron que Gal-PP-prenol y Ram-Gal-PP-Prenol eran uti-
lizados como aceptores de Ram y Man respectivamente.

Puesto que los nucleótido-azúcares están presentes en el citoplasma muy probablemente las reacciones recién enunciadas se desarrollen en la cara citoplasmática de la membrana.

1.4.4.2. Polimerización de las unidades repetitivas

El siguiente paso constituye la polimerización de las unidades repetitivas. La dirección de crecimiento de las cadenas durante la polimerización fue descubierta por Robbins y colaboradores (104) (Fig.14), utilizando un sistema libre de células de S. anatum, resultando ser análogo al crecimiento de las cadenas polipeptídicas en los ribosomas. Como se muestra en la Fig.14 la cadena en crecimiento siempre es agregada a

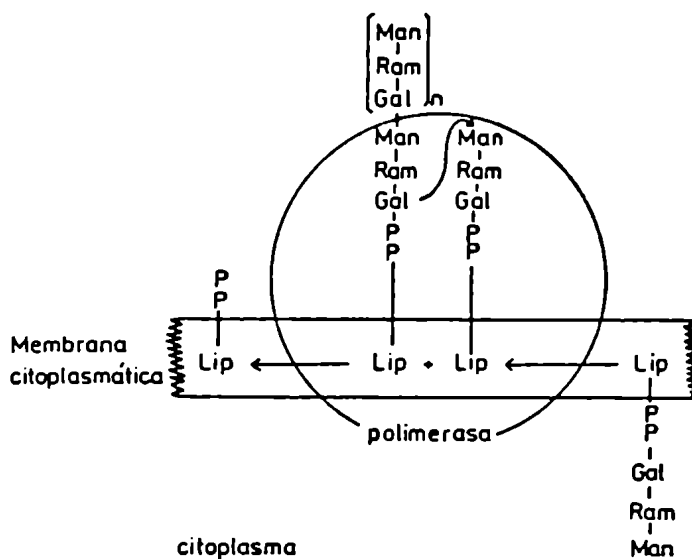


Figura 14: Mecanismo de polimerización del polisacárido-O en Salmonella anatum. Tomado de (105).

una unidad repetitiva (trisacárido). De esta manera la elongación ocurre por el extremo reductor de la cadena en crecimiento.

El producto secundario de la polimerización de las unidades repetitivas es el undecaprenol difosfato. Este debe ser hidrolizado a monofosfato por una pirofosfatasa unida a membrana antes que el prenoil pueda participar nuevamente en otro ciclo. La enzima fué purificada de membrana de M. luteus por Strominger y colaboradores (105).

1.4.4.3. Formación de ramas laterales

El polisacárido-0 de S. typhimurium posee una abecucosa como rama lateral. Esta se forma durante la polimerización de las unidades repetitivas. Al clivarse la unión galactosil-fosfato de la galactosa de la cadena en crecimiento y ser transferida a la manosa del tetrasacárido-lípido, queda la abecucosa como rama lateral (101) (Fig.15).

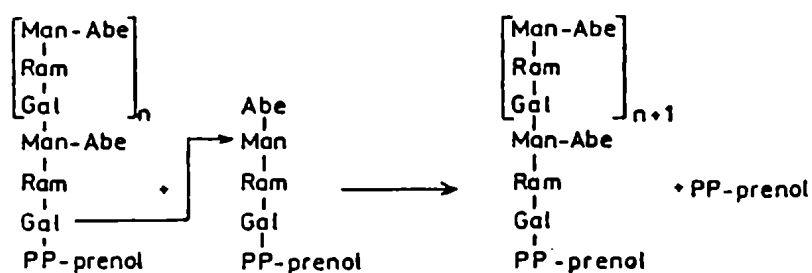


Figura 15: Formación de ramas laterales del polisacárido-0 de S. typhimurium (101,106)

Un caso diferente ocurre en Salmonella anatum E¹⁵ E³⁴. El polisacárido-0 de la misma contiene una glucosa como rama lateral, unida al carbono 4 de la galactosa. La glucosa es transferida en un proceso en dos etapas. En la primera se forma, a partir de UDP-glucosa y undecaprenol-P, undecaprenol-P-glucosa y éste en una segunda etapa, cede su resto glucosilo al polisacárido. Dado que la glucosa está unida a galactosas cuya configuración anomérica es β (107,108) Wright (68), propuso que durante la polimerización las unidades glucosa son transferidas no a la primer galactosa que es α -1-P sino a la β -galactosa más próxima al prenoI, como se muestra en la Fig.16. Debido a esta exigencia el hexasacárido difosfato prenoI sería el aceptor mínimo. Este mecanismo de glucosilación asegura un agregado sistemático de glucosa a la cadena en crecimiento.

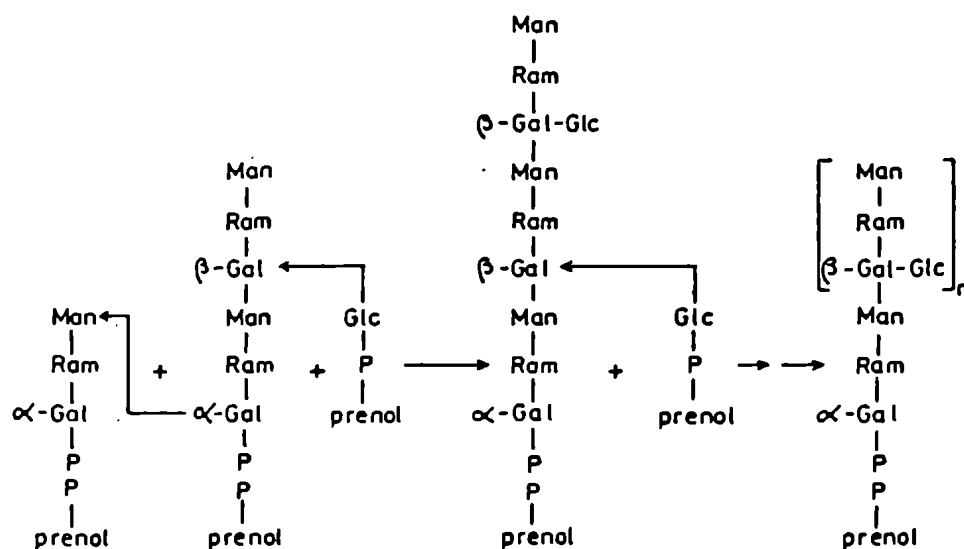


Figura 16: Glucosilación del polisacárido-O de *Salmonella anatum* E15 E34 (68,106)

1.4.4.4. Acetilación del polisacárido-O

Los grupos acetilo son sustituyentes frecuentes en los polisacáridos-O, siendo responsables de características anti-génicas de los mismos. El único caso estudiado es el de Salmonella anatum, donde los grupos acetilo se encuentran esterificando el C-6 de la galactosa. La reacción de acetilación fué estudiada por Keller (109,110), quien encontró que el acetil-CoA era utilizado como dador de acetilo, empleando fracciones

particuladas de S. anatum como fuente de enzimas y polisacárido-0. Varios oligosacáridos probaron ser buenos aceptores de los grupos acetilo, especialmente aquellos que contenían la secuencia ramnosil-galactosa presente en el polisacárido.

Pero no se pudo aclarar si la acetilación se producía sobre un oligosacárido difosfato preno1 o sobre el producto final.

1.4.5. Síntesis de exopolisacáridos

La síntesis de exopolisacáridos fué demostrada con claridad únicamente en el polisacárido capsular de Aerobacter aerogenes por Heath y colaboradores (62). Ese grupo de investigadores demostró que los preno1 fosfo azúcares cumplen una función similar a la que desarrollan en la formación del polisacárido-0 (sección 1.4.4.). La secuencia de reacciones para la síntesis de la unidad repetitiva del exopolisacárido se muestra en la Fig.17.

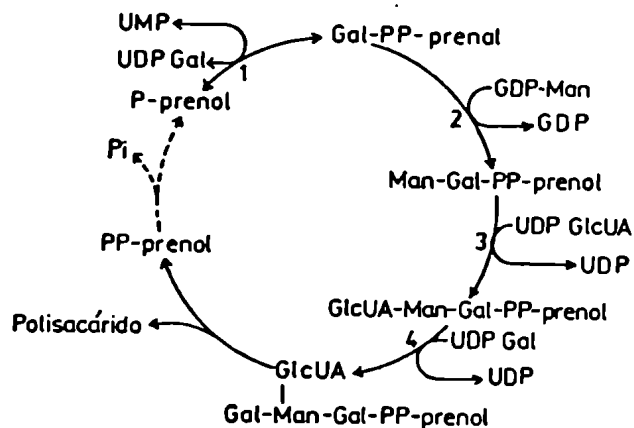


Figura 17: Síntesis del polisacárido capsular de Aerobacter aerogenes según Heath y col. (62).

La unidad repetitiva está compuesta por un tetrasacárido, el cual se forma por la transferencia secuencial y específica al prenil fosfato de galactosa, manosa, ácido glucurónico y una segunda galactosa, a partir de los correspondientes nucleótido-azúcares. La galactosa terminal de la unidad repetitiva siempre se une a la manosa del trisacárido, es decir que la transferencia del ácido glucurónico debe ser previa a la de la segunda galactosa. Este es un ejemplo de formación de ramas laterales durante la síntesis de la unidad repetitiva y es diferente a los ejemplos citados en la sección 1.4.4.3.. Si bien los autores encontraron un octasacárido difosfato prenil equi-

valente a dos unidades repetitivas unidas, el mecanismo de elongación y extrusión y el tipo de fuerzas que unen al polisacárido a la pared celular son desconocidos.

Evidencias de la participación de lípidos intermediarios en la síntesis de un polisacárido capsular en otra cepa de Aerobacter fué comunicado por Sutherland y Norval (111), pero la estructura del intermediario no fué analizada. Más recientemente Johnson y Wilson examinaron la síntesis del ácido colánico (Fig.8) en dos mutantes de Escherichia coli (81). El intermediario formado "in vitro" poseía glucosa y fucosa en iguales cantidades: (fucosa₃-glucosa₂)-glucosa-PP-lípido, en lugar de los seis azúcares que componen la unidad repetitiva del polímero. Los autores comentan que probablemente el sistema enzimático empleado fué dañado durante la preparación de la fracción particulada, de tal forma que producía una versión aberrante del precursor. Comentando el mismo trabajo I.W. Sutherland (16) propone que quizás los polisacáridos con cadenas laterales de tres o más monosacáridos requieran más de un lípido intermediario en su construcción - uno para la cadena principal y otro para la cadena lateral - similar a lo que acontece en la formación de ramas laterales en el polisacárido-0 de Salmonella (Fig.16).

El lípido que interviene en el proceso mostrado en la Fig.17 fué purificado y analizado por espectrometría de masas

(62). Resultó ser en un 95% un undecaprenol similar al descrito en la síntesis de lipopolisacárido y mureina. De esta manera, probablemente exista una competición por el lípido, el cual está presente en la célula en pequeñas cantidades. Existen suficientes evidencias indirectas que indican que la formación de mureina es prioritaria sobre la formación de lipopolisacárido y ésta sobre la formación de exopolisacáridos. Por lo tanto parecería que la disponibilidad de lípido fosfato es un factor crítico en la síntesis de exopolisacáridos (16).

1.4.5.1. Incorporación de restos no glicosídicos

Muchos polisacáridos contienen proporciones variables de grupos acilos y acetales (sección 1.3.1.), cuya importancia radica en que las propiedades de los exopolisacáridos en solución varían con el contenido de estos grupos (112). Por otra parte el ácido pirúvico, presente en numerosos polisacáridos bacterianos, es un determinante antigénico en el polisacárido de Rhizobium TA1 (113) y la presencia de acetilos en el polisacárido-O de Salmonella anatum determina su sensibilidad al fago C 341 (68).

En cuanto a los precursores de estos grupos ya fue mencionado que Keller (109,110) encontró que el acetil-CoA es el dador de los grupos acetilo en el polisacárido-O de Salmonella (sección 1.4.4.4.) aunque sin aclarar a que nivel se producía

la reacción. La transferencia de restos piruvato no ha sido estudiada aunque Sutherland (16) propuso que probablemente el dador sea el fosfoenolpiruvato (PEP).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

2.1. Antecedentes

Cuando se comenzó este estudio solamente había sido descripta la participación de preno1 fosfo azúcares en la formación de heteropolisacáridos de pared. Resultaba de interés entonces estudiar si en la formación de homopolisacáridos bacterianos, que no poseen unidades repetitivas tan complejas, intervienen "lípidos intermediarios". El sistema elegido como modelo fue la biosíntesis de celulosa en Acetobacter xylinum. Esta bacteria gram negativa se caracteriza por excretar una película mucosa que flota sobre el medio de cultivo, constituida fundamentalmente por celulosa (114)

Glaser informó que fracciones particuladas de Acetobacter xylinum sintetizaban celulosa a partir de UDP-glucosa (115).

En nuestro laboratorio, empleando células de A. xylinum tratadas con EDTA como fuente de enzimas y UDP-(¹⁴C)glucosa como nucleótido dador se observó la incorporación de (¹⁴C)glucosa a celulosa, confirmando los resultados de Glaser, a un glucano hidrosoluble y a material liposoluble. Por análisis estructural pudo establecerse que parte de este material estaba compuesto por (92):

- a) Glucosa-PP-preno1
- b) Celobiosa-PP-preno1

Se estableció además que incubando a bajas temperaturas (0°C) se acumulaba glucosa difosfato preno1, mientras que la formación del glucano estaba prácticamente bloqueada (75,116). El estudio de la síntesis de este glucano es uno de los objetivos de este trabajo.

Por otra parte, con algunas preparaciones enzimáticas se observó la formación de pequeñas cantidades de otro compuesto, que resultó ser un trisacárido-PP-preno1. Creyendo estar ante la presencia de celotriosa-PP-preno1 se pensó que junto con los compuestos a) y b) participaba en la síntesis de celulosa. Pero estudios estructurales posteriores (75) demostraron que el trisacárido era β -manosil-1,3-celobiosa.

Por otra parte realizando estudios complementarios, el mismo preparado enzimático se incubó en presencia de UDP-(¹⁴C)glucurónico. En estas condiciones se observó la formación de principalmente un compuesto, con las características de los lípidos intermediarios (solubles en solventes orgánicos, lábiles en medio ácido suave, etc). Un compuesto de similares propiedades podía obtenerse con marca en glucosa a partir de UDP-(¹⁴C)glucosa, viéndose incrementada su formación en presencia de UDP-glucurónico no radioactivo.

La formación de lípido-azúcares conteniendo ácido glucurónico condujo a la búsqueda de polisacáridos que lo contuvieran. Así P. Romero, trabajando en nuestro laboratorio, pudo

establecer que A. xylinum produce, además de celulosa, un polisacárido primeramente denominado γ y luego acetano, que es retenido en columnas de DEAE-celulosa (117). El estudio de la composición del mismo demostró que estaba formado por glucosa, manosa, ramnosa y ácido glucurónico. A lo largo de este trabajo nos referiremos a este polisacárido con el nombre de acetano.

2.1.1. Lípidos intermediarios en la síntesis de exopolisacáridos de Acetobacter xylinum

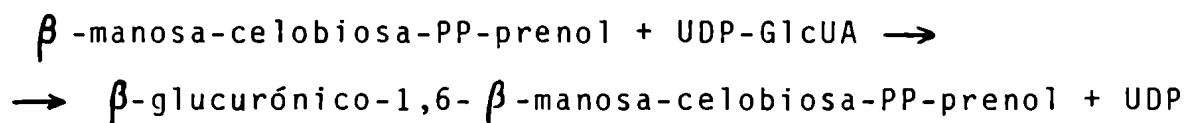
La presencia de manosa en el exopolisacárido acetano estimuló la búsqueda de lípido-azúcares utilizando GDP-(^{14}C)manosa como nucleótido dador. Colaborando con R.O.Couso (75,118) pudo encontrarse un compuesto liposoluble cuya formación era incrementada cuando a la mezcla de incubación se le agregaba UDP-glucosa. Los análisis indicaron que se trataba de β -manosil-1,3,- α -celobiosa difosfato prenil (que llamaremos AX₃-PP-prenil) y los estudios sobre su biosíntesis permitieron establecer que se formaba por la siguiente reacción:

celobiosa-PP-prenil + GDP-Man \rightarrow

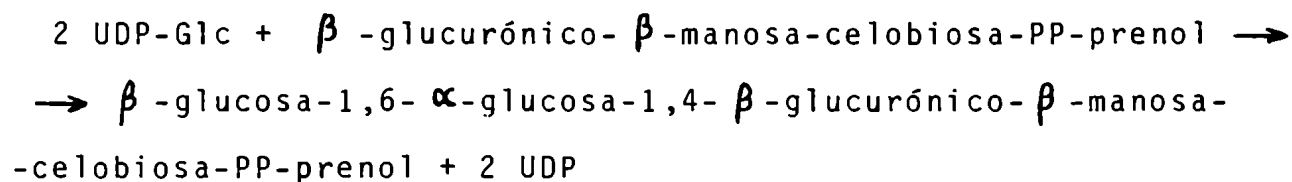
$\rightarrow \beta$ -manosa-1,3-celobiosa-PP-prenil + GDP

Posteriormente pudo aclararse la formación de AX₄-PP-prenil (Fig.18). Este compuesto se forma por la transferencia de ácido glucurónico, a partir de UDP-glucurónico,

al carbono 6 del residuo manosa del AX₃. La reacción puede representarse como sigue:

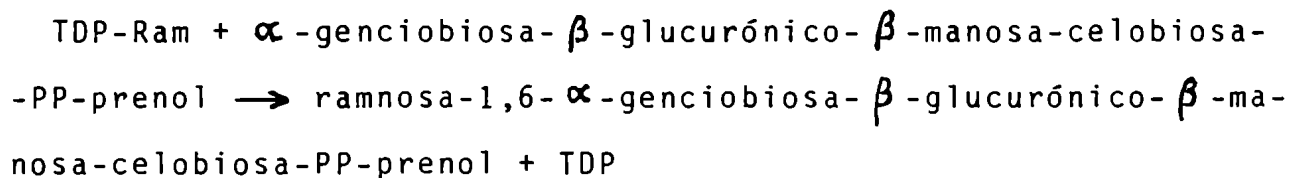


La transferencia sucesiva de dos glucosas a partir de UDP-glucosa conduce a la formación del AX₆-PP-prenol:



El intermediario AX₅-PP-prenol con una única molécula de glucosa unida al ácido glucurónico del AX₄ pudo obtenerse en pequeñas cantidades y en condiciones especiales.

Finalmente por la transferencia de ramnosa, a partir de TDP-ramnosa, al AX₆ se forma AX₇-PP-prenol:



Los preparados enzimáticos de A. xylinum forman, además de los lípidos-azúcares ya descritos, dos lípidos monofosfato azúcar: β -galactosa-P-prenol (82,83) y β -manosa-P-prenol (75), y lípido glucurónico (Fig.18, reacciones 10', 11 y 4' respectivamente). Las funciones de estos tres últimos compuestos aún no ha sido aclarada.

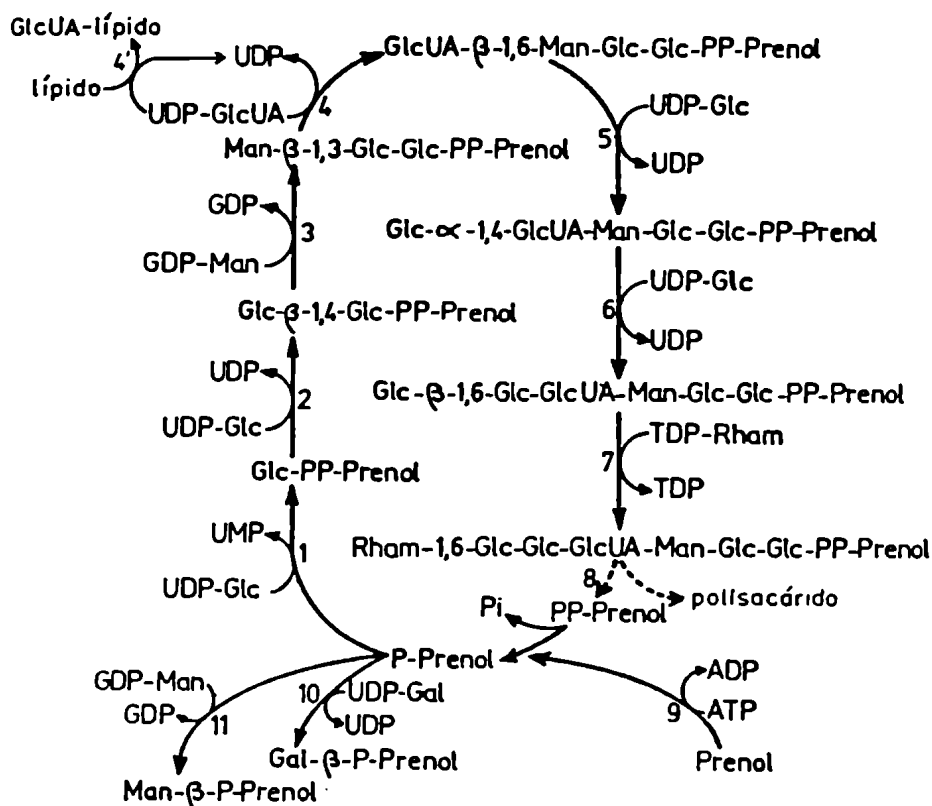


Figura 18: Esquema propuesto para la síntesis del heptasacárido difosfato prenil y reacciones relacionadas (75,82,83, 94,118).

El esquema de la Fig.18 resume la formación de lípido-azúcares, obtenidos en nuestro laboratorio, con preparados enzimáticos de A. xylinum. Si bien no se estableció el destino del heptasacárido difosfato prenil producto de la reacción 7, es muy probable que sea un intermediario en la síntesis del polisacárido acetano, debido a la similitud de los azúcares

que lo componen. Por ello pareció de interés efectuar un estudio más detallado de la estructura de ese polisacárido.

2.1.2. El xantano

El xantano es un heteropolisacárido exocelular producido por la bacteria gram negativa Xanthomonas campestris. La bacteria es patógena para ciertas plantas (col, coliflor, mostaza, nabo, repollo, rabano, etc.), teniendo prácticamente difusión mundial (119). En la Argentina se la encuentra difundida en la zona húmeda de los alrededores de Buenos Aires, Santa Fé, Entre Ríos y Corrientes (119).

El polisacárido, que es de interés industrial, ha sido sometido a un exhaustivo análisis estructural. Dos grupos, trabajando en forma independiente, confirmaron que está compuesto por unidades repetitivas de cinco azúcares (120,121). El parecido estructural de la unidad repetitiva del xantano (Fig.19) con los prenil fosfo azúcares obtenidos de A. xylinum es evidente: en ambos casos la celobiosa es el disacárido base sobre el que se adicionan cadenas de tres azúcares (en el xantano) o de cinco azúcares (en el AX₇-PP-prenol).

El xantano contiene también grupos acetilo y acetal piruvato en diferentes proporciones (Fig.19).

La importancia tecnológica del xantano reside en las inusuales propiedades de su solución acuosa (15). Algunas de

estas propiedades son: 1) Pseudoplasticidad, 2) Alta viscosidad a bajas concentraciones, 3) Pequeña variación de la viscosidad con la temperatura y 4) Habilidad para formar geles con otros polisacáridos (por ejemplo: galactomananos). El xan-

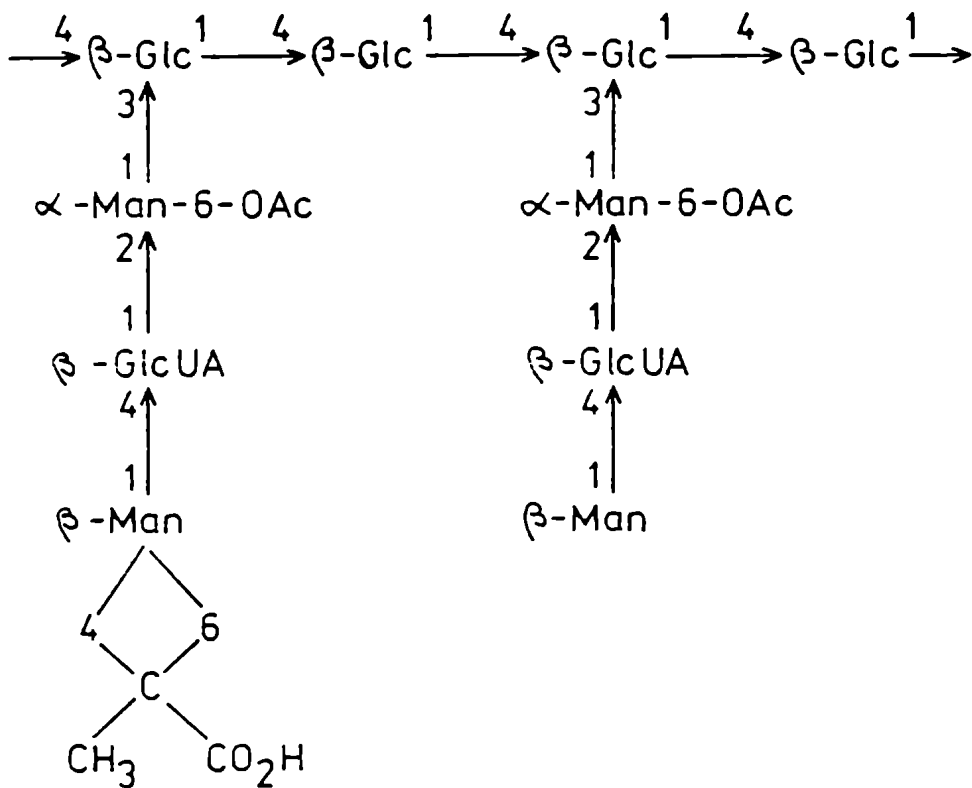


Figura 19: Unidad repetitiva del xantano (120,121).

tano tiene numerosas aplicaciones. En la industria alimenticia es empleado en la producción de bebidas frutales sintéticas,

leche en polvo, salsas, caldos deshidratados, gelatinas, quesos crema, etc. (15). En la industria no alimenticia es utilizado en la preparación de abrasivos, adhesivos, cosméticos, pigmentos, productos farmacéuticos, pinturas, tinturas, etc. (15). Un uso potencial muy importante es el empleo del xantano en la industria del petróleo. Si los estudios y las proyecciones son correctas en 1985 se utilizarán 90 a 100.000 toneladas de xantano en la recuperación secundaria del hidrocarburo (15).

Si bien el xantano ha sido objeto de estudios sobre producción (122), propiedades (15), composición (123) y estructura (120,121), su biosíntesis no había sido aclarada y constituye el tema central de este trabajo.

La presencia de grupos acetales y acilos en el xantano nos brindó la oportunidad de estudiar el mecanismo de incorporación de ambos grupos en el polisacárido y su posible intervención en la regulación de la biosíntesis del mismo. Al comenzar estos estudios lo único que se sabía sobre este tema era referente a la acetilación del polisacárido-O de Salmonella (sección 1.4.4.4.). Pero en la literatura no se encontraban trabajos sobre el nivel de incorporación de ninguno de los dos grupos, es decir si los mismos se incorporaban al polisacárido formado, o si en cambio lo hacían en algún paso intermedio, o de ambas maneras.

2.2. Objetivos

En vista de los datos hasta aquí presentados los objetivos del presente trabajo fueron:

a) Estudiar la síntesis del glucano en preparaciones enzimáticas de Acetobacter xylinum. Esta tarea se realizó estudiando la participación de glucosa-PP-prenol en la formación del polímero.

b) Estudiar la estructura del acetano y comparar los datos obtenidos con las estructuras conocidas en los oligosacáridos formados por preparados de A. xylinum "in vitro" (sección 2.1.1).

c) Estudiar la biosíntesis del xantano y la posible participación de los lípidos intermediarios en este proceso. Esta segunda tarea se encaró estudiando la incorporación de cada uno de los azúcares presentes en el polisacárido a productos liposolubles, empleando los respectivos nucleótidos como dadores.

d) Estudiar la estructura de los posibles lípido oligosacáridos aislados.

e) Estudiar la formación de polisacárido en relación con los lípido azúcares caracterizados.

f) Estudiar el dador del grupo piruvato y la forma de incorporación en el polisacárido.

g) Estudiar el dador del grupo acetilo y como en el caso anterior la forma de incorporación al polisacárido.

3. MATERIALES Y METODOS

1

3.1. Cultivo de Acetobacter xylinum y preparación de enzimas

3.1.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo fue el de Hestrin y colaboradores (26) que contiene:

	(% p/v)
Glucosa	2,0
Peptona (Difco u OCEFA)	0,5
Extracto de levadura (Difco o Yeast Product Inc.)	0,5
Fosfato disódico anhidro	0,27
Acido cítrico con 1 mol de agua	0,115

3.1.2. Condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa de Acetobacter xylinum NRRL B42 cultivada en forma estática a 30°C durante 48 horas en frasco de Roux de 1 litro que contenían 200 ml de medio. Las siembras se hicieron con 20 ml de líquido infranadante de un cultivo de 48 horas. En estas condiciones se forma el medio de cultivo una película que consiste principalmente en celulosa y que

contiene en su interior a la mayoría de las células, no obstante, el líquido infranadante contiene también células y se lo puede usar como iniciador.

El mismo medio adicionado de un 5% de agar se utilizó para conservar a 4°C, cultivos de 48-72 horas. Se hicieron repiques cada 2 ó 3 meses.

3.1.3. Obtención de células

Se siguió la técnica de Hestrin y colaboradores (26) ligeramente simplificada. Todas las operaciones se realizaron a temperaturas no mayores de 4°C.

Con la ayuda de una varilla de vidrio se retiraron las películas de los frascos de Roux y se lavaron en grupos de 4 con 200 ml de buffer 0,01 M fosfato-citrato pH 6 (buffer de lavado). Se repitió el lavado y luego las 4 zoogreas se colocaron en una licuadora común, se completó el volumen total a 500 ml con el buffer de lavado, y se homogeneizó durante un minuto a velocidad máxima.

A continuación se filtró a través de tela para quitar la celulosa, y el filtrado que contenía las células se centrifugó a 6.100 x g 15 minutos. El sobrenadante obtenido se usó como fuente de polisacáridos (sección 3.11.1.). El precipitado se resuspendió en el mínimo de buffer de lavado y centrifugó a 12.000 x g 5 minutos. Esta operación de lavado se repitió

otra vez. Las células se conservaron a -20°C o se procesaron como se señala en "Preparación de enzimas".

3.1.4. Preparación de enzimas

Se utilizaron varios preparados enzimáticos:

a) Células tratadas con EDTA (82). Las bacterias lavadas se resuspendieron en buffer 0,01 M EDTA-Tris pH 8 en una proporción de 2,5 ml de buffer por litro de medio de cultivo y luego se congelaron. Cuando fue necesario usarlas (en algunos casos después de 1 año) se descongelaron y volvieron a lavar 4 veces con 2 volúmenes de buffer EDTA-Tris pH 8. Luego se resuspendieron en un volumen del mismo buffer y se volvieron a congelar. Este preparado enzimático conserva su actividad por varios meses.

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

0,5 gramos de células húmedas

2,5 gramos de ballotini (5 micrones)

5,0 ml de buffer 0,070 M Tris-HCl pH 8,2

La operación se realizó a -10°C en un tiempo total de 4,5 minutos divididos en tres períodos iguales de 1,5 minutos, con intervalos de 1 minuto. El material resultante se centrifugó a $480 \times g$ durante 5 minutos para eliminar los ballotini

y células sin romper.

El sobrenadante de 480 x g se centrifugó a 30.000 x g 45 minutos obteniéndose un precipitado que se resuspendió en 0,6 ml de buffer 0,070 M Tris-HCl pH 8,2. Este preparado mantenido a -10°C conserva su actividad durante varios meses y nos referiremos a él como enzima P30.

3.2. Mantenimiento y cultivo de Xanthomonas campestris y preparación de enzimas

3.2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo fue el desarrollado por Cadmus y colaboradores (124), y contiene:

	(% p/v)
Glucosa	1,0
Peptona (Difco)	0,5
Extracto de levadura (Difco)	0,3
Extracto de malta (Oxoid)	0,3

El mismo medio adicionado de un 2% de agar se utilizó para la observación de colonias en cajas de Petri.

3.2.2. Condiciones de mantenimiento

El mantenimiento de Xanthomonas campestris NRRL B-1459 (ATCC 13951) requiere especial atención para asegurar una pro-

ducción uniforme con buenos rendimientos del exopolisacárido xantano (125). En las condiciones corrientes de mantenimiento de bacterias sobre agar inclinado se desarrollan, en el caso de X. campestris varios tipos de colonias que poseen un tamaño menor que la colonia original (124,125). Así después de repetidos pasajes la colonia original grande (G) desaparece y en cambio se desarrollan otros dos tipos: uno de tamaño mediano (M) y otra de tamaño pequeño (P) (124). Estas colonias presentan, además de la diferencia en tamaño, distinto aspecto, coloración y producción de polisacárido: las colonias G, mucoides, amarillas claras, producen polisacárido abundante y normal; las colonias M, mucoides, de color amarillo oscuro, producen polisacárido en menor cantidad; las colonias P, no mucoides, de color amarillo oscuro, no producen polisacárido (124). Estudios realizados sobre la composición del polisacárido producido por las colonias M indican que la relación molar de los azúcares que lo componen es similar al del producido por las colonias G, pero difieren en el contenido de ácido pirúvico (aproximadamente un 45% menor para el polisacárido producido por las colonias M) (125).

Las bacterias que producen colonias tipo G fueron mantenidas por liofilización, empleando el siguiente procedimiento: (todas las operaciones, tanto de obtención como las siguientes, se realizan en forma esteril). Las células, obtenidas como se

describe en la siguiente sección, fueron lavadas con 3-4 volúmenes de leche descremada al 20% (ver preparación más abajo) y centrifugadas (10 min. a 9.000 x g a 4°C). El precipitado fue resuspendido en el menor volumen posible de leche descremada, transfiriéndose alícuotas de 0,1-0,2 ml a tubos de 13 x 100 mm con tapón de algodón. Finalmente el contenido fue liofilizado, y los tubos cerrados a la llama se guardaron en congelador a -70°C. Este método fue realizado de acuerdo al Manual of Microbiological Methods (126) pag. 100-101 y al Manual of Methods for General Bacteriology (127).

Preparación de leche descremada: a 40 g de leche descremada se agregaron 200 ml de agua bidestilada caliente, agitando vigorosamente con agitador magnético; se filtra a través de tela para quesos, se cargan tubos de ensayo con 5-6 ml y se autoclava exactamente 13 min a 115°C (aprox. 11 lb). Debe asegurarse amplio espacio para la circulación de calor alrededor de los tubos para una buena esterilización.

3.2.3. Condiciones de crecimiento y obtención de células.

En este trabajo se utilizaron colonias tipo G, exclusivamente, las cuales fueron mantenidas por liofilización.

El esquema empleado fue el siguiente: células liofilizadas se transfirieron asepticamente a un erlenmeyer de 250 ml

de capacidad conteniendo 50 ml de medio de cultivo. Luego de 24-48 h de incubación a 26-28°C (con agitación circular, 200 rpm aprox.) se inocularon cajas de Petri, las que se incubaron en estufa 48 h. Al cabo de ese tiempo se observaron colonias mucoides, grandes, color amarillo suave, siendo frecuente la presencia de muy pocas colonias medianas (de 1 a 3 por caja). Una de las colonias grandes se transfirió asepticamente a un tubo de 15 x 150 mm conteniendo 7 ml de medio. Esta y las siguientes incubaciones se realizaron a 26-28°C, con agitación circular (200 rpm) y durante 24 h. El cultivo completo fue utilizado para inocular 50 ml de medio contenido en un erlenmeyer de 250 ml, que luego de la incubación correspondiente fue utilizado para inocular 500 ml de medio, contenidos en un erlenmeyer de 2000 ml. Finalmente, luego de la incubación, las células fueron centrifugadas (10 min a 9000 x g a 4°C) y procesadas como se señala en "Condiciones de mantenimiento" o en "Preparación de enzimas". El sobrenadante obtenido se usó como fuente del polisacárido xantano (sección 3.11.2.).

3.2.4. Preparación de enzimas

Se emplearon células tratadas con EDTA (82) como preparado enzimático. Las bacterias obtenidas como se describe en la sección anterior, fueron lavadas dos veces con buffer fosfato-citrato 10 mM, pH 6 y se resuspendieron en buffer

EDTA-Tris 10 mM pH 8. Se midió concentración de proteínas entre 20 y 40 mg/ml. Esta preparación se sometió a ciclos de congelamiento-descongelamiento empleando N₂ líquido (7 veces por lo menos). Luego se lavaron con dos volúmenes de buffer EDTA-Tris, resuspendiéndose finalmente en el mismo buffer, respetando el volumen original. Este preparado mantenido a -70°C conserva su actividad por más de 1 año.

3.3. Sistemas de incubación con enzimas de *A. xylinum*

3.3.1. Incubación standard-Método A

La mezcla de incubación standard contenía 5 µmoles de buffer Tris-HCl pH 8,2; 0,6 µmoles de MgCl₂; UDP-(¹⁴C)Glc (AE: 268-288 Ci/mol) ó (¹⁴C)Glc-PP-ficaprenol [(¹⁴C)Glc-PP-Fic] (ver método C) y enzima. La cantidad de compuesto radioactivo y de enzima, así como el tiempo y temperatura de incubación se indican en cada caso. El volumen total de la reacción fue de 70 µl.

Cuando se incubó en presencia de FMP, se evaporó el solvente en que venía disuelto bajo una corriente de N₂, luego se agregó Tritón X-100 (la concentración se indica en cada caso), buffer y se agitó vigorosamente en vortex para resuspenderlo bien. Recién entonces se completó la mezcla de incubación y se agregó la enzima.

Las reacciones se inactivaron con el agregado de 0,1 ml de butanol, se agitó en vortex, se centrifugó y se separó la fase superior orgánica. Esta extracción se repitió tres veces y los extractos combinados se lavaron tres veces con 0,1 ml de H₂O cada vez. Finalmente se tomaron alícuotas de las fracciones butanólica y acuosa para determinar la radioactividad.

Rutinariamente el material soluble en butanol se cromatografió en papel en los solventes E e I. El solvente I permite distinguir lípido fosfo azúcares, que migran cerca del frente, de nucleótido-azúcares, hexosas y sus ésteres fosfóricos de movilidad menor, que podrían contaminar el extracto.

El solvente E, en cambio, distingue entre Gal-P-prenol, Glc-PP-prenol y celobiosa-PP-prenol. Gal-P-prenol migra cerca del frente del solvente ($R_f=0,9$)(82), Glc-PP-prenol y celobiosa-PP-prenol se descomponen produciendo los ésteres cíclicos de los correspondientes azúcares, de movilidades características: $R_f=0,57$ para el éster proveniente de Glc-PP-prenol y $R_f=0,43$ para el éster proveniente de celobiosa-PP-prenol (82).

La incorporación de radioactividad a polisacárido se determinó tratando el material insoluble en butanol 3 veces con 50 μ l de una solución agua-metanol 5:1. El precipitado se descartó y el sobrenadante se cromatografió en solvente 0 para separar sustancias de alto peso molecular, que quedan en el origen del cromatograma, del exceso de sustrato radioacti-

vo, de movilidad mayor. La zona del origen de cada uno de los cromatogramas se cortó para medir su radioactividad.

3.3.2. Incubación en dos etapas

3.3.2.1. Método B.- Se utilizó este procedimiento cuando se deseaba acumular Glc-PP-prenol en una primera etapa, para utilizarlo en una segunda etapa en distintas condiciones. Se incubó en una primera etapa con UDP-(¹⁴C)Glc a 0°C durante 30 min. La reacción se detuvo con 1,25 µmoles de EDTA y 2 ml de Tris-HCl 70 mM; se agitó en vortex, se centrifugó 10 min a 8.000 rpm, se descartó el sobrenadante, y al precipitado se lo lavó dos veces más con 2 ml de Tris-HCl 70 mM cada vez. Estos lavados eliminan el nucleótido que no reaccionó y sus productos de ruptura que son hidrosolubles. El precipitado lavado se resuspendió en buffer Tris-HCl 70 mM pH 8,2 y MgCl₂ manteniendo las concentraciones iniciales. La segunda incubación se efectuó con los agregados y en las condiciones de temperatura y tiempo que se indican en cada paso. La reacción se inactivó y se procesó como en el caso del método A. Rutinariamente una alícuota del precipitado lavado pero no incubado por segunda vez fue inactivado y procesado, con el objeto de analizar los productos formados durante la primera incubación ("Control"). La incorporación de radioactividad a material

liposoluble y a polisacárido se efectuó como se detalla en el método A.

3.3.3. Incubaciones utilizando lípido-glucosa como sustrato exógeno.

3.3.3.1. Método C.- La solución de (^{14}C)Glc-PP-Fic en butanol se llevó a sequedad bajo una corriente de N_2 para eliminar el solvente orgánico. Se agregó la cantidad de Tritón X-100 que se indica en cada caso, buffer Tris-HCl, MgCl_2 , etc, se resuspendió repetidamente con vortex y finalmente se agregó la enzima. Las reacciones se detuvieron y analizaron como se detalla en el caso del método A:

3.4. Sistemas de incubación con enzimas de Xanthomonas campestris

3.4.1. Incubación standard.

La mezcla de incubación standard contenía 5 μmoles de buffer Tris-HCl pH 8,2, 0,6 μmoles de MgCl_2 , nucleótido-azúcar(es) y enzima. La cantidad de nucleótido-azúcares y de enzima, así como temperatura y tiempo de incubación se indican en cada caso. El volúmen total de la reacción fue de 70 μl .

Las reacciones se inactivaron con el agregado de EDTA (método D) o con el agregado de butanol (método E).

3.4.1.1. Método D.- La reacción se inactivó añadiendo 2,5 μ moles de EDTA en 0,5 ml de Tris-HCl 70 mM pH 8,2; se agitó en vortex, se centrifugó 5 min a 6.000 x g, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y al precipitado se lo lavó dos veces más con 0,5 ml de Tris-HCl 70 mM; los lavados se reunieron a la fase acuosa inicial, refiriéndonos a ellos como "fracción de lavados". El precipitado se extrajo tres veces con 0,13 ml de Cl_3CH , CH_3OH , H_2O (1:2:0,3) (149). Este extracto, al cual nos referiremos como "extracto 1203", contiene todos los lípido fosfo azúcares que se describen en este trabajo. Rutinariamente el "extracto 1203" se cromatografió en papel en solventes E ó F. Es conveniente aclarar que una cromatografía en dichos solventes es equivalente a un tratamiento alcalino suave. Los lípido monofosfato azúcares no son atacados y migran con el frente del solvente, pero los lípido-difosfato-azúcares se descomponen dando el azúcar 1,2 fosfato cíclico, siempre que el OH en la posición 2 del azúcar esté libre y en cis respecto del grupo fosfato (144). Este método fue adoptado por su sencillez y rapidez, siendo extensivamente usado en el presente trabajo, pues permite identificar diferentes oligosacárido-difosfato-lípidos a través de las movilida-

des de sus derivados cíclicos. En estos solventes el UDP-glucosa se descompone en glucosa-1,2-fosfato cíclico, siendo éste un compuesto de referencia frecuentemente utilizado y que abreviaremos GlcPc.

"La fracción de lavados", que contiene el exceso de nucleótidos que no reaccionaron y sus productos de ruptura, se utilizó para determinar la formación de polisacárido como se describe a continuación. Al material concentrado hasta sequedad por liofilización o con corriente de N_2 se le agregó 225 μ g de xantano no marcado como portador y 0,2 ml de KCl al 2% en H_2O . Luego de agitar en vortex se añadió 0,2 ml de etanol absoluto, agitándose en vortex, El precipitado formado fue separado por centrifugación a velocidad máxima en una centrifuga "clínica", redissuelto en 0,2 ml de KCl_2 2% en H_2O y reprecipitado con 0,2 ml de etanol absoluto. El procedimiento fue repetido hasta que no hubo radioactividad detectable en el sobrenadante (usualmente 5-6 veces). El precipitado fue redissuelto en agua y una alícuota fue contada para radioactividad.

3.4.1.2. Método E.- A la incubación estandar se le añadió 0,1 ml de butanol, se agitó en vortex, centrifugó y se separó la fase superior orgánica. Esta extracción se repitió dos veces más y los extractos combinados se lavaron tres

veces con 0,1 ml de H₂O cada vez. Se tomó una alícuota de la fracción butanólica para determinar radioactividad.

Este método extrae muy bien monosacárido-fosfato-lípidos y oligosacárido-difosfato-lípidos con dos o tres hexosas, y por su rapidez y sencillez fue adoptado para estudiar o preparar glucosa- o celobiosa-PP-prenol. Los oligosacárido-difosfato-lípidos de cuatro o más hexosas (siendo ácido glucurónico uno de ellos) se extraen parcialmente en la fase butanólica y pasan a la fase acuosa con suficientes lavados, por lo tanto este método no es aplicable en estos casos.

3.4.2. Incubaciones en dos etapas

3.4.2.1. Método F.- Se utilizó este procedimiento cuando se deseaba incubar con diversos nucleótido-azúcares en forma sucesiva y no conjunta. Se incubó en una primera etapa con los sustratos correspondientes, se detuvo la reacción con 1,25 μ moles de EDTA y se prosiguió con el procedimiento de lavado del método D. El precipitado lavado se resuspendió en buffer Tris-HCl 70 mM pH 8,2 y MgCl₂ manteniendo las concentraciones iniciales, se agregaron los nucleótido-azúcares correspondientes y se incubó nuevamente en las condiciones indicadas en cada caso. Las reacciones se inactivaron y procesaron como se indica en el método D.

3.5. Tratamientos degradativos

3.5.1. Hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares

La hidrólisis ácida suave de lípido-azúcares se realizó de dos maneras:

3.5.1.1. Compuestos cuya porción azúcar no contiene ácidos urónicos.- Las muestras en "extracto 1203" se concentraron bajo una corriente de N_2 hasta casi sequedad. Luego se agregó un volúmen de butanol, un volúmen de metanol, cuatro volúmenes de H_2O y ácido HCl hasta una concentración final de 0,01 N, calentándose a $100^\circ C$ durante 10 min. Se enfrió, se agregó butanol hasta observar dos fases de aproximadamente igual volúmen. Se agitó en vortex, se centrifugó y la fase acuosa se transfirió a otro tubo. La fase orgánica se lavó dos veces con agua y este lavado se unió a la fase acuosa. Finalmente se midió radioactividad en alícuotas de ambas fases.

Cuando se deseó analizar el (los) producto(s) obtenido(s) en la fase acuosa, ésta se llevó a seco bajo presión reducida, se resuspendió dos veces, llevando a seco cada vez bajo presión reducida (este procedimiento se realizó para eliminar el ácido HCl). Finalmente se resuspendió en agua y se procesó como se indica en cada caso.

3.5.1.2; Compuestos cuya porción azúcar contiene ácidos urónicos.- Las muestras en "extracto 1203" se concentraron hasta casi sequedad bajo una corriente de N_2 . Luego se agregó 0,2 ml de agua y se eliminaron los restos de Cl_3CH y CH_3OH bajo presión reducida. Se agregó ácido HCl hasta una concentración final de 0,01 N, calentándose a $100^\circ C$ durante 10 min. Se llevó a seco bajo presión reducida, se resuspendió dos veces con 50 μl de agua llevando a seco cada vez bajo presión reducida, para eliminar el ácido HCl. Finalmente se resuspendió en agua, y se procesó como se indica en cada caso.

3.5.2. Hidrólisis ácida parcial o total de oligo ó polisacáridos.

Las hidrólisis ácidas de oligo o polisacáridos se realizaron de dos maneras: (el grado de hidrólisis (parcial o total) se logró variando el tiempo de calentamiento)

a) Las muestras llevadas a seco bajo una corriente de N_2 o presión reducida se disolvieron en HCl 0,1 N, agregándose una punta de espátula de resina Dowex 50 x 8 (128). Los tubos se cerraron a la llama y se calentó a $100^\circ C$ por el tiempo que se indica en cada caso. Se enfrió, y luego de abrir el tubo, se pasó el sobrenadante a otro tubo. La resina se lavó dos veces con 0,1 ml de agua y los lavados se unieron a la fase acuosa inicial. El extracto acuoso combinado se llevó a seco

bajo presión reducida, se tomó dos veces con 50 μ l de agua, llevando a seco cada vez bajo presión reducida. Finalmente se disolvió en agua y se procesó como se indica en cada caso.

b) Las muestras llevadas a seco bajo N_2 o presión reducida se disolvieron en HCl 1N. Los tubos se cerraron a la llama y se calentó a 100°C el tiempo que se indica en cada caso. Se enfrió, y luego de abrir el tubo, el extracto acuoso se llevó a seco bajo presión reducida, se tomó dos veces con 50 μ l de agua, llevando a seco cada vez bajo presión reducida. Finalmente se disolvió en agua y se procesó como se indica en cada caso.

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

3.5.3. Reducción catalítica

Se hizo en la forma descrita por Pont Lezica y colaboradores (129) con ligeras modificaciones. El platino se preparó a partir de una solución acuosa de hexacloroplatinato de amonio y exceso de $NaBH_4$. El precipitado de Pt metálico se lavó con agua y con butanol saturado en agua.

La muestra disuelta en butanol se añadió sobre el Pt, se agitó para resuspenderlo y se burbujeó H_2 por el tiempo indicado en cada caso, con intensidad suficiente para mantener el

Pt en suspensión. Se centrifugó, quitó el butanol, y el platino se lavó sucesivamente con butanol y agua. Las fracciones butanólicas se combinaron y lavaron con agua y todas las fases acuosas se reunieron. Finalmente se contaron alícuotas de ambas fases.

3.5.4. Tratamiento con fenol

Este tratamiento se efectuó tal como lo describen García y colaboradores (82). En general las muestras se llevaron casi a seco, se les agregó 0,160 ml de fenol al 50% y se trataron a 68-70°C durante los tiempos indicados en cada caso. Se enfriaron y centrifugaron para separar las fases acuosa y fenólica. La fase fenólica se lavó 3 veces con 0,060 ml de agua. Estos lavados acuosos se combinaron con la fase acuosa inicial y se lavaron 3 veces con éter etílico para eliminar el fenol.

La fase fenólica se llevó a seco agregando éter etílico varias veces y evaporando con corriente de N₂ cada vez. Se contaron alícuotas de ambas fases.

3.5.5. Deacilación de oligosacáridos

Las muestras llevadas a seco se disolvieron en 0,1 ml de NaOH 60 mM y se dejó 10 min a temperatura ambiente (130). Se finalizó la reacción mediante el agregado de una punta de

espátula de resina Dowex 50 x 8 (H^+). Se agitó en vortex, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se lavó la resina dos veces con 50-100 μ l de agua y se combinaron los sobrenadantes, que se concentraron bajo corriente de N_2 . Cuando se trataron por este método (^{14}C)acetil-oligosacáridos, los sobrenadantes desalados se llevaron a pH 10 con NH_4OH antes de ser concentrados, a fin de fijar el ácido (^{14}C)acético como su sal de amonio.

3.5.6. Tratamiento alcalino del lípido glucurónico

Se realizó sobre el material según la técnica de Kennedy para fosfolípidos (130), con ligeras modificaciones. Se tomó la muestra en butanol (0,250 ml) y se agregó 1 ml de Cl_3CH , 0,5 ml de CH_3OH y 0,010 ml de $NaOH$ 10 N. Se agitó con vortex y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron luego 0,5 ml de agua, se agitó bien y se centrifugó. Se removió la fase superior (acuosa), y se volvió a extraer la fase inferior con 0,5 ml de agua. Los extractos acuosos combinados, se pasaron por una columna de resina Dowex 50 x 8 previamente tratada con piridina y lavada con agua. Se contó la radioactividad en alícuotas de las fases clorofórmica y acuosa: en la primera queda el compuesto sin hidrolizar y en la segunda productos de ruptura del compuesto o los derivados deacilados en el caso de los fosfolípidos.

3.5.7. Oxidación con periodato

Se realizó la oxidación con periodato en las condiciones descriptas por Fales (151). La muestra se disolvió en 0,050 ml de agua, se le agregaron 0,050 ml de metaperiodato de sodio 0,2 M y se dejó 48 h a 4°C; posteriormente se le agregaron 10 µl de etilenglicol y se dejó 1 h a temperatura ambiente. La muestra se analizó como se indica en cada caso.

3.5.8. Degradación de Smith

La degradación de Smith se realizó según la técnica de Smith y colaboradores (131). La muestra se disolvió en 0,2 ml de NaIO₄ 40 mM en buffer NaAcO 50 mM pH 5 (preparado en el momento) y se dejó en oscuridad a 4°C durante 120 h. El exceso de NaIO₄ se destruyó con 10 µmoles de etilenglicol y luego de 4 h a temperatura ambiente se agregó 10 mg de NaBH₄ y se dejó una noche. Se ajustó el pH a 1 con HCl 6 N, el tubo se tapó con una bolita de vidrio y se calentó a 100°C durante 30 min. Luego de enfriar la solución se desaló por filtración a través de una columna (0,7 x 11 cm) de Amberlite MB3 (forma acetato), lavando con 2 ml de agua. El percolado se concentró bajo presión reducida y los productos de degradación se analizaron por cromatografía.

3.5.9. Reducción con borohidruro

3.5.9.1. Reducción con borohidruro de sodio.- La reducción se efectuó en la forma descrita por García y colaboradores (82). La muestra a ser reducida se disolvió en 0,1-0,2 ml de agua, se agregó 5-10 mg de NaBH_4 y se dejó una noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con el agregado de resina Dowex 50 x 8 (forma H^+) para destruir el exceso de borohidruro y eliminar los cationes, y se dejó 30 min a temperatura ambiente. La solución fue llevada a seco bajo presión reducida y el ácido bórico eliminado con metanol.

3.5.9.2. Reducción con borotrituro de sodio.- En algunos casos los mono u oligosacáridos producidos por hidrólisis del polisacárido acetano fueron reducidos con borotrituro de sodio. En este caso la muestra llevada a seco se disolvió en 1 ml de NH_4OH 1 N, se agregó 0,2 mg de $(^3\text{H})\text{NaBH}_4$ (0,75mCi) en NaOH 10 mM y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó 1-2 mg de NaBH_4 y se dejó 2 h a fin de completar la reducción, la reacción se detuvo y procesó como se detalla en la sección anterior.

Este procedimiento de reducción convierte los azúcares neutros y los ácidos urónicos en los alditoles y ácidos aldó-

nicos correspondientes respectivamente.

3.5.10. Reducción del grupo carboxilo en oligosacáridos que contienen ácido glucurónico

El grupo carboxilo del ácido glucurónico presente en oligosacáridos fue reducido al grupo alcohol por una modificación del método de Taylor y Conrad (132). La muestra llevada a seco se disolvió en 0,3 ml de metanol al 33%, se agregó 10 mg de 1-etil-3[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (Sigma Chemical Co) y el pH se ajustó a 4,7 con HCl 0,1 N, utilizando verde de bromo cresol como indicador externo (pH 4,7 color verde). Se dejó 2 h a temperatura ambiente, controlando a intervalos el valor del pH, agregando HCl si fuera necesario. Luego se agregó 10 mg de NaBH_4 y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con el agregado de resina Dowex 50 x 8 (forma H^+) para destruir el exceso de borohidruro. La solución fue llevada a seco bajo presión reducida y el ácido bórico fue eliminado con metanol. El producto reducido se desalificó por cromatografía en papel Whatman N°3 MM cosido a papel Whatman N°1, dejándose desarrollar la misma durante 48 h. Luego de ubicado por radiocromatografía el compuesto fue eluido y sometido a electroforesis en buffer G, donde debe comportarse como neutro si la reducción fue completa.

3.5.11. Acetolisis

La mezcla acetilante contenía 0,5 ml de ácido acético glacial, 0,5 ml de anhídrido acético y 0,050 ml de ácido sulfúrico concentrado (133).

La muestra llevada a seco se disolvió en 0,25 ml de mezcla acetilante, se cerró el tubo a la llama y se dejó 2 h a 55°C. Luego se agregó 1 ml de piridina anhidra y se concentró bajo corriente de N₂ hasta 0,3 ml. Se repitió la operación tres veces llevando en la última el material hasta casi seco (quedó un residuo de característica siruposa). Se dejó durante una noche en desecador, se le agregó 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, se agitó bien y se extrajo la fase superior acuosa.

El cloroformo se lavó con 1 ml de agua varias veces (aproximadamente 7) hasta que los lavados fueron neutros. El cloroformo lavado se llevó a seco. Se agregaron 0,2 ml de CH₃OH y 60 µl de metóxido de sodio en metanol (25 mg de Na en 5 ml de metanol) y se dejó 10 min a 30°C. Se finalizó la reacción mediante el agregado de resina Dowex 50 x 8 hasta que se observó neutralidad frente al colorante Azul de Bromotimol. Se centrifugó, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se lavó la resina dos veces con 50 µl de agua y se combinaron los sobrenadantes. Este extracto combinado contenía los productos de acetolisis, desacetilados.

3.5.12. Permetilación

Se realizó por el método de Hakomori (134), según lo describen Sandford y Conrad (135), con algunas modificaciones. El método utiliza metilsulfinilanión para generar el alcóxido de oligo ó polisacáridos antes de agregar el agente metilante, yoduro de metilo.

Reactivos:

- Dimetilsulfóxido (DMSO)

El dimetilsulfóxido (Fluka A.G.) se agitó en presencia de H_2Ca a $40^\circ C$ durante 30 h y se destiló a aproximadamente 20 mm Hg (temperatura de ebullición $72^\circ C$). Se conserva en desecador al vacío.

-Hidruro de sodio

Se utilizó HNa Sigma sin aceite mineral. Se conserva en desecador al vacío.

Ioduro de metilo (Fluka o en su defecto Sigma). Se conserva en heladera ($4-8^\circ C$)

Preparación del dimetilsulfinilanión (DMSA).

A 15 ml de DMSO, contenidos en un tubo con salida lateral, e inmerso en un baño de vaselina a $65-68^\circ C$, se agregaron 750 mg de HNa, con agitación y en atmósfera de N_2 . Luego de 2 h la suspensión se centrifugó a temperatura ambiente. Se conserva con una capa de vaselina líquida a $-20^\circ C$ y su estabilidad

es de aproximadamente 1 mes.

3.5.12.1. Permetilación de oligosacáridos.- La muestra se llevó a seco en un tubo cónico de 0,6 ml de capacidad. Por cada mg de muestra se agregó 1 ml de DMSO (nunca menos de 0,2 ml). Se sonicó (Sonifier modelo W 140) al máximo de potencia en tres períodos de 2 min con 1 min de intervalo entre períodos. La solución se transfirió a un tubo de ensayos, conteniendo una barra magnética, se agregó 1 volumen de DMSA, y se agitó en ambiente de N_2 . Luego de 2 h, si el ligosacárido era neutro, o de 6 h si era cargado negativamente, se agregó 1 volumen de IMe y se continuó agitando durante 2 h más. La reacción se detuvo agregando 2 ml de agua, se agitó con vortex y la solución se extrajo 3 veces con 2 ml de Cl_3CH . Las fases clorofórmicas reunidas se lavaron 3-4 veces con 6 ml de agua cada vez, se transfirieron a un tubo de 13 x 100 mm y se llevaron a sequedad en corriente de N_2 .

Hidrólisis del material permetilado.- El material metilado se suspendió con 1,5 ml de HCl 1N, agitándose con vortex durante 5 min. El tubo se cerró a la llama y se hidrolizó el material durante 4 h a $100^\circ C$. Finalmente se eliminó al HCl llevando a sequedad con evaporador rotatorio y el residuo final se tomó con agua y se cromatografió en placa delgada.

3.5.12.2. Permetilación de polisacáridos.- La permetilación de polisacáridos se realizó por el mismo procedimiento empleado para oligosacáridos, con las salvedades que se indican:

- a) El polisacárido en DMSO se sonicó durante 1 h en baño de agua hielo.
- b) La formación del alcóxido con DMSA se realizó durante 18-24 h.
- c) El agregado de IMe se realizó sumergiendo el tubo que contiene la muestra en baño de agua-hielo.
- d) Una vez detenida la reacción de metilación el polisacárido se dializó exhaustivamente contra agua destilada y luego se liofilizó.

Hidrólisis de polisacáridos permetilados.- El polisacárido permetilado se disolvió en HCOOH 90%, el tubo se cerró a la llama y se calentó a 100°C durante 1 h. El ácido se eliminó llevando a seco varias veces con evaporador rotatorio. El residuo final se tomó con 2 ml de H₂SO₄ 0,25M y se calentó a 100°C durante 16 h. El ácido se eliminó pasando la solución por una columna (7 x 0,5 cm) de resina Dowex (forma HCO₃⁻) controlándose el pH (5 ó 6). Se concentró en evaporador rotatorio y el residuo se tomó en agua y se cromatografió en placa delgada.

3.6. Métodos analíticos

Los azúcares se dosaron en general con el método de fenol-sulfúrico (136), usando glucosa como patrón.

La ramnosa se determinó por el método de Dische y colaboradores (137) tal como lo describe Spiro (138), usando ramnosa como patrón. Este método puede aplicarse sobre muestras de polisacárido hidrolizado o no hidrolizado.

Los ácidos urónicos se determinaron por el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (139), usando glucuronolactona como patrón, y al igual que el método para determinar ramnosa puede utilizarse tanto sobre el polisacárido hidrolizado o no hidrolizado.

La glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa (140) tal como lo describe Ugalde (141), usando glucosa como patrón.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (142), usando albúmina de suero bovino como patrón.

3.7. Tratamientos enzimáticos

3.7.1. Fosfatasa alcalina

La muestra llevada a seco se resuspendió en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, se agregaron 0,21 unidades de fosfatasa alcalina de E. coli (Sigma), en volúmen total de 0,1 ml,

incubándose a 30°C durante 1 h. La reacción se detuvo con dos volúmenes de etanol y luego de centrifugar se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

3.7.2. α-Manosidasa.

Se utilizaron 2,4 unidades de α-manosidasa de "Jack bean" (Sigma tipo III). La incubación se realizó en buffer citrato de sodio 50 mM, pH 4,5 (volumen total 50 μl) durante 8 h a 25°C. La reacción se detuvo con 1 volumen de etanol y se desaló con resina Amberlite MB-3 (forma acetato). El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se lavó la resina con 0,1 ml de agua y los extractos acuosos combinados se concentraron a presión reducida.

En estas condiciones el p-nitrofenil-β-manósido no se hidrolizó, en cambio el p-nitrofenil-α-manósido se hidrolizó en 30 min de incubación.

3.7.3. β-Glucuronidasa.

Se utilizaron 60 unidades de β-glucuronidasa bovina (Sigma, tipo I) en buffer 0,1 M de AcONa, pH 4,5 en un volumen total de 0,1 ml. Se incubó a 37°C durante una noche. La reacción se detuvo con dos volúmenes de etanol, se centrifugó y se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

3.7.4. Pirofosfatasa inorgánica

La muestra llevada a seco se resuspendió en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, MgCl₂ 2 mM y se agregaron 0,64 unidades de pirofosfatasa inorgánica en un volúmen total de 0,1 ml. Se incubó a 37°C durante 2 h y se detuvo la reacción con dos volúmenes de etanol. Luego de centrifugar se analizó el sobrenadante como se indica en cada caso.

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

b) Cuando los tiempos de incubación excedieron las 2 h, las mismas se realizaron en atmósfera de tolueno.

3.8. Cromatografías

3.8.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

3.8.1.1. DEAE-Celulosa para soluciones lipofílicas

Se utilizaron columnas de 1,2 x 60 cm, que fueron desarrolladas según el método de Dankert y colaboradores (60). Primero se lavó con metanol 99% para eluir los compuestos neutros y luego con un gradiente lineal de 0 a 2 M de AcONH₄ en metanol

99%. Las fracciones colectadas fueron de 3 ml.

3.8.1.2. DEAE-Celulosa para soluciones acuosas.-

La DEAE tratada con ácido, alcali y lavada, se resuspendió directamente con ácido acético 1 M y se filtró y lavó para quitar el exceso de ácido.

Se utilizó una columna de 1,2 x 60 cm sin refrigeración. Se eluyó con un gradiente lineal (400 ml) de 0 a 0,4 M de AcONH_4 en agua y se colectaron fracciones de 3 ml.

3.8.2. Cromatografía en columna de geles.

Se utilizó Bio Gel A-5m, 100-200 mesh, en una columna de 54 x 1,2 cm, equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 7,0.

Los volúmenes de exclusión total y de inclusión total se determinaron por los volúmenes de elución del dextrano azul (4 mg) y de CoCl_2 (200 μmoles) respectivamente.

El flujo de la columna se reguló en 0,25 ml/min y se colectaron fracciones de 2 ml. Los volúmenes de elución de los polisacáridos no radioactivos se determinaron por el método de fenol-sulfúrico (sección 3.6.) sobre alícuotas de 0,5 ml de cada tubo. Donde corresponde se midió radioactividad en alícuotas (0,2 a 1,0 ml según el caso) de cada fracción.

3.8.3. Cromatografía y electroforesis en papel

Se utilizó papel Whatman N°1, y se emplearon los siguientes solventes:

D: Etanol 96% - amoníaco (99/1) (v/v). (143)

E: Etanol 96% - amoníaco (8/2) (v/v). (82)

F: Etanol 96% - amoníaco (7/3) (v/v). (144)

G: Acetato de piridina 1,2 M, pH 6,5. (82)

H: Butanol-piridina-agua (6/4/3) (v/v). (145)

I: Isopropanol-ácido acético-agua (27/4/9) (v/v). (146)

J: Butanol-piridina-agua (4/3/4) (v/v). (147)

K: Etanol-acetato de amonio 1M (15/6) (v/v). (144)

L; Borato de potasio 50 mM, pH 9,2. (148)

M: Molibdato de sodio 0,1 M-ácido sulfúrico csp pH 5.
(161)

N; Carbonato-bicarbonato de sodio 0,25 M, pH 9,2. (150)

O: Etanol-ácido acético-acetato de amonio 1M (75/26/4)
(v/v). (144)

P: Tris-HCl 0,1M, pH 7,8. (151)

Q: Borato de sodio 30 mM, pH 9,8. (148)

Para los solventes D, E y F se usó la técnica ascendente.
Con el solvente I se utilizó frecuentemente como estándar un hidrolizado parcial de glucógeno (maltooligosacáridos).
Las electroforesis se efectuaron tal como lo señalan

García y colaboradores (82). Normalmente se efectuaron a voltaje constante y se aplicaron 1000 volts (20 volts/cm) durante 180 min. Con el solvente G, se aplicaron en algunas ocasiones 2000 volts (40 volts/cm) durante 90 min, observándose las mismas separaciones respecto de las condiciones originales, para los componentes analizados en este trabajo, con el consiguiente ahorro de tiempo. Con este mismo solvente se utilizaron AMP y UMP como standard.

Para la ubicación de los azúcares reductores se utilizó el nitrato de plata alcalino (152). La ubicación de los nucleótidos AMP y UMP se determinó por su absorbancia a la luz ultravioleta. La ubicación de los ácidos acético y pirúvico, empleados como standard en las cromatografías con solvente D, se realizó vaporizando una solución de azul de bromofenol (143). Los compuestos con grupos fosfato fueron ubicados con el reactivo de molibdato (153).

3.8.4. Cromatografía en placa delgada

Se utilizaron placas de sílica gel 60 de 0,25 mm de espesor (Merck). Se emplearon los siguientes solventes:

R: Benceno-acetona-amoniaco -agua
(50/200/1,35/1). (154)

S: Benceno-acetona-amoniaco -agua
(50/200/1,5/3). (154)

Para la ubicación de los azúcares metilados se vaporizó la placa con H_2SO_4 al 5% en etanol comercial y se calentó en estufa a $140^\circ C$ durante 5 min.

3.9. Medida de la radioactividad

La radioactividad en electroforogramas y cromatogramas en papel o placa delgada se detectó con un radiocromatógrafo Packard modelo 7201. Cuando se empleó el solvente D, el papel fue previamente vaporizado con una solución 0,2M de fosfato monoácido de potasio (143).

Los compuestos radioactivos en solución se midieron con la solución de Bray (155) o con una mezcla que contenía 4 gramos de Omnifluor (New England Nuclear) en 1 litro de tolueno en contadores de centelleo Packard Tri-Carb modelos 2002 y 2003.

La mezcla de Omnifluor en tolueno se utilizó para medir (^{14}C) en trozos de papel provenientes de cromatografías o electroforesis. Luego de contado cada papel se lavó tres veces con tolueno para quitar el exceso de material de centelleo y tres veces con éter etílico para eliminar el tolueno y poder así eluir las sustancias medidas.

3.10. Obtención de compuestos radioactivos

$(^{14}\text{C})\text{Glc-PP-Fic}$ fue preparado a partir de FMP y UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$, siguiendo la técnica descrita por Romero (117) empleando enzima P30 (sección 3.1.4.). El FMP fue preparado por S. Raffo siguiendo la técnica de Cramer (156), a partir de ficaprenol (obtenido por la técnica de Stone y colaboradores (157)), tal cual lo describe Romero (117, pags.49 a 53).

$(^{14}\text{C})\text{Celobiosa-PP-prenol}$ fue preparado a partir de UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$, siguiendo la técnica de García y colaboradores (82).

$(^{14}\text{C})\text{-}\beta\text{-manosil-1,3-celobiosa-PP-prenol}$ fue preparado a partir de UDP-Glc y GDP- $(^{14}\text{C})\text{Man}$, siguiendo la técnica descrita por Couso y colaboradores (75). Para simplificar la nomenclatura nos referiremos a este compuesto como AX₃-PP-prenol, a su derivado fosfato cíclico como AX₃Pc y a la porción azúcar como AX₃.

$(^{14}\text{C})\text{-}\beta\text{-glucuronil-1,6-}\beta\text{-manosil-1,3-celobiosa-PP-prenol}$ y $(^{14}\text{C-GlcUA})\text{-}\beta\text{-glucosil-1,6-}\alpha\text{-glucosil-1,4-}\beta\text{-glucuronil-1,6-}\beta\text{-manosil-1,3-celobiosa-PP-prenol}$ fueron preparados a partir de UDP-Glc, GDP-Man y UDP- $(^{14}\text{C})\text{GlcUA}$ siguiendo la técnica de Couso y colaboradores (94). Como en el caso anterior, para simplificar la nomenclatura nos referiremos a ellos como AX₄-PP-prenol y AX₆-PP-prenol, a sus derivados fosfato cíclicos como AX₄Pc y AX₆Pc y a la porción azúcar como AX₄ y AX₆, respectivamente.

En todos los casos se obtuvieron los ésteres fosfórico cíclicos por cromatografía del respectivo lípido-azúcar en el solvente alcalino F y posterior elución, mientras que los oligosacáridos libres se obtuvieron por hidrólisis ácida suave del respectivo lípido-azúcar (sección 3.5.1.).

3.10.1. Preparación de nucleótido-azúcares

Los nucleótido-azúcares fueron preparados por Susana Raffo y Marta Eirin.

UDP-(^{14}C)Glc fue preparado a partir de glucosa uniformemente marcada (Amersham Searle, 200-300 Ci/mol de actividad) siguiendo la técnica descripta por Thomas (158) con diversas adaptaciones.

(β ^{32}P)UDP-Glc fue preparado a partir de (^{32}P) O_4H_3 (Amersham Searle, sin portador) tal cual lo describe Couso (118).

UDP-(^{14}C)GlcUA y GDP-(^{14}C)Man fueron preparados a partir de UDP-(^{14}C)Glc y de (^{14}C)manosa (New England Nuclear, 200-300 Ci/mol) respectivamente, tal cual lo describe Couso (118).

3.10.2. Otros compuestos radioactivos

(1- ^{14}C)Acetil-CoA (AE: 55,9 Ci/mol) y ácido fosfoenol-(1- ^{14}C)pirúvico (AE: 12,4 Ci/mol) (como sal de ciclohexilamo-

1 nio) fueron obtenidos de New England Nuclear y de Amersham Searle respectivamente.

3.11. Obtención de polisacáridos

3.11.1. Obtención de acetano

El acetano se aisló y purificó a partir del sobrenadante de la obtención de células de Acetobacter xylinum (sección 3.1.3.). El polisacárido se obtuvo por dos métodos:

Método A: se utilizó la técnica descrita por Conrad (159), tal cual la describe Romero (117, pag.55) para aislamiento de polisacáridos. El material fue posteriormente purificado por cromatografía en columna DEAE-celulosa (117, pag.120). El rendimiento obtenido por este método fue generalmente bajo (10 al 20% del material introducido en la columna).

Método B: se siguió la técnica descrita por Słoneker y Jeanes (123) para el aislamiento del xantano.

A partir del sobrenadante libre de células se obtuvo una fracción cruda de polisacáridos por una serie de precipitaciones por alcohol al 66% en presencia de KCl al 1% (ambas son concentraciones finales). El precipitado final fue disuelto en agua, dializado contra agua destilada y liofilizado.

La fracción cruda de polisacáridos fue purificada siguiendo el método de Holzwarth (160) para la purificación del xan-

tano. El material liofilizado se disolvió en agua (0,3 g/l) y se agitó toda la noche. Luego se agregó NaCl (0,34 M) y EDTA (2,5 mM), y se agitó con agitador magnético a baja velocidad durante 10 min. Se llevó el pH a 7, se agregó etanol (300 ml/l de agua) y se centrifugó la solución a 45.000 rpm durante 90 min. El precipitado fue descartado y al sobrenadante se le agregó etanol (440 ml/l de agua). El polisacárido precipita como un gel y fue aislado por centrifugación a 12.000 rpm durante 30 min. El precipitado se disolvió en agua y se agregó EDTA y NaCl (25 mM y 0,43 M respectivamente). El polisacárido se reprecipitó con etanol (1 ml/l de agua) y posterior centrifugación (12.000 rpm durante 30 min). Este material se disolvió en agua, se dializó contra agua deionizada y se liofilizó.

Por este procedimiento se obtuvieron rendimientos que variaron entre el 50 y 60% respecto de la fracción cruda.

3.11.2. Obtención de xantano

El xantano se aisló y purificó a partir del sobrenadante libre de células de Xanthomonas campestris (sección 3.2.3.). Para ello se siguió la técnica descrita en el método B para la obtención de acetano.

La fracción cruda de polisacárido se utilizó como portador en los ensayos realizados para determinar la formación de

4. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE ACETOBACTER XYLINUM

4.1. Glucano, propiedades y síntesis

4.1.1. Antecedentes

Se mencionó en la sección 2.1. que utilizando un preparado enzimático de Acetobacter xylinum y UDP-(¹⁴C)glucosa como nucleótido dador se formaba, además de celulosa y material li-
posoluble, un producto soluble en agua que fue caracterizado como un homopolisacárido de glucosa o glucano.

R. García, trabajando en nuestro laboratorio, encontró que el producto poseía entre otras las siguientes propiedades:

- No migraba luego de prolongada cromatografía en papel con solvente 0 y se comportaba como neutro en electroforesis en papel con buffer G y en cromatografías en columnas de DEAE-celulosa o Dowex 1 ó 50X.

- No era dializable y eluía en el volumen de exclusión en cromatografía en columna de Bio-Gel P-200 y Sephadex G-75. En columnas de Bio-Gel A 1,5-m parte se excluía y parte se incluía.

- Era lábil a la hidrólisis ácido suave (pH 2, 10 min,

100°C) liberando productos, de menor peso molecular que el compuesto de partida, que no fueron caracterizados.

- Era resistente a la acción de α ó β -amilasa, pululanasa (sola o combinada con β -amilasa), exo o endo- β -1,3-glucanhidrolasa, β -glucosidasa y pronasa.

- Sometido a hidrólisis ácida total rendía (^{14}C)glucosa como único monosacárido radioactivo. Por hidrólisis ácida parcial se obtenía una serie de oligosacáridos, uno de los cuales se caracterizó como al disacárido soforosa (β -glucosa-1,2-glucosa).

La formación del polímero "in vitro" poseía las siguientes propiedades:

- Tenía un requerimiento absoluto de iones Mg, siendo la concentración óptima de 6-8 mM.

- La incorporación de glucosa al glucano era dependiente de la temperatura. A 0°C estaba muy disminuida y era máxima a 30°C.

- La incorporación de (^{14}C)glucosa a partir de UDP-(^{14}C)glucosa al glucano era lineal hasta aproximadamente 2 h de incubación.

- No se observó incorporación de ^{32}P al glucano cuando UDP-(^{14}C)glucosa fue reemplazado por (β ^{32}P)-UDP-glucosa.

4.1.1.1. Síntesis del glucano

Uno de los componentes del material liposoluble mencionado más arriba fue identificado como glucosa difosfato preno1 (82). Se planteó la duda entonces si este compuesto era un intermediario en el camino biosintético del glucano.

Como ya se discutió se sabía que a bajas temperaturas se acumulaba glucosa difosfato preno1, mientras que la formación del glucano estaba muy disminuida. Se efectuaron entonces incubaciones en dos etapas. Es conveniente aclarar que ésta es una valiosa técnica que ha sido empleada en nuestro laboratorio con éxito, ayudándonos a estudiar la biosíntesis de diferentes lípidos intermediarios (75,94,118). En una primera etapa se incubó el preparado enzimático en presencia de UDP-(¹⁴C)glucosa a 0°C, con el fin de acumular glucosa difosfato preno1. Luego de eliminar el exceso de nucleótido por lavado, se efectuó una segunda incubación a 30°C. Los resultados, que se resumen en la Fig.20, muestran que el aumento de la temperatura de incubación condujo a una rápida disminución de la cantidad de glucosa-PP-preno1, acompañado por un aumento proporcional en la cantidad del glucano radioactivo.

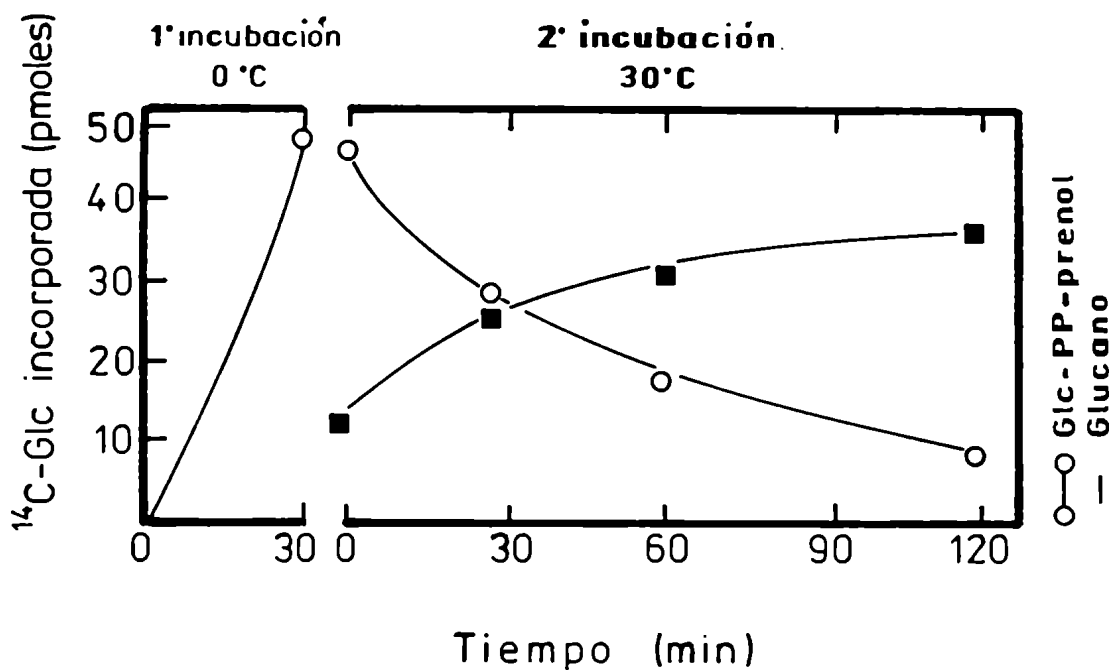


Figura 20: Metabolización de glucosa difosfato prenil

Se efectuó una incubación estándar en un volumen total de 0,65 ml, conteniendo UDP-(^{14}C)Glc (5310 pmoles) y 2,5 mg de enzima, según el método B. Luego de la primera incubación las células lavadas y resuspendidas fueron incubadas a 30°C (2ª incubación). Se procesaron alícuotas de 0,1 ml en los tiempos indicados. Tomado de (116).

Estos resultados fueron interpretados como una indicación que glucosa-PP-prenol acumulado en la 1ª. incubación era el dador de la glucosa para la síntesis del glucano, ya que la 2ª. incubación se realizó en ausencia de nucleótido-azúcares.

R. García estudió además la reversibilidad de la reacción de formación de glucosa-PP-prenol, empleando el mismo esquema

utilizado en el estudio de la síntesis del glucano. Se acumuló (^{14}C)glucosa-PP-prenol en la primera incubación. El agregado de UMP en la segunda incubación, realizada como la primera a 0°C , determinó una rápida disminución de glucosa-PP-prenol, con un aumento similar en la cantidad de UDP-(^{14}C)glucosa. Por lo tanto se confirmó la reversibilidad de la formación de glucosa-PP-prenol de acuerdo a la siguiente ecuación:



R. García y P. Romero estudiaron además el efecto del agregado de FMP exógeno, en presencia de Tritón X-100, sobre la síntesis de glucosa-PP-prenol y de glucano. Encontraron que a 30°C , temperatura de máxima formación del polímero, el detergente poseía un fuerte efecto inhibitorio; en cambio a 15°C observaron un incremento en la cantidad del polímero formado. En esas condiciones, en presencia de Tritón X-100 y FMP obtuvieron un aumento en la cantidad de glucosa-PP-prenol, con un aumento mayor en la cantidad de glucano (tabla 4).

Tabla 4: Incorporación de (^{14}C)hexosa a Glc-PP-prenol y a polímero

Condiciones de incubación	(^{14}C)hexosa incorporada	
	Glc-PP-prenol	Polímero
	(pmoles/mg prot.)	
Sin adiciones	187	335
+ Tritón X-100	209	781
+ Tritón X-100 + FMP	335	1414

Se efectuó una incubación estandar durante 60 min a 15°C , con 1,29 nmoles de UDP-(^{14}C)Glc, enzima P30 (200 μg de prot.) y donde se indica 0,09% de Tritón X-100 y 3,6 nmoles de FMP. Las reacciones se procesaron por el método A. (Tomado de 117, pag. 117)

Se demostró además que el FMP es sustrato y no un activador de la reacción de síntesis de glucosa-PP-prenol, empleando ficaprenol monofosfato marcado con ^{32}P y UDP-(^{14}C)glucosa en la mezcla de incubación. Por columna de DEAE-celulosa se aisló (^{14}C)Glc-P-(^{32}P)P-ficaprenol.

Por otra parte la bacitracina, que es un inhibidor de la pirofosfatasa que regenera el P-prenol a partir de PP-prenol (164), no inhibió ni la formación de glucosa-PP-prenol ni la del glucano (R. García, resultados no publicados).

Finalmente es importante señalar que mutantes de A. xylinum que no forman celulosa (NCIB 8746 y 8747) no sintetizan ni glucosa-PP-prenol ni glucano.

Estos resultados apoyaban la idea original sobre la participación del lípido difosfato azúcar en la biosíntesis del polímero.

4.1.2. Resultados obtenidos

En vista de los datos presentados en la sección anterior, se decidió completar el estudio de la biosíntesis del glucano. El primer objetivo fijado fue tratar de obtener formación del polímero a partir de glucosa-PP-ficaprenol agregado en forma exógena. Se preparó entonces (^{14}C)glucosa-PP-lípido como se indica en la sección 3.10., el cual fue incubado en presencia de Tritón X-100 a 15°C. Se efectuó además un segundo ensayo en presencia de UDP-glucosa no radioactivo, pues un punto que no había quedado aclarado en ese entonces, era establecer el dador de la glucosa no reductora de celobiosa-PP-prenol (otro de los componentes del material liposoluble obtenido al incubar en presencia de UDP-(^{14}C)glucosa (sección 2.1.)).

Los datos obtenidos (tabla 5) muestran que hubo incorporación de radioactividad en el extracto acuoso, y que se encuentra algo incrementada cuando la incubación se efectuó en pre-

sencia de UDP-glucosa.

Tabla 5: Incorporación de (^{14}C)glucosa a partir de (^{14}C)Glc-PP-prenol a material hidrosoluble

Condiciones de incubación	$(^{14}\text{C})\text{Glc}$ presente en material	
	liposoluble	hidrosoluble (cpm)
Sin adiciones	33.000	6.200
+ UDP-Glc	30.000	9.700

$(^{14}\text{C})\text{Glc-PP-Fic}$ (39.000 cpm) obtenido como se indica en la sección 3.10., se resuspendió en presencia de Tritón X-100 (0,09%) en una mezcla de incubación standard, con 80 μg de enzima P30. Donde se indica se agregó UDP-Glc (142 μM). Luego de incubar durante 2 h a 15°C se procesó por el método C.

El análisis del extracto butanólico obtenido en ausencia de UDP-glucosa determinó que estaba compuesto por (^{14}C)glucosa-PP-lípido y que en el caso de la incubación en presencia de UDP-glucosa se formaba una pequeña cantidad de celobiosa difosfato lípido. Posteriormente se confirmó que UDP-glucosa era el dador de la glucosa no reductora de la celobiosa, es decir:



Un estudio completo de esta reacción puede encontrarse en la tesis de R. O. Couso (118) o en otra publicación de este laboratorio (75).

Por otra parte el extracto acuoso (obtenido en la incubación cuyos datos se resumen en la tabla 5) fue analizado por cromatografía en papel con solvente 0 (Fig.21), donde el glucano no migra, como fue mencionado anteriormente. En ambos casos se encontró radioactividad en el origen, un pico principal de R_{Glc} : 0,9 (correspondiente a GlcPc) y un pico menor de R_{Glc} : 0,8 (correspondiente a Glc-1-P). Pero solo cuando se agregó UDP-glucosa no radioactivo en la incubación se encontró UDP-(^{14}C)glucosa (Fig.21 B). Estos resultados pueden ser inter-

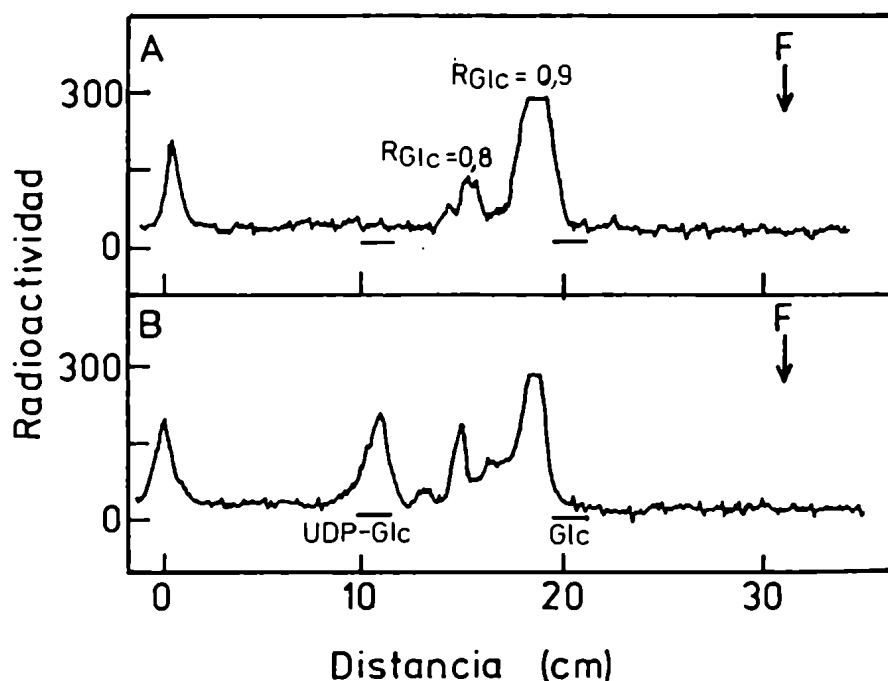


Figura 21: Obtención de (^{14}C)glucano a partir de (^{14}C)Glc-PP-lípido. Los extractos acuosos obtenidos como se indica en la tabla 5 se cromatografiaron en solvente 0. Sin adiciones (A), + UDP-Glc (B).

pretados si se admite la presencia de UMP en el preparado enzimático, que formaría con el (^{14}C)glucosa-PP-prenol agregado, UDP-(^{14}C)glucosa. Este por hidrólisis enzimática (una pirofosfatasa) o hidrólisis química produciría glucosa-1-P. La presencia de UDP-glucosa no radioactivo protegería por dilución isotópica al UDP-(^{14}C)glucosa formado, y por ello se observó su presencia.

Según esta interpretación, la presencia de UMP invalidó el objetivo original del experimento pues el UDP-(^{14}C)glucosa formado podía actuar como sustrato para la formación del glucano.

En vista de estos resultados se consideró necesario estudiar el efecto del UMP en la reacción de formación del glucano, ya fuera a partir de UDP-glucosa o de glucosa-PP-lípido.

4.1.2.1. Efecto del UMP en la formación del glucano a partir de glucosa difosfato lípido

Se pensó que si el lípido azúcar era un precursor del polímero, su formación debería inhibirse en presencia de UMP, puesto que con el (^{14}C)glucosa-PP-lípido (agregado como sustrato) formaría UDP-(^{14}C)glucosa. Por el contrario una estimulación en la síntesis del glucano por el nucleótido monofosfato indicaría que el lípido azúcar no participaría en la biosíntesis del mismo, efectuándose esta directamente a partir de

UDP-glucosa. Se hizo entonces un ensayo con (^{14}C)glucosa-PP-lípido agregado en forma exógena en ausencia y en presencia de UMP ó de UMP + UDP-glucosa no radioactivo. Los resultados obtenidos muestran que la radioactividad incorporada en el extracto acuoso (tabla 6) es discretamente mayor en presencia, que en ausencia de UMP, pero es significativamente mayor, con respecto a ambos casos, en presencia de UMP y UDP-glucosa.

Tabla 6: Efecto del UMP sobre la incorporación de radioactividad en extracto acuoso a partir de (^{14}C)Glc-PP-lípido

Condiciones de incubación	Radioactividad presente en material:	
	liposoluble	hidrosoluble
	cpm	
Sin adiciones	20.200	7.300
+ UMP	17.500	9.600
+ UMP + UDP-Glc	13.300	13.000

(^{14}C)Glc-PP-Fic (27.00 cpm) se incubaron en las mismas condiciones descritas en la tabla 5. Donde se indica se agregó UMP (142 μM) y/o UDP-Glc (142 μM).

Los componentes de cada uno de los extractos acuosos fueron analizados por cromatografía en papel: (Fig.22). En ausencia de UMP (cuadro A) se observó poca radioactividad en el origen, es decir en el glucano. Por el contrario, en presencia de UMP se observó que la formación del glucano era considerablemente mayor (cuadro B), notándose además un pico de menor radioactividad que comigra con UDP-glucosa como era de esperar. En el último caso (UMP + UDP-Glucosa) el glucano radioactivo formado es solo algo mayor que en el caso del incubado directo, pero se observa un fuerte aumento de la radioactividad que comigra con UDP-glucosa (cuadro C). En todos los casos se observó además un producto radioactivo de R_{Glc} : 0,9 (presumiblemente GlcPc). El análisis de la fracción liposoluble mostró que estaba constituida por glucosa-PP-lípido en los tres casos.

El aumento en la formación del glucano debido a la presencia de UMP parecería indicar que el UDP-glucosa era un precursor directo del mismo.

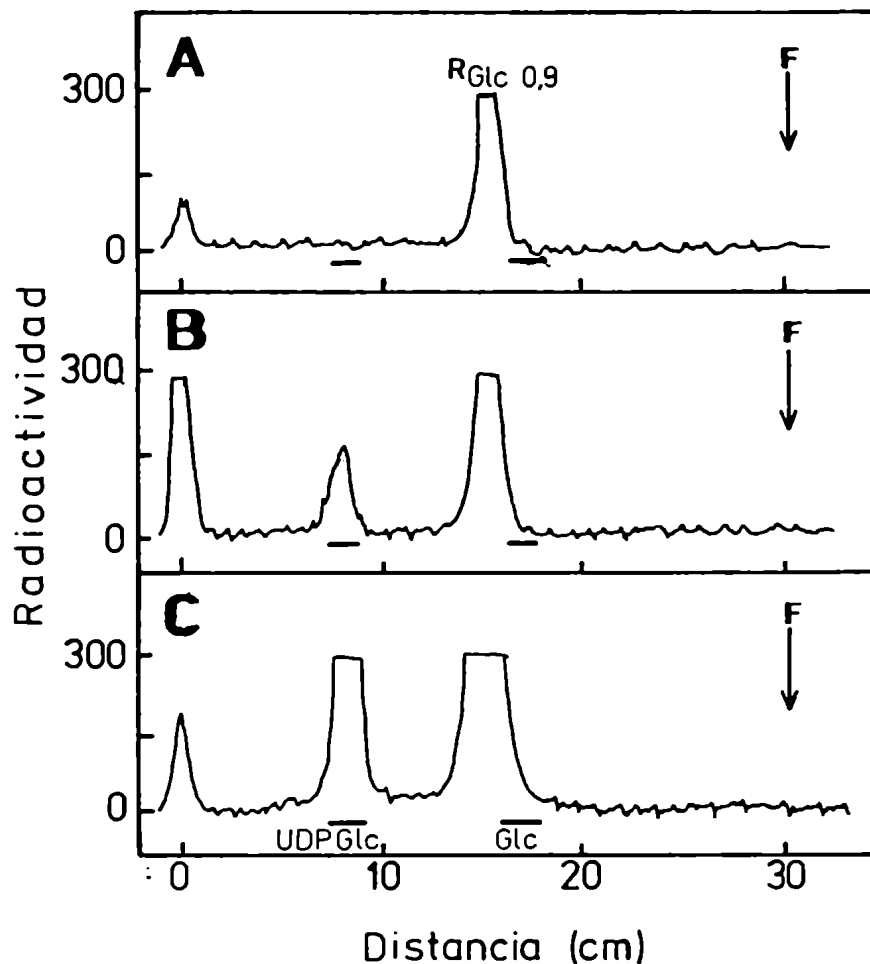


Figura 22: Análisis del extracto acuoso. Extractos acuosos obtenidos como se indica en la tabla 6 se cromatografiaron en solvente 0 (A: sin adiciones; B: + UMP; C: + UMP + UDP-Glc)

En vista de los resultados obtenidos se repitió la formación del polímero en incubaciones realizadas en dos etapas, efectuándose en estas condiciones una curva con cantidades crecientes de UMP. En una primera etapa se incubó a 0°C para formar el lípido-azúcar y en la segunda etapa, realizada a

30°C, se agregaron distintas cantidades del nucleótido. De esta manera se observó un incremento en la formación del glucano a medida que aumentaba la cantidad de UMP (Fig.23). Este resultado era concordante con los ya encontrados, indicando que el polímero se sintetizaría directamente a partir de UDP-glucosa.

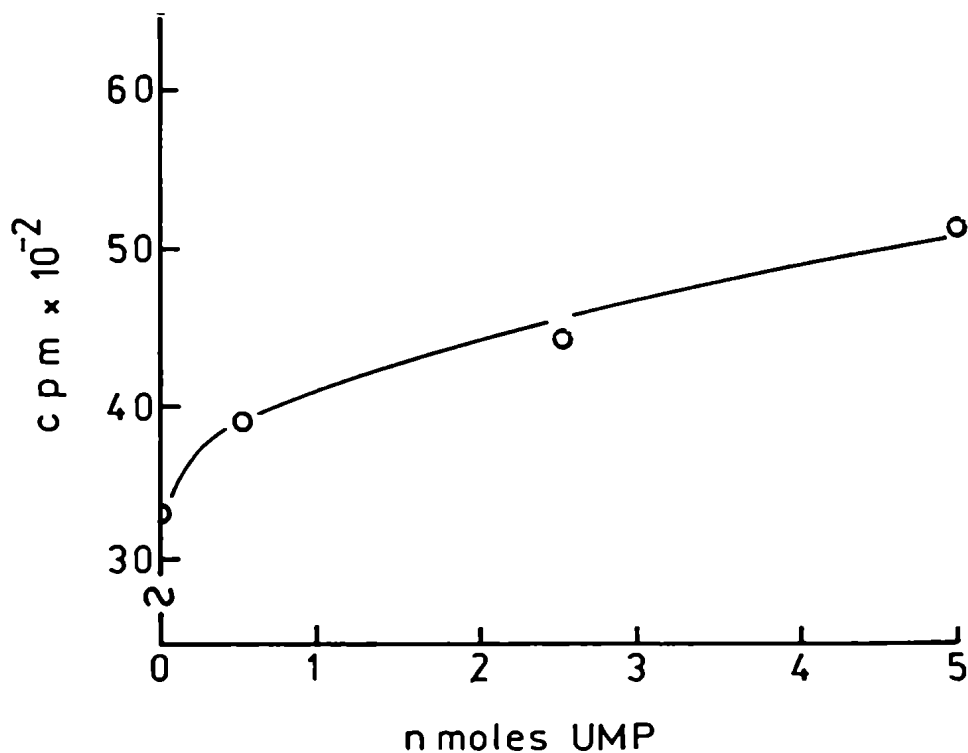


Figura 23: Efecto del UMP sobre la formación del glucano a partir de $(^{14}\text{C})\text{Glc-PP-prenol}$. Se efectuó una incubación estándar en un volumen final de 0,35 ml, conteniendo 3700 pmoles de UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ y 2 mg de enzima, según el método B. Luego de la primera incubación, las células lavadas y resuspendidas se dividieron en cinco alícuotas iguales. A cuatro de ellas se le agregaron las cantidades de UMP que se indican, se incubaron a 30°C durante 30 min y se determinó la cantidad de radioactividad incorporada a polisacárido. A estos valores se les restó la cantidad incorporada en el control (5a alícuota).

4.1.2.2. Efecto del UMP en la formación de glucosa difosfato lípido y del glucano a partir de UDP-glucosa

Para tratar de comprender mejor el sistema se estudió el efecto que poseía el UMP en la reacción de formación del glucano y de glucosa-PP-prenol, en incubaciones realizadas en presencia de UDP-(¹⁴C)glucosa como sustrato (Fig.24).

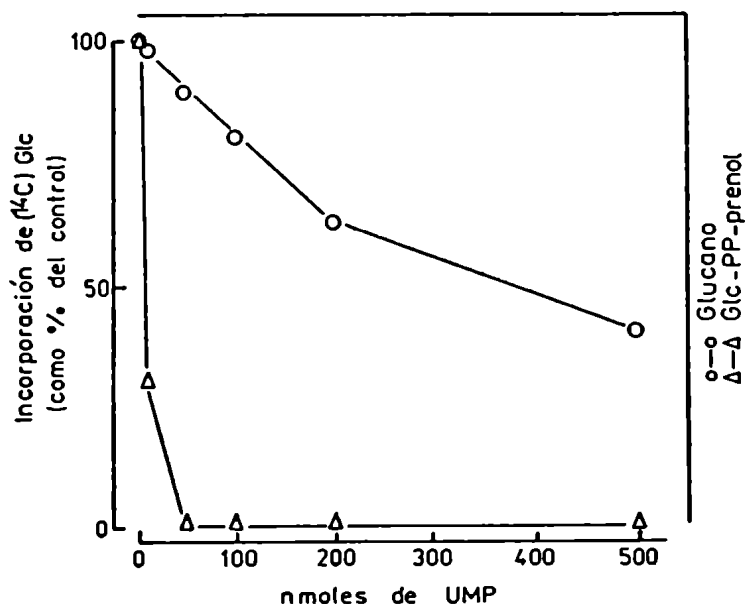


Figura 24: Efecto del UMP sobre la formación de glucosa-PP-prenol y del glucano. Se efectuaron incubaciones estándar en presencia de 940 pmoles de UDP-(¹⁴C)Glc, las cantidades de UMP que se indican y 0,225 mg de enzima. Las incubaciones, realizadas a 30°C durante 30 min, se procesaron por el método A.

El nucleótido monofosfato inhibió la formación de ambos compuestos, pero en diferente grado. Así 50 nmoles de UMP en la incubación inhibieron totalmente la formación del lípido-azúcar, en cambio solo hubo un poco más del 10% de disminución en el glucano. Aumentando 10 veces la cantidad del nucleótido (500 nmoles) se observó una disminución del orden del 60% en la formación de polímero. La presencia de UDP (50 nmoles) en la incubación inhibió la formación de glucosa-PP-prenol en un 65% y del polímero en un 81%. La inhibición en la formación del glucano podría deberse a una inhibición competitiva de la enzima por el UDP. Un resultado similar ha sido descripto en la síntesis del glucógeno (162).

Los datos hasta aquí presentados parecerían indicar que el glucano se sintetizaría utilizando UDP-glucosa como dador de glucosas, pero no puede descartarse totalmente que glucosa-PP-prenol participe en alguna proporción. El nucleótido-azúcar participa además en la formación de glucosa difosfato pre-nol y junto con éste en la formación de celobiosa-difosfato pre-nol, entre otras varias reacciones (ver Fig.18). La síntesis del primero de los lípido-azúcares nombrados se realiza mediante una reacción reversible, hecho que hizo dificultoso el empleo del mismo como sustrato para el estudio de otras reacciones.

4.2. Análisis estructural del acetano

4.2.1. Generalidades

El heptasacárido difosfato preno1 descrito en la sección 2.1.1. y Fig.18 tiene todas las propiedades de un lípido intermediario. De hecho y como se explica en la mencionada sección se logró su obtención gracias al conocimiento de los azúcares que componen el acetano (94,118).

La pregunta surgió inmediatamente: ¿Es el acetano el destino final del heptasacárido-PP-preno1?. Una manera posible de responder era estudiar la estructura del polisacárido y compararla con la ya conocida del heptasacárido. Esta tarea se realizó en dos etapas fundamentales: Por una parte era necesario comprobar si la relación de los azúcares constituyentes del acetano era la misma que la del heptasacárido y determinar si en la estructura del polisacárido estaban involucrados algunos fragmentos (por ejemplo disacáridos) que formaban parte del heptasacárido.

Por otra parte el estudio de la estructura del polímero por medio de la permetilación nos permitirá conocer si el polisacárido es lineal o ramificado, además de confirmar lo actuado anteriormente. Esta segunda etapa, ya en su fase final es realizada en el laboratorio por R.O. Couso.

4.2.2. Composición

La composición del polisacárido se logró por análisis de los azúcares liberados por hidrólisis ácida total del mismo. Debido a la presencia de ácido glucurónico la hidrólisis del polisacárido se logró luego de varios ensayos. Como se describe en la sección 3.5.2. se encontraron dos métodos para llevar a cabo este propósito. Uno de ellos emplea HCl 0,1N en presencia de resina Dowex forma protónica, hidrolizándose durante 48 h a 100°C. En el otro método se utiliza HCl 1N y la hidrólisis se realiza durante 22-24 h a 100°C. Los productos del tratamiento ácido por cualquiera de los dos métodos fueron analizados por cromatografía y electroforesis en papel en diferentes solventes, observándose la presencia de glucosa (cromatografía en solventes H e I, electroforesis en buffer L), ramnosa (cromatografía en solvente I, electroforesis en buffer G y M). En la Fig.25 se muestra a modo de ejemplo los productos obtenidos y cromatografiados en solvente I.

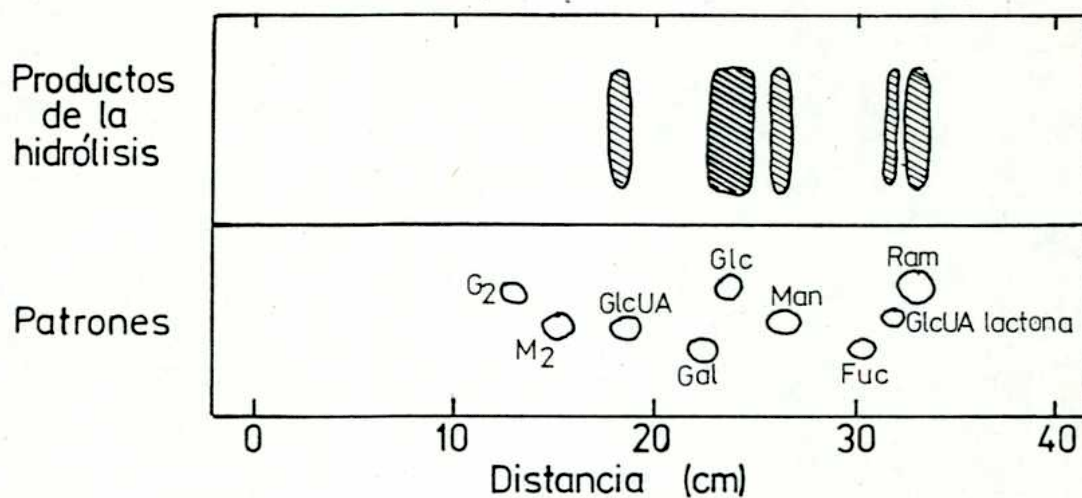


Figura 25: Composición de los azúcares del acetano. Se efectuó una hidrólisis ácida total (sección 3.5.2.b) sobre 10 mg de polisacárido durante 22 h. Luego de eliminar el HCl, los productos se cromatografiaron en solvente I.

4.2.3. Determinación de la relación glucosa-manosa-ramnosa-ácido glucurónico.

La cuantificación de glucosa se realizó por el método de glucosa oxidasa y por lo tanto debe ser necesariamente realizada sobre el polisacárido hidrolizado. En cambio los métodos para la determinación de ramnosa y de ácido glucurónico pueden ser aplicados sobre polisacáridos hidrolizados o no.

Por lo tanto se efectuó una determinación de glucosa, ramnosa y ácido glucurónico sobre muestras de polisacárido hidrolizado y una determinación de ramnosa y ácido glucurónico so-

bre muestras de polisacárido sin hidrolizar. Los resultados (tabla 7) muestran que en el polisacárido hidrolizado la relación glucosa-ramnosa-ácido glucurónico es aproximadamente 4:1:1. La relación ramnosa-ácido glucurónico, obtenida a partir del polisacárido no hidrolizado, dió aproximadamente 1:1

Tabla 7: Cuantificación de glucosa, ramnosa y ácido glucurónico en el acetano

Polisacárido	Cantidad de			Relación	
	Glc (a)	Ram (b) (nmoles)	GlcUA (c)	a:b:c	b:c
Hidrolizado ⁺	2430	616	600	4,05:1,03:1,00	
No hidroliza do*	—	350	370	—	0,95:1,00

El polisacárido fue aislado y purificado como se describe en la sección 3.12.1. (método A). Una porción de 0,9 mg fue sometida a hidrólisis ácida total durante 48 h (sección 3.5.2.a) y el residuo llevado a seco fue disuelto en 3,00 ml (+). Otra porción de 0,6 mg de polisacárido se disolvió en 1,00 ml (*). Sobre alícuotas apropiadas se determinó glucosa, ramnosa y ácidos urónicos (sección 3.6.). Todos los datos son el promedio de 4 determinaciones y están expresadas por cantidad total de polisacárido.

La relación glucosa-manosa se determinó analizando los productos liberados por hidrólisis ácida total por cromatografía gaseosa obteniéndose una relación de 4,1 a 1 respectivamente. (1)

En resumen puede concluirse que en el acetano la relación glucosa-manosa-ramnosa-ácido glucurónico es de 4:1:1:1. Este resultado era el esperado y coincidió con el obtenido para el heptasacárido preparado "in vitro" (94,118).

4.2.4. Productos obtenidos por métodos degradativos

El acetano se sometió a una serie de tratamientos degradativos cuyas condiciones se obtuvieron a partir de nuestros conocimientos previos sobre la labilidad de las distintas uniones presentes en el heptasacárido AX₇ (94,118). Como se muestra

(1) El polisacárido (5 mg) fue sometido a hidrólisis ácida total durante 22 h (sección 3.5.2.b). Los productos liberados por este tratamiento fueron reducidos con NaBH₄ (sección 3.5.9.1.) y luego acetilados con anhídrido acético (163).⁴ La mezcla de alditol acetatos obtenida fue analizada por cromatografía gaseosa (cortesía del Dr Gross del Dto. de Qca. Orgánica de la FCEyN). Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard 5830 A con detector de ionización de llama, equipado con una columna de vidrio de 180 cm de longitud y 2 mm de diámetro. La fase fija consistía de ECN3EM al 3% sobre cromosob Q. La corrida se desarrolló en forma isotérmica a 180°C, empleándose N₂ como gas portador. En estas condiciones se obtuvo un tiempo de retención de 20,93 para la manosa y de 29,89 para la glucosa.

en la Fig.26 a partir de dicho heptasacárido se puede obtener por hidrólisis ácida parcial dos disacáridos neutros, celobiosa y genciobiosa y un disacárido cargado, glucuronil-manosa. En cambio si el acetano es sometido a una acetolisis puede obtenerse, entre otros productos, un disacárido cargado diferente al anterior: glucosil-glucurónico

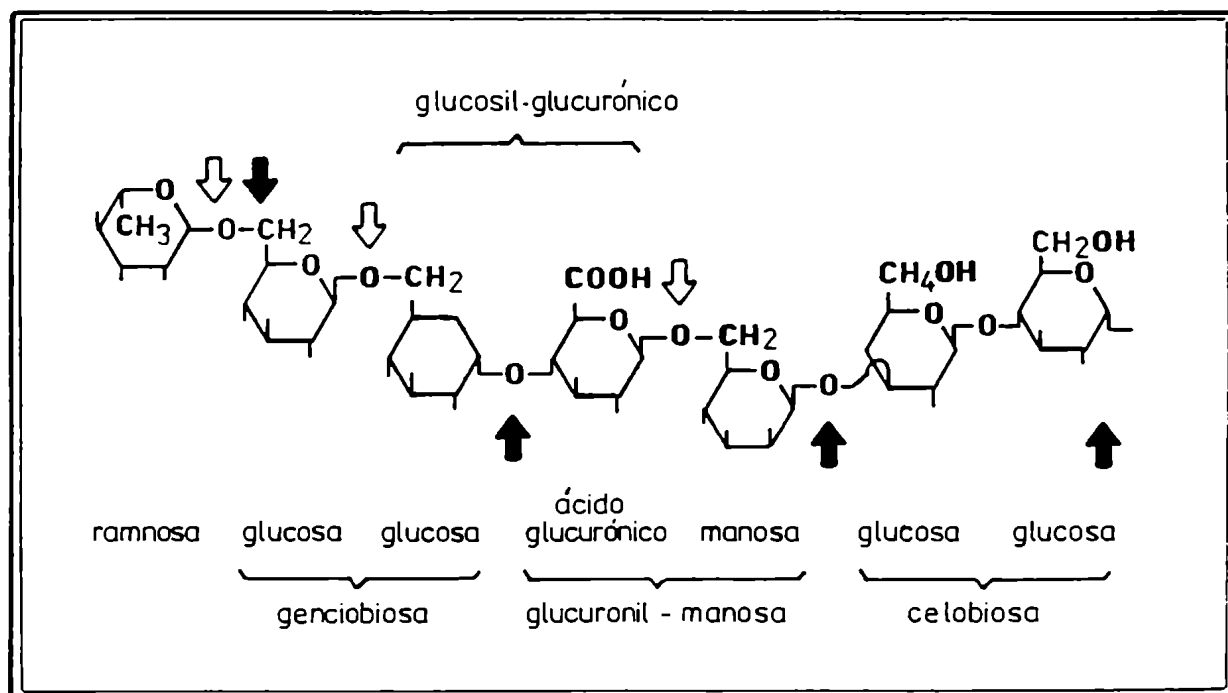


Figura 26: Principales productos obtenidos por métodos degradativos a partir del heptasacárido AX₇. Las flechas negras indican las uniones lábiles a la hidrólisis ácida. Las flechas blancas indican las uniones lábiles a la acetolisis.

Se intentó entonces aplicar al acetano estos métodos degradativos en similares condiciones y observar si los fragmentos producidos (principalmente los disacáridos) eran los mismos que se obtenían a partir del AX₇.

4.2.4.1. Aislamiento y caracterización de β -glucuronil-manosa.

Cuando el hexasacárido AX₆ (Fig.26), obtenido con marca en el ácido glucurónico o en la manosa, fue sometido a hidrólisis ácida parcial se obtuvo entre otros productos, un disacárido, que fue caracterizado como β -glucuronil-1,6-manosa (94,18). El acetano fue sometido a idéntico procedimiento y los productos de hidrólisis ácida parcial fueron electroforesizados en buffer G. Se observaron además de los compuestos neutros, 4 compuestos cargados (Fig.27 A), uno de los cuales migró como el disacárido (¹⁴C)glucuronil-manosa estándar (R_{UMP} = 0,9, Fig.27 B). Los otros tres compuestos cargados no fueron posteriormente analizados. El presunto β -glucuronil-manosa fue identificado como tal a juzgar por el comportamiento cromatográfico en solvente I, tanto del compuesto tal cual, como de su producto de reducción con (³H)NaBH₄, y por la liberación de manosa y ácido glucurónico luego de ser tratado con β -glucuronidasa (datos no mostrados).

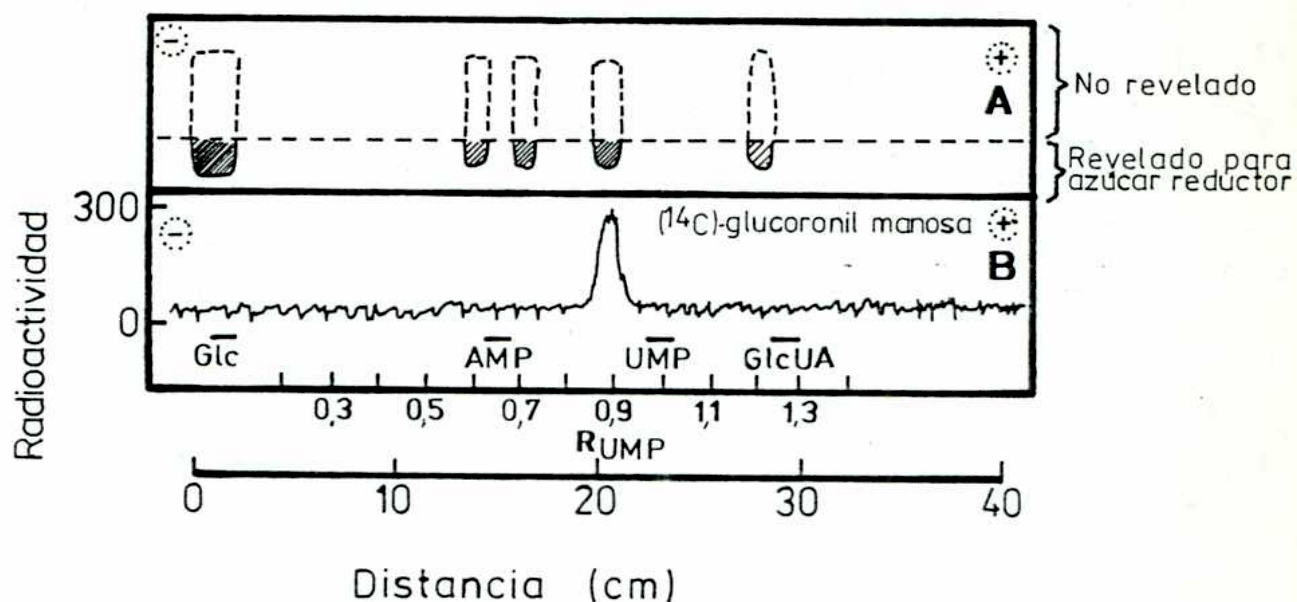


Figura 27: Compuestos cargados obtenidos por hidrólisis ácida parcial del acetano. Se efectuó una hidrólisis ácida parcial durante 1 h sobre 10 mg de polisacárido (sección 3.5.2.b). Los productos fueron electroforetizados en buffer G (A). (^{14}C)Glucuronil-manosa fue electroforetizado en las mismas condiciones (B). Este compuesto se obtuvo por hidrólisis ácida parcial como en A, a partir de (^{14}C -GlcUA)-AX₆ y se aisló por cromatografía en solvente I (94).

Nota: Como el material analizado en A era no radioactivo, se cortó la tira donde se realizó la electroforesis (o la cromatografía) longitudinalmente y se localizó la posición de los diferentes componentes revelando sólo una de ellas. Los compuestos de interés fueron eluidos de la tira no tratada, continuándose su análisis.

4.2.4.2. Aislamiento y caracterización de genciobiosa.

La fracción neutra del material obtenido por una hidrólisis ácida parcial (similar a la descrita en la sección anterior, Fig.27) fue cromatografiada en solvente I. Como se muestra en la Fig.28, el tratamiento produjo glucosa, manosa, ramosa y otros tres componentes, dos de ellos en pequeña cantidad. El compuesto que migró como la genciobiosa standard mostró ser tal a juzgar por su movilidad electroforética en buffer L, y por la movilidad electroforética en buffer M y comportamiento cromatográfico en solvente I de su producto de reducción (con NaBH_4 ó con $(^3\text{H})\text{NaBH}_4$) (Datos no mostrados). Los otros dos compuestos de menor movilidad que la genciobiosa no fueron analizados.

4.2.4.3. Aislamiento y caracterización de celobiosa

En los trabajos realizados para la obtención de genciobiosa mostrados en la sección anterior, pudo notarse la ausencia de celobiosa entre los productos neutros de la hidrólisis ácida parcial. La obtención de este disacárido se logró gracias a un aumento significativo de la cantidad de polisacárido hidrolizado (100 mg, aproximadamente unas 15 veces el necesario para la obtención de genciobiosa). La hidrólisis ácida parcial

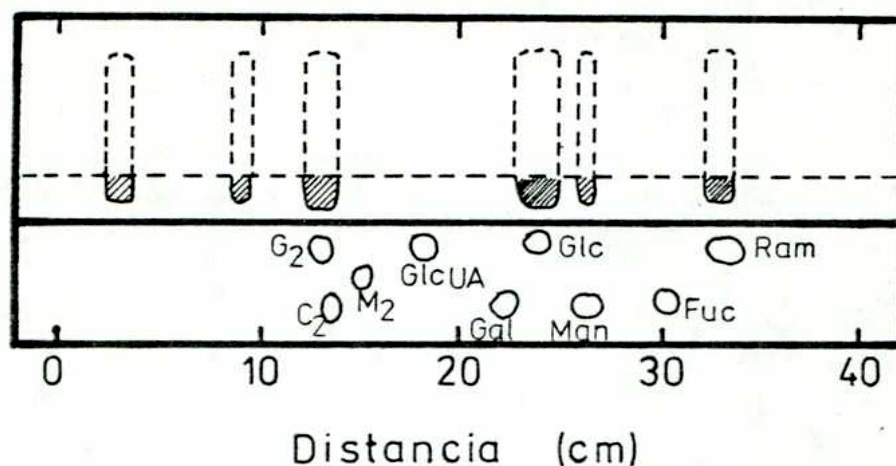


Figura 28: Compuestos neutros obtenidos por hidrólisis ácida parcial del acetano. Se efectuó una hidrólisis ácida parcial a 7 mg de acetano durante 30 min (sección 3.5.2.b). Los productos fueron electroforetizados en papel en buffer G y los compuestos neutros eluidos y cromatografiados en solvente I, revelándose aproximadamente una cuarta parte de la tira.

y la separación de los productos neutros de cargados fue realizada como se detalla al pie de la Fig.28. Los componentes neutros, junto con (¹⁴C)celobiosa (sección 3.10.) como estándar interno, fueron cromatografiados en papel en solvente I. Realizado el cromatograma, se eluyó la zona del papel correspondiente a la celobiosa radioactiva y los productos, reducidos con NaBH₄ fueron sometidos a electroforesis en buffer M, detectándose la presencia de celobiitol, que comigró con el (¹⁴C)celobiitol (Datos no mostrados)

4.2.4.4. Aislamiento y caracterización de glucosil-glucurónico

El análisis de la estructura del hexasacárido AX₆ (Fig.26) mostró que el ácido glucurónico está unido al C-6 de una manosa y que está sustituido en su C-4 por una molécula de glucosa (94). Debido a la labilidad de la unión 1-6 a la acetólisis, se pudo obtener por este tratamiento el disacárido glucosil-glucurónico (Fig.29 B). El mismo procedimiento fue aplicado al polisacárido, y como en los casos anteriores se separaron los compuestos neutros de cargados por electroforesis en buffer G (Fig.29 A). Se obtuvieron dos compuestos cargados. El compuesto de mayor movilidad mostró ser básicamente ácido glucurónico y el restante fue caracterizado como glucosil-glucurónico por su comportamiento cromatográfico en solvente I, por la migración en buffer M del compuesto tal cual y de su producto de reducción y por la liberación de ácido glucurónico y glucosa, luego de hidrólisis ácida (Datos no mostrados)

En resumen se ha determinado en el acetano la relación entre los azúcares glucosa, manosa, ramnosa y ácido glucurónico, siendo ésta similar a la del heptasacárido AX₇.

Además se han aislado y caracterizado cuatro disacáridos, dos neutros: celobiosa y genciobiosa, y dos cargados: glucuronil-manosa y glucosil-glucurónico. Estos resultados están en

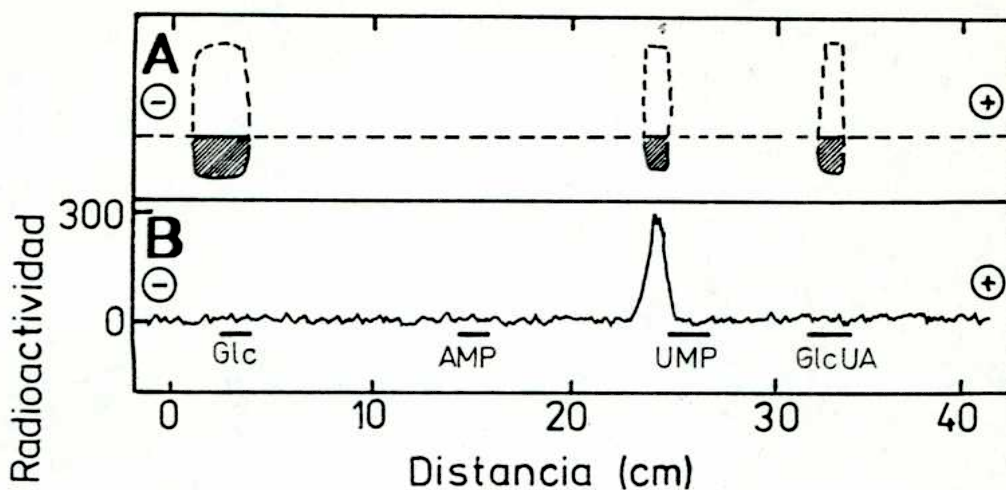


Figura 29: Compuestos cargados obtenidos por acetolisis del acetano. Se efectuó una acetolisis (sección 3.5.11.) sobre 7 mg de polisacárido. Los productos fueron electroforetizados en buffer G (A). Glucosil- (^{14}C) glucurónico fue electroforetizado como en A (B). Este compuesto se obtuvo por acetolisis como en A a partir de $(^{14}\text{C}\text{-GlcUA})\text{AX}_6$ y fue aislado por cromatografía en solvente I (118).

total concordancia con los obtenidos a partir del heptasacárido AX_7 .

La estructura del acetano no pudo ser completamente resuelta por estos métodos por lo cual se recurrió a la permetilación como se mencionó al principio de este capítulo. Si bien resta aún completar estos estudios, resultados previos obtenidos por R.O. Couso confirmaron la presencia de 2,6-di-Me-glucosa (indicando la presencia de una cadena lateral) y de 2,3,4-tri-Me-

-ramnosa (indicando que la ramnosa es el azúcar terminal de dicha cadena) entre otros productos.

El conjunto de estos resultados permite asignar al acetano la estructura que se muestra en la Fig.30.

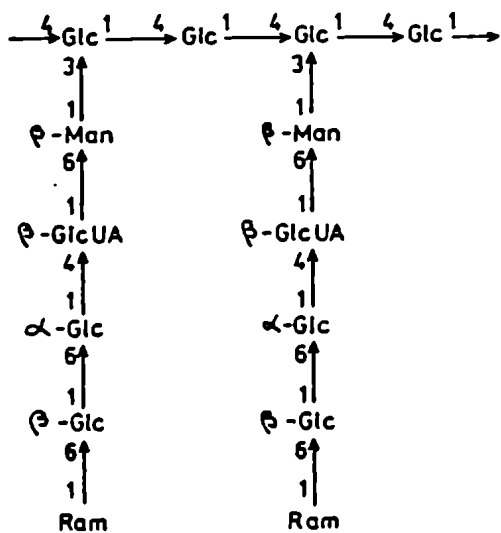


Figura 30: Estructura propuesta para el polisacárido acetano

5. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS

5.1. Evidencias

Como ya se mencionó en la sección 2.1.2. Xanthomonas campestris libera al medio de cultivo el exopolisacárido xantano, cuya estructura (Fig.31) es muy similar a la del acetano, descrita en páginas anteriores. Ambos pueden considerarse celulosas modificadas pues consisten en un esqueleto de glucosas unidas en posición β -1,4 con cadenas laterales de tres o cinco azúcares, glucosa por medio.

Esta tercera parte del trabajo consistió en investigar si a partir de los nucleótido-azúcares dadores más probables, UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico, se podía obtener formación de xantano "in vitro" y si en este proceso participaban prenil-fosfo-azúcares.

Uno de los primeros problemas encarados fue determinar si las células de Xanthomonas campestris tratadas con EDTA, producían el exopolisacárido radioactivo al ser incubadas en presencia de los respectivos nucleótido-azúcares mencionados. El exopolisacárido radioactivo se midió por coprecipitación

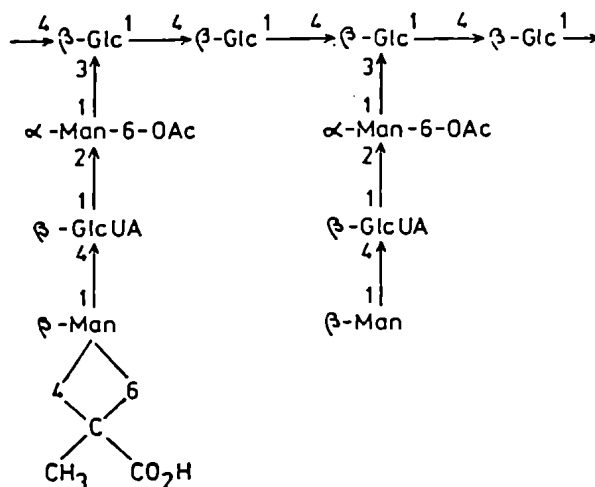


Figura 31: Unidad repetitiva propuesta para el xantano (120,121)

con xantano no radioactivo, como se describe en la sección 3.4.1.1.. Las incubaciones se realizaron a tres temperaturas diferentes (12, 20 y 30°C) en presencia de los tres nucleótido-azúcares, con uno de ellos radioactivo. Los resultados (tabla 8) fueron muy alentadores y sugirieron que efectivamente se podía sintetizar polisacárido "in vitro" ya que los tres azúcares se incorporaron al polímero. Si bien a 30°C la cantidad de (¹⁴C)glucosa, (¹⁴C)manosa ó ácido (¹⁴C)glucurónico incorporada al polisacárido fue baja, a 12 y 20°C fue 5 y 10 veces superior respectivamente.

Tabla 8: Síntesis de exopolisacárido radioactivo "in vitro" a distintas temperaturas

Nucleótidos presentes en la incubación	(^{14}C) Hexosa incorporada al polisacárido (pmoles)		
	12°C	20°C	30°C
UDP- (^{14}C) Glc, GDP-Man, UDP-GlcUA	7	18	0,5
UDP-Glc, GDP- (^{14}C) Man, UDP-GlcUA	17	29	3
UDP-Glc, GDP-Man, UDP- (^{14}C) GlcUA	12	29	3

Se realizaron incubaciones estandar con 1,1 mg de proteína a las temperaturas indicadas, durante 30 min. Donde se indica se agregó 17,1 μM de UDP- (^{14}C) Glc, 23,6 μM de GDP- (^{14}C) Man, 21,4 μM de UDP- (^{14}C) GlcUA ó 285 μM de UDP-Glc, 28,5 de GDP-Man, 28,5 μM de UDP-GlcUA. En cada caso se midió la incorporación de radioactividad al polisacárido según se describe en la sección 3.4.1.1..

5.1.1. Caracterización del producto obtenido

5.1.1.1. Filtración en columna de geles

Para tener una idea del tamaño del producto formado se recurrió a la filtración por geles. Por cromatografía en Bio-Gel A-5m se obtuvieron los perfiles mostrados en las Figs. 32, 33 y 34. El polisacárido sintetizado "in vitro", marcado

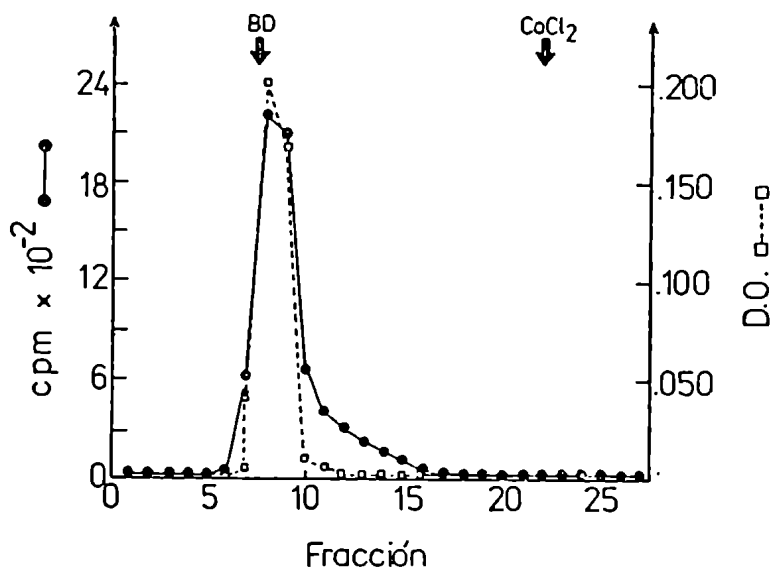


Figura 32: Filtración en tamiz molecular del producto de polimerización Polisacárido (^{14}C)Glc (8.000 cpm) obtenido com en la tabla 8 línea 1 a 20°C , fue filtrado a través de Bio-Gel A-5m (sección 3.8.2.). Cada fracción se dividió en dos alícuotas iguales para medir azúcares totales por fenol-sulfúrico (sección 3.6.) (\square) y radioactividad (\bullet).

tanto con glucosa, con manosa ó con ácido glucurónico cocromatografió con el acetano natural, correspondiendo un PM de 4 millones aproximadamente.

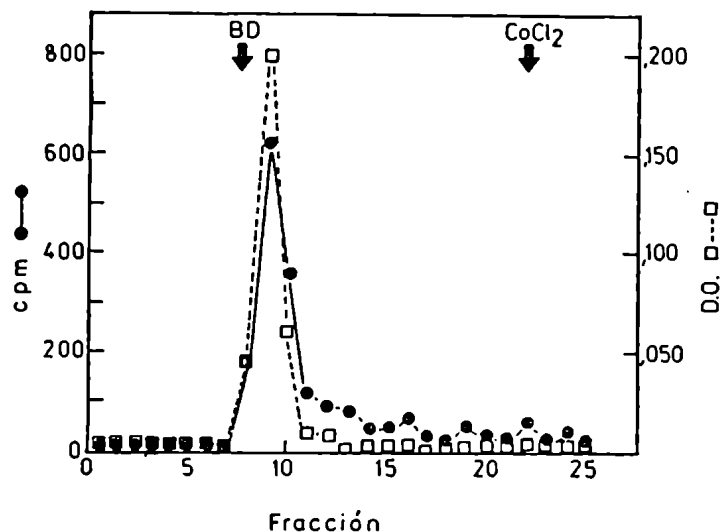


Figura 33: Filtración en tamiz molecular del producto de polimerización. Polisacárido (^{14}C)Man (4000 cpm) obtenido como en la tabla 8 línea 2, a 20°C , fue filtrado a través de Bio-Gel A-5m (sección 3.8.2.). Sobre alícuotas de cada fracción se midió azúcares totales (\square) y radioactividad (\bullet) como se indica en la Fig.32.

En los tres casos se observaron compuestos de menor tamaño, especialmente en el del ácido (^{14}C)glucurónico (Fig.34), posiblemente polisacáridos menores e intermediarios del producto final.

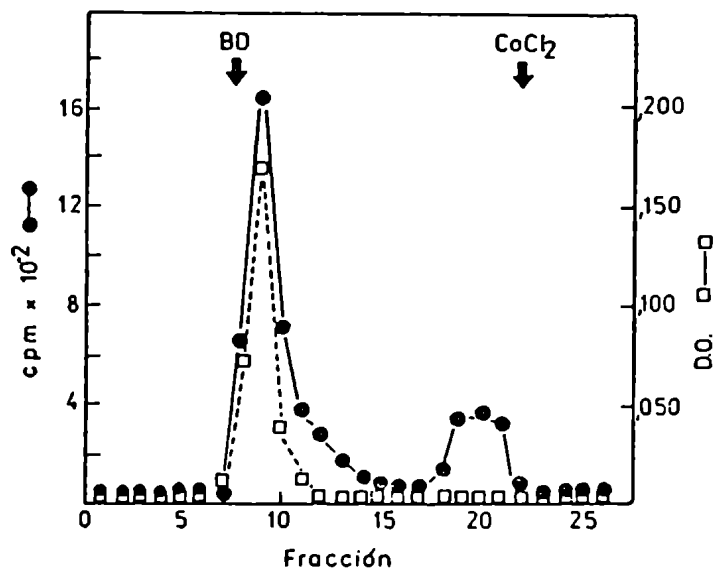


Figura 34: Filtración en tamiz molecular del producto de polimerización. Polisacárido (¹⁴C)GlcUA (6.000 cpm) obtenido como en la tabla 8 línea 3, a 20°C, fue filtrado a través de Bio-Gel A-5m (sección 3.8.2.). Sobre alícuotas de cada fracción se midió azúcares totales (□) y radioactividad (●) como se indica en la Fig.32.

5.1.1.2. Permetilación de polisacárido marcado en (¹⁴C)glucosa

Otra confirmación importante de que el producto radioactivo obtenido, que coprecipitaba y cocromatografiaba con el polisacárido nativo, correspondía a xantano era estudiar la presencia de glucosas disustituidas, correspondientes a la ra-

mificación en el carbono 3 y a la cadena principal en el carbono 4. El método de elección fue la permetilación. Con este método la glucosa en estudio debe rendir un dimetil derivado (2,6-di-Me-Glc). La otra glucosa debe rendir un trimetil derivado (2,3,6-tri-Me-Glc). El resultado de la permetilación del polisacárido obtenido "in vitro" con marca en glucosa (Fig.35) mostró que los dos compuestos esperados fueron los únicos observados y en cantidad prácticamente equimolar.

Estos resultados permitieron concluir que efectivamente se estaba sintetizando xantano "in vitro", y pasar a estudiar en detalle este proceso.

5.1.2. Evidencia sobre la participación de lípidos intermediarios en la síntesis de xantano.

El próximo punto fue aclarar si el xantano se sintetizaba sobre una cadena central de celulosa, a la cual se le agregaban ramas laterales o si en cambio se sintetizaba por la polimerización de n unidades de pentasacárido, es decir por la polimerización de sus unidades repetitivas. Por supuesto el problema planteado no se puede resolver con una incubación, pero como se muestra en la tabla 9, la formación de polisacárido requiere la presencia de los tres nucleótidos, no detectándose la formación de celulosa en presencia de UDP-glucosa.

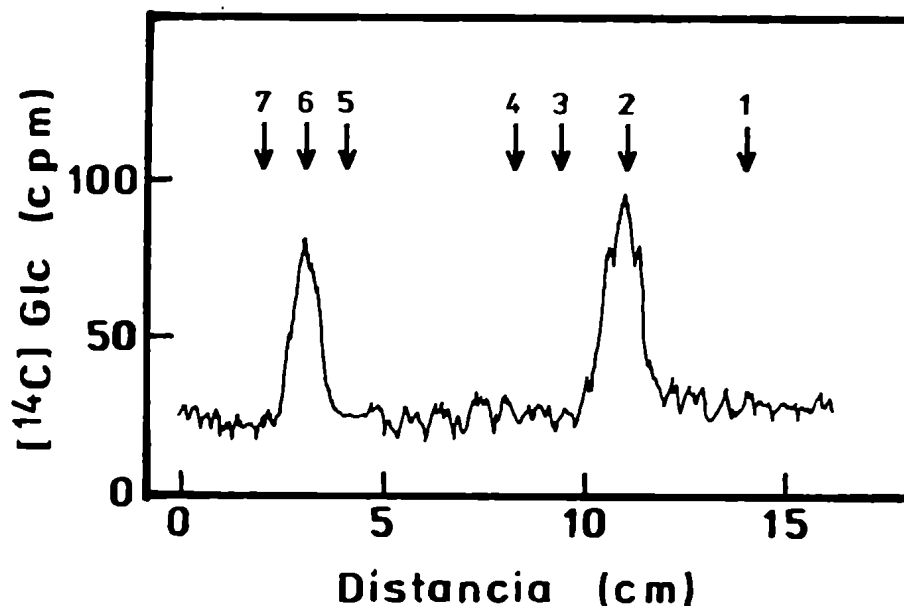


Figura 35: Permetilación del producto obtenido "in vitro". Polisacárido (^{14}C)Glc (15.000 cpm) obtenido como en la tabla 8 línea 1, a 20°C , fue sometido a permetilación (sección 3.5.12.2.). Luego de la hidrólisis ácida los productos fueron cromatografiados en placa delgada con solvente R.

Las flechas indican la posición de los estándar 1: 2,3,4,6-tetra-Me-Glc; 2: 2,3,6-tri-Me-Glc; 3: 2,4,6-tri-Me-Glc; 4: 2,3,4-tri-Me-Glc; 5: 2,4-di-Me-Glc; 6: 2,6-di-Me-Glc; 7: 4,6-di-Me-Glc.

Estos resultados sugirieron que el polisacárido se sintetizaría por la segunda alternativa, es decir por la polimerización de sus unidades repetitivas

Tabla 9: Efecto de GDP-Man y/o UDP-GlcUA en la incorporación de (¹⁴C)Glc a polisacárido.

Agregados	Cantidad de (¹⁴ C)Glc incorporada en polisacárido (pmoles)
Ninguno	0,8
GDP-Man	8,0
UDP-GlcUA	0,8
GDP-Man + UDP-GlcUA	41,5

Se realizaron incubaciones estandar con 0,4 mg de proteína, 15,7 μ M de UDP-(¹⁴C)Glc y donde se indica 71 μ M de GDP-Man y/o 35,7 μ M de UDP-GlcUA. Se incubó 1 h a 20°C y se determinó la formación de polisacárido como se indica en la sección 3.4.1.1.

Por lo tanto era casi evidente que debía existir un "carrier" que activara las unidades repetitivas. Este es justamente uno de los roles asignados a los lípidos intermediarios.

En los próximos capítulos se detallarán los resultados obtenidos al incubar las preparaciones enzimáticas en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y/o UDP-glucurónico. Estos resultados condujeron a la confirmación de la hipótesis planteada.

5.2. Incorporación de glucosa a material liposoluble

La unidad repetitiva del xantano contiene glucosa, manosa y ácido glucurónico en relación 2:2:1 (Fig.31) (120,121). Si la síntesis del polímero se realizara a través de la participación de lípido-azúcares, como surge de los datos previos mencionados en la sección precedente, pensamos que las unidades repetitivas "fisiológicas" posibles, podían ser dos (Fig.36). La diferencia entre ellas estriba en la posición de la cadena lateral: en una de ellas está unida a la glucosa no reductora, en cambio en la otra lo está sobre la glucosa reductora.

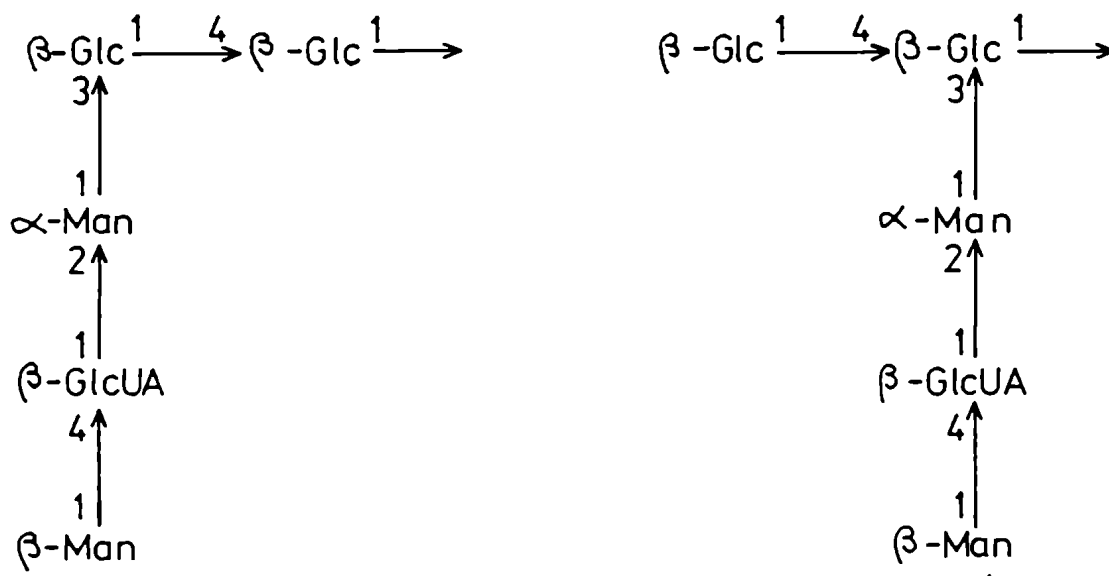


Figura 36: Posibles unidades repetitivas "fisiológicas" del xantano

El mismo producto final resulta de la polimerización de cualquiera de las dos unidades repetitivas.

Como en ambas unidades el extremo reductor, al cual estaría unido el lípido, es una molécula de glucosa, se comenzó estos estudios incubando el preparado enzimático de X. campes-
tris en presencia de UDP-glucosa radioactivo.

Como primer intento se efectuaron incubaciones a diferentes temperaturas, pues en el laboratorio se sabía que trabajando "in vitro", el incubar a temperaturas menores a la óptima para el crecimiento bacteriano, tenía por efecto acumular lípidos intermediarios (sección 4.1.1.1., 75, 118). Como se muestra en la tabla 10 la incorporación de radioactividad en

Tabla 10: Incorporación de glucosa a material liposoluble

Exp	Temperatura de incubación (°C)	(¹⁴ C)Glc incorporada en extracto 1203 (pmoles)
1	0	12
2	12	55
3	20	50
4	30	25

Las condiciones de incubación fueron standard. Se utilizaron en cada incubación UDP-(¹⁴C)Glc (17 µM) y enzima (1,1 mg). Se incubó durante 30 min a las temperaturas indicadas, y luego se procedió según el método D.

extracto 1203 fue máxima a 12 y 20°C, disminuyendo en un 50 y 75% a 30 y 0°C respectivamente.

Por otra parte, a 12°C la incorporación de (¹⁴C)glucosa a material liposoluble en función del tiempo de incubación mostró ser aproximadamente lineal hasta los 30 min de incubación (Fig.37)

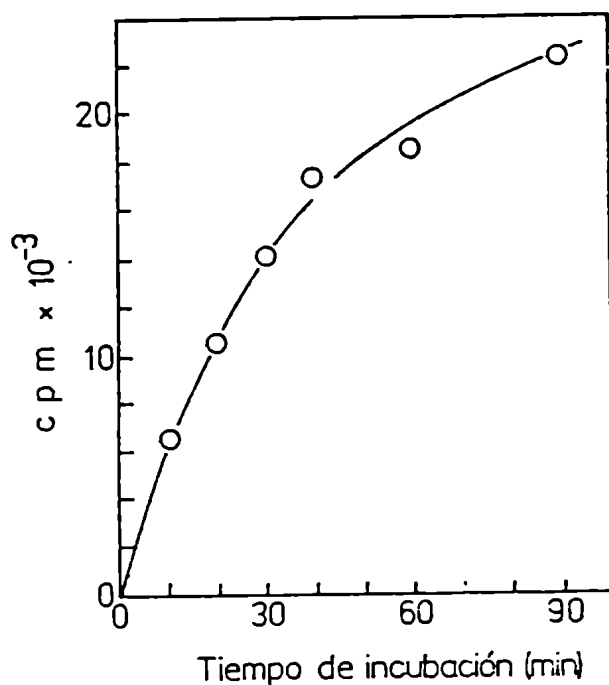


Figura 37: Incorporación de (¹⁴C)Glc a material liposoluble en función del tiempo. Las condiciones de incubación fueron similares a las descritas en la tabla 10, salvo que se realizaron a 12°C y durante los tiempos indicados. Se procesó por el método D y se midió la radioactividad incorporada en extracto 1203.

5.2.1. Análisis del material liposoluble marcado con (^{14}C) glucosa.

El análisis del extracto 1203 se realizó por cromatografía en columna de DEAE-celulosa y por cromatografía en papel en solventes E e I.

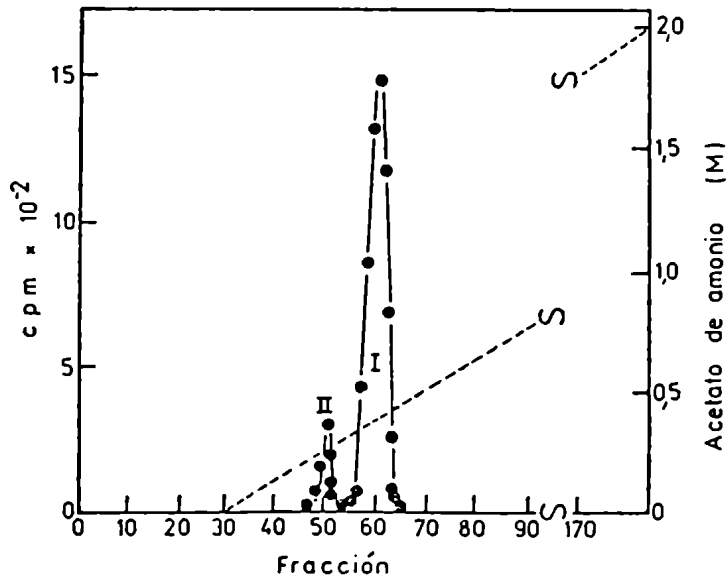


Figura 38: Cromatografía en DEAE-celulosa del material liposoluble marcado con glucosa. El material liposoluble se preparó mediante una incubación estandar incrementada cuatro veces (vol. total 280 μl) con 17 μM de UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ y 4,4 mg de prot. Se incubó 30 min a 12°C y se procesó según el método E. Se cromatografiaron en columna de DEAE-celulosa (sección 3.8.1.1.) 20.000 cpm del extracto butanólico. Se contó radioactividad en alícuotas de 0,75 ml de cada fracción.

La cromatografía en columna de DEAE-celulosa en CH_3OH 99% con un gradiente de AcONH_4 en CH_3OH 99% ha sido utilizada para separar azúcares-P-lípidos de azúcares-PP-lípidos y estos últimos entre sí, dependiendo del tamaño del oligosacárido (82).

Del análisis del perfil cromatográfico surge que no hay ningún compuesto neutro y que existen dos compuestos cargados en distinta proporción: un pico principal (compuesto I) que se eluyó con AcONH_4 0,4 M y un pico menor (compuesto II) que lo hizo con 0,25 M de la sal (Fig.38). Estas posiciones de elución corresponden a un lípido difosfato azúcar y a un lípido monofosfato azúcar respectivamente (82).

Además el extracto 1203 se analizó, como se mencionó más arriba, por cromatografía en solventes I y E (Fig.39 A y B respectivamente).

La movilidad en solvente I (R_f : 0,87) confirma la naturaleza lipídica del material analizado y descarta la posibilidad de artificios, como por ejemplo azúcares libres arrastrados a la fase orgánica.

El perfil cromatográfico en el solvente E denota la presencia de un pico principal, que posee la misma movilidad que el estándar de celobiosa fosfato cíclico (C_2Pc). La labilidad al medio alcalino sugirió la presencia de una unión difosfato entre el lípido y el azúcar, hecho que es concordante con la posición en la columna de DEAE-celulosa (0,4 M de AcONH_4).

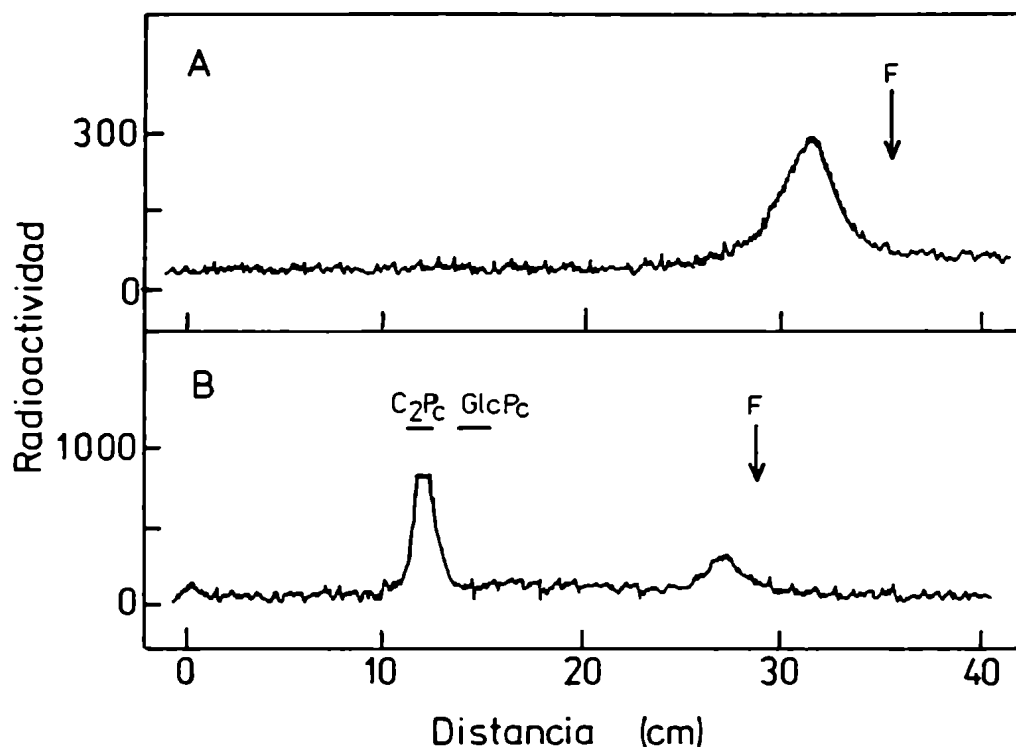


Figura 39: Cromatografía en papel del material liposoluble marcado con glucosa. Se preparó el extracto 1203 en las condiciones de la Fig.37 (tiempo de incubación 30 min) y se cromatografió en solvente I (A) y en solvente E (B). C_2Pc se obtuvo como se indica en la sección 3.10.

En la cromatografía desarrollada con solvente E se observa además del pico principal un pico menor, cuya movilidad coincide con la de los lípido monofosfato azúcares (82). Se pensó que este compuesto podía ser el que se eluyó con $AcONH_4$ 0,25 M en la columna de DEAE-celulosa (compuesto II, Fig 38).

Esto se confirmó reuniendo las fracciones 48 a 53 de la columna y sometiéndolas a cromatografía en papel en solvente E. Se observó un único pico que migró cerca del frente (datos no mostrados). Este compuesto no fue posteriormente analizado.

5.2.2. Estudio estructural del compuesto I

La relación de incorporación de radioactividad entre los compuestos I y II dependía del preparado enzimático utilizado. En algunos casos sólo se obtuvo compuesto I y aprovechando este hecho se lo estudió obteniéndolo a partir de una preparación enzimática de este tipo sin posterior purificación.

5.2.2.1. Hidrólisis ácida suave: Caracterización de celobiosa

El compuesto I resultó ser sensible a la hidrólisis ácida suave, liberando un producto soluble en agua, que fue caracterizado como celobiosa, a juzgar por su movilidad en cromatografía en papel con solvente I (Fig.40 A) y por su movilidad electroforética en buffer Q (Fig.40 B). Reducido con NaBH_4 y sometido a electroforesis en buffer M, mostró poseer la misma movilidad electroforética del celobitol (agregado como standard interno) (Fig.40 C).

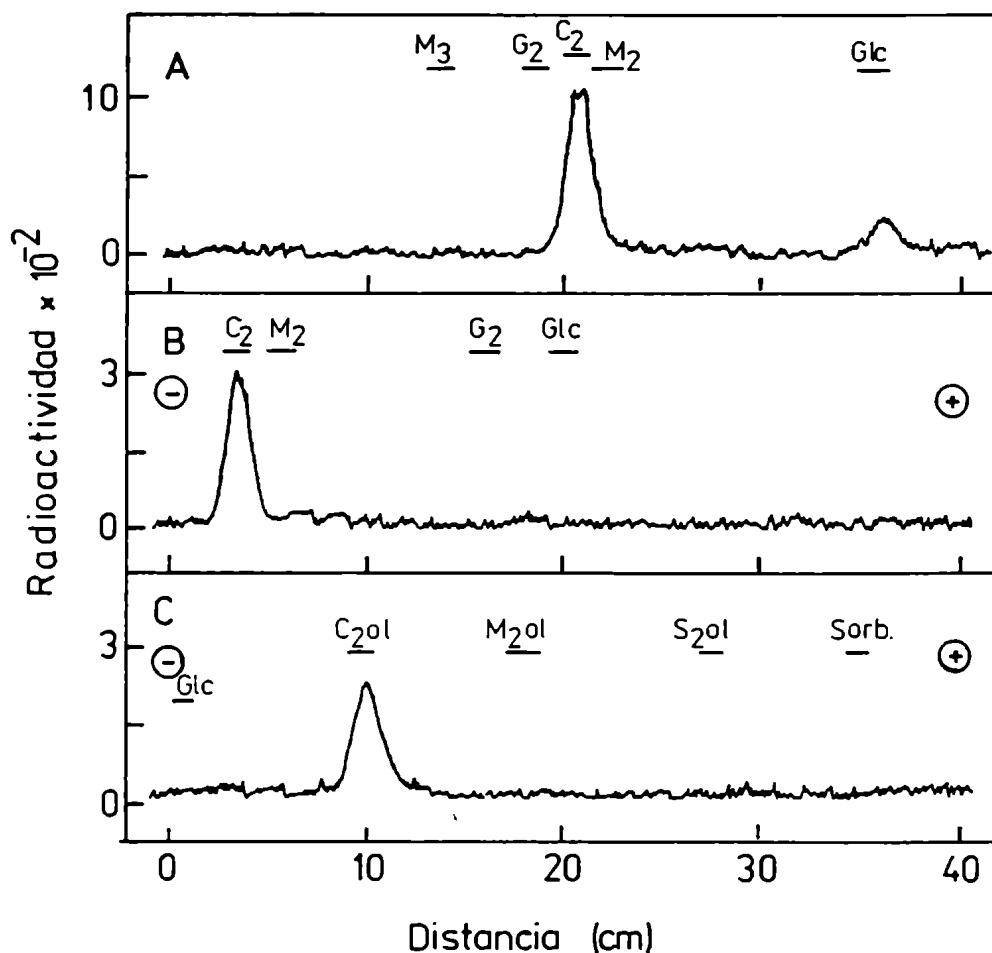


Figura 40: Análisis del producto de hidrólisis ácida suave del compuesto I. El extracto 1203 (preparado como se indica en la Fig. 37, tiempo de incubación 30 min) se sometió a hidrólisis ácida suave (sección 3.5.1.) y los productos se cromatografiaron en solvente I (A). Se eluyó de A el pico que cromatografió como C_2 y el eluido se dividió en dos alícuotas: una se electroforetizó en buffer Q (B) y la restante se electroforetizó en buffer M (C) luego de ser reducida con $NaBH_4$ (sección 3.5.9.1.).

5.2.2.2. Confirmación de la unión difosfato entre la porción lipídica y la celobiosa

Cuando el extracto 1203 se analizó por cromatografía en solvente E se obtuvo un compuesto con la misma movilidad que el éster fosfórico cíclico de la celobiosa (Fig.39 B). El com-

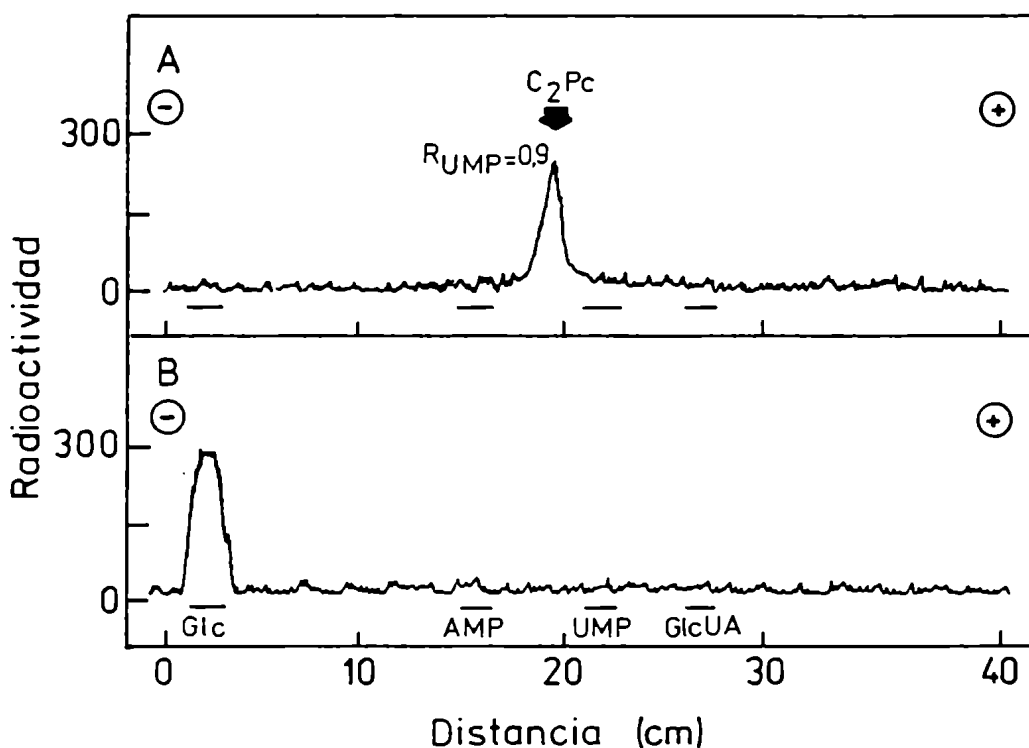


Figura 41: Análisis del producto de degradación alcalina. Se preparó extracto 1203 en las condiciones de la Fig. 37 (tiempo de incubación 30 min) y se cromatografió en solvente E. El pico que cromatografió como C_2Pc se eluyó y se dividió en dos alícuotas. Una se electroforetizó tal cual en buffer G (A). La otra se hidrolizó con HCl 0,1N durante 10 min a 100°C, se trató con fosfatasa alcalina (sección 3.7.1.) y electroforetizó en buffer G (B). C_2Pc se obtuvo como se indica en la sección 3.10.

puesto fue caracterizado por su movilidad electroforética en buffer G (R_{UMp} : 0,9) y por su sensibilidad a la fosfatasa alcalina luego de hidrólisis ácida (Fig.41 A y B respectivamente). El tratamiento ácido abre el éster fosfórico cíclico, produciéndose el oligosacárido-2-fosfato. La fosfatasa alcalina puede entonces actuar para dar el oligosacárido libre, que fue caracterizado como celobiosa, empleando los mismos criterios utilizados con el producto de la hidrólisis ácida suave (sección 5.2.2.1.). La formación de ésteres fosfóricos cíclicos en estas condiciones es característica de la unión difosfato (82) quedando así reforzada su presencia en este derivado.

5.2.2.3. Tratamiento con fenol 50%

El tratamiento con fenol permite obtener alguna información respecto de la estructura de los prenil-fosfo-azúcares. Mientras que los compuestos que poseen un prenil α -saturado (del tipo de los dolicoles) son resistentes al tratamiento, los α -insaturados se rompen entre el prenil y el fosfato adyacente, liberando azúcar-fosfato o azúcar-difosfato según corresponda (82). Además la vida media de los compuestos sujetos al tratamiento permite obtener información acerca del tipo de unión. Mientras los monofosfatos poseen una vida media de aproximadamente una hora (75,82), los difosfatos poseen una vida media de alrededor de 5 minutos (75).

El comportamiento del compuesto I (Fig.42) resultó ser, como se esperaba, el de un lípido difosfato azúcar, con un lípido del tipo de los prenoles α -insaturados o alílicos.

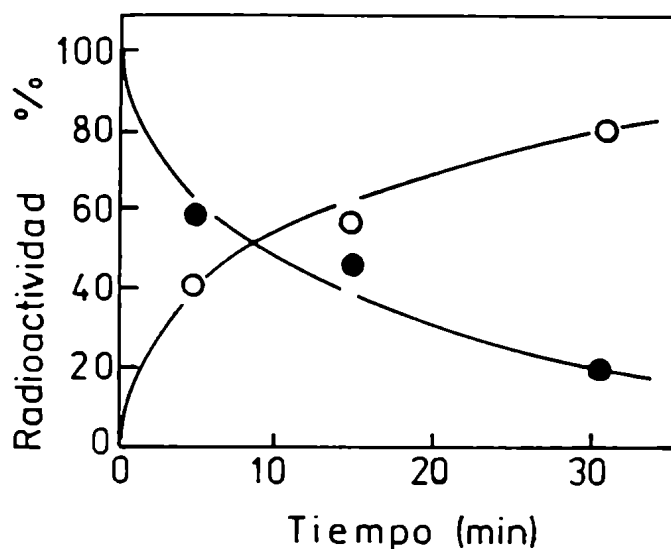


Figura 42: Tratamiento con fenol 50%. El compuesto I (8.800 cpm) obtenido de una incubación estándar con UDP-(^{14}C)Glc (libre de compuesto II) se trató con fenol 50% (sección 3.5.4.) durante los tiempos indicados. Se midió radioactividad en la fase acuosa (o-o) y en la fase fenólica (●-●).

Se confirmó que el producto hidrosoluble de dicho tratamiento era un azúcar difosfato por su movilidad en electroforesis y por su sensibilidad a la fosfatasa alcalina y a la hidrólisis ácida.

Una parte del producto hidrosoluble obtenido se sometió

a electroforesis en buffer N, donde migró más que celobiosa-2-fosfato y que el éster fosfórico cíclico de la celobiosa, descartando que se tratara de alguno de estos dos compuestos (Fig.43).

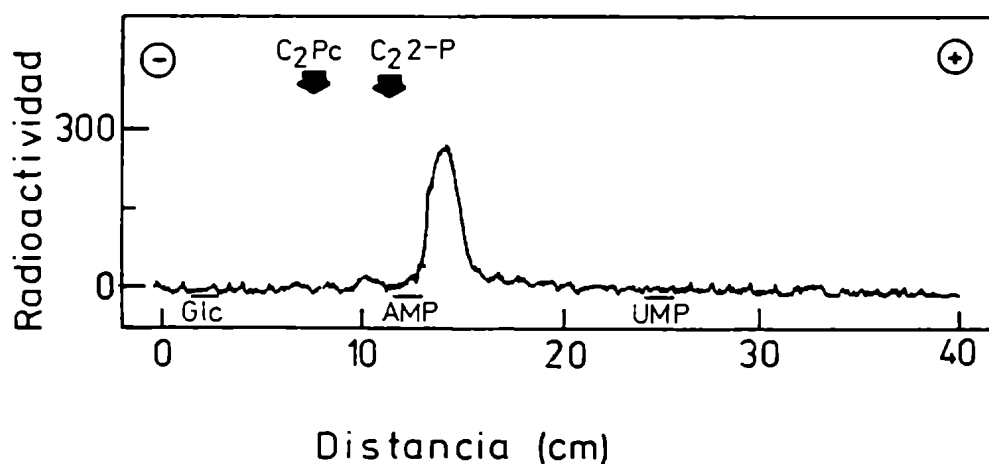


Figura 43: Electroforesis en buffer N del producto hidrosoluble obtenido por tratamiento con fenol del compuesto I.

El resto de la fase acuosa se dividió en dos alícuotas. A una de ellas se la trató con fosfatasa alcalina y a la otra se la hidrolizó en medio ácido (HCl 0,1N, 10 min, 100°C). El producto de ambos tratamientos se sometió a electroforesis en buffer N, comportándose ambos como productos neutros. Eluidos

y cromatografiados en solvente I sus movilidades coincidieron con celobiosa standard (datos no mostrados). Estos resultados confirmaron que unido al prenoI en el compuesto I había celobiosa-1-difosfato.

5.2.2.4. Reducción catalítica

La labilidad del compuesto I al tratamiento con fenol sugirió la presencia de un prenoI del tipo alílico (α -insaturado). Con el objeto de obtener información adicional acerca de la naturaleza del prenoI, el compuesto I fue sometido a reducción catalítica con hidrógeno. En este método los compuestos se rompen de manera similar al tratamiento con fenol, es decir los α -saturados son resistentes y los α -insaturados clivan entre el prenoI y el fosfato adyacente (75,129).

Los resultados indican que el compuesto I fue degradado en un 90% en 15 min de tratamiento a temperatura ambiente, valor similar al encontrado para glucosa difosfato prenoI de Acetobacter xylinum (75). En forma similar al tratamiento con fenol se pudo demostrar la presencia de celobiosa-1-difosfato como producto de ruptura. Este resultado concuerda con el obtenido por el tratamiento alcalino y sugiere que la porción lipídica del compuesto I sería un prenoI α -insaturado.

En resumen en este capítulo ha quedado establecido la

identidad de un probable eslabón en la síntesis del xantano, celobiosa difosfato preno1. Es de hacer notar que en los experimentos realizados no ha sido detectada la presencia de glucosa difosfato preno1. Este compuesto es un precursor obligado en la síntesis de celobiosa difosfato preno1, como quedó claramente demostrado utilizando el sistema de A. xylinum (75). Pero no se hicieron mayores intentos para demostrar su presencia. A 0°C ya se formaba celobiosa-PP-preno1 a diferencia del sistema de A. xylinum (sección 4.1.1.1.).

5.3. Incorporación de manosa a material liposoluble

En el capítulo anterior se mostró que preparados enzimáticos de X. campestris son capaces de sintetizar celobiosa difosfato preñol. Teniendo en cuenta la estructura de la unidad repetitiva del xantano (Fig.31, sección 5.1.) el siguiente paso era determinar si esos preparados eran capaces de sintetizar manosilcelobiosa difosfato preñol. Por lo tanto, empleando un sistema de incubación estándar, se utilizó GDP-manosa radioactivo como dador sustrato dador, en presencia de concentraciones crecientes de UDP-glucosa no radioactivo. Se obtuvo una clara activación de la marca incorporada en material soluble en 1203, llegándose a una meseta con una concentración de aproximadamente 200 μM de UDP-glucosa (Fig.44).

5.3.1. Análisis del material liposoluble marcado con (^{14}C)manosa

El análisis del material liposoluble marcado con (^{14}C)manosa se realizó empleando como control β -manosa-1,3- α -celobiosa difosfato preñol ($\text{AX}_3\text{-PP-preñol}$), obtenido de A. xylinum (sección 3.10. y Fig.18). Este lípido trisacárido, así como sus derivados, el trisacárido libre AX_3 , y el respectivo éster fosfórico cíclico AX_3Pc , tuvieron indudable valor como compues-

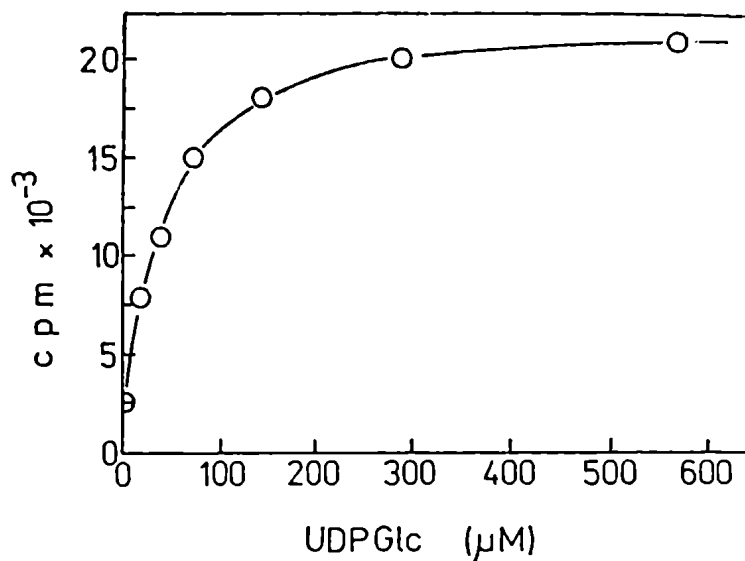


Figura 44: Incorporación de (¹⁴C)manosa en función de la concentración de UDP-Glc. Se efectuaron incubaciones estandar a 12°C durante 30 min, empleando 0,4 mg de prot., 17,1 μM de GDP-(¹⁴C)Man (AE: 216 Ci/mol) y las cantidades de UDP-Glc que se indican. Se procesó por el método D y se midió radioactividad en alícuotas del extracto 1203.

tos de referencia.

El extracto 1203, obtenido en incubaciones con enzima de X. campestris y en presencia de GDP-(¹⁴C)manosa y UDP-glucosa, fue analizado por cromatografía en papel en solvente I (Fig. 45). En este sistema se observó la presencia de un pico principal que migró cerca del frente (R_f 0,8). Esta movilidad, similar a la del AX₃-PP-prenol (118) confirma la naturaleza li-

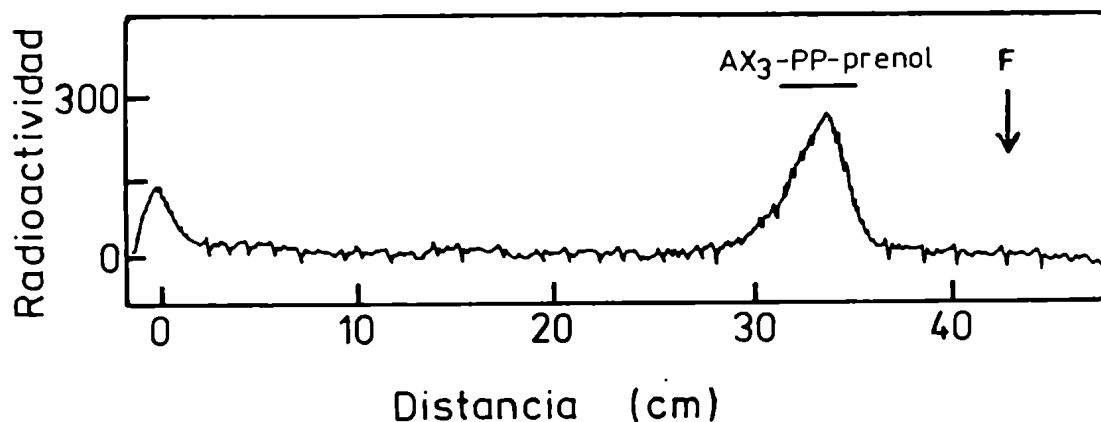


Figura 45: Análisis del extracto 1203 marcado en manosa. Extracto 1203 obtenido en las mismas condiciones de la Fig. 44, con 285 μM de UDP-Glc, se cromatografió en solvente I. AX_3 -PP-prenol estándar fue obtenido como se indica en la sección 3.10.

pídica del compuesto analizado.

Se observó además, un segundo pico en cantidad menor que no migró. Esta posición descartó que este compuesto fuera de carácter lipídico.

Para estudiar la naturaleza de los compuestos solubles en solvente 1203, se los sometió a hidrólisis ácida suave y alcalina suave. Por el primero de los tratamientos mencionados toda la radioactividad se convirtió en hidrosoluble, la cual se analizó por cromatografía en papel en solvente I. Como se

muestra en la Fig.46 A, se obtuvo un producto principal que posee el mismo comportamiento cromatográfico que el trisacárido AX_3 (es decir manosilcelobiosa). Por el segundo tratamiento (cromatografía en solvente F) se obtuvo también principalmente un compuesto, con la misma movilidad del éster cíclico del AX_3 (Fig.46 B)

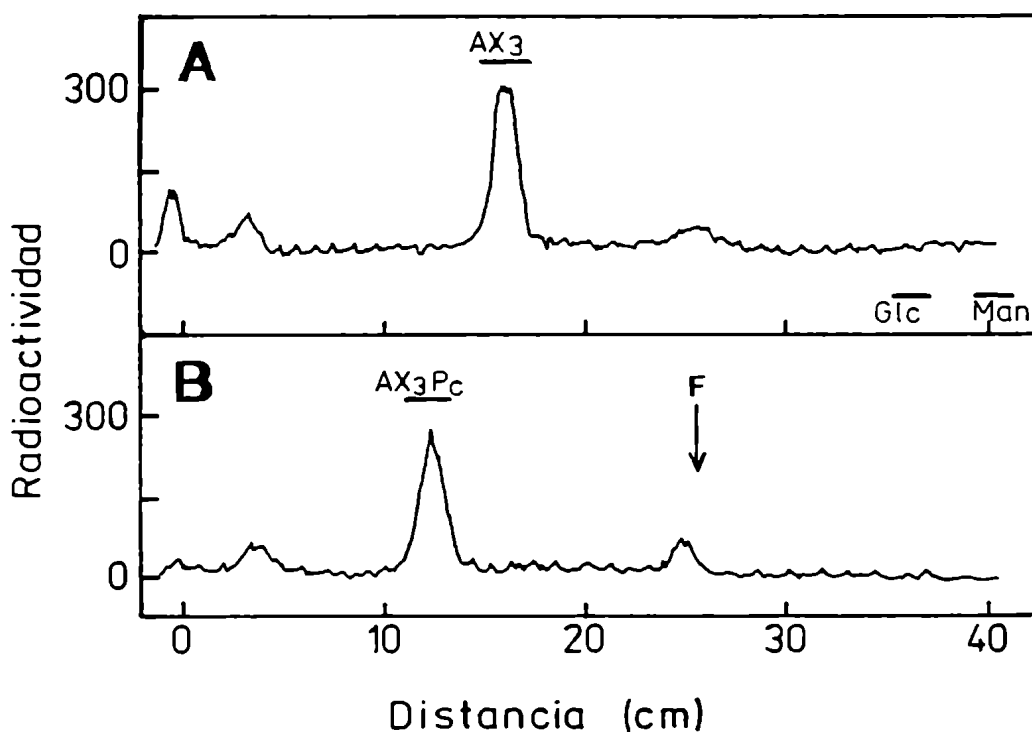


Figura 46: Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis ácida y alcalina suave. Se preparó extracto 1203 en las mismas condiciones de la Fig. 45 y se tomaron dos alícuotas. Una de ellas se sometió a hidrólisis ácida suave y los productos hidrosolubles se cromatografiaron en solvente I (A). La restante alícuota se cromatografió directamente en solvente F (B). AX_3 y AX_3Pc se obtuvieron como se indica en la sección 3.10.

Estos resultados confirmaron la naturaleza lipídica del principal compuesto soluble en solvente 1203 e indican además que se trataría de un trisacárido difosfato lípido.

Como era de esperar ambos tratamientos produjeron además otros compuestos (Fig.46 A y B). Dos de ellos, que se desplazaron aproximadamente 4 cm en ambas cromatografías corresponden a derivados de un pentasacárido difosfato lípido, el cual será objeto de un detallado análisis en la próxima sección . Se produjeron además otros dos compuestos, uno que no se desplazó en cromatografía en solvente I y el otro que lo hizo con el frente en la cromatografía en solvente F. Estos productos están relacionados con el compuesto que no migró en la cromatografía en solvente I del extracto 1203 en la Fig.45, y serán estudiados en la sección 5.9..

5.3.2. Estudio de la unión entre el trisacárido y la porción lipídica

El principal producto obtenido por tratamiento alcalino suave (cromatografía en solvente F, Fig.46 B) del extracto 1203 fue eluido y caracterizado como trisacárido fosfato cíclico por su movilidad electroforética en buffer G (idéntica al AX₃Pc, Fig.47 A) y por su insensibilidad a la fosfatasa alcalina (Fig.47 B) a menos que fuera sometido previamente a una hidrólisis ácida (HCl 0,1N, 10 min, 100°C) (Fig.47 C y D).

El compuesto neutro así obtenido tuvo el mismo comportamiento cromatográfico en solvente I que el trisacárido obtenido por hidrólisis ácida suave (Fig.47 E).

El compuesto neutro que aparece en la Fig.47 C se caracterizó como trisacárido libre. Su presencia es debida a que el medio básico que produce el éster fosfórico cíclico, puede en parte provocar la apertura del ciclo, y dar algo de oligosacárido-2-P, el cual es sustrato de la fosfatasa alcalina.

5.3.3. Obtención de trisacárido difosfato lípido marcado con (^{14}C)glucosa

Si la suposición era correcta, es decir el trisacárido era manosilcelobiosa, se debería poder obtener un compuesto con las mismas propiedades pero con marca en glucosa. Con este fin, el preparado enzimático se incubó con UDP-(^{14}C)glucosa y GDP-manosa. El análisis de la radioactividad incorporada en extracto 1203 muestra la presencia de un compuesto con las mismas propiedades que el (^{14}C -Man)trisacárido difosfato lípido, a juzgar por los resultados obtenidos por cromatografía en solvente I del producto hidrosoluble de la hidrólisis ácida suave (Fig.48 A), por cromatografía en solvente E del extracto sin tratar (Fig.48 B) y por electroforesis del éster fosfato cíclico derivado del tratamiento alcalino suave (Fig.48 C).

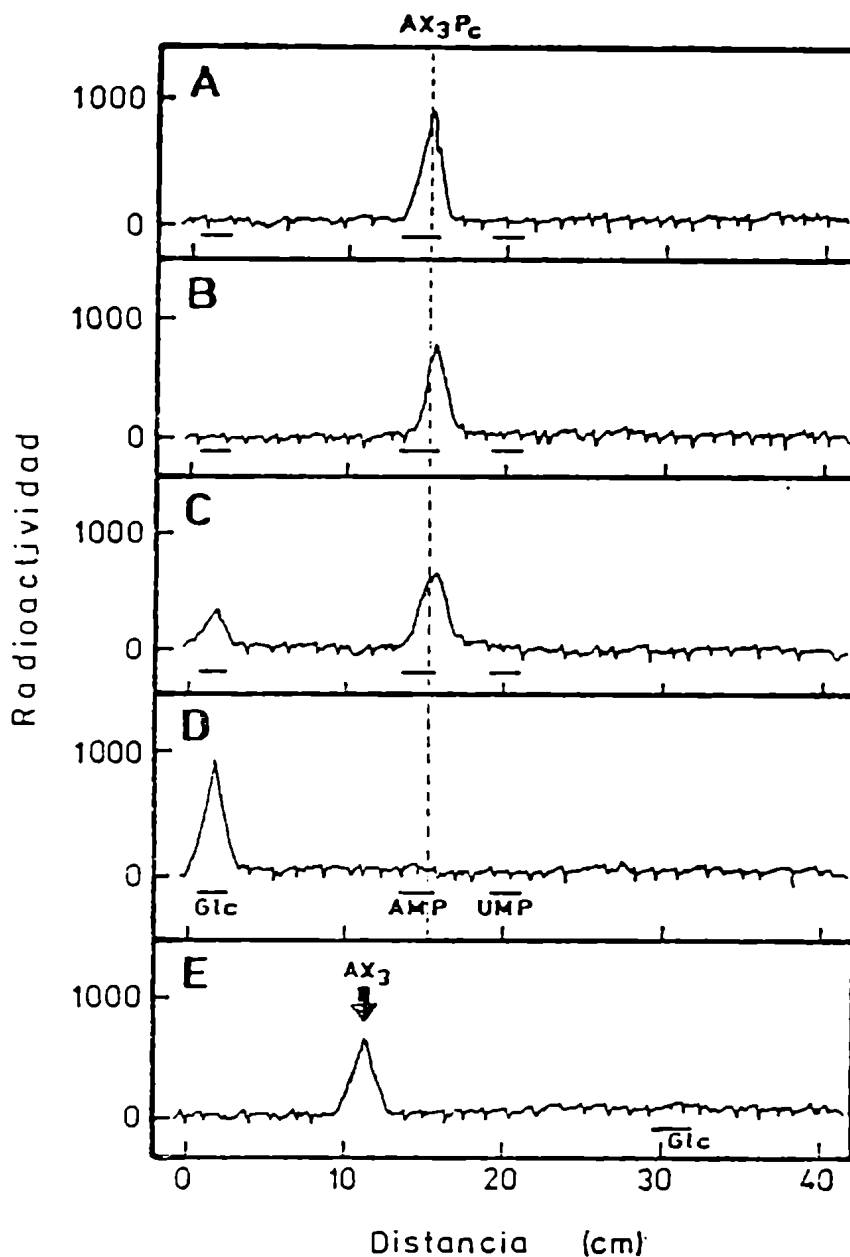


Figura 47: Caracterización del éster cíclico del trisacárido. Extracto 1203 obtenido a partir de GDP- (^{14}C) Man y UDP-Glc en las condiciones de la Fig. 45 se cromatografió en solvente F. El único producto obtenido se eluyó de dicha cromatografía, se dividió en cuatro alícuotas y se electroforizó en buffer G luego de los siguientes tratamientos:

- A. Sin tratar
- B. Hidrólisis ácida (pH 1, 10 min, 100°C)
- C. Fosfatasa alcalina (sección 3.7.1.)
- D. Hidrólisis ácida (como en B) + fosfatasa alcalina.

El producto neutro de D fue eluido y cromatografiado en papel con solvente I (E).

Estos resultados confirman que el trisacárido está formado por glucosa y manosa. Decidimos entonces estudiar la síntesis del trisacárido difosfato lípido utilizando celobiosa difosfato prenil como precursor.

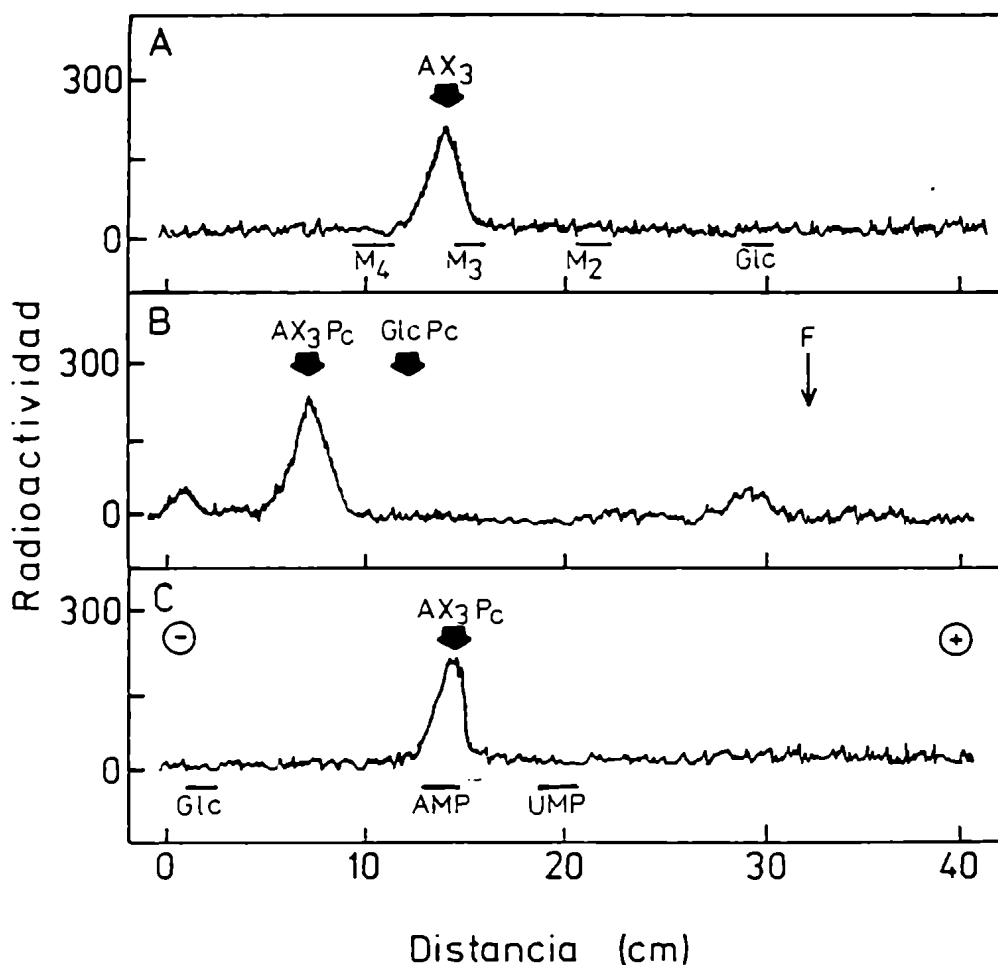


Figura 48: Análisis del producto obtenido con UDP-(¹⁴C)Glc y GDP-Man. Se efectuó una incubación estándar a 12°C durante 30 min, empleando 0,4 mg de prot., 17 μM de UDP-(¹⁴C)Glc (AE: 196 Ci/mol) y 36 μM de GDP-Man. Se procesó por el método D y una alícuota del extracto 1203 se sometió a hidrólisis ácida suave. El producto de la misma se cromatografió en papel en solvente I (A). El resto del extracto 1203 se cromatografió en solvente E (B). El producto de (B) se eluyó y se electroforesizó en buffer G (C). AX₃ y AX₃Pc se obtuvieron como se indica en la sección 3.10.

5.3.4. Celobiosa difosfato prenil como precursor de trisacárido difosfato prenil

Para estudiar si celobiosa difosfato prenil era precursor de trisacárido difosfato lípido se efectuó una incubación en dos etapas. En una primera incubación se sintetizó (^{14}C)celobiosa difosfato prenil y, luego de eliminar el exceso de UDP-(^{14}C)glucosa, se estudió la formación de productos en presencia y en ausencia de GDP-manosa. Puede apreciarse en la Fig.49 que (^{14}C)celobiosa difosfato prenil acumulado en la primera incubación (cuadro A), permaneció inalterado al reincubarlo sin ningún agregado (cuadro B), pero se transformó totalmente en manosil-(^{14}C)celobiosa difosfato prenil al reincubarlo en presencia de GDP-manosa (cuadro C). Confirmando así que el celobiosa difosfato prenil era capaz de aceptar una molécula de manosa, para formar manosilcelobiosa difosfato prenil.

5.3.5. Estructura del trisacárido

5.3.5.1. Estudio de la unión manosa-celobiosa

En la estructura propuesta para el xantano (Fig.31, sección 5.1.) la manosa interna está unida a carbono 3 de una glucosa. Se debía pues determinar si en el trisacárido obtenido

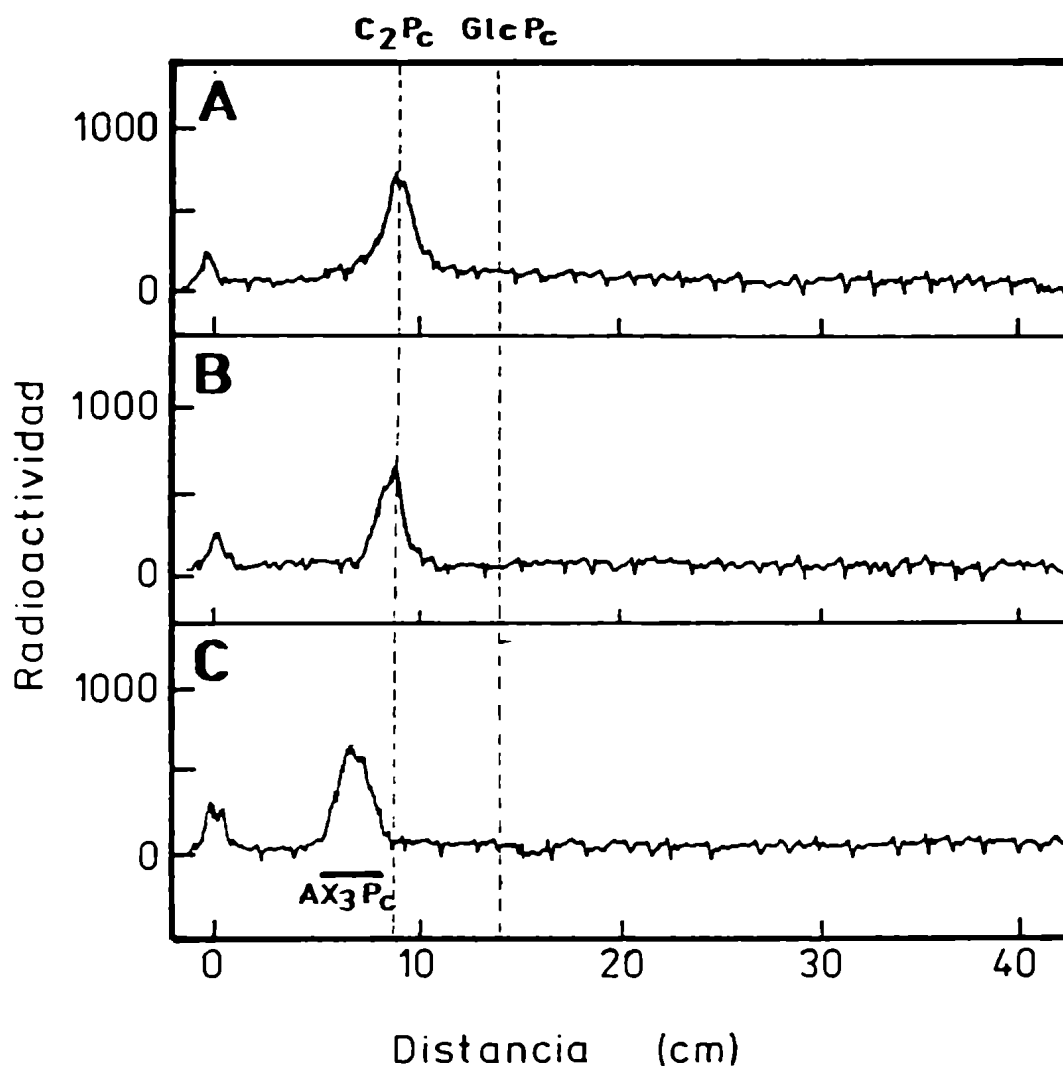


Figura 49: Formación de trisacárido-PP-prenol a partir de celobiosa-PP-prenol. Se realizó una incubación en dos etapas según el método F, en un volumen final de 0,21 ml y en presencia de $17 \mu M$ de UDP- $(^{14}C)Glc$ (AE: 196 Ci/mol) y 3,3 mg de enzima. Luego del lavado con buffer la resuspensión se dividió en tres alícuotas iguales. Una no se reincubó (A). Otra se reincubó sin adiciones (B) y a la tercera se le agregó GDP-Man ($36 \mu M$) y se reincubó junto con B (C). Ambas incubaciones se realizaron a $12^\circ C$ durante 30 min. Los extractos 1203 se cromatografiaron en solvente E. C_2Pc y AX_3Pc se obtuvieron como se indica en la sección 3.10.

"in vitro", la manosa estaba unida también al carbono 3 de una glucosa y además en cual de las glucosas de la celobiosa se establecía la unión. Es decir se debía determinar si el trisacárido unido al lípido era lineal o ramificado. La importancia de este dato estructural radica en que su conocimiento daría un primer indicio sobre cual de las dos unidades repetitivas fisiológicas posibles (Fig.36, sección 5.2.) era la correcta.

Para lograr nuestro propósito se recurrió al tratamiento con periodato que ya se había probado con éxito en el estudio de la estructura del AX₃ (75). El procedimiento, resumido en la Fig.50, involucra someter a tratamiento con periodato al trisacárido-1,2-fosfato cíclico marcado en ambas glucosas.

La glucosa reductora del trisacárido se encuentra protegida del ataque por periodato por la presencia del fosfato cíclico y por estar el carbono 4 involucrado en la unión con la otra glucosa. La glucosa no reductora se encontraría protegida de la oxidación únicamente si la manosa se encuentra unida a ella en posición 1→3 (alternativa A), como ocurre en el polisacárido. Por lo tanto si la manosa está unida en posición 1→3 a la glucosa no reductora de la celobiosa, formando un trisacárido lineal, el tratamiento con periodato sobre manosil-(¹⁴C)celobiosa-1,2-fosfato cíclico debería dejar la celobiosa intacta. Por posterior hidrólisis con ácido y fosfatasa alcalina se debería obtener (¹⁴C)celobiosa. En cualquier otro

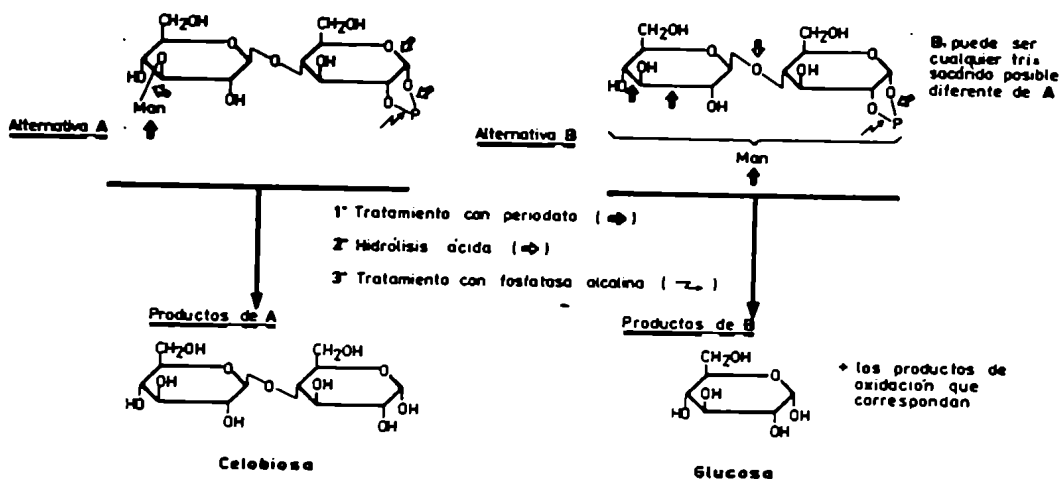


Figura 50: Esquema del procedimiento empleado para determinar la unión manosa-celobiosa. Se señalan los productos que se deberían obtener en función de las distintas alternativas.

caso, incluyendo una unión 1 \rightarrow 3 a la glucosa reductora como se propuso para la unidad repetitiva (120), el tratamiento completo debería rendir (14 C)glucosa, además de los productos de oxidación que correspondan (alternativa B). En ambos casos la manosa se oxidaría, aunque los productos no se detectarían debido a que el azúcar no estaba marcado.

En la Fig.51 se observa el perfil electroforético del

(^{14}C -Glc) trisacárido fosfato cíclico utilizado, sin tratar (cuadro A) y después (cuadro B) del tratamiento con periodato, comportándose este último como un solo compuesto, cargado y de movilidad similar al trisacárido fosfato cíclico inicial. Ambos materiales se eluyeron y se trataron en medio ácido (pH 1, 10 min, 100°C) condiciones que hidrolizan los productos de oxidación de la manosa y abren el ciclo del fosfato pero no rompen uniones glicosídicas, incubándose finalmente con fosfatasa alcalina. Los productos se analizaron por cromatografía en solvente I. Con el material sin tratar se observó, como era de esperar, el trisacárido libre (cuadro C). En cambio en el material tratado con periodato solo se observó celobiosa (cuadro D).

Dos conclusiones importantes se pueden inferir de este resultado:

1°. El trisacárido es lineal, es decir la manosa está unida a la glucosa no reductora de la celobiosa, y

2°. La manosa está unida en posición $1\rightarrow 3$ a dicha glucosa.

5.3.5.2. Configuración anomérica de la manosa en manosil-celobiosa.

Con el objeto de determinar la configuración anomérica de la manosa, el trisacárido marcado con (^{14}C)manosa fue some-

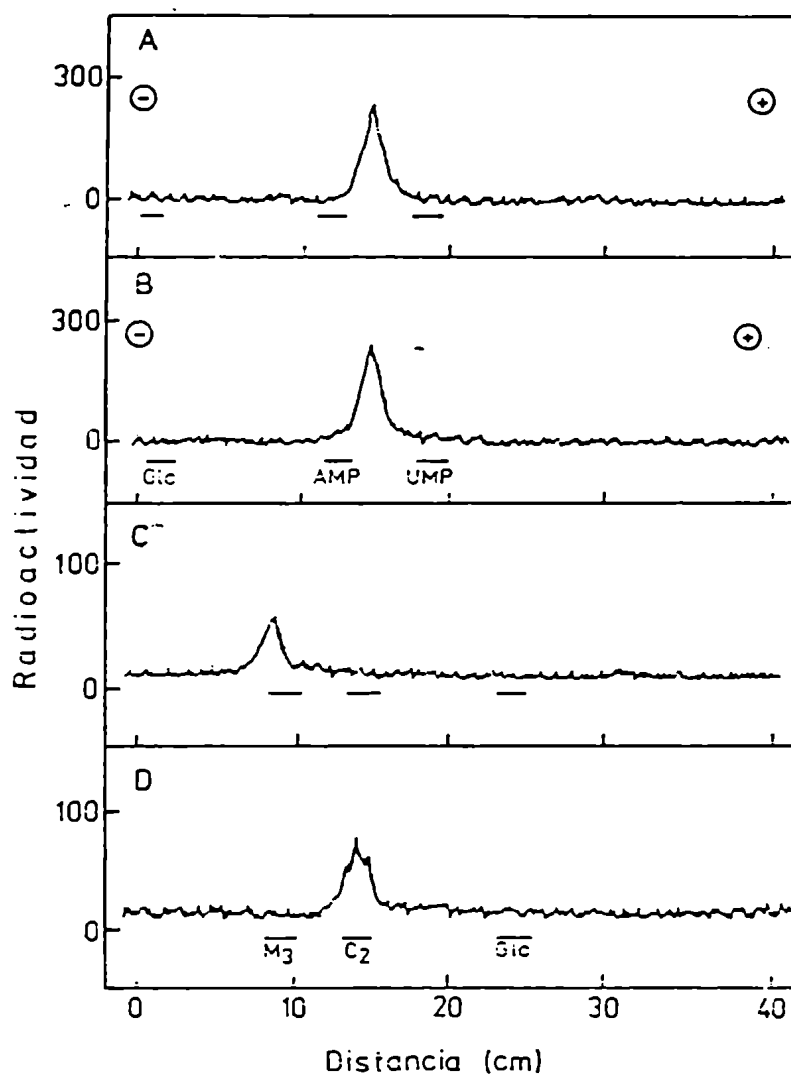


Figura 51: Unión de la manosa a la glucosa en el manosilcelobiosa difosfato prenil. Manosil-(^{14}C)celobiosa-1,2-P-cíclico obtenido como se indica en la Fig. 48 cuadro C se dividió en dos alícuotas. Una de las mismas se electroforetizó tal cual en buffer G (A). La otra se electroforetizó en el mismo buffer luego del tratamiento con IO_4^- (sección 3.5.7) (B). Después de eluidos los compuestos radioactivos de A y B se hidrolizaron con HCl 0,1N durante 10 min a 100°C , se incubaron con fosfatasa alcalina (sección 3.7.1.) y se cromatografiaron en papel en solvente I (cuadros C y D respectivamente).

tido a la acción de una α -manosidasa, libre de β -manosidasa. Bajo las condiciones descritas en materiales y métodos prácticamente todo el (^{14}C)manosil-celobiosa fue convertido en (^{14}C)manosa en 8 h de incubación (Fig.52); en cambio el p-nitrofenil-manósido no fue hidrolizado en las mismas condiciones.

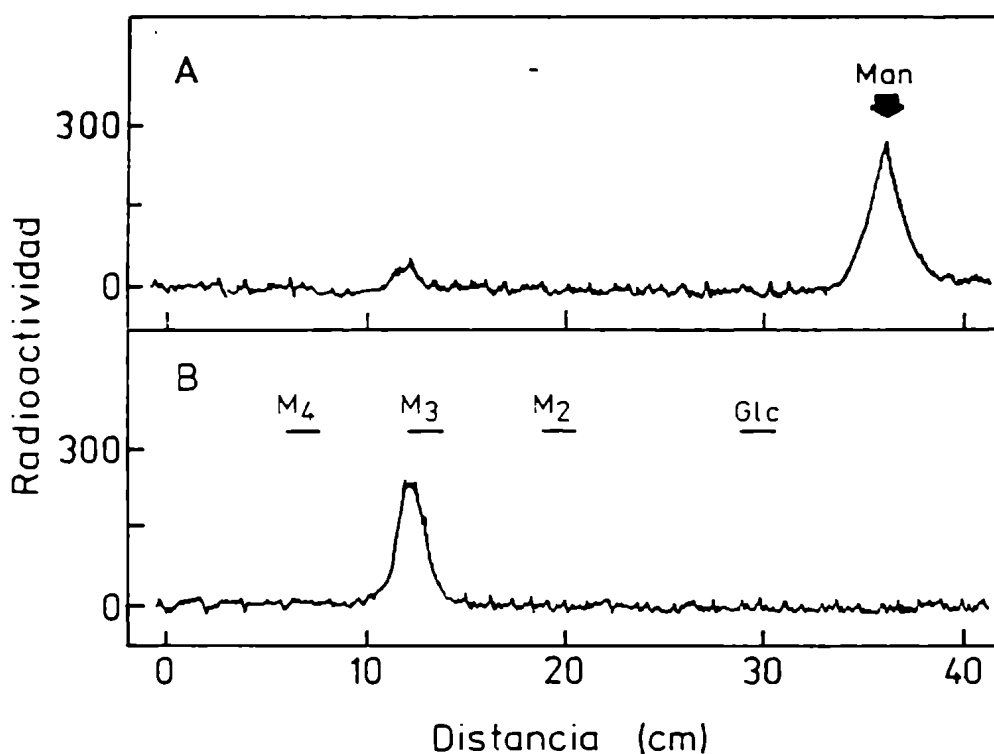
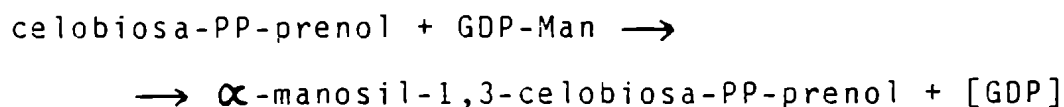


Figura 52: Tratamiento con α -manosidasa de (^{14}C)manosil-celobiosa. (^{14}C)manosil-celobiosa se obtuvo por hidrólisis ácida suave y cromatografía en solvente I como se detalla en la Fig. 46 cuadro A. Aproximadamente 2500 cpm del trisacárido se trataron con α -manosidasa (sección 3.7.2.) y los productos se cromatografiaron en solvente I (A). Otras 2500 cpm se trataron de idéntica manera salvo que la enzima se agregó luego de inactivar la incubación (B).

En resumen en este capítulo ha quedado demostrado que preparados enzimáticos de Xanthomonas campestris son capaces de incorporar manosa sobre celobiosa difosfato preno1, utilizando GDP-manosa como dador. Se demostró también que la manosa está unida al carbono 3 de la glucosa no reductora de la celobiosa, y que su configuración es α . La ecuación de síntesis del trisacárido puede entonces representarse así:



Una reacción similar se demostró en la formación de β -manosil-1,3-celobiosa difosfato preno1 empleando el sistema de A. xylinum (75,118).

5.4. Obtención de la unidad repetitiva asociada a un lípido difosfato

5.4.1. Generalidades

Como ya se mencionó la estructura del xantano está compuesta por glucosa, manosa y ácido glucurónico (ver Fig.31, sección 5.1.). En los capítulos precedentes se ha descrito los lípido-azúcares encontrados en incubaciones en presencia de UDP-glucosa y de UDP-glucosa y GDP-manosa. Por lo tanto y con la finalidad de obtener "in vitro" la unidad repetitiva asociada a un lípido difosfato se incubó el preparado enzimático utilizado en los casos anteriores, en presencia de los tres nucleótidos simultáneamente, con uno de ellos radioactivo (tabla 11). En los tres casos se observó incorporación de radioactividad en extracto 1203, el cual fue analizado como se detalla más abajo.

Tabla 11: Incorporación de (^{14}C)hexosa a material liposoluble en presencia de UDP-Glc, GDP-Man y UDP-GlcUA.

Nucleótido-azúcares presentes en la incubación	Incorporación de radioactividad en extracto 1203 (pmoles)
UDP-(^{14}C)Glc, GDP-Man, UDP-GlcUA	57
UDP-Glc, GDP-(^{14}C)Man, UDP-GlcUA	114
UDP-Glc, GDP-Man, UDP-(^{14}C)GlcUA	52

Se efectuaron incubaciones standard con 0,4 mg de prot. y donde se indica 15,7 μM de UDP-(^{14}C)Glc (AE: 196 Ci/mol), 15,7 μM de GDP-(^{14}C)Man (AE: 216 Ci/mol), 21 μM de UDP-(^{14}C)GlcUA (AE: 268 Ci/mol), 285 μM de UDP-Glc, 142 μM de GDP-Man ó 285 μM de UDP-GlcUA. Se incubó durante 30 min a 20°C y se procedió según el método D.

5.4.2. Análisis del material liposoluble obtenido

5.4.2.1. Hidrólisis ácida y alcalina suave

El resultado del análisis del material extraído en solvente 1203 resultó ser idéntico para los tres casos presentados en la tabla 11. Con el objeto de no repetir resultados se darán aquellos obtenidos en el caso de la incubación realizada con UDP-glucurónico radioactivo. Dicho material se analizó por

diversos criterios:

Sometido a electroforesis en buffer G no se movió de su lugar de siembra (Fig.53 A), una propiedad característica de los lípido-azúcares, descartando contaminaciones con azúcares libres o sus ésteres fosfóricos.

Por hidrólisis ácida suave y posterior electroforesis en buffer G (Fig.53 B) migró, a diferencia del compuesto original con una movilidad de R_{UMP} : 0,6.

Por cromatografía en solvente alcalino se obtuvo un solo compuesto de R_f : 0,25 (Fig.53 C), que eluido y sometido a electroforesis (Fig.53 D) migró a diferencia del compuesto original y del producto de hidrólisis ácida suave con un R_{UMP} : 1,0-1,1. Esta labilidad al medio alcalino sugirió la presencia de una unión difosfato entre el lípido y el azúcar.

Estos resultados son compatibles con un compuesto donde un prenol está unido a la cadena de azúcares mediante un puente difosfato. Por razones de simplicidad en adelante al compuesto total se lo denominará pentasacárido-PP-lípido (PS-PP-lípido), al oligosacárido libre pentasacárido (PS) y al derivado fosfato cíclico pentasacárido fosfato cíclico (PSPc).

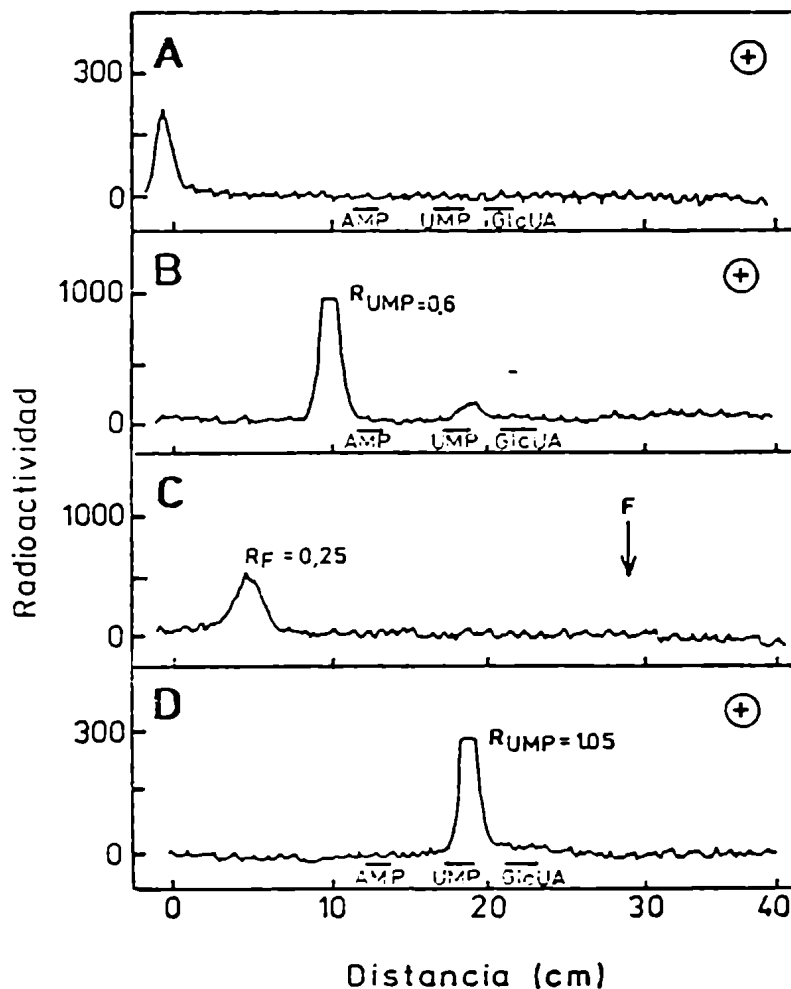


Figura 53: Propiedades del material soluble en solvente 1203. La radioactividad incorporada en extracto 1203 obtenido en las condiciones de la tabla 11 (con UDP-(^{14}C)GlcUA) se analizó por los siguientes criterios:

- A: Electroforesis en buffer G
- B: Electroforesis en buffer G del producto de hidrólisis ácida suave
- C: Cromatografía en solvente F
- D: Electroforesis en buffer G del compuesto eluido de C.

5.4.2.2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

El extracto 1203 obtenido con marca en ácido (^{14}C)glucurónico fue cromatografiado en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con CH_3OH 99%, utilizando como eluyente un gradiente de AcONH_4 . Del análisis del perfil cromatográfico, mostrado en la Fig.54, surge que no hay ningún compuesto neutro y que existen, además, tres compuestos cargados diferentes que se eluyen con AcONH_4 0,6-0,7 M (compuesto III), con 0,9-1,0 M (compuesto IV) y con 1,0-1,1 M (compuesto V). Estos resultados no concordaban con el análisis del material extraído en solvente 1203 mostrado en la Fig.53, que indicaba la presencia de un solo compuesto. Es posible que el compuesto III haya pasado desapercibido debido a su pequeña cantidad, pero no pudo ocurrir lo mismo con uno de los otros dos compuestos. Con el objeto de simplificar esta exposición diremos que el compuesto III era "lípidogluconico", y los estudios realizados sobre el mismo se darán en la sección 5.9.. A su vez el compuesto V resultó ser piruvil-pentasacárido-PP-lípido, cuyo análisis y propiedades se comentarán en la sección 5.8.1.. La presencia de este compuesto fue justificada debido a que se utilizó un preparado enzimático distinto al utilizado en la sección anterior y que posteriormente comprobamos contenía un dador endógeno de grupos piruvato (sección 5.8.1.3., Fig.74).

Nos ocuparemos por ahora del análisis del compuesto IV

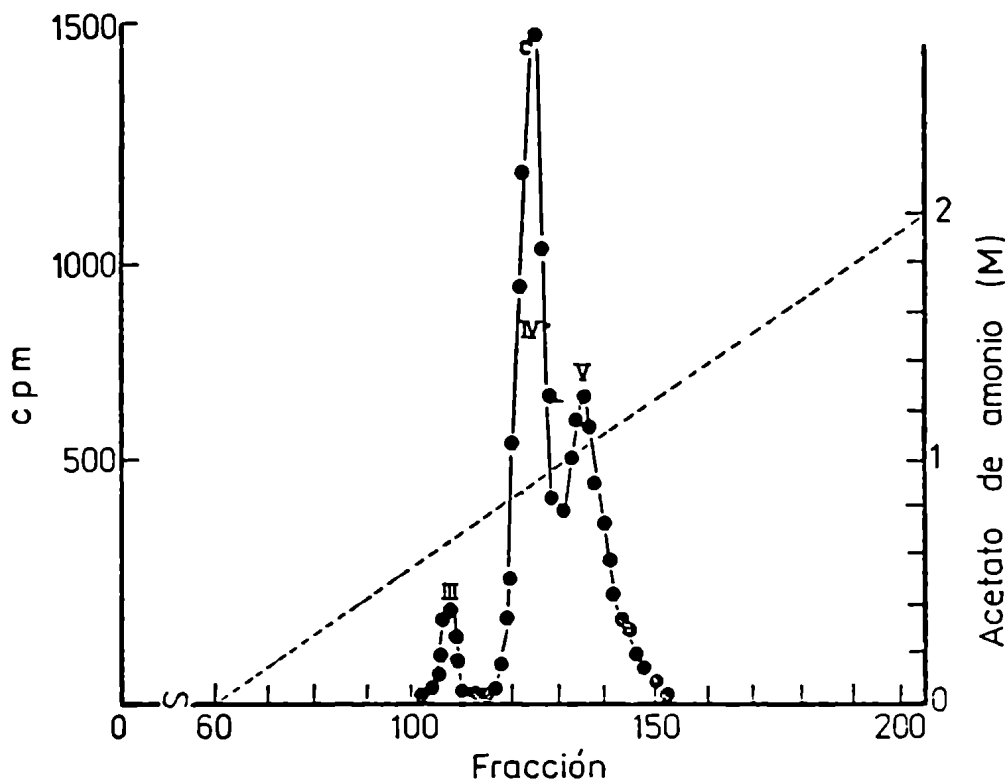


Figura 54: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Se preparó extracto 1203 como se describe en la tabla 11 (con UDP-(^{14}C)GlcUA). Aproximadamente 28.000 cpm de dicho extracto se cromatografiaron en una columna de DEAE-celulosa (sección 3.8.1.1.). Alícuotas de 0,25 ml de cada fracción se contaron para radioactividad.

que reveló poseía las siguientes propiedades: el producto de hidrólisis ácida suave migró en electroforesis en buffer G como un único compuesto de R_{UMP} : 0,6; por cromatografía en solvente F se obtuvo también un único compuesto de R_f : 0,25, que

eluido y sometido a electroforesis en buffer G migró con un R_{UMP} : 1 (Datos no mostrados). Es decir que el material analizado en la sección anterior y el compuesto IV son la misma entidad, o expresado de otra manera pentasacárido-PP-lípido se eluye en columna de DEAE-celulosa con acetato de amonio 0,9-1,0 M. En lo que sigue se trabajó con el preparado enzimático que solo formaba compuesto IV.

5.4.3. Obtención de pentasacárido difosfato prenoI a partir de celobiosa difosfato prenoI.

En la sección 5.2. fue descripto que al incubar células de X.campestris a 12°C en presencia de UDP-(¹⁴C)glucosa se forma (¹⁴C)celobiosa difosfato prenoI. Este hecho fue aprovechado para acumular este compuesto y utilizarlo como sustrato, luego de haber eliminado el exceso de nucleótido. La finalidad de este experimento era la posibilidad de obtener pentasacárido-PP-lípido a partir de celobiosa-PP-prenoI, empleando nuevamente la técnica de incubar en dos etapas. La segunda incubación se realizó también a 12°C, pues esta temperatura no afecta la síntesis de pentasacárido-PP-lípido, como se mostrará en la tabla 13, sección 5.4.4.1..

Los resultados mostraron (tabla 12) que la cantidad de (¹⁴C)glucosa incorporada a extracto 1203 durante la primera incubación (alícuota A) permaneció constante cuando la segun-

da incubación se efectuó sin agregados (alícuota B), o cuando durante la misma se agregó UDP-glucurónico (alícuota D). En cambio, cuando en la incubación se agregó GDP-manosa (alícuota C) o GDP-manosa y UDP-glucurónico (alícuota E) se observó una disminución del orden del 30-40%.

Tabla 12: Biosíntesis de pentasacárido-PP-lípido

Alícuota	Agregados en la reincubación	(¹⁴ C)Glc incorporado en extracto 1203 (pmoles)
A	No reincubado	36
B	Nada	34
C	GDP-Man	22
D	UDP-GlcUA	36
E	UDP-GlcUA + GDP-Man	26

Se realizó una incubación estándar en un volumen final de 0,35 ml, en presencia de UDP-(¹⁴C)Glc (AE: 196 Ci/mol) y de 1,8 mg de prot., a 12°C durante 30 min. Se procesó por el método F y las células lavadas se dividieron en 5 alícuotas. Donde se indica se agregó UDP-GlcUA (285 µM) y/o GDP-Man (285 µM). Se reincubó a 12°C durante 30 min. Una alícuota (A) no se reincubó.

Si en lugar de realizar la segunda incubación a 12°C se efectúa a 20°C, las disminuciones en la incorporación de radioactividad en el caso de las alícuotas C y E se incrementan. Este hecho, tanto cuando se reincuba a 12°C como a 20°C, se debe en el caso de la alícuota E a que el producto formado en presencia de GDP-manosa y UDP-glucurónico es convertido en polisacárido, como se mostrará en la sección 5.7.2.2., tablas 18 y 19. En el caso de la alícuota C, la causa de la disminución no es tan clara, pero se justificó en primera instancia debido a la presencia de UDP-glucurónico en el preparado enzimático (ver análisis del extracto 1203 correspondiente en Fig.55 C) lo cual determinaría que en algún grado se forme el mismo compuesto que en el caso de la alícuota E, con la consiguiente polimerización.

El análisis por cromatografía en papel en solvente F (Fig.55) reveló que el extracto 1203 estaba compuesto por celobiosa difosfato prenoI en las alícuotas A (cuadro A), B (cuadro B) y D (cuadro D). En el caso de la alícuota E, el celobiosa difosfato prenoI acumulado en la primera etapa fue transformado completamente en presencia de GDP-manosa y UDP-glucurónico en pentasacárido-PP-prenoI (cuadro E). Finalmente en el caso de la alícuota C, el extracto estaba compuesto por una mezcla de trisacárido y pentasacárido-PP-prenoI (cuadro C), cuya formación puede ser justificada si se acepta la presencia de un dador endógeno de ácido glucurónico.

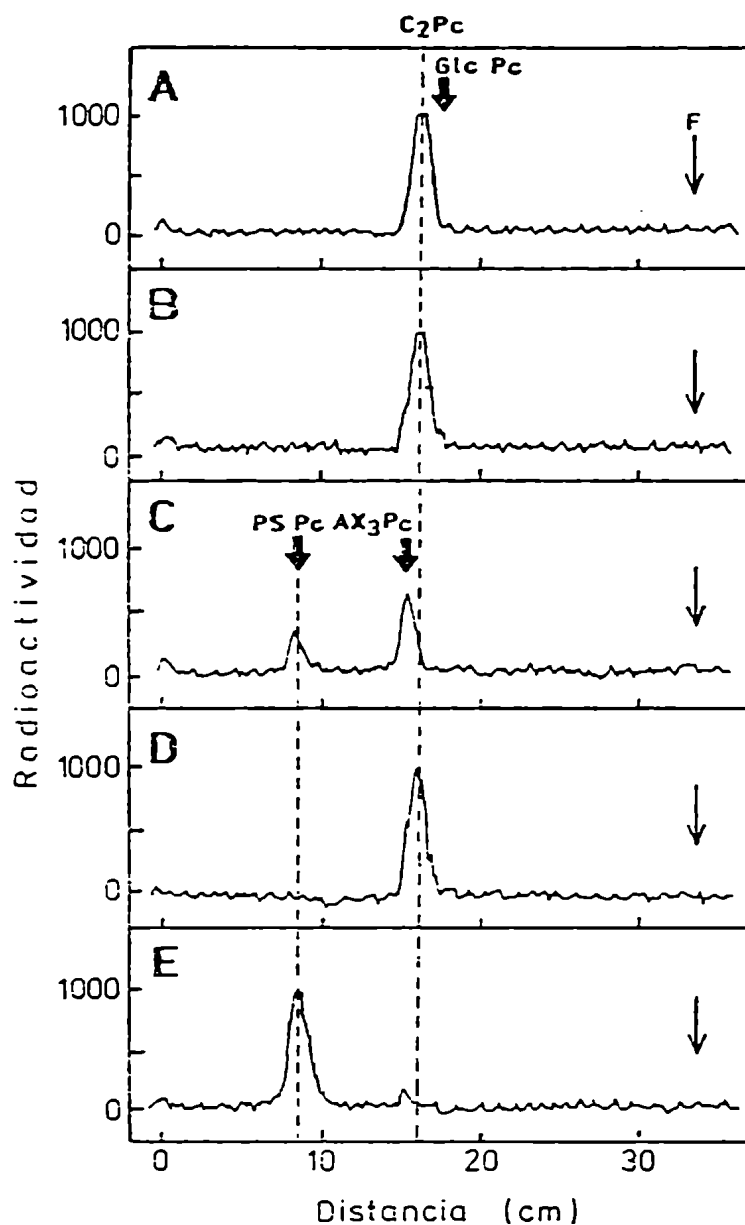


Figura 55: Obtención de pentasacárido-PP-prenol a partir de (^{14}C)celobiosa-PP-prenol. Los extractos 1203 obtenidos como se indica en la tabla 12 se cromatografiaron en solvente F. La letra de cada cuadro se corresponde con aquella de cada alícuota de la tabla 12. C_2Pc y AX_3Pc fueron obtenidos como se indica en la sección 3.10., PSPc , marcado en ácido glucurónico, se obtuvo como se indica en la Fig. 53 C.

A partir de estos datos se puede concluir entonces que celobiosa difosfato prenil es un precursor de pentasacárido-PP-lípido. Además cuando el lípido disacárido fue incubado en presencia de GDP-manosa formó manosilcelobiosa difosfato lípido (Fig.55, cuadro C) como era de esperar, pero cuando además de GDP-manosa se agregó UDP-glucurónico todo el celobiosa difosfato prenil se transformó en pentasacárido-PP-lípido (Fig.55 E), lo que indicaría que el lípido trisacárido también es un precursor en la formación de pentasacárido-PP-lípido, como era de esperar. Esta suposición fue posteriormente confirmada.

5.4.4. Condiciones de obtención

Con el objeto de disponer de cantidades grandes de pentasacárido-PP-lípido para poder estudiarlo se realizaron incubaciones variando el tiempo y la temperatura de las mismas, como así también las concentraciones de sustrato, de enzima y de magnesio.

5.4.4.1. Efecto de la temperatura de incubación

El efecto de la temperatura de incubación sobre la síntesis de pentasacárido-PP-lípido puede observarse en la tabla 13. Teniendo en cuenta la dependencia de la formación del polisacárido con la temperatura (ya mencionados en la sección 5.1. ta-

bla 8, y que se repiten en la tabla 13 para mejor comprensión) se encuentra que 20°C es la temperatura óptima de incubación para sintetizar tanto pentasacárido-PP-lípido como polisacárido, pero mientras que la síntesis del primero no se modifica a 12°C, sí lo hace la del polisacárido.

Tabla 13: Efecto de la temperatura de incubación sobre la síntesis de pentasacárido difosfato lípido y polisacárido

Temperatura de incubación (°C)	Incorporación de (¹⁴ C)GlcUA en: extracto 1203 (pmoles)	polisacárido*
12	16	12
20	16	29
30	10	3

Se efectuaron incubaciones standard con 0,2 mg de prot. a las temperaturas indicadas, durante 30 min, en presencia de 285 µM de UDP-Glc, 28,5 µM de GDP-Man y 21,4 µM de UDP-(¹⁴C)GlcUA (AE: 268 Ci/mol). Las incubaciones fueron procesadas según el método D.

* Datos tomados de tabla 8.

5.4.4.2. Curva de tiempo

Se efectuó una curva de tiempo a 12°C, como se indica en la Fig.56. Se observa que pentasacárido-PP-lípido alcanza un

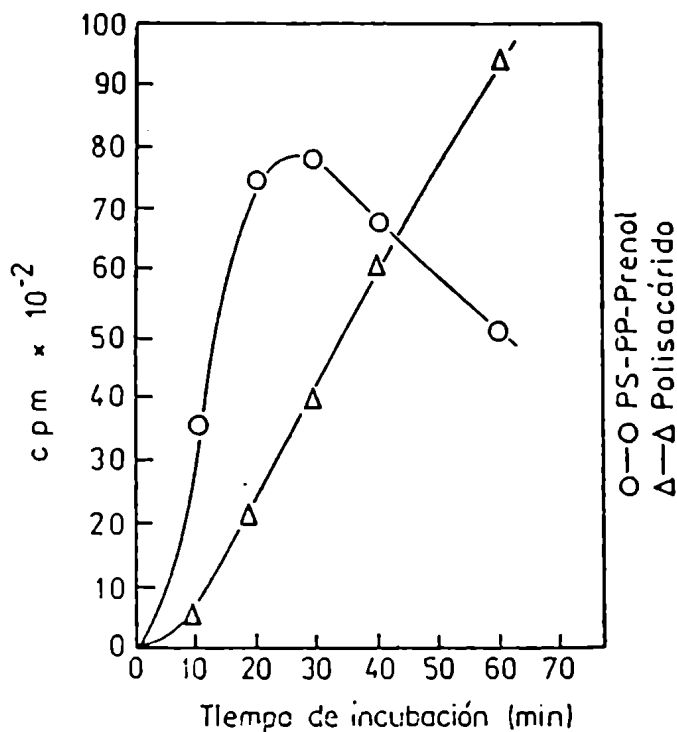


Figura 56: Formación de pentasacárido-PP-lípido en función del tiempo de incubación. Cada punto de la figura corresponde a una incubación estándar empleando 1,1 mg de prot. y realizada a 12°C durante los tiempos indicados, en presencia de 285 μM de GDP-Man, 285 μM de UDP-GlcUA y 17,1 μM de UDP-(¹⁴C)Glc (AE: 196 Ci/mol). Se procesaron las mismas según el método D. Los extractos 1203 fueron cromatografiados en solvente F. El área correspondiente a PSPc (Rf 0,25) fue cortada, contada y el valor encontrado fue asignado a PS-PP-lípido. El polisacárido se midió como se indica en la sección 3.4.1.1..

máximo a los 20-30 min de incubación, y que luego decae. En contraposición la formación de polisacárido, que no es óptima a 12°C, aumenta continuamente en todo el rango de tiempo estu-

diado, sugiriendo una relación precursor-producto.

5.4.4.3. Concentración de sustratos

En la sección 5.3. se mostró que la incorporación de manosa en el trisacárido difosfato lípido alcanza una meseta en presencia de 285 μM de UDP-glucosa, valor que fue tomado como óptimo para la síntesis de pentasacárido-PP-lípido. Se estudió entonces el efecto de la concentración de UDP-glucurónico sobre la síntesis de PS-PP-lípido, en presencia de una cantidad considerada razonablemente elevada de GDP-manosa (285 μM). Los datos obtenidos, que se muestran en la tabla 14, indican que en el rango de concentraciones estudiado no existe una diferencia significativa en la síntesis del lípido intermediario.

Un resultado similar al descrito se encontró al estudiar la dependencia de la formación de PS-PP-lípido con la concentración de GDP-manosa. En incubaciones realizadas en presencia de 285 μM de UDP-glucosa, 21,4 μM de UDP-(^{14}C)glucurónico y GDP-manosa entre 14,2 y 570 μM no se observaron variaciones de importancia en la formación del lípido intermediario.

Tabla 14: Efecto de la concentración de UDP-GlcUA sobre la síntesis de PS-PP-lípido.

UDP-GlcUA en la incubación (μM)	Incorporación de (^{14}C)GlcUA en PS-PP-lípido (pmoles)
14,2	36
35,5	40
71	41
142	44

Se obtuvo PS-PP-lípido marcado en (^{14}C)GlcUA en condiciones standard, utilizando 0,44 mg de prot. Se incubó a 12°C durante 30 min, en presencia de 285 μM de UDP-Glc, 285 μM de GDP-Man y 14,2 μM de UDP-(^{14}C)GlcUA no radioactivo para completar las cantidades que se indican en cada caso. Las incubaciones se procesaron por el método D y los extractos 1203 fueron cromatografiados en papel en solvente F. El área correspondiente a PSPc (R_f 0,25) fue cortada y contada. El valor encontrado fue asignado a PS-PP-lípido.

5.4.4.4. Concentración de enzimas

Utilizando las concentraciones de sustratos encontradas se hizo una curva de formación de pentasacárido-PP-lípido en función de la concentración de proteínas presentes en la incubación (Fig.57). Se encontró una relación lineal entre el producto formado y la concentración de proteínas utilizada hasta 500-600 μg aproximadamente. Para valores de proteínas mayores

de los señalados la formación del compuesto deja de ser lineal. Una probable interpretación de estos resultados es que para dichas concentraciones de enzimas y aceptores endógenos comienzan a ser limitantes los sustratos agregados.

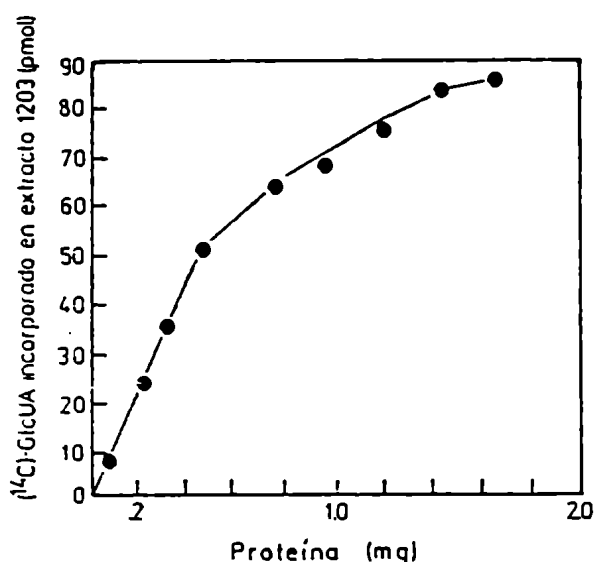


Figura 57: Curva de concentración de enzimas. Cada punto de la figura corresponde a una incubación estándar realizada a 12°C durante 30 min con la cantidad de proteína que se indica y en presencia de 285 μM de UDP-Glc, 142 μM de GDP-Man y 17,1 μM de UDP-(^{14}C)GlcUA (AE: 268 Ci/mol). Las incubaciones se procesaron por el método D.

5.4.4.5. Dependencia de la concentración de Mg^{++}

En la Fig.58 se observa que la síntesis de pentasacárido-PP-lípido depende de la presencia de Mg^{++} en el medio de incu-

bación. En ausencia del catión no hay formación del lípido oligosacárido, mientras que con una concentración de 6 mM se llega a una meseta, que no se modifica hasta 12 mM (máximo valor estudiado). Asimismo se midió la formación de polisacárido, observándose una velocidad máxima de síntesis con una concentración de 6 mM del catión.

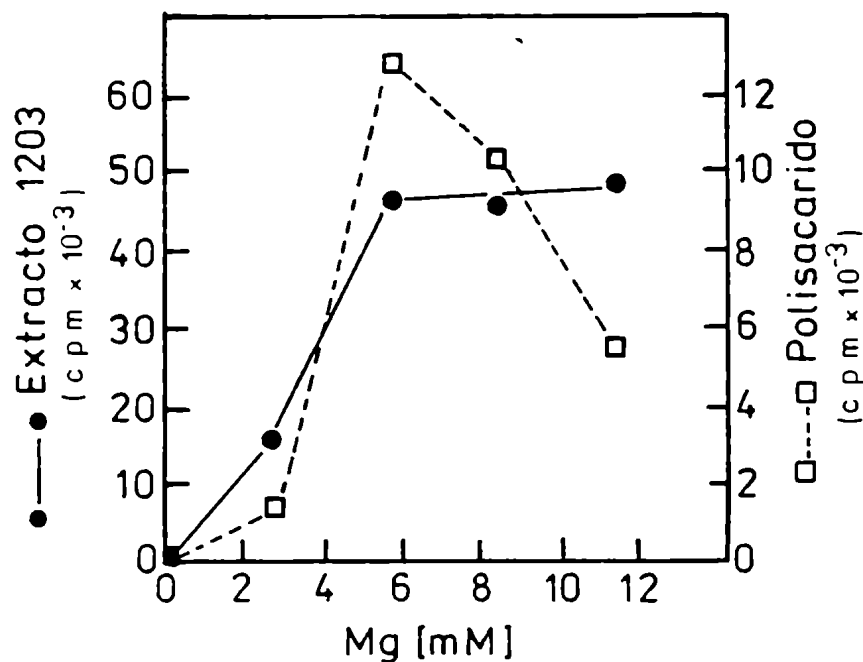


Figura 58: Efecto del Mg^{++} en la formación de PS-PP-lípido y polisacárido. Se realizaron incubaciones estandar a $12^{\circ}C$ con las concentraciones de Mg^{++} que se indican y en presencia de $17,1 \mu M$ de UDP- $(^{14}C)Glc$, $214 \mu M$ de GDP-Man y $21,4 \mu M$ de UDP-GlcUA. Luego de 30 min se procesaron por el método D y alícuotas del extracto 1203 se contaron para radioactividad. La incorporación de radioactividad al polisacárido se efectuó como se indica en la sección 3.4.1.1..

5.4.5. Tamaño del oligosacárido

Una cuestión importante a determinar era el número de manosas que componían el oligosacárido obtenido por hidrólisis ácida suave. Para este fin se recurrió también a dos oligosacáridos producidos por A. xylinum, fundamentalmente por la similitud estructural de esos compuestos con la unidad repetitiva del xantano. Los oligosacáridos de referencia son el tetrasacárido AX₄ y hexasacárido AX₆ (sección 2.1.1. y Fig.26). Luego de electroforesis en papel en buffer G el oligosacárido PS proveniente de X. campestris migró ligeramente menos (R_{UMP} : 0,6) que el tetrasacárido AX₄ (R_{UMP} : 0,7), pero más que el hexasacárido AX₆ (R_{UMP} : 0,5) (Fig.59 A, B y C respectivamente). Similarmente sometido a cromatografía en papel con solvente I o con solvente O el oligosacárido PS se desplazó menos que el AX₄, pero más que el AX₆ (Fig.59 D, E y F en solvente I y G, H e I en solvente O).

Estos resultados indican que el oligosacárido PS se comporta tanto por su migración electroforética como por su movilidad cromatográfica como un pentasacárido, que posee una carga negativa debido a la presencia de ácido glucurónico en su estructura.

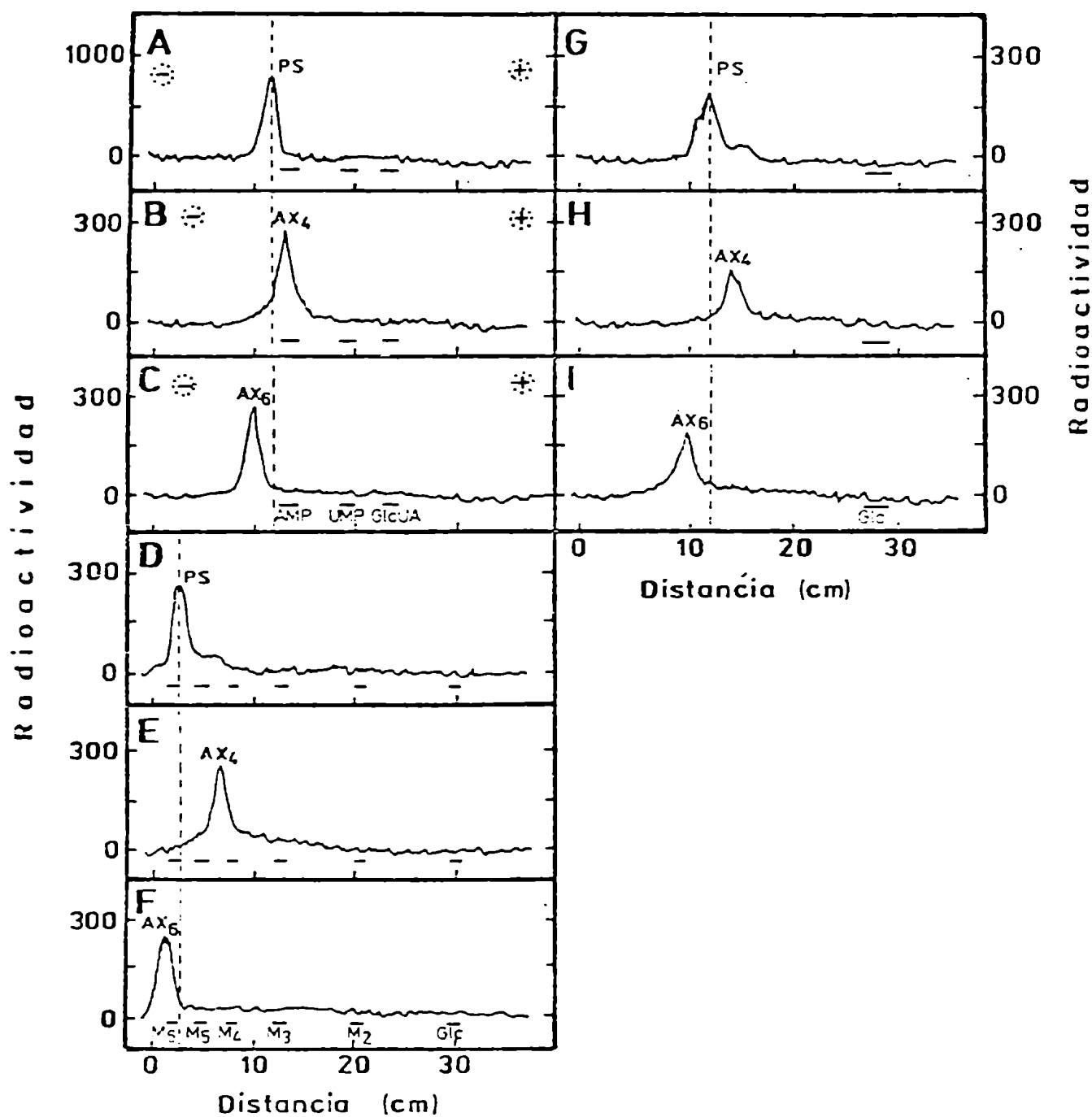


Figura 59: Cromatografía en papel del pentasacárido. El oligosacárido PS se obtuvo como se indica en la Fig. 53 B y se sometió a electroforesis en buffer G (A), ó a cromatografía en solvente I (D) ó en solvente 0 (G). Se muestran los radiocromatogramas correspondientes a AX₄ y AX₆ en los tres sistemas (B y C en buffer G, E y F en solvente I y H e I en solvente 0). AX₄ y AX₆ se obtuvieron como se indica en la sección 3.10..

5.4.6. Estructura del pentasacárido

5.4.6.1. Generalidades

El estudio de la estructura de la unidad repetitiva del xantano fue realizada, como se mencionó anteriormente, por el grupo de Lindberg (120) y confirmada por el grupo de Melton y colaboradores (121). Con el objeto de comparar la estructura del pentasacárido PS asociado al lípido con la unidad repetitiva propuesta para el polisacárido se efectuaron los estudios siguientes.

Nuestro objetivo estaba ya logrado en parte con los datos obtenidos en el estudio del proceso de la biosíntesis del pentasacárido-PP-lípido, descriptos en los capítulos precedentes y el resto se obtuvo sometiendo al pentasacárido a métodos degradativos. Así la presencia de la estructura de la celobiosa y de α -manosil-1,3-celobiosa en el pentasacárido se dió por aceptada desde el momento en que pudo obtenerse el pentasacárido a partir de celobiosa-PP-prenol y α -manosil-1,3-celobiosa-PP-prenol (secciones 5.4.3. y 5.7.2.2. (Tabla 19) respectivamente). Lo que se va a demostrar en las secciones siguientes es que en el pentasacárido el ácido glucurónico está unido al carbono 2 de un residuo manosa y que a su vez dicho ácido tiene su carbono 4 sustituido por otro residuo manosa.

5.4.6.2. Aislamiento y caracterización de glucuronil-manosa.

Por los estudios llevados a cabo en el laboratorio, utilizando la bacteria A. xylinum, sabemos que el disacárido β -glucuronil-1,6-manosa se puede obtener por hidrólisis ácida parcial de los oligosacáridos AX₄ ó AX₆, pues la unión aldobiurónica es resistente a la hidrólisis ácida. Dicho oligosacárido posee una movilidad electroforética de R_{UMP}: 0,9 en buffer G (sección 4.2.4.1.). Aprovechando estos conocimientos se trató de aislar el disacárido glucuronil-manosa por hidrólisis ácida parcial y posterior electroforesis, a partir del pentasacárido marcado en la manosa ó de pentasacárido marcado en el ácido glucurónico. En el primer caso (Fig.60 A) se obtuvo un gran producto neutro, que cromatografió como manosa en solvente H y dos productos cargados (1 y 2). A su vez en el segundo caso (Fig.60 B) también se obtuvo un compuesto neutro y tres compuestos cargados (1', 2' y 3'). El compuesto neutro tuvo el mismo comportamiento cromatográfico en solvente I que la lactona del ácido glucurónico; los compuestos 1, 1' y 2' no fueron analizados en detalle. Los productos 2 y 3' que muestran la misma movilidad por esta técnica (R_{UMP}: 0,9), poseen también el mismo comportamiento cromatográfico en solvente I (Fig.60 C y D respectivamente). Sometidos a la acción de una β -glucuronidasa el compuesto 2 fue degradado totalmente a (¹⁴C)manosa mien-

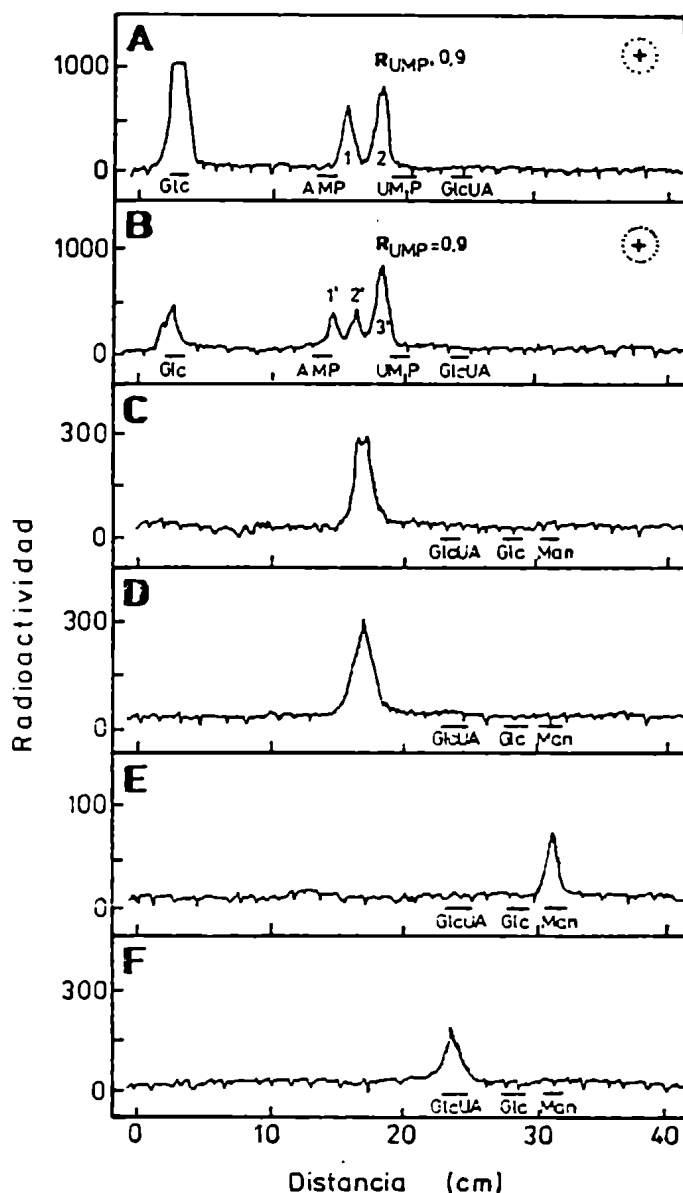


Figura 60: Obtención y caracterización de glucuronil-manosa. Se preparó PS-PP-lípido marcado en $(^{14}\text{C})\text{Man}$ ó en $(^{14}\text{C})\text{GlcUA}$ como se describe en la tabla 11 (sección 5.4.1.) líneas 2 y 3 respectivamente. Los pentasacáridos correspondientes, aislados por hidrólisis ácida suave y posterior electroforesis en buffer G, se sometieron a hidrólisis ácida parcial (sección 3.5.2. b) durante 1 h y los productos se electroforetizaron en buffer G (A y B). Los picos de $R_{\text{UMP}}: 0,9$ (2 y 3') se eluyeron y cromatografiaron con solvente I (C y D) ó se trataron con β -glucuronidasa (sección 3.7.3.) y sus productos se cromatografiaron con solvente I (E y F).

tras que el compuesto 3' fue degradado totalmente a ácido (^{14}C)glucurónico (Fig.60 E y F respectivamente). Estos datos son consistentes con que el compuesto 2 es β -glucuronil- (^{14}C)manosa y el compuesto 3' es (^{14}C) β -glucuronil-manosa, demostrando así que en el pentasacárido la manosa está sustituida por un residuo de ácido glucurónico.

5.4.6.3. Permetilación del pentasacárido marcado en (^{14}C)manosa

Habiéndose determinado que en el pentasacárido existe una manosa sustituida por un residuo de ácido glucurónico restaba confirmar que el carbono de la manosa involucrado en dicha unión era el 2, como fue propuesto para el xantano (120,121). El procedimiento elegido para lograr este propósito fue la permetilación. Empleando esta técnica sobre el pentasacárido obtenido con marca en manosa deberíamos obtener 3,4,6-tri-Me-manosa. Además debería formarse tetra-Me-manosa lo que nos permitiría confirmar que en el pentasacárido obtenido "in vitro" el azúcar del extremo no reductor es una manosa.

Los resultados obtenidos (Fig.61) mostraron que se formaron los dos derivados esperados: el 3,4,6-tri-Me-manosa y el 2,3,4,6-tetra-Me-manosa en relación prácticamente equimolar, confirmando de esta manera que en el pentasacárido la manosa posee

un sustituyente en el carbono 2 y que el azúcar del extremo no reductor es una manosa.

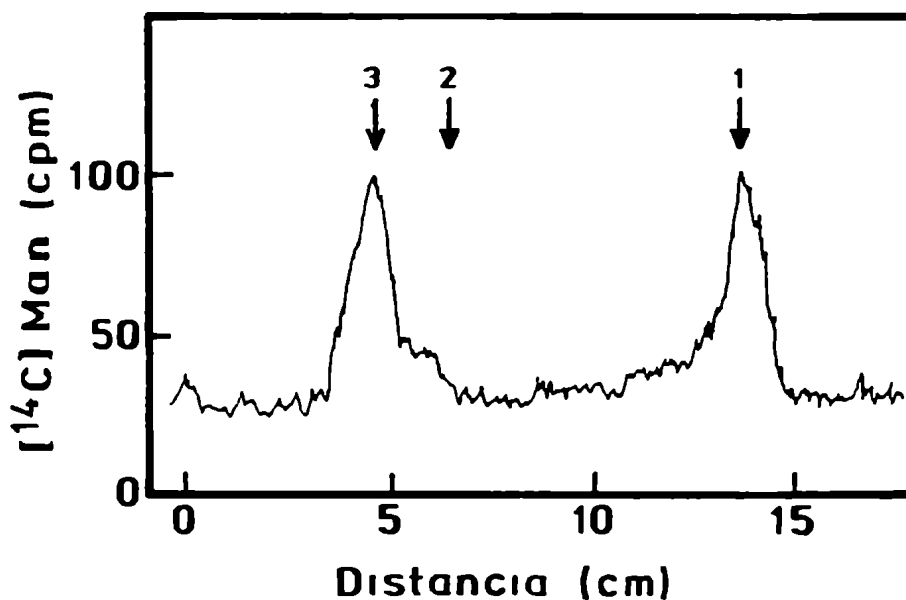


Figura 61: Cromatografía en placa delgada de los productos de (¹⁴C-Man) pentasacárido. Se preparó PS marcado en (¹⁴C)Man como se describe en la tabla 11 línea 2. El pentasacárido, aislado por hidrólisis ácida suave y posterior electroforesis en buffer G, se sometió a permetilación (sección 3.5.12.). El producto obtenido se hidrolizó como se describe en la sección 3.5.12.2. y los productos se cromatografiaron en placa delgada con solvente S.

. Las flechas indican la posición de los estándar:

1: 2,3,4,6-tetra-Me-Man; 2: 2,3,4-tri-Me-Man; 3: 3,4,6-tri-Me-Man.

2,3,6- y 2,4,6-tri-Me-Man se desplazan en este sistema cromatográfico entre los derivados 1 y 2 (154).

Los estándar 2 y 3 fueron cedidos gentilmente por D. Mendelzon y G. Lederkremer respectivamente .

5.4.6.4. El ácido glucurónico del pentasacárido está sustituido en posición 4

En la estructura propuesta para el xantano el ácido glucurónico está sustituido por un residuo manosa en el carbono 4. Si esto fuera válido para el pentasacárido obtenido "in vitro", preparando PS marcado en ácido glucurónico y reduciendo su grupo carboxilo a un alcohol debería liberarse (^{14}C)eritritol luego de una degradación de Smith.

Con ese objeto se aisló el pentasacárido (Fig. 62 A) y se lo redujo por el método de Taylor y Conrad (sección 3.5.10.) (Fig.62 B). El compuesto neutro así obtenido fue sometido a una degradación de Smith, identificándose (^{14}C)eritritol como único producto (Fig.62 C). Estos resultados indican que también en el pentasacárido unido al lípido el ácido glucurónico está sustituido en el carbono 4, como ocurre en el polisacárido.

5.4.6.5. Permetilación del pentasacárido marcado en (^{14}C)glucosa.

Cuando se analizó la estructura del trisacárido α -mano-sil-celobiosa se encontró que era lineal (sección 5.3.5.). Este dato estructural era importante pues nos permitía descartar una de las dos unidades repetitivas fisiológicas posibles planteadas para el xantano (Fig.36, sección 5.2.).

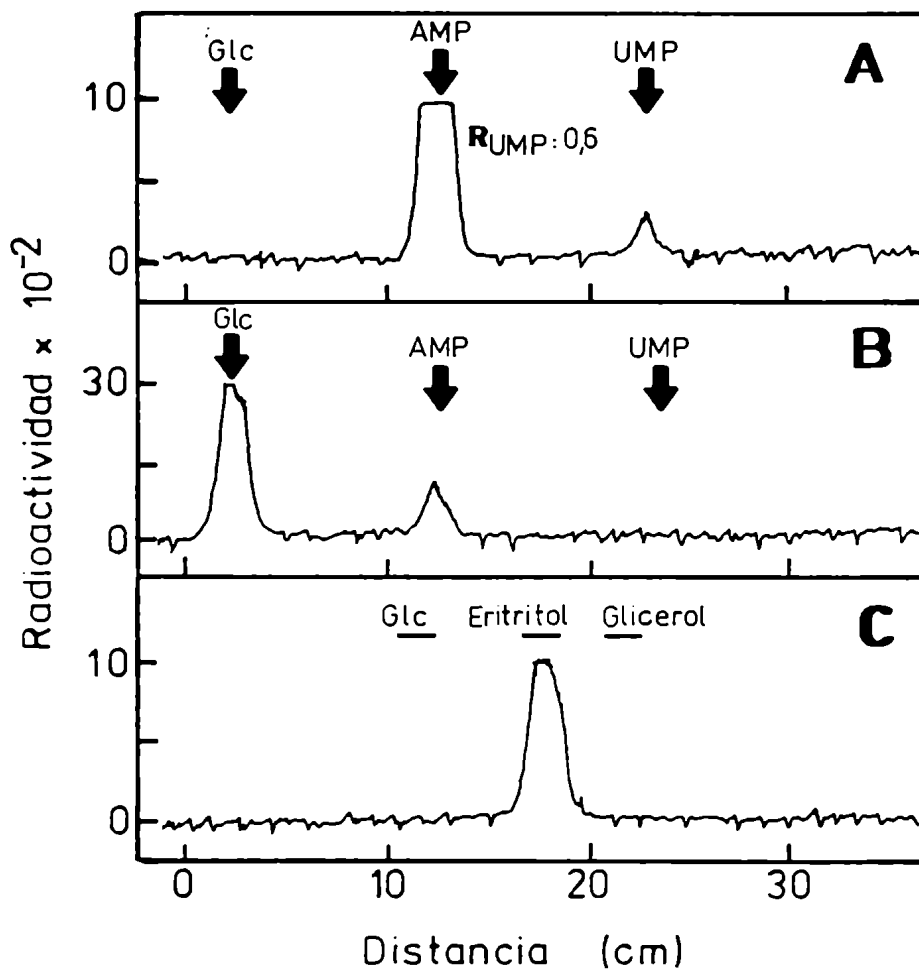


Figura 62: Reducción del grupo -COOH del pentasacárido y posterior degradación de Smith. Se preparó (¹⁴C-GlcUA)PS por hidrólisis ácida suave de un extracto 1203 obtenido como en la tabla 11, línea 3 (sección 5.4.1.). El producto de la hidrólisis se electroforetizó en buffer G (A) y el PS (R_{UMP}: 0,6) fue reducido por el método de Taylor y Conrad (sección 3.5.10.). Los productos se electroforetizaron en el mismo buffer (cuadro B), y el compuesto neutro se sometió a una degradación de Smith (sección 3.5.8.), cromatografiándose sus productos en solvente H.

Con la finalidad de confirmar que la unidad repetitiva lineal y no la ramificada, era la correcta, se realizó la permetilación del pentasacárido marcado en glucosa. Con esta técnica la unidad repetitiva lineal debería rendir dos trimetilderivados: 2,3,6- y 2,4,6-tri-Me-(^{14}C)glucosa. En cambio la unidad repetitiva ramificada rendiría un tetra y un dimetil derivado: 2,3,4,6- y 2,6-di-Me-(^{14}C)glucosa.

La permetilación del pentasacárido marcado en glucosa (Fig.63) mostró que solo se formaron los dos trimetilderivados correspondientes a la unidad repetitiva lineal. Estos resultados, reunidos con los obtenidos sobre el trisacárido nos permiten concluir sin lugar a dudas que la unidad repetitiva fisiológica del xantano es la lineal.

En resumen en este capítulo se demostró que preparados enzimáticos de X. campestris forman en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico pentasacárido difosfato prenoI. Se demostró también que celobiosa difosfato prenoI es un precursor de dicho compuesto. Se confirmó además que la estructura del pentasacárido es la misma que la propuesta para la unidad repetitiva del xantano (120,121), encontrándose que la unidad repetitiva fisiológica es la lineal.

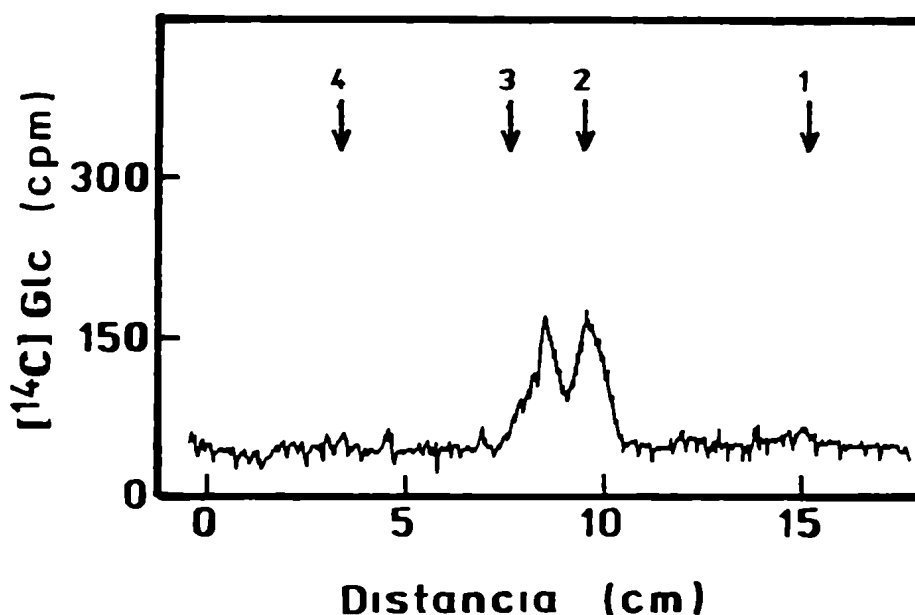


Figura 63: Cromatografía en placa delgada de los productos de permetilación de (^{14}C -Glc)pentasacárido. Se preparó PS marcado en (^{14}C)Glc como se describe en la tabla 11 línea 1 (sección 5.4.1.). El pentasacárido, aislado por hidrólisis ácida suave y posterior electroforesis en buffer G (R_{UMP} : 0,6), se sometió a permetilación (sección 3.5.12.1.). Luego de la hidrólisis ácida, los productos se cromatografiaron en placa delgada con solvente R.

Las flechas indican la posición de los estándar:

1: 2,3,4,6-tetra-Me-Glc; 2: 2,3,6-tri-Me-Glc; 3: 2,3,4-tri-Me-Glc; 4: 2,6-di-Me-Glc.

2,4,6-tri-Me-Glc se desplaza en este sistema cromatográfico entre los estándar 2 y 3; en cambio 3,4,6-tri-Me-Glc lo hace entre los derivados 3 y 4 (154).

5.5. Transferencia de glucosa-1-fosfato al fosfato prenol endógeno

En la sección 5.2. se ha visto que el primer azúcar incorporado a un lípido endógeno es la glucosa, formando celobiosa difosfato prenol. Sin embargo no pudo detectarse en los experimentos realizados, la presencia de glucosa difosfato prenol. Este compuesto debe ser un intermediario obligado en la biosíntesis de celobiosa-PP-prenol, como quedó claramente demostrado en el sistema de A. xylinum (75,118).

Como la formación de glucosa-PP-prenol involucra la transferencia de glucosa-1-fosfato a un prenol fosforilado endógeno, se decidió emplear entonces (β -³²P)UDP-glucosa como nucleótido dador.

Por otra parte en la sección 5.4.2. se describieron resultados que indican que el pentasacárido está unido al prenol por un puente pirofosfato. Se llegó a esta conclusión por análisis de los productos de hidrólisis ácida suave e hidrólisis alcalina suave del pentasacárido difosfato lípido. Además la presencia del grupo pirofosfato fue establecida por los mismos métodos en los precursores del mencionado compuesto (secciones 5.2.2.2. y 5.3.2.).

Entonces con el objeto de aclarar la biosíntesis de celobiosa difosfato prenol y confirmar el tipo de unión entre los distintos oligosacáridos y la porción lipídica se efectuaron

ensayos en condiciones estandar en presencia de (β - ^{32}P)UDP-glucosa solo, o junto con GDP-manosa, o junto con GDP-manosa y UDP-glucurónico. Los extractos 1203 correspondientes a las tres incubaciones fueron analizados sometiendo a electroforesis los productos de degradación alcalina.

Con el objeto de simplificar la exposición, a los derivados cíclicos obtenidos por este método, se los denominará con el nombre del lípido-azúcar respectivo. Los resultados indicaron que en presencia de (β - ^{32}P)UDP-glucosa como único nucleótido se formó principalmente celobiosa-(^{32}P)difosfato lípido (Fig.64 A), confirmando que la primer reacción es la transferencia de glucosa-1-P a un aceptor endógeno, probablemente un prenil fosfato, para formar glucosa- ^{32}P -P-prenil. Este compuesto, a su vez acepta una molécula de glucosa a partir de UDP-glucosa para formar celobiosa- ^{32}P -P-prenil, que fue el compuesto detectado.

Por otra parte cuando en la mezcla de incubación se agregó GDP-manosa, se formó además manosilcelobiosa (^{32}P)difosfato lípido (Fig.64 B). Finalmente al agregarse GDP-manosa y UDP-glucurónico el principal producto formado fue pentasacárido (^{32}P) difosfato lípido (Fig.63 C).

Estos resultados confirmaron los obtenidos en las secciones precedentes y la transferencia "in vitro" de las distintas hexosas a celobiosa-PP-prenil para formar pentasacárido-PP-prenil.

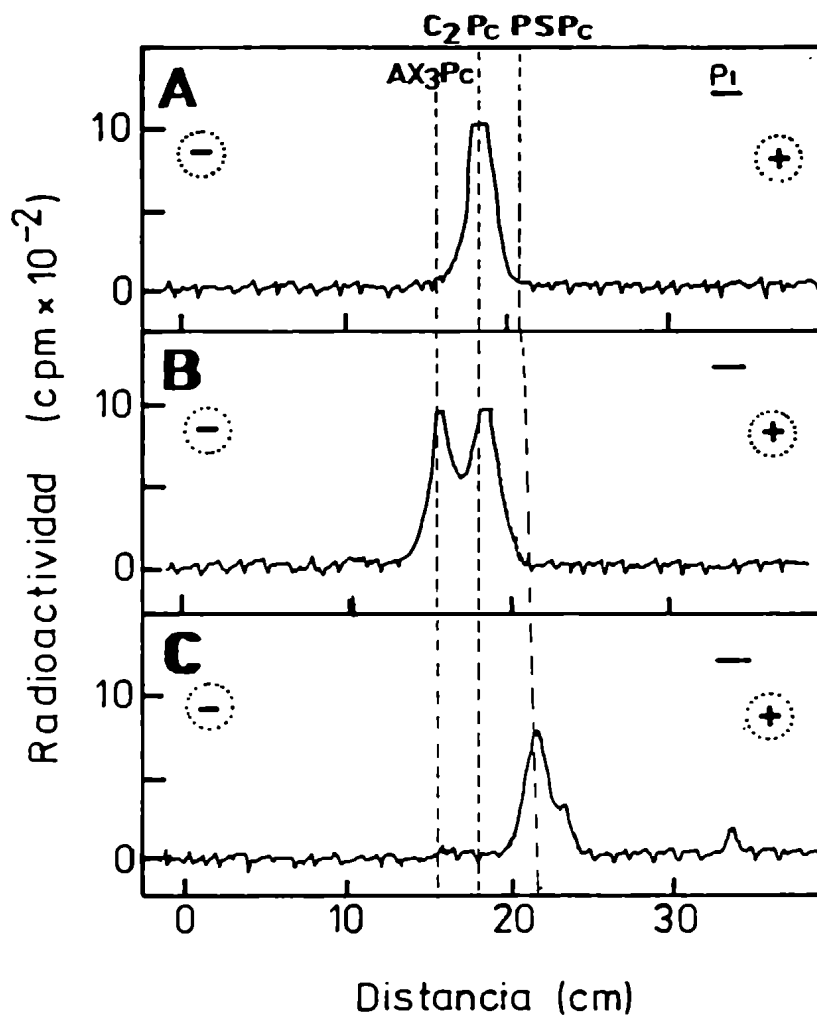


Figura 64: Obtención de oligosacáridos (^{32}P) difosfato lípido. Se efectuaron electroforesis en buffer G de los productos de degradación alcalina (cromatografía en solvente E) de extractos 1203, obtenidos en incubaciones estándar (30 min a 12°C con 1 mg de prot.) con los siguientes agregados:

- A: $15,9 \mu\text{M}$ de (β - ^{32}P)UDP-Glc (AE: 2,78 Ci/mmol),
- B: como en A, más $35,7 \mu\text{M}$ de GDP-Man, y
- C: como en B, más $35,7 \mu\text{M}$ de UDP-GlcUA.

Las incubaciones se procesaron por el método D. C_2Pc y AX_3Pc marcados en glucosa se obtuvieron como se indica en la sección 3.10.; PSPc marcado en ácido glucurónico se obtuvo como se indica en la Fig. 53 C.

Los ésteres fosfóricos cíclicos de celobiosa, manosilcelobiosa y pentasacáridos marcados con ^{32}P , fueron sometidos a tratamiento ácido y posterior hidrólisis con fosfatasa alcalina. Los productos obtenidos fueron electroforetizados en buffer G y en los tres casos se observó que el tratamiento produjo la liberación de ^{32}P como se esperaba. Como ejemplo en la Fig.65 se muestra el resultado obtenido con celobiosa (^{32}P) fosfato cíclico.

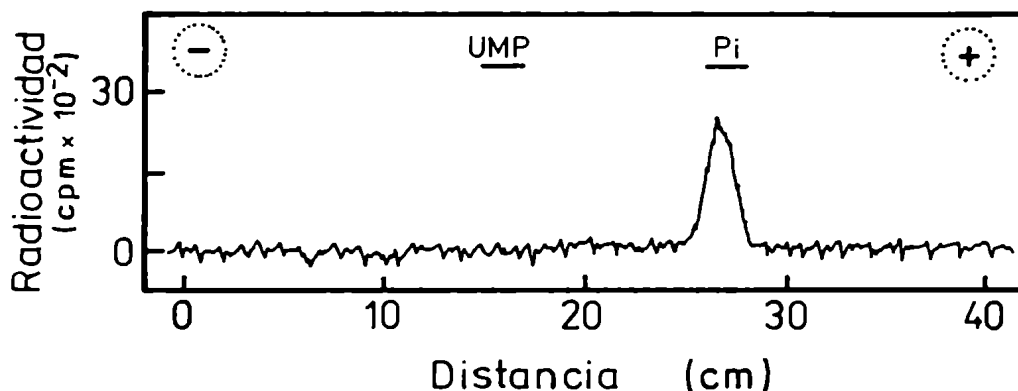


Figura 65: Obtención de ^{32}P a partir de celobiosa (^{32}P) fosfato cíclico. $\text{C}_2(^{32}\text{P})\text{Pc}$, obtenido como se describe en la Fig. 64 A, fue tratado con HCl 0,1 N a 100°C , durante 10 min y, luego de eliminar el ácido con fosfatasa alcalina. El producto obtenido fue electroforetizado en buffer G.

Una prueba más directa de la presencia del grupo difosfato se obtuvo aislandolo en forma de pirofosfato inorgánico. Para

ello se sometió a hidrólisis ácida suave a los tres oligosacáridos difosfato lípido marcados en ^{32}P . En la Fig.66 se muestra el resultado obtenido con pentasacárido (^{32}P)difosfato lípido, siendo idéntico para los dos restantes. Como puede verse se obtuvieron cantidades casi equivalentes de fosfato y pirofosfato inorgánico (Fig.66 A). La identidad del grupo pirofosfato aislado de esta manera se confirmó tratándolo con pirofosfatasa inorgánica (Fig.66 B), enzima que es altamente específica para ese sustrato y que lo transformó totalmente en fósforo inorgánico. Como la actividad de esta enzima es dependiente del catión Mg^{++} se efectuó un control en ausencia de dicho metal. En este caso como era de esperar no hubo degradación (Fig.66 C).

Estos resultados confirman la presencia de un grupo pirofosfato como nexo entre la porción azúcar y el lípido de los diferentes compuestos hasta aquí descritos.

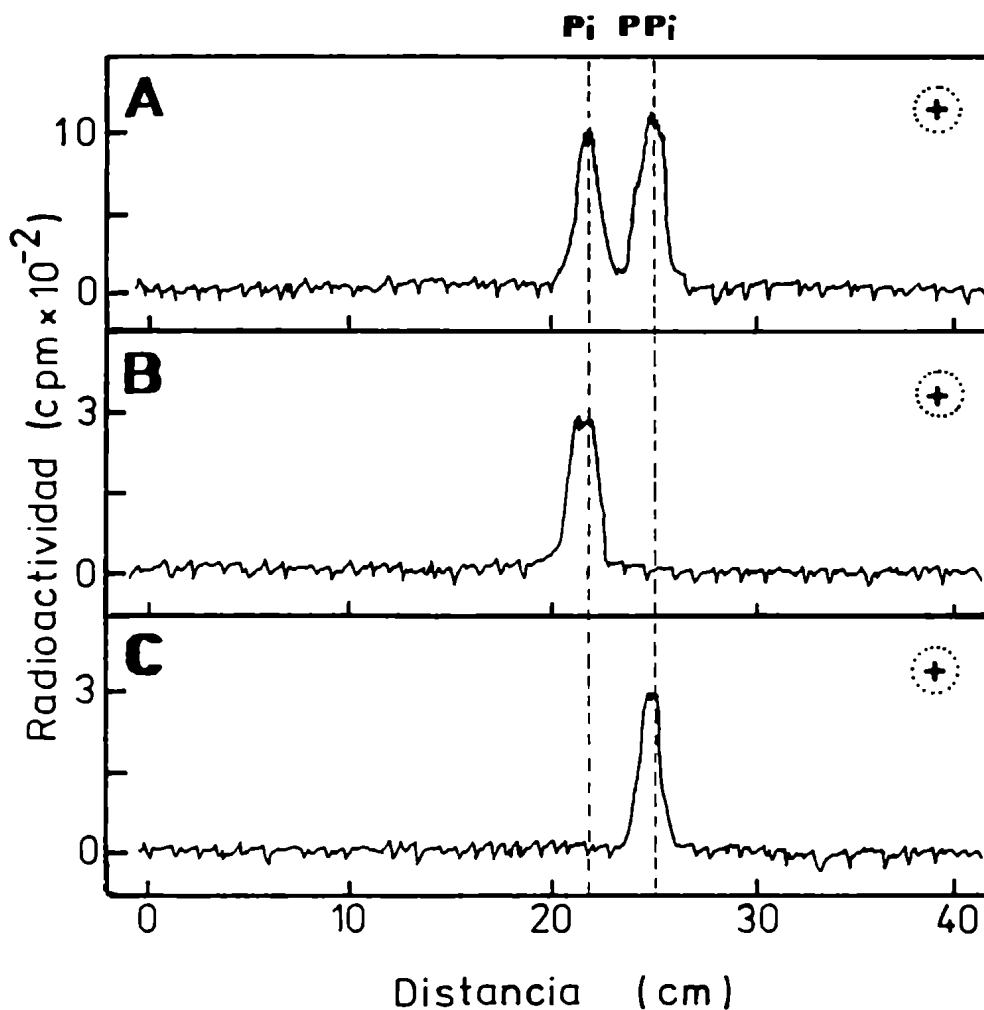


Figura 66: Aislamiento del grupo pirofosfato a partir de pentasacárido (^{32}P)difosfato lípido. PS- ^{32}PP -lípido obtenido en una incubación estándar como se describe en la leyenda de la Fig. 64 (caso C) fue sometido a hidrólisis ácida suave, y los productos se electroforetizaron en buffer G (A). El pico que presentó la misma movilidad que el pirofosfato estándar fue eluido y dividido en dos alícuotas iguales. Ambas fueron incubadas con pirofosfatasa inorgánica (sección 3.7.4.), en presencia (B) o en ausencia (C) de 2mM Mg^{++}

5.6. Síntesis de glucuronil-manosilcelobiosa difosfato prenoI

5.6.1. Incorporación de ácido (^{14}C)glucurónico a manosilcelobiosa difosfato prenoI

En las secciones precedentes se ha descrito la síntesis y se han estudiado las estructuras de celobiosa, de manosilcelobiosa y de pentasacárido asociados a un lípido. En este capítulo se detallan los experimentos realizados con el fin de aislar y estudiar el compuesto que sirve de nexo entre el trisacárido, manosilcelobiosa difosfato prenoI y el pentasacárido difosfato prenoI, es decir el tetrasacárido glucuronil-manosilcelobiosa difosfato prenoI. Este compuesto a su vez debería ser capaz de aceptar otra manosa para completar la unidad repetitiva. Precisamente debido a este hecho es que al incubar el preparado enzimático en presencia de los tres nucleótidos, UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico, se obtiene el pentasacárido difosfato prenoI, como se mencionó en la sección 5.4.. Con el fin de obviar este inconveniente, recurrimos a la técnica de incubar en dos etapas, que ya empleamos en el estudio de la síntesis de manosilcelobiosa difosfato prenoI y en la síntesis de pentasacárido difosfato prenoI (secciones 5.3.4. y 5.4.3. respectivamente).

En una primera etapa se incubó en presencia de UDP-glucosa y de GDP-manosa, con el fin de acumular manosilcelobiosa difosfato preno1, de acuerdo a lo descrito en la sección 5.3.. Este compuesto debería servir como aceptor de ácido glucurónico en una segunda incubación efectuada en presencia de UDP-glucurónico radioactivo. También se hizo un control, consistente en realizar la primera incubación en ausencia de nucleótido-azúcares. Los resultados obtenidos (tabla 15) indicaron claramente que solo se logró incorporación de ácido glucurónico cuando se permitió preformar trisacárido aceptor en la primera incubación.

Tabla 15: Incorporación de ácido glucurónico radioactivo en extracto 1203 en incubaciones realizadas en dos etapas

Agregados en la 1º incubación	(¹⁴ C)GlcUA incorporado en extracto 1203 (pmoles)
Nada	3
UDP-Glc + GDP-Man	42

Se realizaron incubaciones en dos etapas procesadas según el método F, en presencia de 0,4 mg de prot. Ambas incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min. La primera se efectuó tanto en ausencia de nucleótido-azúcares como en presencia de 285 µM de UDP-Glc y de 214 µM de GDP-Man. La segunda incubación se realizó en ambos casos en presencia de 17,1 µM de UDP-¹⁴C) GlcUA (AE: 266 Ci/mol). En alícuotas de ambos extractos 1203 se midió radioactividad.

5.6.2. Análisis del material liposoluble obtenido en incubaciones en dos etapas con marca en ácido glucurónico.

En este estudio nuevamente se utilizó como referencia a un compuesto de estructura conocida producido por A. xylinum, en este caso β -glucuronil-1,6- β -manosil-1,3-celobiosa-PP-prenol (94) u oligosacárido AX₄-PP-prenol, y sus derivados: el éster fosfórico cíclico, AX₄Pc y el oligosacárido libre AX₄.

El material liposoluble obtenido en la tabla 15 línea 2 se analizó por los mismos criterios ya empleados con los otros lípido-azúcares estudiados.

Por hidrólisis ácida suave y posterior electroforesis en buffer G, la radioactividad migró como único compuesto de R_{UMP}: 0,7 (Fig.67 A).

Por cromatografía en solvente alcalino se obtuvo un solo compuesto de R_f: 0,33 (Fig.67 B), que eluído y sometido a electroforesis migró, a diferencia del producto de hidrólisis ácida, con un R_{UMP}: 1,1-1,15 (Fig.67 C). Pero cuando el producto de la degradación alcalina fue tratado con ácido (HCl 0,1N, 100°C, 10 min) y fosfatasa alcalina se obtuvo un compuesto con la misma movilidad que el producto de hidrólisis ácida (R_{UMP}: 0,7, dato no mostrado).

Estos resultados fueron similares a los encontrados cuando el AX₁-PP-prenol fue sometido a los mismos tratamientos

(Fig.66 A,B y C). Es decir que estaríamos en presencia de un tetrasacárido difosfato lípido como esperábamos.

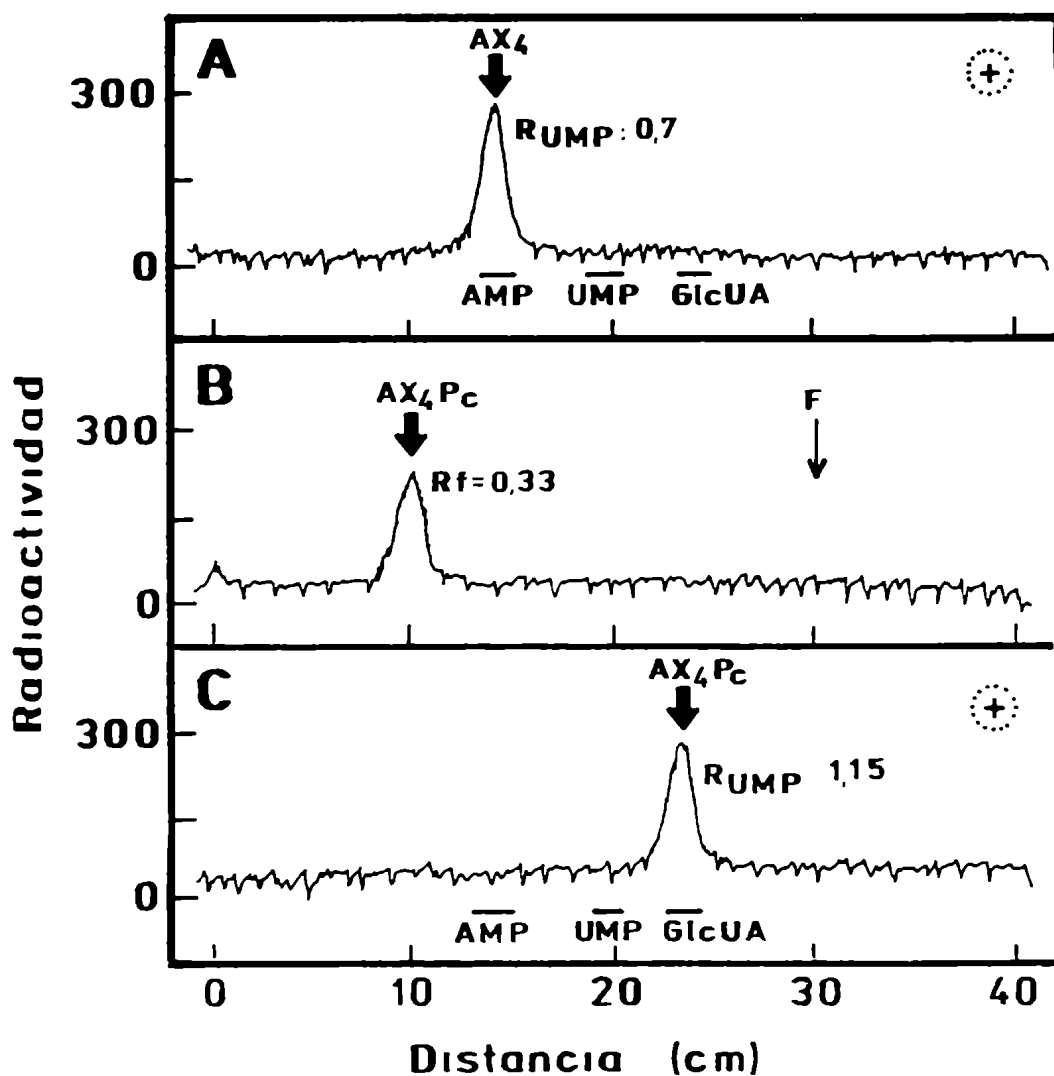


Figura 67: Análisis del material liposoluble marcado en ácido glucurónico. El material se obtuvo como se indica en la tabla 15 línea 2. Una alícuota del extracto 1203 se sometió a hidrólisis ácida suave (sección 3.5.1.2.) y los productos se electroforetizaron en buffer G (A). El resto del extracto se cromatografió en papel en solvente F (B). Se eluyó el único pico radioactivo de B y se sometió a electroforesis en papel en buffer G (C).

AX₄ y AX₄Pc se obtuvieron como se indica en la sección 3.10..

Con el objeto de poseer un dato adicional sobre el tamaño, el oligosacárido, obtenido por hidrólisis ácida fue cromatografiado en papel en solventes I y 0 (Fig. 68 A y B respectivamente). En ambos sistemas se comportó como el tetrasacárido AX₄.

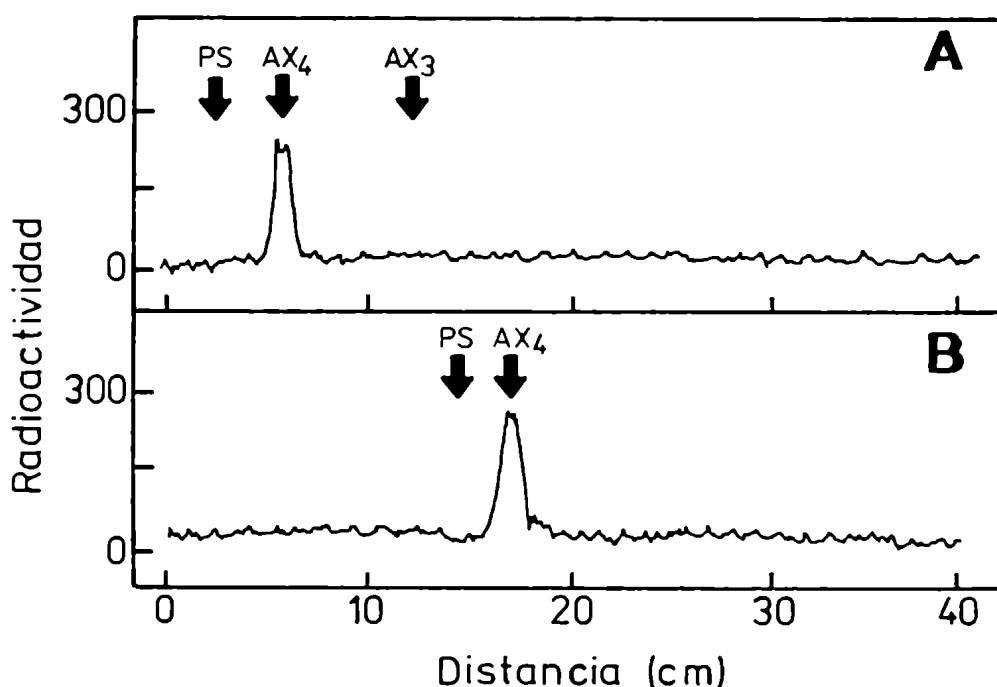


Figura 68: Cromatografía en papel del oligosacárido marcado en ácido glucurónico. El oligosacárido se obtuvo como se indica en la Fig. 67 A y se cromatografió en papel en solventes I (A) y 0 (B).

AX₃ y AX₄ se obtuvieron como se indica en la sección 3.10. y PS se obtuvo como se indica en la Fig. 53 B.

Estos resultados, junto con los mostrados en la Fig.67, confirmaron que el compuesto estudiado era un tetrasacárido difosfato lípido. Este se pudo obtener gracias a la incubación en dos etapas. La diferencia fundamental respecto de incubar los tres nucleótidos directamente residió en el lavado entre las dos incubaciones, que eliminó el exceso de nucleótidos de la primera. La ausencia de GDP-manosa en la segunda incubación impidió que el compuesto formado fuera utilizado en la síntesis del pentasacárido difosfato lípido.

5.6.3. Obtención del tetrasacárido difosfato lípido marcado con glucosa o con manosa

Como una evidencia más de que estábamos frente al glucuronil-manosilcelobiosa difosfato lípido se lo intentó sintetizar en presencia de UDP-(^{14}C)glucosa o en presencia de GDP-(^{14}C)manosa, siguiendo un esquema de incubación en dos etapas similar al desarrollado para obtener el mismo compuesto con marca en ácido glucurónico.

Para obtener el compuesto con marca en glucosa se efectuó una primera incubación con UDP-(^{14}C)glucosa y GDP-manosa no radioactivo, con el objeto de obtener manosil-(^{14}C)celobiosa difosfato prenoí. Para el caso de obtenerlo con marca en manosa, la primera incubación se realizó en presencia de UDP-glucosa no radioactivo y de GDP-(^{14}C)manosa, para obtener en este

caso (^{14}C)manosil-celobiosa difosfato preno1. En ambos casos luego de lavar, se reincubó en presencia de UDP-glucurónico no radioactivo (tabla 16).

Tabla 16: Síntesis de tetrasacárido-PP-prenol marcado en glucosa o en manosa.

Nucleótidos agregados en		^{14}C Glc ó ^{14}C Man incorporados en ésteres fosfóricos cíclicos en:		
1 ^a incubación	2 ^a incubación	Manosil-celobiosa	Glucuronil-manosil-celobiosa (pmoles)	
Exp. A	UDP-(^{14}C)Glc + GDP-Män	Ninguno	80	0
	UDP-(^{14}C)Glc + GDP-Man	UDP-GlcUA	43	31
Exp. B	UDP-Glc - GDP-(^{14}C)Man	Ninguno	110	0
	UDP-Glc - GDP-(^{14}C)Man	UDP-GlcUA	55	50

Se realizaron incubaciones en dos etapas, según el método F, en presencia de 0,4 mg de prot.. Ambas incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min. En la primera incubación del experimento A se emplearon 15,7 μM de UDP-(^{14}C)Glc (AE: 196 Ci/mol) y 214 μM de GDP-Man; en el experimento B se emplearon 285 μM de UDP-Glc y 17,1 μM de GDP-(^{14}C)Man (AE: 216 Ci/mol). En los dos experimentos se agregaron, cuando se indica en la segunda etapa, 35,7 μM de UDP-GlcUA. El extracto 1203 de todos los casos se analizó por cromatografía en papel en solvente F. Luego de radiocromatografiadas, las tiras cromatográficas se cortaron y se midió radioactividad en las áreas correspondientes a los ésteres fosfórico-cíclicos de trisacárido y de tetrasacárido.

Nuevamente se observó formación del tetrasacárido solamente cuando se realizó la segunda incubación en presencia de UDP-glucurónico. Por la naturaleza de la marca en estos dos casos se pudo ver, además, que en las condiciones del ensayo aproximadamente la mitad del trisacárido formado en la primera etapa se convirtió en tetrasacárido en la segunda etapa.

5.6.4. El tetrasacárido difosfato prenoI como precursor del pentasacárido difosfato prenoI

Se mencionó al comienzo de este capítulo que el tetrasacárido difosfato prenoI debería ser capaz de aceptar un residuo de manosa para formar el pentasacárido difosfato prenoI. Con este objeto se realizó una incubación en dos etapas. En la primera de ellas se formó manosilcelobiosa difosfato prenoI no marcado y en la segunda se incubó con UDP-(^{14}C)glucurónico en presencia y en ausencia de GDP-manosa. Los compuestos formados de esta manera fueron analizados a través de los productos liberados por hidrólisis ácida suave y posterior cromatografía (Fig.69)

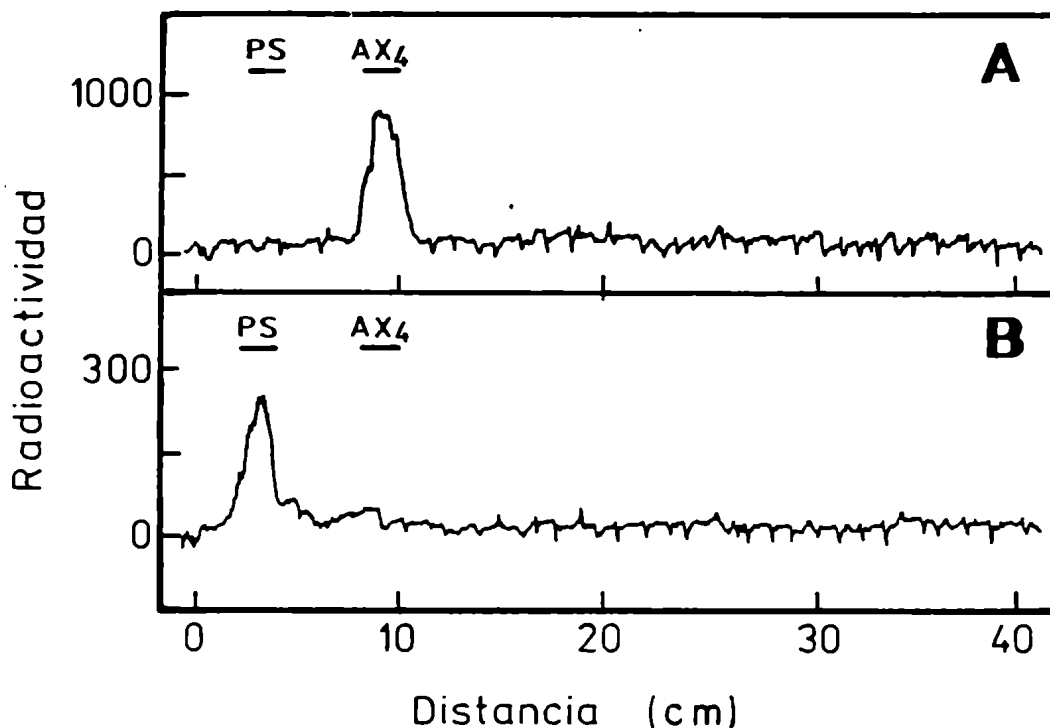


Figura 69: Síntesis de pentasacárido-PP-prenol a partir de (^{14}C -GlcUA) tetrasacárido-PP-prenol. Se realizaron incubaciones en dos etapas, procesadas según el método F, en presencia de 0,3 mg de prot.. Ambas incubaciones se realizaron a 12°C durante 30 min. En la 1^a incubación se agregó $285\ \mu\text{M}$ de UDP-Glc y $214\ \mu\text{M}$ de GDP-Man. En la 2^a se agregó $17,1\ \mu\text{M}$ de UDP- $(^{14}\text{C})\text{GlcUA}$ (AE: 268 Ci/mol) (A); y, además $214\ \mu\text{M}$ de GDP-Man (B). Se efectuó una hidrólisis ácida suave del material incorporado en extracto 1203, y los productos se cromatografiaron en papel en solvente I.

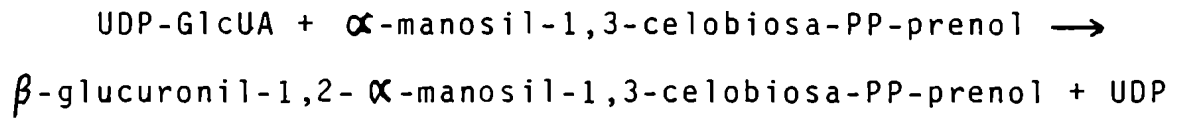
En la segunda incubación en ausencia de GDP-manosa el UDP- (^{14}C) glucurónico cedió su resto azúcar al manosilcelobiosa difosfa-

to prenoI formado en la primera incubación, obteniéndose (por la técnica empleada) (^{14}C)glucuronil-manosilcelobiosa, como era de esperarse (Fig.69 A). Cuando además del nucleótido radioactivo se agregó GDP-manosa se obtuvo (^{14}C -GlcUA)pentasacárido (Fig.69 B). Es decir que el tetrasacárido difosfato prenoI fue capaz de aceptar un residuo manosa para formar el pentasacárido difosfato prenoI, que era lo que queríamos demostrar.

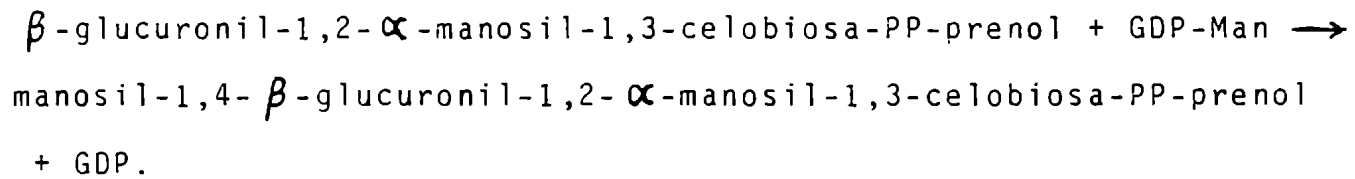
Además si el GDP-manosa agregado en la segunda incubación se reemplazaba por UDP-glucosa, el pentasacárido no se formaba, quedando tetrasacárido como producto final. Este resultado, junto con el hecho de que el residuo de ácido glucurónico del pentasacárido tiene un sustituyente en su carbono 4 (sección 5.4.6.4.), indican que en el pentasacárido el ácido glucurónico está sustituido por un residuo manosa.

Un hecho importante a señalar es la disminución en la cantidad del pentasacárido recuperado con respecto al tetrasacárido formado (ver escalas Fig.69). Se debe, como se detallará en el capítulo siguiente, a que el pentasacárido difosfato prenoI es precursor del polisacárido. Por este motivo la segunda incubación debió realizarse a 12°C , pues a esta temperatura la reacción polimerización es menor (tabla 8, sección 5.1.).

Estos resultados nos permiten concluir que la incorporación de ácido glucurónico al trisacárido lípido ocurre según la siguiente reacción:



A su vez el tetrasacárido es capaz de aceptar un residuo manosa a partir de GDP-manosa para formar la unidad repetitiva difosfato prenoI:



5.7. Biosíntesis del xantano "in vitro"

5.7.1. Generalidades

Los resultados mencionados en los capítulos anteriores revelaron que la formación del pentasacárido difosfato prenoI era evidente solo cuando los tres nucleótido-azúcares estaban presentes (sección 5.4.). Igualmente, esta era la condición necesaria para obtener síntesis de xantano, tal como se señaló en la sección 5.1.. Estos resultados eran consistentes con la hipótesis de que el lípido pentasacárido era un precursor del polisacárido.

En este capítulo se describirán los experimentos realizados para confirmar o desechar esta hipótesis.

5.7.2. Pentasacárido difosfato lípido como precursor del polisacárido.

5.7.2.1. Obtención

Para confirmar la participación del pentasacárido difosfato prenoI en la síntesis del xantano se efectuaron incubacio-

nes en dos etapas. En la primera se incubó el preparado enzimático en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico (éste último radioactivo) para formar y acumular el lípido-azúcar. Luego de lavar las células con buffer, se las dividió en dos alícuotas iguales (tabla 17). La primera no fue reincubada (alícuota A) para analizar el (los) componente(s) formado(s) en esta etapa. La restante (alícuota B) fue reincubada a 20°C sin ningún agregado para permitir que ocurra la polimerización, si la había. Los resultados indicaron que el lípido-azúcar acumulado en la primera incubación disminuyó en la segunda, al tiempo que se observó incorporación de radioactividad en xantano.

Este resultado señala claramente la participación del pentasacárido difosfato prenoI en la síntesis del xantano. No obstante debe aclararse que en la tabla 17, la suma de las cantidades de ácido (^{14}C)glucurónico incorporados en el polisacárido y en PS-PP-prenoI (alícuota B) no alcanzan a cubrir las cantidades incorporadas al lípido-azúcar en el control sin reincubar (alícuota A). La diferencia se encontró en los sobrenadantes obtenidos después de precipitar y lavar el xantano y no fueron posteriormente analizados. Nuestra idea, que trataremos de confirmar en futuros trabajos, es que dicha radioactividad se halla en compuestos de peso molecular intermedio entre el producto final y el pentasacárido difosfato prenoI.

Tabla 17: Síntesis de xantano en dos etapas

Alícuotas	Condiciones de ensayo	$(^{14}\text{C})\text{GlcUA}$ incorporado en: PS-PP-lípido polisacárido (pmoles)	
A	No reincubado	52	7
B	Reincubado	19	17

Se realizó una incubación en dos etapas procesada por el método F, en un volumen final de 140 μl y en presencia de 0,8 mg de prot. y de UDP-Glc (285 μM), GDP-Man (214 μM) y UDP- $(^{14}\text{C})\text{GlcUA}$ (17,1 μM , AE: 268 Ci/mol). Luego del lavado con buffer la resuspensión se dividió en dos alícuotas iguales. Una no se reincubó (A) y la otra se reincubó sin adiciones (B). Ambas incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min. Los extractos 1203 se analizaron por cromatografía en solvente F. Las tiras cromatográficas se radiocromatografiaron y las áreas correspondientes al PSPc se cortaron y contaron para radioactividad, la cual se adjudicó a PS-PP-lípido. El polisacárido se midió como se indica en la sección 3.4.1.1..

5.7.2.2. Requerimientos de la polimerización

Con el objeto de confirmar los resultados anteriores se efectuó el siguiente experimento en dos etapas (tabla 18). La primera incubación se realizó en presencia de UDP-glucosa radioactiva para formar $(^{14}\text{C})\text{celobiosa difosfato preno1}$. Luego de los lavados correspondientes se realizó una segunda incubación con diferentes agregados. Como era de esperar, única-

mente en presencia de GDP-manosa y UDP-glucurónico hubo apreciable formación de polisacárido (alícuota 5), no observándose cantidades significativas del mismo cuando se efectuaron reincubaciones sin agregados (alícuota 2) ó cuando se agregó UDP-glucurónico (alícuota 3), ó GDP-manosa (alícuota 4), así como en el control que no fue reincubado (alícuota 1).

Tabla 18: Polimerización del pentasacárido difosfato prenil (I)

Alícuota	Agregados en la reincubación	$(^{14}\text{C})\text{Glc}$ incorporada en: extracto 1203 (pmoles)	polisacárido	Estructura del oligosacárido unido al lípido difosfato
1	No reincubado	41	0,2	celobiosa
2	Sin agregados	39	0,6	celobiosa
3	UDP-GlcUA	37	0,6	celobiosa
4	GDP-Man	15,7	3,8	manosilcelobiosa
5	UDP-GlcUA + GDP-Man	9,7	12,0	pentasacárido

Se realizó una incubación en un volúmen final de 0,35 ml, en presencia de 2 mg de prot. y de 15,7 μM de UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ (AE: 196 Ci/mol), a 12°C y durante 30 min. La reacción se detuvo y procesó como se indica en el método F, y las células lavadas y resuspendidas se dividieron en cinco alícuotas. En donde se indica se agregó UDP-GlcUA (285 μM) o GDP-Man (285 μM) o ambos, y se reincubó a 20°C durante 30 min. La alícuota 1 no se reincubó.

El polisacárido obtenido en presencia de los tres nucleótidos, alícuota 5, fue filtrado por una columna de Bio-Gel A-5m. El perfil cromatográfico obtenido (Fig.70) resultó ser similar al mostrado en las Figs.32, 33 y 34, indicando que el producto formado a partir del pentasacárido difosfato preno1 es similar, por este criterio, al obtenido a partir directamente de los nucleótido-azúcares.

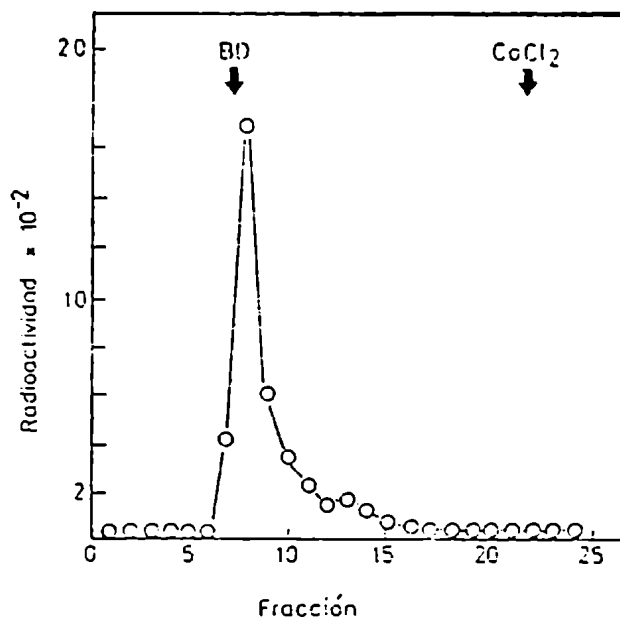


Figura 70: Filtración en tamiz del producto de polimerización en dos etapas. Polisacárido (¹⁴C)Glc obtenido como en la tabla 18, alícuota 5 fue filtrado a través de Bio-Gel A-5m (sección 3.8.2.).

Los datos presentados en la tabla 18 confirman nuevamente que se requiere la formación de pentasacárido difosfato preno1 para que ocurra la síntesis del polisacárido. Así el celobiosa difosfato preno1, acumulado en la primera etapa permanece prácticamente inalterado durante la segunda incubación, indicando que no hubo síntesis de celulosa (alícuotas 1 y 2). Este resultado descarta una posible alternativa para la síntesis del xantano que comenzaría con la formación de una cadena central de celulosa, con posterior agregado de los azúcares que componen la rama lateral.

Sin embargo cuando en la segunda incubación se agregó GDP-manosa (alícuota 4) se observó una importante disminución de la glucosa radioactiva incorporada en extracto 1203. El análisis de este extracto indicó que estaba compuesto fundamentalmente por manosilcelobiosa difosfato preno1 (como se señala en la tabla) pero que además había una pequeña cantidad de pentasacárido difosfato preno1, probablemente debida a la existencia de un dador endógeno de ácido glucurónico. La presencia del lípido pentasacárido explicaría el aumento en la síntesis del xantano observado en este caso.

Para descartar o confirmar la posibilidad de que el manosilcelobiosa difosfato preno1 pudiera polimerizar, se efectuó nuevamente un experimento en dos etapas. En la primera incubación se formó el lípido trisacárido y, efectuando la segunda

incubación a 20°C para favorecer la polimerización en el caso de que fuera posible. Además en la segunda etapa se investigaron varias alternativas: Se agregó UDP-glucurónico, lo que nos permitió estudiar si el tetrasacárido formado podía ser polimerizado y finalmente se agregó UDP-glucurónico y GDP-manosa para permitir la formación de pentasacárido difosfato preno1 y controlar la reacción de polimerización. Resumiendo la finalidad de este experimento fue estudiar si el trisacárido o el tetrasacárido asociados al lípido podían funcionar como sustratos para la reacción de polimerización, o si por el contrario, el pentasacárido difosfato preno1 era el único sustrato de dicha reacción.

Teniendo en cuenta estas premisas se incubaron células tratadas con EDTA en presencia de UDP-glucosa y de GDP-(¹⁴C) manosa a 12°C. Luego de lavarlas con buffer se las dividió en cuatro alícuotas iguales (tabla 19). La primera (alícuota 1) no fue reincubada, para permitir analizar el (los) componente(s) formado(s) en esta etapa. Las otras alícuotas fueron reincubadas a 20°C en las siguientes condiciones: la segunda (alícuota 2) tal cual y las restantes en presencia de UDP-glucurónico para permitir la formación del lípido tetrasacárido (alícuota 3) o de UDP-glucurónico y de GDP-manosa (alícuota 4) para permitir la formación de la unidad repetitiva. En todos los casos se investigó la formación de polisacá-

rido y se analizaron los distintos extractos 1203 para determinar su composición.

Los resultados indican que en la primera etapa se formó como se esperaba, únicamente manosilcelobiosa difosfato preno1 (alícuota 1) y que tanto este compuesto (alícuota 2) como el glucuronil-manosilcelobiosa difosfato preno1 (alícuota 3) formados durante la segunda incubación no pueden ser polimerizados. Finalmente como en los casos anteriores, cuando se permitió la formación de pentasacárido difosfato preno1 hubo polimerización (alícuota 4).

Tabla 19: Polimerización del pentasacárido difosfato preno1 (II)

Alícuota	Agregados en la reincubación	$(^{14}\text{C})\text{Glc}$ incorporada en: extracto 1203 polisacárido (pmoles)		Estructura del oligosacárido unido al lípido difosfato
1	No reincubado	59	2	manosilcelobiosa
2	Sin agregados	51	3	manosilcelobiosa
3	UDP-GlcUA	45	2	glucuronil-manosilcelobiosa
4	UDP-GlcUA + GDP-Man	22	32	pentasacárido

Se realizó una incubación estandar en un volumen final de 0,28 ml en presencia de 1,6 mg de prot., 15,8 μM de GDP- $(^{14}\text{C})\text{Man}$ (AE: 216 Ci/mol) y 285 μM de UDP-Glc, a 12°C y durante 30 min. La reacción se detuvo y procesó por el método F y las células lavadas y resuspendidas se dividieron en cuatro alícuotas. En donde se indica se agregó UDP-GlcUA (285 μM) ó GDP-Man (285 μM) ó ambos y se reincubó a 20°C durante 30 min. Una alícuota (n°1) no se reincubó.

Los resultados presentados en este capítulo nos permitieron concluir que la síntesis del xantano se realiza por la polimerización de las unidades repetitivas a partir del pentasacárido difosfato preno1 y que ninguno de los precursores del pentasacárido puede ser polimerizado directamente.

5.8. Incorporación de restos no glicosídicos

Como se mencionó en la introducción, sección 1.3.1., en los heteropolisacáridos muchas veces están presentes, además de los diferentes monosacáridos, uno o varios grupos acilos. Los más comunes son el acetato, como grupo O-acetilo y el piruvato en la forma de acetales unido en las posiciones 3 y 4 ó 4 y 6 de un azúcar neutro, ó más raramente a un ácido urónico (16). En el caso particular del xantano, objeto de nuestro estudio, se ha encontrado un grupo acetilo, unido en el carbono 6 de la manosa interna, y además un grupo piruvato unido a los carbonos 4 y 6 de la manosa externa o terminal (Fig.71).

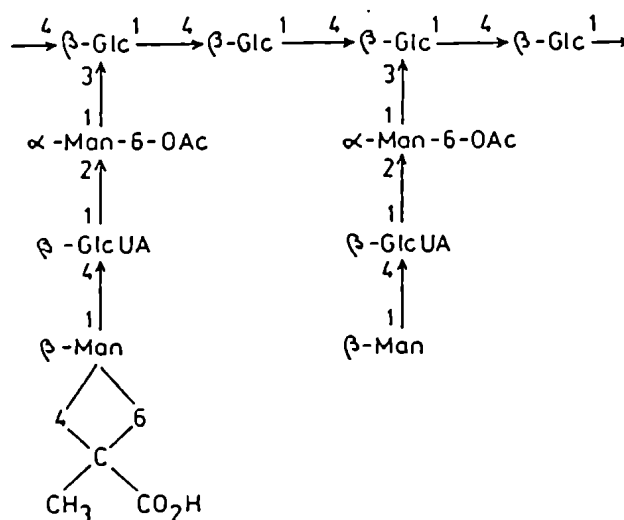


Figura 71: Presencia de grupos acetato y piruvato en la unidad repetitiva del xantano (120).

La presencia de estos grupos en el polisacárido nos permitió estudiar principalmente dos cuestiones. La primera de ellas era establecer que compuestos actuaban como dadores de dichos grupos. La segunda cuestión era determinar si estos grupos eran cedidos a los residuos glicosídicos en la etapa de lípido intermediarios, o si lo eran cuando el polisacárido estaba ya formado, o de ambas maneras.

En este capítulo, se describirán los resultados encontrados sobre los dadores y el nivel en que se produce la incorporación de los grupos piruvato y acetato.

5.8.1. Incorporación de piruvato a material liposoluble

Como se mencionó en los párrafos anteriores, una de las cuestiones a aclarar era determinar el compuesto que actuaba como dador del piruvato. Evidentemente este grupo debería encontrarse en un "estado activado" y por esta razón se utilizó ácido fosfoenolpirúvico (PEP), que por otra parte se encuentra tanto en células eucarióticas como procarióticas.

La segunda cuestión a determinar era si el piruvato se incorporaba a nivel de lípido intermediario o al polisacárido ya formado. Se efectuaron entonces una serie de incubaciones en presencia de ácido (^{14}C)fosfoenolpirúvico (^{14}C -PEP) con todas las combinaciones posibles de los tres nucleótido-azúcares

dadores (tabla 20). Los resultados indicaron que hubo incorporación de radioactividad en material liposoluble y que ésta aumentó si en la incubación estaban presentes simultáneamente UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico (tabla 20, nº8). Estos resultados indicaron que el piruvato se incorporaba a nivel de prenil-fosfo-azúcar. Las incorporaciones observadas en presencia de menos de tres dadores se deberían probablemente a la presencia de pentasacárido-PP-prenol endógeno.

5.8.1.1. Análisis del producto obtenido

El producto extraído en solvente 1203 fue analizado por varios criterios (Fig.72).

Sometido a electroforesis en buffer G quedó en el lugar de siembra como sucede con los lípidos azúcares (Fig.72 A). Pero si previamente es sometido a una hidrólisis ácida suave, se observa un pico con una movilidad R_{UMp} : 1,0, la cual es mayor que la correspondiente al pentasacárido, PS(R_{UMp} : 0,6) (Fig.72 B). Esta diferencia de movilidad fue atribuida a la presencia de un grupo piruvato unido al pentasacárido. Es de hacer notar que en estas condiciones de hidrólisis, (HCl 0,01N, 10 min, 100°C) no se observó liberación de ácido pirúvico.

Cuando el extracto 1203 fue cromatografiado en solvente F se obtuvo un único pico de radioactividad de movilidad simi-

Tabla 20: Incorporación de (^{14}C)piruvato en extracto 1203.
Efecto de los nucleótido-azúcares.

N°	Agregados			(^{14}C) piruvato incorporado en extracto 1203 (pmoles)
	UDP-Glc	GDP-Man	UDP-GlcUA	
1	-	-	-	21
2	+	-	-	28
3	-	+	-	24
4	-	-	+	22
5	+	+	-	24
6	+	-	+	21
7	-	+	+	21
8	+	+	+	67

La mezcla de incubación estándar contenía 0,16 mg de proteínas, 570 μM de (^{14}C)PEP y donde se indica 285 μM de UDP-Glc, 142 μM de GDP-Man ó 35,7 μM de UDP-GlcUA. Las incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min y se procesaron por el método D. Se contó radioactividad en alícuotas de cada extracto 1203.

lar (R_f 0,25) a la del PSPc (Fig.72 C). Sin embargo electroforesis de este pico en buffer G muestra un único pico, cuya movilidad (R_{UMP} : 1,4) nuevamente es mayor que la observada para PSPc (R_{UMP} : 1,0) (Fig.72 D). Se supuso entonces que el compues-

to de R_{UMP} : 1,4 era el derivado fosfórico cíclico del pentasacárido piruvilado (Pir-PSPC). Esta suposición fue confirmada tratando al compuesto con ácido y luego con fosfatasa alcalina: se obtuvo piruvil-pentasacárido libre pues al ser sometido a electroforesis en buffer G se observó un perfil radio-cromatográfico idéntico al obtenido en la Fig.72 B, con un único compuesto radioactivo de movilidad R_{UMP} : 1,0. Como en el caso de la hidrólisis ácida suave, tampoco se detectó liberación de ácido pirúvico.

5.8.1.2. Condiciones de incorporación de piruvato

5.8.1.2.1. Temperatura de incubación

Se estudió el efecto de la temperatura de incubación en la incorporación de (^{14}C)piruvato a material liposoluble (tabla 21) encontrándose que a 20°C se incorporaba aproximadamente 4 veces más que a 0°C ó 12°C.

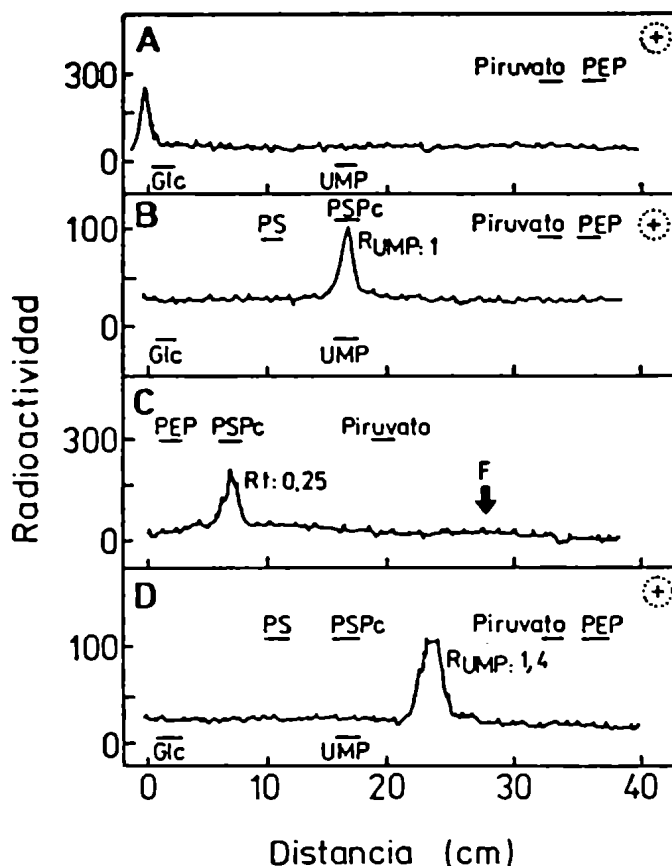


Figura 72: Caracterización del material incorporado en extracto 1203. El material marcado en ácido (^{14}C)pirúvico obtenido como se indica en la Tabla 20 n°8, se sometió directamente (A), o luego de una hidrólisis ácida suave (B) a electroforesis en papel con buffer G.

Otra muestra del extracto 1203 se cromatografió en papel con solvente F (C) y el único pico observado (Rf: 0,25) se eluyó y electroforetizó en buffer G (D).

PS y PSPc marcados en ácido glucurónico se obtuvieron como se indica en la Fig. 53 B y D.

Tabla 21: Efecto de la temperatura sobre la incorporación de piruvato proveniente de (^{14}C)PEP a material liposoluble.

T (°C)	(^{14}C)Piruvato incorporado a extracto 1203 (pmoles)
0	15
12	12
20	55

Se realizaron incubaciones standard con 0,2 mg de prot., durante 30 min a las temperaturas indicadas, en presencia de 285 μM de UDP-Glc, 35,7 μM GDP-Man, 35,7 μM UDP-GlcUA y 570 μM (^{14}C)PEP. Las reacciones se inactivaron y se procesaron por el método D.

5.8.1.2.2. El PEP como sustrato

Para confirmar que el PEP y no el piruvato era el sustrato dador, se efectuaron incubaciones en presencia de exceso de PEP, o de piruvato, ambos no radioactivos. En este último caso, la incorporación de (^{14}C)piruvato en extracto 1203 a partir de (^{14}C)PEP fue afectada en menor grado (25%) que en el primer caso, donde la incorporación disminuyó en aproximadamente un 75% (Tabla 22)

Tabla 22: Efecto de PEP y piruvato no radioactivos sobre la incorporación de (^{14}C)piruvato a partir de (^{14}C)PEP en extracto 1203.

Exp	Agregado	(^{14}C)Piruvato incorporado a extracto 1203 (cpm)
1	Nada	1210
2	PEP	300
3	Pir	900

Se obtuvo extracto 1203 en las mismas condiciones que las indicadas en la tabla 21 (a 20°C), pero añadiendo en el Exp 2 PEP (4,3 mM), y en el Exp 3 Pir (4,3 mM), ambos no radioactivos.

5.8.1.3. Obtención del piruvil-pentasacárido difosfato prenil marcado con glucosa, con manosa ó con ácido glucurónico.

Para comprobar que el (^{14}C)piruvato se había incorporado sobre el pentasacárido difosfato prenil era necesario encontrar el nuevo compuesto marcado en cualquiera de los azúcares que lo constituyen, esto es, glucosa, manosa ó ácido glucurónico.

Se efectuaron entonces incubaciones standard en presencia de los tres nucleótido-azúcares, con uno de ellos radioactivo, en presencia y ausencia de fosfoenolpiruvato no radioactivo. El material incorporado al extracto 1203 se analizó por

tratamiento alcalino suave y posterior electroforesis de los productos obtenidos. En la Fig.73 se muestran los resultados obtenidos empleando GDP-(^{14}C)manosa como nucleótido radioactivo, siendo completamente similares los obtenidos con los otros dos nucleótidos radioactivos.

En el caso de incubar en ausencia de PEP el análisis mostró la existencia de un dador endógeno de grupos piruvato, ya que se formó una pequeña cantidad de un compuesto cuya movilidad electroforética (R_{UMP} : 1,4, Fig.73 A) coincidió con la obtenida para el piruvil-pentasacárido fosfato cíclico marcado en el grupo piruvato. De todos modos al añadir PEP a la incubación la cantidad de este compuesto aumentó considerablemente (Fig.73 B).

Es importante aclarar que la cantidad total de radioactividad incorporada en solvente 1203 no varió por el agregado de PEP. Esto es el aumento de piruvil-pentasacárido difosfato preno1 se efectuó a expensas del pentasacárido difosfato preno1.

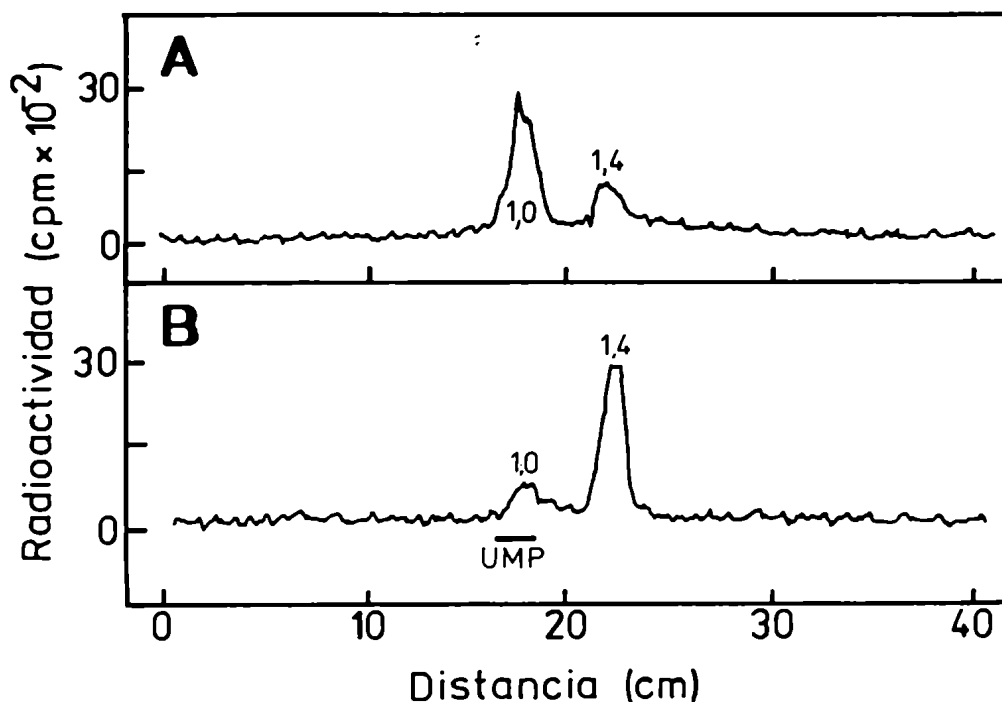


Figura 73: Obtención de piruvil-pentacárido difosfato lípido marcado en manosa. Se efectuaron dos incubaciones estándar en ausencia (A) y en presencia (B) de $714 \mu\text{M}$ de PEP no radioactivo, conteniendo además en ambos casos $0,4 \text{ mg}$ de prot., $285 \mu\text{M}$ de UDP-Glc, $17,1 \mu\text{M}$ de $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{Man}$ (AE: 216 Ci/mol) y $285 \mu\text{M}$ de UDP-GlcUA. Las incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min y se procesaron por el método D. Los extractos 1203 se cromatografiaron con solvente F. En ambos casos se obtuvo un solo pico de $R_f: 0,25$ (no mostrado) que se eluyó y sometió a electroforesis en papel con buffer G.

La presencia del dador endógeno de grupos piruvato pudo ser eliminada si se efectuaba una incubación previa con GDP-manosa no radioactivo. En la Fig.74 se muestran los resultados ob-

tenidos al realizar una incubación directa (cuadro A) y los obtenidos al realizar la misma incubación pero después de incubar el preparado enzimático en presencia de GDP-manosa (cuadro B). El compuesto piruvilado podía obtenerse nuevamente si en la segunda incubación se agregaba PEP (cuadro C). Cabe aclarar que no todas las preparaciones enzimáticas estudiadas contenían dadores endógenos de piruvato, lo que justifica que sus productos no fueran observados en los estudios precedentes.

5.8.1.4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

Cuando el pentasacárido difosfato lípido se cromatografió en columna de DEAE-celulosa para lípidos (sección 5.4.2.1.) fue eluído con AcONH_4 0,9-1,0 M. Entonces si el piruvil-pentasacárido difosfato prenil era cromatografiado en el mismo sistema debería eluir a una concentración mayor de AcONH_4 , debido a la carga extra proporcionada por el grupo piruvato. De hecho un pico con estas características se había obtenido al cromatografiar el pentasacárido difosfato prenil (pico V Fig.54).

Se efectuó entonces una incubación estándar en presencia de los tres nucleótidos (uno de ellos radioactivo) y de alta concentración de PEP con la finalidad de obtener el mayor por-

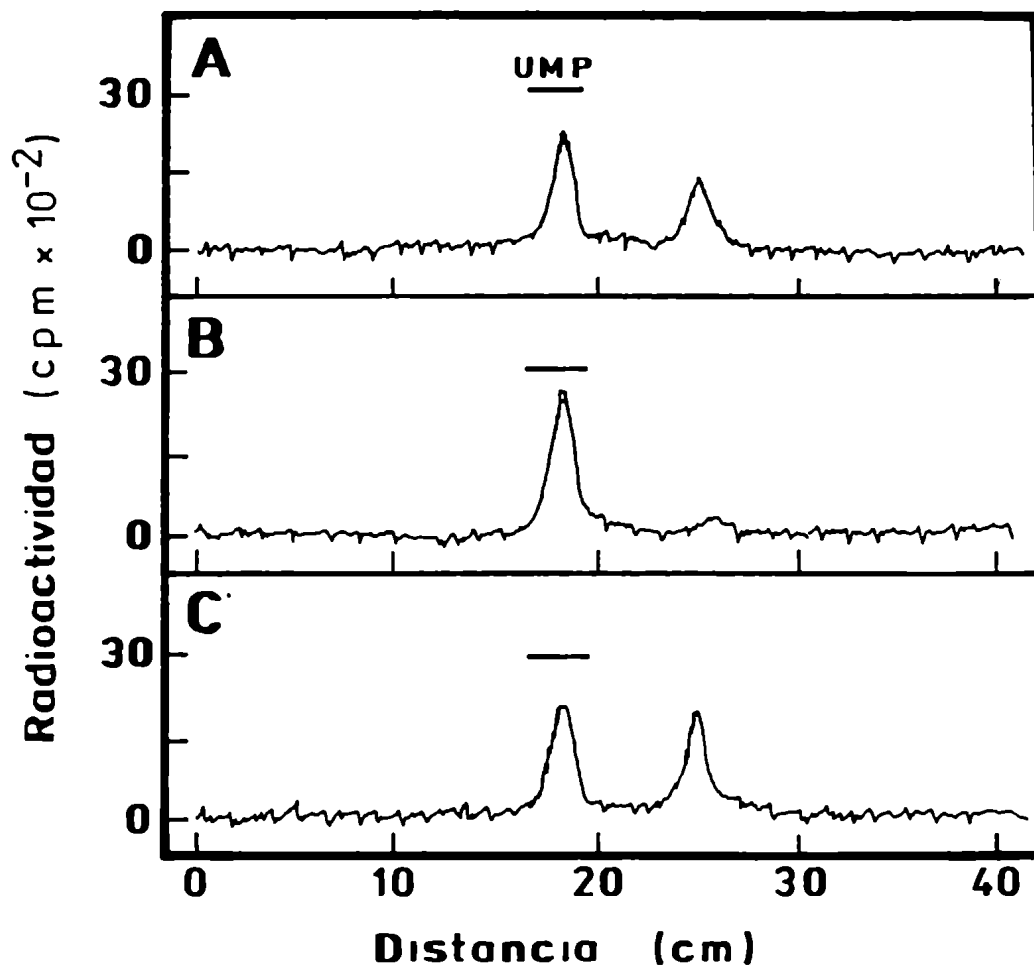


Figura 74: Eliminación de dadores endógenos del grupo piruvato. Se efectuó una incubación estándar en las mismas condiciones de la Fig. 73 A (A). Se efectuaron además incubaciones en condiciones estándar en presencia de 0,4 mg de prot. y de 214 μ M de GDP-Man no radioactivo. Las incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min y las células se lavaron dos veces con 1 ml de buffer Tris-HCl 70 mM y se reincubaron con los tres nucleótidos en las condiciones que se detallan en la Fig. 73 en ausencia (B) y en presencia (C) de 714 μ M PEP no radioactivo.

centaje del compuesto piruvilado. El producto liposoluble obtenido se cromatografió en columna de DEAE-celulosa equilibrada con CH_3OH 99%. Del análisis del perfil cromatográfico obtenido (Fig.75) surge que hay dos compuestos cargados, uno menor (aproximadamente un 15% de la radioactividad analizada) que se eluyó con AcONH_4 0,95 M y un segundo compuesto predominante que se eluyó con AcONH_4 1,1 M.

Los resultados obtenidos concordaron con nuestras expectativas pues el pico menor se eluyó a la misma concentración que el pentasacárido difosfato preno1, mientras que el pico principal se eluyó a una concentración mayor, consistente con la presencia de una carga negativa extra proporcionada por el grupo piruvato. Estos resultados se confirmaron analizando cada compuesto por hidrólisis ácida suave y posterior electroforesis de los productos obtenidos en buffer G; por este método se obtuvo pentasacárido libre (R_{UMP} : 0,6) a partir del compuesto que se eluyó con AcONH_4 0,95 M y piruvil-pentasacárido (R_{UMP} : 1,1) a partir del compuesto que se eluyó con AcONH_4 1,1 M (Datos no mostrados).

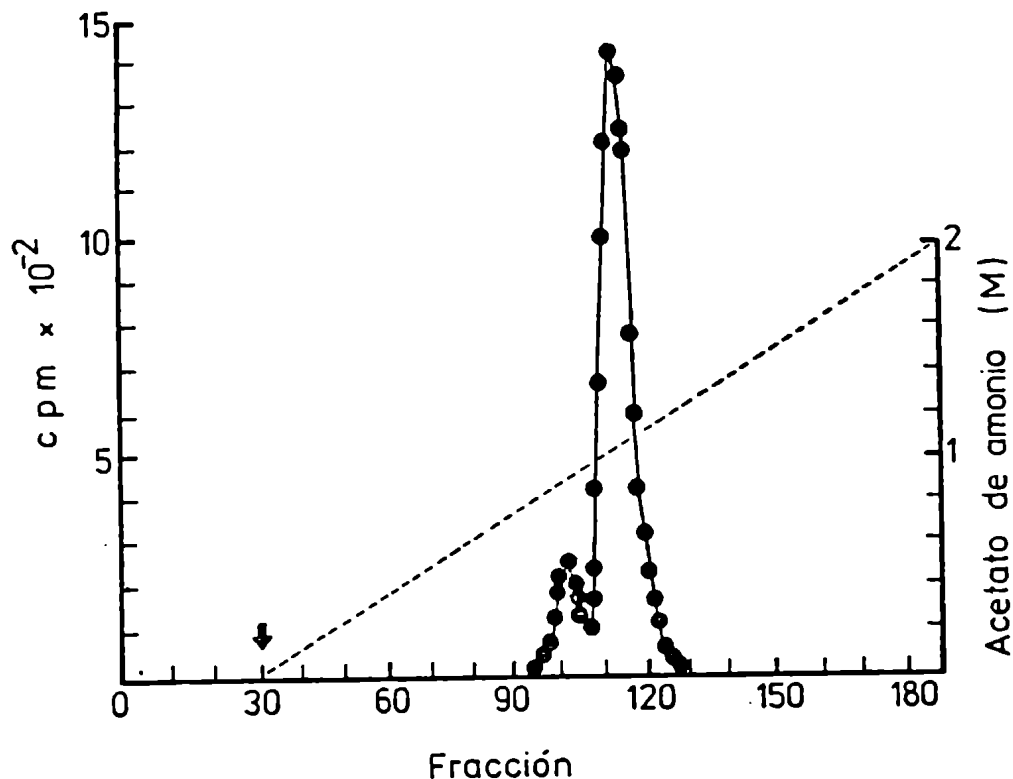


Figura 75: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Se efectuó una incubación estándar en presencia de 0,5 mg de proteína, 285 μM de UDP-Glc, 142 μM de GDP-Man, 14,3 mM de PEP y 21,4 μM de UDP-(¹⁴C)GlcUA. La incubación se realizó a 20°C durante 30 min y se procesó por el método D. Una alícuota de 0,7 ml de extracto 1203 (79.000 cpm) se cromatografió en columna de DEAE-celulosa (sección 3.8.1.1.). La flecha indica el comienzo del gradiente. Se contó radioactividad en alícuotas de 0,75 ml de cada fracción.

5.8.1.5. Posición del grupo piruvato

Al estudiar la estructura del xantano varios autores (120,121) establecieron que el grupo piruvato estaba unido a los carbonos 4 y 6 de la manosa externa. Decidimos entonces confirmar que el grupo acetálico estaba unido en la misma posición en el caso del piruvil-pentasacárido-PP-prenol. Para ello se procedió a efectuar una degradación de Smith sobre el Pir-pentasacárido, marcado en ambas manosas. Si el ácido pirúvico estaba unido a la manosa terminal por los carbonos 4 y 6 deberíamos obtener (^{14}C)eritritol (carbonos 3, 4, 5 y 6) y además (^{14}C)-glicerol (carbonos 4, 5 y 6 de la manosa interna) en una proporción equimolar (Fig.76).

Si el piruvato no estaba unido a ninguna de las manosas obtendríamos únicamente (^{14}C)glicerol. En el supuesto que el piruvato estuviese unido a la manosa interna, ésta no sería afectada por la degradación pues tendría todos sus hidroxilos protegidos. Los resultados del tratamiento (Fig.77, cuadro B) muestran claramente dos picos: uno con la movilidad del eritritol y el segundo con la movilidad del glicerol, en una relación

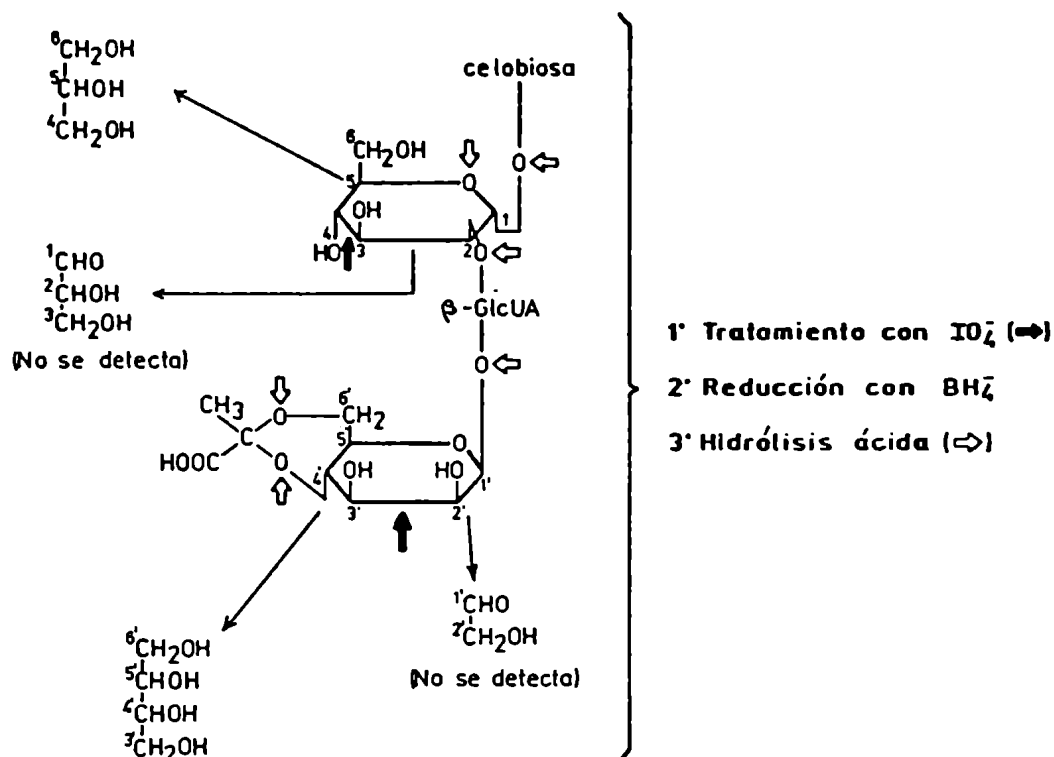


Figura 76: Degradación de Smith del piruvil-pentasacárido marcado en manosa. Las dos manosas radioactivas se indican por sus fórmulas de Haworth.

aproximada de 1 a 1. Su obtención a partir de piruvil-pentasacárido marcado en (^{14}C)manosa confirmó que el piruvato estaba unido a la manosa terminal y que los carbonos involucrados son el 4 y el 6.

Idéntico tratamiento realizado sobre el pentasacárido sin piruvilar produjo solamente glicerol (Fig.77, cuadro A)

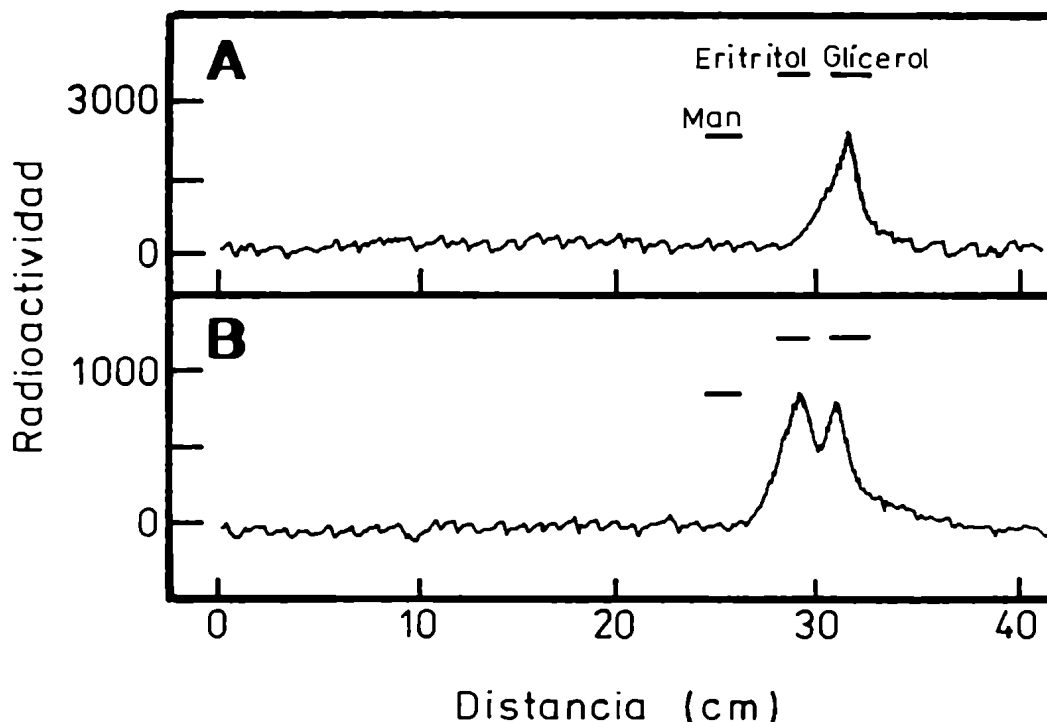


Figura 77: Degradación de Smith sobre PS y Pir-PS marcados en manosa. Se efectuaron incubaciones en condiciones estándar en ausencia y presencia de 1,4 mM de PEP como se indica en la Fig. 73. Los extractos 1203 obtenidos se sometieron a hidrólisis ácida suave, aislándose pentasacárido y piruvil-pentasacárido por electroforesis en papel con buffer G (R_{UMP} : 0,6 y 1,0 respectivamente). Ambos compuestos fueron sometidos a una degradación de Smith (sección 3.5.8.). Los productos del pentasacárido (A) y del piruvil-pentasacárido (B) se cromatografiaron con solvente I.

5.8.1.6. Incorporación del grupo piruvato al polisacárido

En los párrafos anteriores se ha descrito la formación "in vitro" del piruvil-pentasacárido-PP-prenol. La polimerización de este compuesto junto con el pentasacárido-PP-prenol determinaría la incorporación del grupo piruvato al polisacárido.

Para tratar de aclarar si el grupo piruvato podía incorporarse directamente al polisacárido se depiruvilizó por hidrólisis ácida, y el producto se incubó con el preparado enzimático en presencia de PEP (Tabla 23). Los resultados obtenidos indican que en estas condiciones no hubo incorporación de piruvato, como así tampoco cuando se reemplazó el polisacárido libre de pirúvico, por el polisacárido nativo.

Por otra parte y como era de esperar por lo visto en la tabla 20, solo en presencia de los tres nucleótido-azúcares el PEP cedió el resto piruvato en cantidades significativas tanto al pentasacárido-PP-lípido como al polisacárido.

Tabla 23:

Agregados	Acido (¹⁴ C)pirúvico en:	
	Pir-PS	polisacárido
	(pmoles)	
Sin agregados	1	3
UDP-Glc, GDP-Man y UDP-GlcUA	21	17
xantano	0	1
xantano libre de piruvato	0	0

Se efectuaron incubaciones estandar en presencia de 640 µg de proteína y de GDP-Man no radioactivo para eliminar aceptores endógenos, como se indica en la Fig. 74. Las células lavadas se reincubaron en condiciones estandar en presencia de 570 µM de (¹⁴C)PEP y, donde se indica, con 285 µM de UDP-Glc, 214 µM de GDP-Man, 35,7 µM de UDP-GlcUA, 75 µg de xantano o 75 µg de xantano libre de piruvato. Este último fue obtenido por hidrólisis ácida del xantano (HCl 0,1N, 100°C, 30 min). Las incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min y se procesaron por el método D. Los extractos 1203 se cromatografiaron con solvente F y se determinó la cantidad de PirPS-PP-lípido (Pir-PS) cortando y contando para radioactividad las áreas correspondientes al derivado fosfato cíclico (Rf: 0,25).

5.8.1.7. Efecto de la concentración de PEP

Los estudios realizados sobre la estructura del xantano demostraron que no todas las unidades repetitivas contenían un grupo acetal-piruvato, aceptándose actualmente que aproximadamente un tercio (121), o la mitad (120) de los residuos

manosa terminal están sustituidos por ese grupo.

Con el objeto de averiguar si trabajando "in vitro" se podía obtener un pentasacárido difosfato preno1 totalmente piruvilado se efectuaron incubaciones estandard en condiciones de formar lípido-pentasacárido y con cantidades crecientes de PEP. Incubando en presencia de UDP-(¹⁴C)glucurónico se determinó la incorporación de radioactividad a extracto 1203 polisacárido, analizándose a su vez la fase orgánica para estudiar el grado de piruvilización del lípido-pentasacárido (Fig.78).

Los resultados encontrados muestran que a altas concentraciones de PEP (10 mM ó más) puede obtenerse "in vitro" una completa piruvilización del pentasacárido difosfato preno1.

Sin embargo pueden extraerse otras conclusiones igualmente importantes. En primera instancia los efectos encontrados pueden dividirse según dos rangos en concentraciones de PEP:

a) de 0 a 3 mM PEP. En este rango no se detectaron variaciones significativas en la incorporación de ácido (¹⁴C)-glucurónico ni a polisacárido ni a extracto 1203. El análisis de este último demostró que un aumento en la concentración de PEP durante la incubación se tradujo en un aumento de piruvil-pentasacárido-PP-preno1 a expensas de pentasacárido-PP-preno1. La polimerización de ambos compuestos conduciría a la formación de polisacáridos con distinto contenido de grupos piruvato.

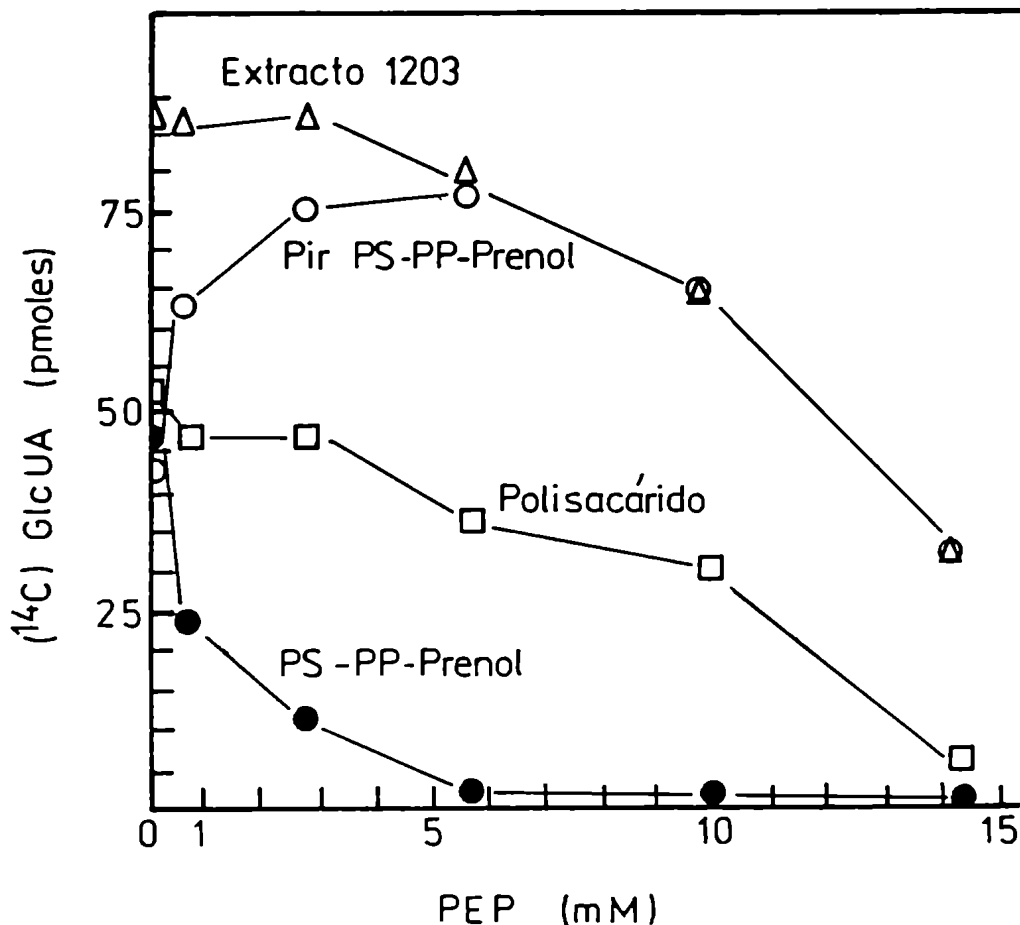


Figura 78: Formación de intermediarios lipídicos y de polisacárido en función de la concentración de PEP. Se realizaron incubaciones en condiciones estándar en presencia de 1 mg de prot., 285 μM UDP-Glc, 214 μM GDP-Man, 21,4 μM de UDP-(^{14}C)GlcUA y las cantidades de PEP que se indican. Las incubaciones se realizaron a 20°C durante 30 min y se procesaron por el método D. Se contó radioactividad en alícuotas de cada extracto 1203 y se calculó el total de incorporación. Para estimar las cantidades de PS-PP-lípido y Pir-PS-PP-lípido formado, el resto de los extractos 1203 se sometieron a hidrólisis alcalina suave (cromatografía con solvente F) y los ésteres fosfóricos cíclicos correspondientes se electroforetizaron en buffer G. Luego de radiocromatografiadas las tiras, se midió radioactividad en las áreas de Rump: 1,0 y Rump: 1,4 que se consideraron como incorporación de (^{14}C)GlcUA en PS y Pir-PS-PP-lípido respectivamente.

De hecho se ha encontrado que xantano obtenido de un único cultivo estaría compuesto por moléculas de polisacárido con distinto contenido en pirúvico (165).

b) Más de 3 mM de PEP. A partir de esta concentración comienza a notarse una progresiva disminución en la incorporación de ácido (^{14}C)glucurónico, tanto a extracto 1203 como a polisacárido. Con una concentración de PEP 14 mM, se forma tan solo un 10% del polisacárido, respecto del valor control (0 mM PEP agregado). Es decir, que aparentemente el piruvil-pentasa-cárido-PP-prenol no podía ser polimerizado si en la reacción no participa además pentasacárido-PP-prenol.

Esto estaría de acuerdo con el hecho de no encontrar polisacárido con todas sus unidades repetitivas sustituidas por un grupo piruvato (120).

5.8.1.8. Polimerización del piruvil-pentasa-cárido difosfato prenol

Para estudiar la polimerización del piruvil-pentasa-cárido-PP-prenol recurrimos nuevamente a la incubación en dos etapas (Tabla 24). La primera incubación se realizó en presencia de los tres nucleótidos y una concentración de PEP tal que se formara solamente el compuesto piruvilado. Se utilizó un nucleótido radioactivo (UDP-GlcUA en este caso) pues nos permi-

tiría estimar la posible formación de pentasacárido-PP-prenol.

Luego de eliminar el exceso de nucleótidos y PEP las células lavadas se resuspendieron y dividieron en tres alícuotas.

Una de ellas (A) no se reincubó para permitir analizar los compuestos formados en la primera incubación. Otra (B) se reincubó sin agregados para estudiar la incorporación de ácido (^{14}C)glucurónico a la fracción polisacárido y la última alícuota (C) se reincubó en presencia de los tres nucleótidos (ninguno de ellos radioactivos) para permitir formar durante esta incubación pentasacárido-PP-prenol y observar el efecto que tenía sobre la incorporación del ácido (^{14}C)glucurónico a la fracción polisacárido.

El extracto 1203 de la alícuota A se analizó por cromatografía con el solvente alcalino F y electroforesis en buffer G. De esta manera se estableció que dicho extracto estaba constituido en más de un 95% por piruvil-pentasacárido-PP-prenol y el resto por pentasacárido-PP-prenol, resultado que estaba dentro de lo previsto.

Los resultados que se muestran en la tabla 24 indican que el piruvil-pentasacárido-PP-prenol no fue polimerizado (alícuota B), pero cuando se permitió la formación de pentasacárido-PP-prenol hubo polimerización (alícuota C), confirmando así la suposición planteada: piruvil-pentasacárido-PP-prenol no puede ser polimerizado a menos que esté presente pentasacárido-

Tabla 24: Polimerización del piruvil-pentasacárido-PP-prenol

Alícuota	Agregados en la incubación	¹⁴ C)GlcUA incorporado en	
		Extracto 1203	Polisacárido (pmoles)
A	No reincubado	60	1
B	Sin agregados	35	3
C	UDP-Glc, GDP-Man, y UDP-GlcUA	13	22

Se realizó una incubación en condiciones estándar en un volumen final de 0,21 ml, en presencia de 3 mg de prot., 285 μ M de UDP-Glc, 214 μ M de GDP-Man, 21 μ M de UDP-(¹⁴C)GlcUA (AE: 268 Ci/mol) y 5,7 μ M de PEP. La incubación se realizó a 20°C durante 30 min. Se detuvo y procesó según el método F y el precipitado lavado y resuspendido se dividió en tres alícuotas. La alícuota A no se reincubó. Las alícuotas B y C, con el agregado de UDP-Glc (285 μ M), GDP-Man (214 μ M) y UDP-GlcUA (35,7 μ M), se reincubaron a 20°C durante 30 min. Luego de procesadas se midió radioactividad en extracto 1203 y en polisacárido de cada muestra.

do-PP-prenol.

En resumen se ha demostrado la participación de PEP como dador del grupo piruvato, actuando como aceptor de dicho grupo pentasacárido-PP-prenol, para formar piruvil-pentasacárido-PP-prenol. En este compuesto se demostró que el grupo piruvato está unido en posición 4-6 de la manosa terminal, similar-

mente a lo propuesto para el polisacárido nativo (120). Se encontró también que piruvil-pentasacárido-PP-prenol puede ser polimerizado solo en presencia de pentasacárido-PP-prenol.

Finalmente se mostró que ni el xantano nativo ni el xantano depiruvilado químicamente actúan como aceptores del grupo piruvato, es decir que la incorporación del grupo piruvato al polisacárido se realiza a través del lípido intermediario.

5.8.2. Incorporación del grupo acetilo a material liposoluble y a polisacárido

5.8.2.1. Generalidades

Ya se destacó al principio de este capítulo que la unidad repetitiva del xantano estaba acetilada en posición 6 de la manosa interna (Fig.71).

A semejanza del caso con piruvato, debíamos averiguar cual era el dador del grupo acetilo y si este grupo se incorporaba en la etapa de lípidos intermediarios, como ocurre con el piruvato, o si por el contrario se incorporaba cuando el polisacárido estaba formado.

En cuanto al primer problema, el dador del grupo acetilo, ya se mencionó en la introducción que preparaciones particuladas de Salmonella anatum eran capaces de transferir grupos acetilos a partir de acetil-CoA (109,110). La enzima responsa-

ble de esta reacción catalizaba la acetilación de oligosacáridos cuya secuencia de azúcares era similar a la del polisacárido-0. La actividad del sistema era muy baja y por lo tanto se debieron efectuar incubaciones muy prolongadas. Teniendo en cuenta este antecedente se decidió entonces investigar si el acetil-CoA podía actuar como dador en nuestro sistema.

Se efectuaron entonces, incubaciones standard en presencia de (^{14}C)acetil-CoA y de diferentes combinaciones de nucleótido-azúcares, determinándose la incorporación de radioactividad en solvente 1203 y en la fracción polisacárido. Los resultados (Tabla 25) mostraron que cuando se permitió la formación de mancilcelobiosa-PP-prenol (Exp nº3) hubo incorporación sólo en la fase orgánica; en cambio cuando se permitió la formación de pentasacárido-PP-prenol hubo incorporación tanto en la fase orgánica como en el polisacárido (Exp nº4).

Cabe notar que la incorporación en extracto 1203 en este último caso es sensiblemente menor que en el caso anterior. Esta disminución en extracto 1203 se ve compensada con la incorporación en polisacárido, de tal manera que la incorporación total es similar en ambos casos

Tabla 25: Incorporación de (^{14}C)acetato a partir de (^{14}C)Ac-CoA. Efecto de nucleótido-azúcares

Exp N°	Agregados			Cantidad de (^{14}C)acetato incorporado en:	
	UDP-Glc	GDP-Man	UDP-GlcUA	extracto 1203	polisacárido (pmoles)
1	-	-	-	2	1
2	+	-	-	1	1
3	-	+	-	2	1
4	+	+	-	62	2
5	+	+	+	33	34

Se efectuaron incubaciones estandar en presencia de 0,7 mg de proteína, (^{14}C)Ac-CoA 120 μM y donde se indica 285 μM de UDP-Glc, 214 μM de GDP-Man ó 22 μM de UDP-GlcUA. Luego de 30 min de incubación a 20°C las reacciones se inactivaron y procesaron según el método D.

5.8.2.2. Manosilcelobiosa difosfato preno1 como aceptor del grupo acetilo

Teniendo en cuenta que, por la estructura propuesta (Fig.71), el acetilo ocupaba la posición 6 de la manosa interna, es decir la del trisacárido, los resultados de la sección anterior se consideraron razonables:

La incorporación de acetato radioactivo en incubaciones

en presencia de UDP-glucosa y GDP-manosa sugería que el manosilcelobiosa-PP-prenol podía actuar como aceptor del grupo acetilo. Con el objeto de estudiar esta posibilidad se efectuaron incubaciones con UDP-glucosa y GDP-(^{14}C)manosa en ausencia y presencia de acetil-CoA. La radioactividad incorporada en extracto 1203, que fue similar en ambos casos, se analizó por cromatografía de los productos de hidrólisis ácida suave (Fig. 79 A y B respectivamente).

El mismo procedimiento se efectuó sobre el material liposoluble obtenido en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y (^{14}C)acetil-CoA (Fig.79 C) a fin de poder compararlos.

En el primer caso (incubación en presencia de UDP-Glc y GDP-(^{14}C)Man) el procedimiento utilizado rindió como era de esperar (^{14}C)manosilcelobiosa (Fig.79 A). Pero cuando a la mezcla de incubación se le agregó Acetil-CoA se observó una disminución en la incorporación de (^{14}C)manosa al trisacárido, y la aparición de un nuevo compuesto (R_{Glc} : 0,7, Fig.79 B), supuestamente acetil-manosilcelobiosa. Un producto de similar comportamiento cromatográfico se obtuvo a partir de la incubación efectuada en presencia de UDP-Glc, GDP-Man y (^{14}C)acetil-CoA (Fig.79 C).

En principio podemos concluir entonces que el Acetil-CoA puede donar su resto acetilo al manosilcelobiosa-PP-prenol, para formar el derivado acetilado (R_{Glc} : 0,7) compuesto que

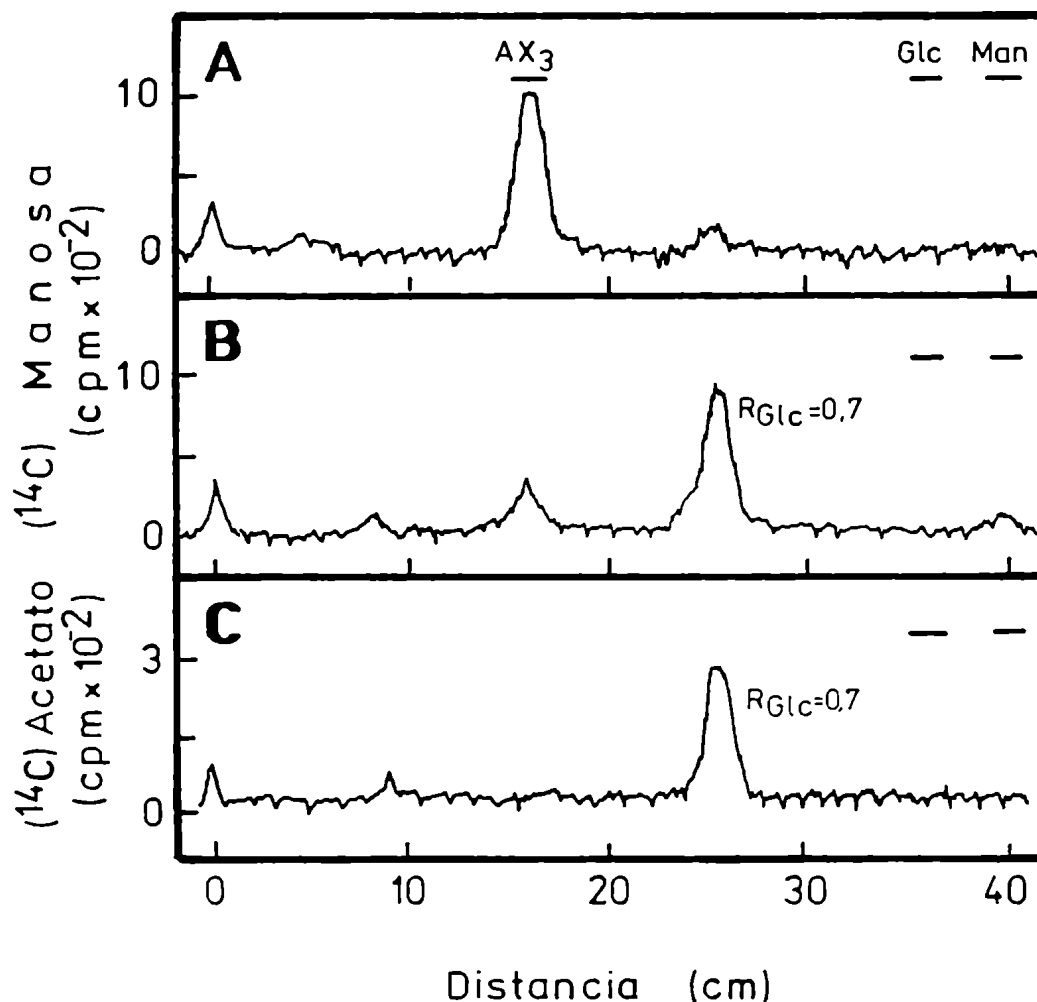


Figura 79: Obtención de trisacárido acetilado. Cromatografía en papel con solvente I de los productos de hidrólisis ácida suave del material incorporado en extracto 1203. Dicho material se obtuvo de incubaciones estándar realizadas durante 30 min a 20°C en presencia de 0,7 mg de prot. y de A: UDP-Glc (285 μ M) y GDP-(14 C)Man (17 μ M, AE: 216 Ci/mol) B: como en A, más Ac-CoA (710 μ M) C: UDP-Glc (285 μ M), GDP-Man (214 μ M) y (14 C)Ac-CoA (120 μ M). Las incubaciones se procesaron por el método D. Los hidrolizados se cromatografiaron durante 90 h. AX₃ se obtuvo como se indica en la sección 3.10..

pudo obtenerse con marca tanto en manosa (Fig.79 B) como en acetato (Fig.79 C).

5.8.2.3. Caracterización del resto acetato en el trisacárido acetilado

Si el compuesto obtenido en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y Acetil-CoA era acetil-manosilcelobiosa, el resto acetato debería ser liberado en medio alcalino. Entonces se aisló por hidrólisis ácida suave y cromatografía en solvente I (como se describe en la Fig.79); el compuesto de $R_{Glc}: 0,7$ con marca en acetato o con marca en manosa; se sometió a ambos a hidrólisis alcalina suave y los productos obtenidos se identificaron por cromatografía en papel (Fig.80). De esta manera pudo detectarse por cromatografía en solvente D la presencia de (^{14}C)acetato (cuadro A) a partir del compuesto de $R_{Glc}: 0,7$ obtenido con marca en acetato. Idéntico tratamiento aplicado sobre el compuesto obtenido con marca en manosa produjo (^{14}C)manosilcelobiosa (cuadro B) a juzgar por la movilidad observada en cromatografía en solvente I.

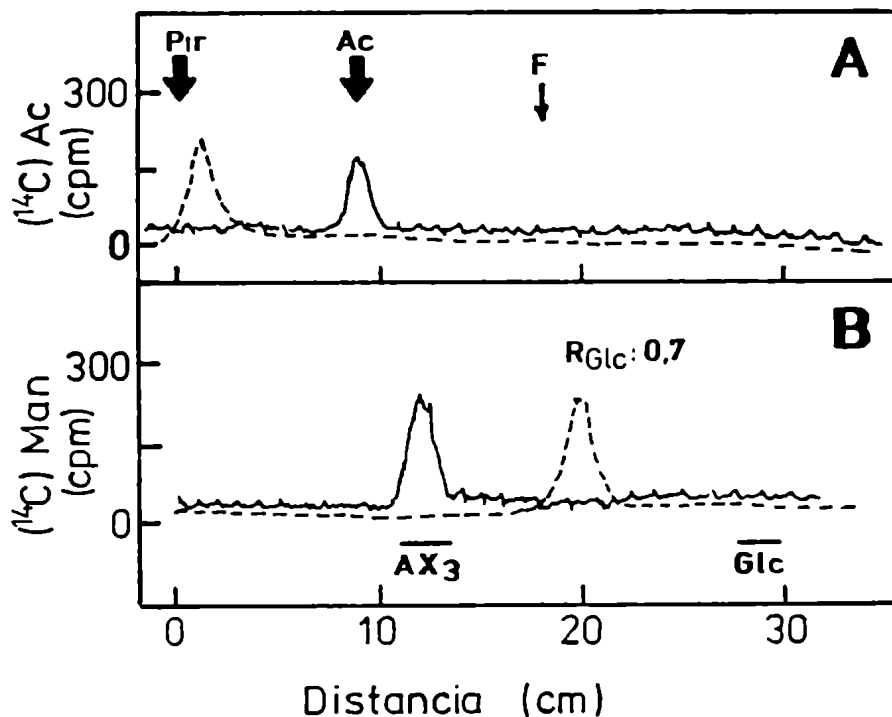


Figura 80: Tratamiento alcalino suave sobre el trisacárido acetilado marcado en (^{14}C) acetato o en (^{14}C) manosa. Se eluyó el compuesto de $R_{\text{Glc}}: 0,7$ marcado en $(^{14}\text{C})\text{Ac}$ de una cromatografía similar a la Fig.79 y se cromatografió en papel con solvente D, antes (---) y después (—) de ser tratado con NaOH 60 mM, durante 10 min a temperatura ambiente (sección 3.5.5.) (A).

De manera similar, el compuesto de $R_{\text{Glc}}: 0,7$ marcado en $(^{14}\text{C})\text{Man}$ se cromatografió en papel con solvente I antes (---) y después (—) del tratamiento alcalino (B).

AX_3 se obtuvo como se indica en la sección 3.10..

Con estos resultados se confirmó que el compuesto de $R_{\text{Glc}}: 0,7$ estudiado era acetil-manosilcelobiosa.

5.8.2.4. El acetato está en la manosa del trisacárido acetilado

El problema a cual de los tres azúcares del trisacárido estaba unido al acetato, fue estudiado de manera indirecta. Sabíamos que el (^{14}C)manosilcelobiosa liberaba (^{14}C)manosa cuando se lo trataba con α -manosidasa (sección 5.3.5.2. y Fig.81 A). En cambio el acetil-(^{14}C)manosilcelobiosa fue resistente ante el mismo tratamiento enzimático (Fig.81 B).

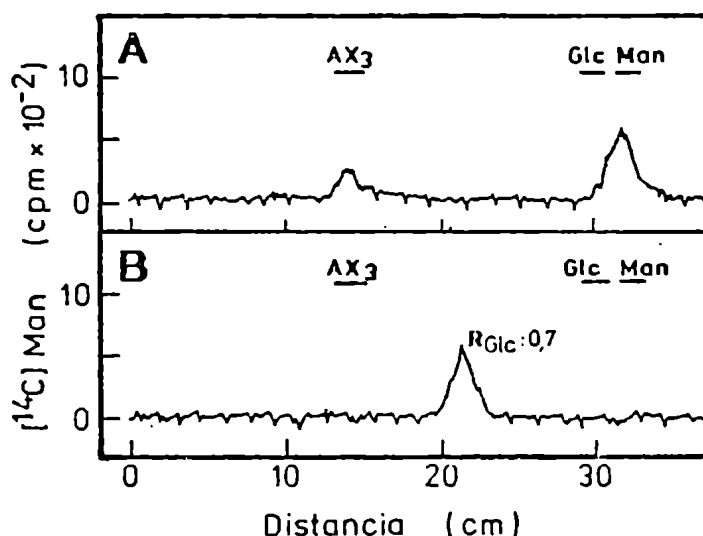


Figura 81: Tratamiento con α -manosidasa sobre el acetil-(^{14}C)manosilcelobiosa. (^{14}C)Manosilcelobiosa se obtuvo por hidrólisis ácida suave y cromatografía en solvente I, como se detalla en la Fig. 79 A. Aproximadamente 6.000 cpm del mismo se trataron con α -manosidasa (sección 3.7.2.) y los productos se cromatografiaron con solvente I (A). Acetil-(^{14}C)manosilcelobiosa (6.000 cpm) se obtuvo como se indica en la Fig.79 C y trató de idéntica manera (B). AX_3 se obtuvo como se indica en la sección 3.10..

Este resultado es consistente con la presencia de un grupo acetilo en el residuo manosa del trisacárido, como prevee la estructura propuesta (Fig.71).

5.8.2.5. El acetyl-CoA como sustrato

Para confirmar que el acetyl-CoA y no el acetato era el sustrato dador, se efectuaron incubaciones en condiciones estandar en presencia de exceso de acetyl-CoA, o de acetato, ambos no radioactivos. En este último caso la incorporación de (^{14}C)acetato a partir de (^{14}C)acetyl-CoA fue afectada en menor grado (20%) que en el primer caso, donde la incorporación disminuyó en aproximadamente un 86% (Tabla 26).

5.8.2.6. Confirmación de que el pentasacárido difosfato prenil está acetilado

Como se mostró en la tabla 25, hubo también buena incorporación de radioactividad a material liposoluble cuando se efectuaron incubaciones en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa, UDP-glucurónico y (^{14}C)acetyl-CoA (Exp n° 5). El análisis de este material se realizó por electroforesis en papel con buffer G. El compuesto sin tratar no se movió del lugar de

Tabla 26: Efecto de Ac-CoA y acetato no radioactivos sobre la incorporación de (¹⁴C)acetil-CoA en extracto 1203.

Exp	Agregados	(¹⁴ C)acetato incorporado en extracto 1203 (cpm)
1	Nada	6400
2	Ac-CoA	880
3	Acetato	5100

Se efectuaron incubaciones estandar en presencia de 0,7 mg de proteína, 285 μ M de UDP-Glc, 214 μ M de GDP-Man y 120 μ M de (¹⁴C)Ac-CoA. En el exp. n° 2 se añadió además un exceso de Ac-CoA (1,4 mM) y en el exp n° 3 se añadió un exceso de AcOMg (1,4 mM), ambos no radioactivos. Luego de 30 min de incubación a 20°C las reacciones se inactivaron y procesaron según el método D.

siembra, como era de esperar de un prenil-fosfo-azúcar (Fig. 82 A). Pero el producto de hidrólisis ácida suave migró como el pentasacárido libre (R_{UMP} : 0,6, Fig.82 B), un resultado razonable, pues el grupo acetilo no prevee ninguna carga extra.

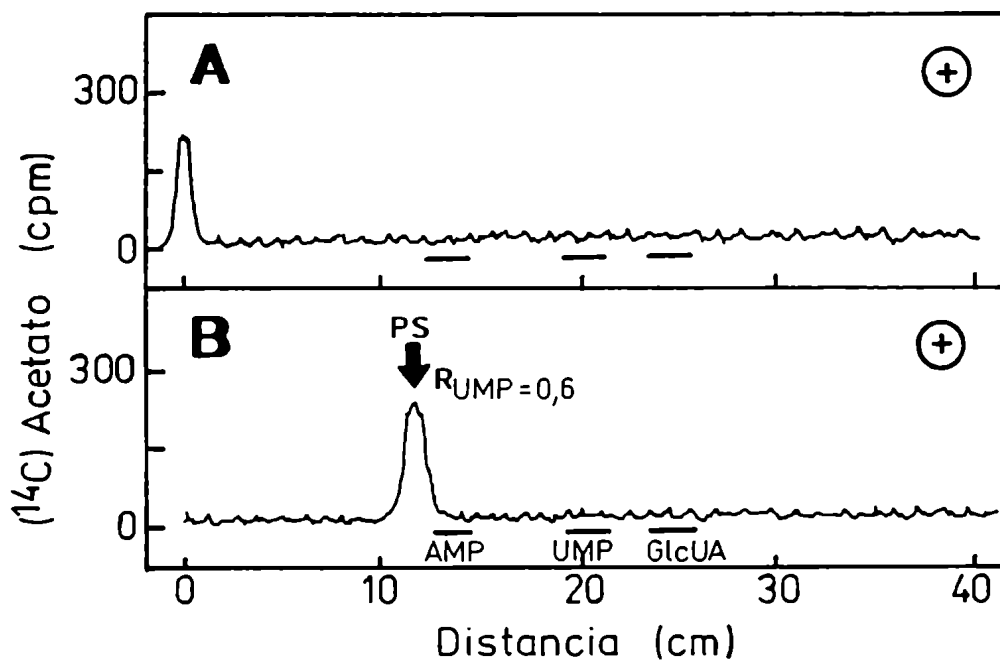


Figura 82: Análisis del material incorporado en extracto 1203. Se obtuvo extracto 1203 como se indica en la Tabla 25 (Exp nº 5). La radioactividad incorporada se analizó directamente por electroforesis en buffer G (A) o por electroforesis en el mismo buffer, de los productos de hidrólisis ácida suave (B).

Para confirmar que este compuesto era el (^{14}C)acetil-pentacárido se hidrolizó en presencia de NaOH 60 mM (sección 3.5.5.) y el producto se sometió a cromatografía en μa , ? con solvente D; análogamente a lo mostrado en el caso del trisacárido acetilado se obtuvo (^{14}C)acetato (Dato no mostrado).

El conjunto de estos resultados indica que tanto el manosilcelobiosa-PP-prenol como el pentasacárido-PP-prenol pueden acetilarse "in vitro". Pero establecer cual es el mejor sustrato de esta reacción y la secuencia de las transferencias de azúcares y/o acetilo exigirá un estudio más detallado de este proceso.

5.8.2.7. Incorporación del grupo acetilo al polisacárido

Análogamente a lo visto en el caso del grupo acetal-piruvato se estudió si el grupo acetilo se incorporaba al polisacárido a través del acetilpentasacárido-PP-prenol descrito, o si por el contrario lo hacía directamente a partir del acetil-CoA (Tabla 27). Para ello se tomó polisacárido nativo (Exp n° 3) y deacetilado (Exp n°4) y se los incubó en presencia de (^{14}C)acetil-CoA. Como control se incubó también en ausencia (Exp n° 1) y en presencia de tres nucleótido-azúcares (Exp n° 2).

Los resultados indican que el grupo acetilo no parece incorporarse directamente al polisacárido (Exp n° 3 y 4) y que únicamente se incorpora al xantano cuando se permite la formación del pentasacárido-PP-prenol (Exp n° 2).

Tabla 27: Incorporación de (^{14}C)acetato al polisacárido

Exp	Agregado	^{14}C -acetilo en	
		extracto 1203	polisacárido (pmoles)
1	Nada	6	3
2	UDP-Glc, GDP-Man, UDP-GlcUA	55	23
3	Xantano	4	4
4	Xantano deacetilado	4	3

Se efectuaron incubaciones estandar en presencia de 0,7 mg de proteína (^{14}C)Ac-CoA (120 μM) y donde se indica 285 μM de UDP-Glc, 214 μM de GDP-Man, 22 μM de UDP-GlcUA, 75 μg de xantano ó 75 μg de xantano deacetilado. Este último se obtuvo tratando al xantano (3-5 mg/ml) con HOK 25 mM, KCl 0,1 M durante 2 h a 20°C en atmósfera de N_2 (166). El xantano libre de acetato se precipitó con etanol, se llevó a sequedad bajo presión reducida y finalmente se resuspendió en agua. Las incubaciones se procesaron por el método D.

En resumen en este capítulo se ha demostrado la participación de acetyl-CoA como dador del grupo acetilo. Dos lípidos intermediarios pueden actuar como aceptores: manosilcelobiosa-difosfato-prenol y pentasacárido-difosfato-prenol.

Por otra parte la acetilación del producto final, el xantano, solo ocurre a través de sus intermediarios: ni el xantano nativo, ni el xantano deacetilado químicamente, actúan como aceptores.

5.9. Otros compuestos obtenidos con el sistema de *X. campestris*

5.9.1. Incubaciones con GDP-(¹⁴C)manosa

Se comentó en la sección 5.3. que al incubar el preparado enzimático de *X. campestris* con GDP-(¹⁴C)manosa se obtenían dos productos radioactivos, uno de los cuales fue caracterizado como manosilcelobiosa-PP-prenol. Procesando las incubaciones por el método D, ambos compuestos se extraían con solvente 1203, pero mientras el arriba nombrado se descompuso cuando fue cromatografiado con solvente alcalino F, para dar el éster fosfórico cíclico correspondiente, el otro de los compuestos aparentemente permaneció inalterado, pues se desplazó con el frente del solvente (ver Fig.46 B). Como tanto los lípidos monofosforados azúcares como muchos glicéridos migran en esa posición (87), se supuso que podría ser manosa monofosfato lípido. Con el objeto de poder estudiarlo fue eluído con solvente 1203 y analizado por diversos criterios.

Migró nuevamente con el frente al ser recromatografiado con solvente F. En cambio no se movió del lugar de siembra cuando se lo cromatografió con solvente I. La falta de movilidad en este último solvente descartó que el compuesto fuese

manosa monofosfato lípido, pues éste migra con un Rf de 0,9 en dicho sistema (118). Además hizo sospechar que este compuesto y aquel que no migraba en cromatografía en solvente I (ver Fig.46 A) eran la misma entidad.

El compuesto resultó ser estable ante una hidrólisis ácida suave, pues luego del tratamiento no mostró variación en las movilidades en solventes F (Rf: 0,9) e I (Rf: 0). Además cromatografiado con solvente H, antes o después del tratamiento, tampoco se movió del origen (Rf: 0).

Sometido a una hidrólisis ácida más enérgica (HCl 1N, 30 min, 100°C) se descompuso, pero no liberó manosa radioactiva como se esperaba, sino otro monosacárido que, a juzgar por la movilidad cromatográfica con solventes H e I, fue identificado como (^{14}C)ramnosa. No se estudiaron otros aspectos de la estructura del compuesto original.

5.9.2. Formación de GDP-D-ramnosa

La presencia de ramnosa radioactiva indicaba que la preparación enzimática utilizada podía convertir GDP-(^{14}C)-D-manosa en GDP-(^{14}C)-D-ramnosa, conversión que fue descrita por primera vez en bacterias gram negativas no clasificadas (167) y luego según Hickman y Ashwell, precisamente en Xanthomonas campestris, aunque no se dieron detalles experimentales (168).

El GDP-(^{14}C)-D-ramnosa formado cedería, entonces, su residuo azúcar a un aceptor endógeno para formar el producto soluble en solvente 1203 que se menciona más arriba.

Los estudios siguientes se efectuaron en colaboración con Susana Raffo. Para confirmar la conversión de un nucleótido en otro se efectuó una incubación en presencia de GDP-(^{14}C)-D-manosa a 30°C. Luego de 30 min el sobrenadante de la misma se analizó por cromatografía en solvente 0. Se encontró que casi toda la radioactividad migró con una movilidad diferente de GDP-D-manosa (Fig.83 A). El compuesto obtenido mostró ser resistente al tratamiento alcalino suave (Fig.83 B), pero ser lábil a hidrólisis ácida suave, liberando ramnosa radioactiva (Fig.83 C). Estos datos indican que efectivamente el preparado enzimático pudo convertir GDP-D-manosa en GDP-D-ramnosa. Es de destacar que este compuesto se obtuvo con muy buen rendimiento (> 90%) en incubaciones realizadas a 30°C, pero prácticamente no se formó cuando la temperatura de incubación disminuyó a 20°C.

La formación de GDP-D-ramnosa por preparados enzimáticos de X. campestris se deba probablemente a la participación del nucleótido-azúcar en la síntesis del lipopolisacárido, del cual la ramnosa es el principal componente (58%) (168).

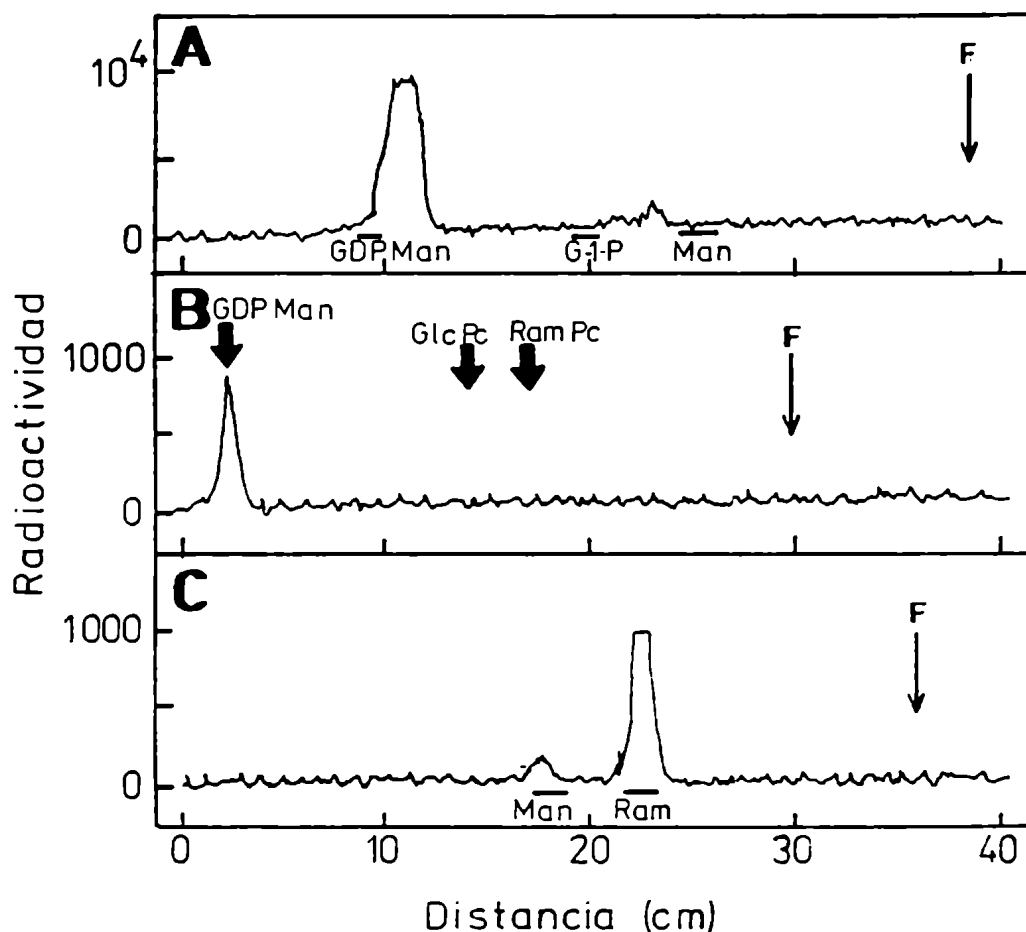


Figura 83: Análisis del producto hidrosoluble obtenido a partir de GDP-(^{14}C)Man. Se efectuó una incubación con 0,3 mg de prot. en presencia de 17,1 μM de GDP-(^{14}C)Man (AE: 216 Ci/mol) a 30°C. Luego de 30 min se detuvo la reacción por el agregado de 2 volúmenes de etanol y el sobrenadante se cromatografió en solvente O durante 26 h (A). El producto de A fue eluído y una alícuota se cromatografió en solvente E con estándar de GDP-Man, UDP-Glc y TDP-Ram (B). Otra alícuota de A fue sometida a hidrólisis ácida suave y los productos cromatografiados en solvente I (C).

5.9.3. Incubaciones con UDP-(¹⁴C)glucurónico

Se comentó en la sección 5.4.2.2. (Fig.54) que al analizar los productos obtenidos en incubaciones realizadas en presencia de UDP-(¹⁴C)glucurónico se encontraron tres productos radioactivos, dos de los cuales fueron caracterizados como pentasacárido difosfato prenil (compuesto IV) y piruvil-pentasacárido difosfato prenil (compuesto V). Para la formación de los dos compuestos arriba nombrados era necesaria la presencia de UDP-glucosa y GDP-manosa en la mezcla de incubación, pero para obtener el restante compuesto, que se denominó "lípidoglucurónico" no ocurría lo mismo. Esta característica permitió obtenerlo como único compuesto facilitando así su estudio.

Por otra parte también preparados enzimáticos de Acetobacter xylinum incubados con UDP-(¹⁴C)glucurónico forman un compuesto igualmente denominado lípidoglucurónico (118). Las propiedades de dicho compuesto fueron:

a. Labilidad en medio ácido suave, liberando ácido glucurónico. Esta propiedad, comparable a la de los prenil-fosfoazúcares, llamó la atención dado que los glucurónidos descritos en la literatura son resistentes a la hidrólisis ácida suave (169).

b. Labilidad al tratamiento alcalino suave (0,06N NaOH, 5 min, temperatura ambiente), liberando ácido glucurónico. Es-

te comportamiento es diferente al de los lípido-fosfo-azúcares que son estables..en estas condiciones.

c. Estabilidad frente al tratamiento con fenol (fenol 50%, 65°C, 2 h). Este comportamiento también es diferente al de los prenil-fosfo-azúcar (donde el prenil es alílico), pues estos se rompen liberando el azúcar fosforilado.

d. Posición en columna de DEAE-celulosa; Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa en metanol 99% el compuesto eluyó con una concentración de AcONH_4 de 0,25 M, comparable a la concentración con que eluye glucosa-PP-prenol.

e. Condiciones de obtención: El compuesto no se pudo obtener con marca en ^{32}P incubando en presencia de $(\beta -^{32}\text{P})\text{UDP-glucurónico}$, ni tampoco se pudo incrementar su síntesis suplementando las incubaciones con FMP. Por otra parte la síntesis de lípido-glucurónico se inhibió por el agregado de UDP y no de UMP.

Estos resultados indicaban que el UDP-glucurónico cedería la porción azúcar a un aceptor del tipo P-lípido para formar glucurónico-P-lípido. En conclusión las propiedades de este compuesto resultaron por un lado diferentes a la de los glucurónidos comunes, y tampoco coincidieron con la de los lípido-azúcares descritos. En cuanto a la aglicona no se efectuaron estudios más detallados sobre su naturaleza.

Con estos antecedentes decidimos comparar el compuesto

obtenido con el sistema de X. campestris con aquel obtenido con A. xylinum.

5.9.3.1. Propiedades del lípido-glucurónico

5.9.3.1.1. Análisis cromatográfico

El lípido-glucurónico fue analizado por cromatografía en papel en solvente F (Fig.84), obteniéndose un solo pico de radioactividad con un Rf: 0,6-0,7 (cuadro A), algo menor al Rf del compuesto formado por A. xylinum (Rf: 0,7, cuadro B).

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa (ver figura 54, sección 5.4.2.2.) eluyó con una concentración de AcONH_4 de aproximadamente 0,7 M (pico III). Se confirmó que se trataba de lípido-glucurónico pues dicha fracción fue analizada por cromatografía en papel en solvente F, observándose un perfil radiocromatográfico similar al mostrado en la Fig.84 A. Este valor (0,7 M) es significativamente mayor que el encontrado para el compuesto obtenido de A. xylinum (0,25 M). Este valor aumentado no pudo deberse a la presencia de un grupo pirofosfato entre la aglicona y el ácido glucurónico, porque la cromatografía en solvente F no mostró evidencias de la existencia de tal grupo, ni tampoco se logró obtener el compuesto con mar-

ca en ^{32}P en incubaciones realizadas en presencia de $(\beta - ^{32}\text{P})\text{UDP-glucurónico}$. La causa se encuentra, posiblemente, en la estructura de la aglicona.

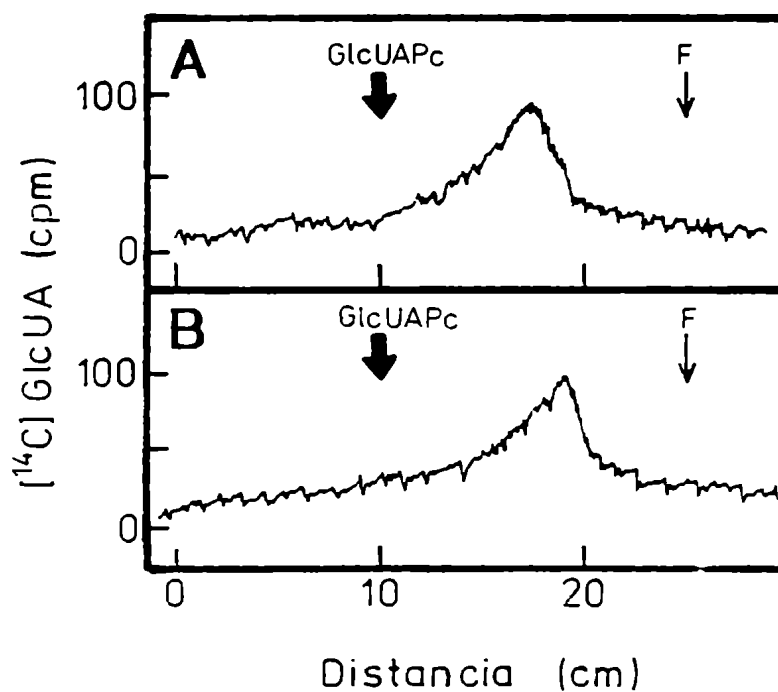


Figura 34: Cromatografía en papel del lípido-glucurónico. Se efectuó una incubación estándar con 1 mg de prot. en presencia de 21,4 μM de $\text{UDP-}-(^{14}\text{C})\text{GlcUA}$ (AE: 268 Ci/mol) durante 30 min a 12°C. La reacción se detuvo y procesó según el método E y el extracto butanólico lavado se cromatografió en papel con solvente F (A). Lípido-glucurónico de *A. xylinum*, obtenido según (118) se cromatografió en el mismo solvente (B).

5.9.3.1.2. Tratamientos degradativos

a. Hidrólisis ácida suave: Por hidrólisis ácida suave (HCl 0,01N, 10 min, 100°C) y ulterior partición butanol/agua (sección 3.5.1.1.) se recuperó más del 95% de la radioactividad en la fase acuosa. No se estudió la estructura del producto liberado.

b. Hidrólisis alcalina: Ante una hidrólisis alcalina suave (sección 3.5.6.) capaz de saponificar fosfolípidos, se recuperó el 100% de la radioactividad en la fase acuosa. En este caso tampoco se aclaró la estructura del compuesto liberado.

Las propiedades hasta aquí estudiadas coinciden con las obtenidas para el compuesto formado por A. xylinum, siendo la diferencia más notable la concentración de AcONH_4 necesaria para eluirlos de una columna de DEAE-celulosa. El hecho de que ambos compuestos sean lábiles tanto a la hidrólisis ácida como a la alcalina abre la posibilidad de estar ante intermedarios distintos a los conocidos hasta el momento y por lo tanto parece interesante estudiar en el futuro la función de estos compuestos así como la naturaleza de la aglicona.

6. DISCUSION Y CONCLUSIONES

6.1. De los resultados encontrados con el sistema de A. xylinum

En la Fig.85 se resumen las reacciones en las que intervienen lípido azúcares estudiadas en nuestro laboratorio con el sistema de Acetobacter xylinum.

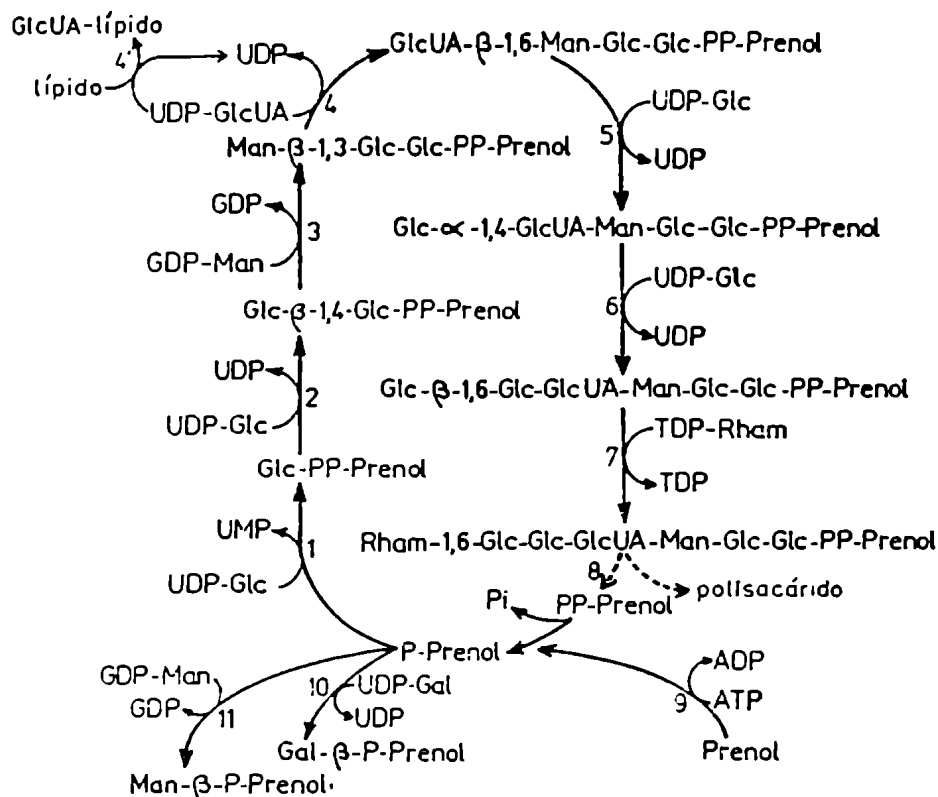


Figura 85: Esquema propuesto para la síntesis del heptasacárido difosfato prenol y reacciones relacionadas (75,82,83,94,118).

Trabajos previos sugerían que el producto de la reacción 1, glucosa-PP-prenol, estaría involucrado en la síntesis de un glucano hidrosoluble (116), que es sintetizado en grandes cantidades cuando el preparado enzimático de A. xylinum se incubaba en presencia de UDP-glucosa. Este homopolisacárido contiene uniones β -1,2.

En la primera parte del trabajo se ha estudiado entonces la posible relación entre glucosa-PP-prenol y la síntesis del glucano.

Se pensó que si se lograba obtener el polisacárido empleando como sustrato exógeno (^{14}C)glucosa-PP-prenol se tendría una confirmación inequívoca de la relación precursor-producto.

Sin embargo aunque se pudo demostrar la formación de glucano a partir de (^{14}C)glucosa-PP-prenol (Fig.21 A), la relación precursor-producto no quedó claramente establecida, debido a la reversibilidad de la reacción de formación de glucosa-PP-prenol. En efecto, cuando se repitió el mismo experimento pero en presencia de UDP-glucosa no radioactivo, se encontró que además de (^{14}C)glucano se formaba durante la incubación UDP-(^{14}C)glucosa (Fig.21 B).

Estos resultados se interpretaron admitiendo la presencia de UMP en la mezcla de reacción. El nucleósido monofosfato formaría con el (^{14}C)glucosa-PP-prenol agregado, UDP-(^{14}C)glucosa. La posible presencia de UMP en el preparado enzimático in-

validaba el objetivo del experimento.

Se decidió entonces estudiar el efecto del UMP en la reacción de formación del glucano.

Se pudo observar así, que empleando (^{14}C)glucosa-PP-prenol como sustrato exógeno, el agregado de UMP en la mezcla de incubación estimulaba la formación de glucano (Fig.22 B), y que éste estímulo dependía de la cantidad de nucleósido monofosfato agregado (Fig.23). Los resultados obtenidos indicaban que el lípido azúcar no sería el único participante en la reacción de síntesis del polisacárido.

Por otra parte en incubaciones realizadas en presencia de UDP-(^{14}C)glucosa, 50 nmoles de UMP inhibieron totalmente la formación de glucosa-PP-prenol, y en cambio solo inhibieron un poco más del 10% la formación de glucano (Fig.24). Por otra parte en presencia de UDP la formación de glucano se inhibió en un 81% y la de prenoI-PP-glucosa en un 65%. Estos resultados, junto con los arriba mencionados sugieren al nucleótido-azúcar como precursor directo del polímero. Sin embargo no descartan totalmente la participación del lípido azúcar. Una posibilidad es que el prenoI-P-glucosa agregue solo residuos glucosa terminales, o formando parte de una rama lateral. Es decir que el lípido azúcar no contribuiría a la formación de la cadena principal, sino que cedería su resto glucosa a una preexistente. Un glucano extracelular de estas características

ha sido aislado a partir del medio de cultivo de A. xylinum (170). La estructura propuesta consiste de una cadena principal de celulosa con una rama lateral de una sola glucosa. Solo una de cada tres glucosas de la cadena principal está ramificada y la unión es del tipo β -1,2.

En un esquema del tipo comentado más arriba, es decir que el prenil-P-glucosa ceda su resto azúcar a una cadena preexistente, la incorporación de (^{14}C)glucosa a glucano en incubaciones realizadas en presencia de (^{14}C)glucosa-PP-prenil (como sustrato exógeno) debería verse incrementada si en la mezcla de incubación se agregase UDP-glucosa. Sin embargo los resultados encontrados mostraron que no hubo variación en la incorporación de radioactividad a glucano en ausencia, o en presencia de UDP-glucosa (Fig.21 A y B respectivamente).

En el estado actual de los conocimientos no se puede descartar totalmente la participación de glucosa difosfato prenil en alguna proporción en la reacción de formación del glucano. Es claro sin embargo, que el prenilfosfoazúcar no es el único sustrato y además que el UDP-glucosa es un precursor directo en la mencionada reacción.

La segunda parte del trabajo realizado con el sistema de A. xylinum trata sobre el polisacárido, del cual los prenil-fosfo-azúcares descritos en la Fig.85 serían precursores.

Como se mencionó en las secciones 2.1.4. y 4.2.1. se pu-

do obtener "in vitro" el heptasacárido-PP-prenol (producto de la reacción 7 Fig.85) gracias al conocimiento de los azúcares que componen el polisacárido acetano (94,118).

Entonces se decidió emprender el estudio de la estructura del acetano y compararla con la ya conocida del heptasacárido con el objeto de decidir si era el destino final del heptasacárido-PP-prenol.

La estructura del acetano fue estudiada en colaboración con R.O. Couso y someramente consistió en:

- i. Determinación de los azúcares componentes. Se realizó sometiendo al polisacárido a hidrólisis ácida total. El análisis de los productos obtenidos estableció que el acetano está constituido por glucosa, manosa, ramnosa y ácido glucurónico (Fig. 25), confirmando los resultados obtenidos por P. Romero (117).
- ii. Determinación de la relación de los azúcares componentes. La relación de los azúcares componentes se obtuvo empleando métodos colorimétricos clásicos y cromatografía gaseosa.

De esta forma pudo estimarse que la relación glucosa: manosa: ramnosa: ácido glucurónico en el polisacárido es de 4:1:1:1 (sección 4.2.3.). Esta relación es idéntica a la del heptasacárido AX₇.

- iii. Caracterización de los productos de hidrólisis ácida parcial y acetolisis del acetano. Se trató de aislar fragmentos del polisacárido (fundamentalmente disacáridos) empleando mé-

todos degradativos. Los productos se identificaron por cromatografía y electroforesis en papel, comparándolos con compuestos de estructura conocida, o con compuestos obtenidos empleando los mismos métodos degradativos sobre el AX₇. De esta forma pudo establecerse la presencia en el acetano de β -glucuronilmanosa (Fig.27), β -glucosil-1,6-glucosa (genciobiosa, Fig. 28), β -glucosil-1,4-glucosa (celobiosa, sección 4.2.4.3.) y glucosil-glucurónico (Fig.29).

iv. Permetilación del acetano. Como ya se mencionó resta aún completar los estudios.

Los resultados obtenidos permiten asignar tentativamente al acetano la estructura propuesta en la Fig.86.

Si bien hasta el presente no se ha logrado, con el sistema de A. xylinum, sintetizar el acetano "in vitro" a partir de los nucleótido-azúcares, no cabe dudas comparando las estructuras de la porción glicosídica del heptasacárido-PP-prenol y la unidad repetitiva propuesta para el exopolisacárido acetano que el lípido-oligosacárido es un intermediario en el camino biosintético del polímero.

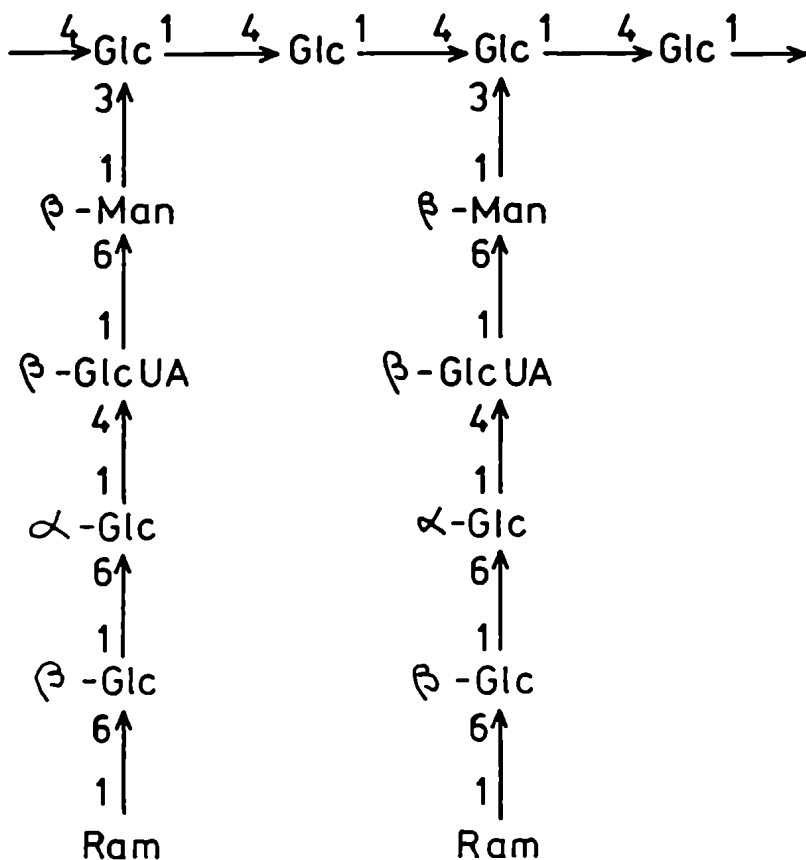


Figura 86: Estructura propuesta para el polisacárido acetano.

6.2. De los resultados encontrados con el sistema de X. campestris.

Los estudios relacionados con la biosíntesis del xantano empleando el sistema de Xanthomonas campestris, podrían resumirse en el cuadro de la Fig.87.

Todos los compuestos formados, salvo el producto final, es decir el xantano (reacción 8), son solubles en solventes orgánicos.

Las diferentes reacciones, con excepción de la 8, se estudiaron determinando la incorporación del azúcar radioactivo correspondiente a material soluble en solventes orgánicos. La reacción 8, en cambio se estudió determinando la incorporación de radioactividad a material coprecipitable con xantano nativo.

Formación de lípidos intermediarios.

Salvo en la reacción 1, en que se transfiere glucosa-1-P, en los casos de las reacciones 2 a 5 el nucleótido precursor solo cede su resto hexosa.

Se encontró que todos los intermediarios del xantano aislados (productos de las reacciones 2 a 7) fueron lábiles a hidrólisis ácida suave (pH 2, 10 min, 100°C) (Figs.40, 46, 67, 53, 72 y 79-82).

En el caso de los productos de las reacciones 2, 3 y 5 se estableció la presencia de un grupo difosfato entre la porción azúcar y la lipídica, aislándolo en forma de pirofosfato inorgánico a partir de los respectivos compuestos marcados en ^{32}P (sección 5.5., Fig.66).

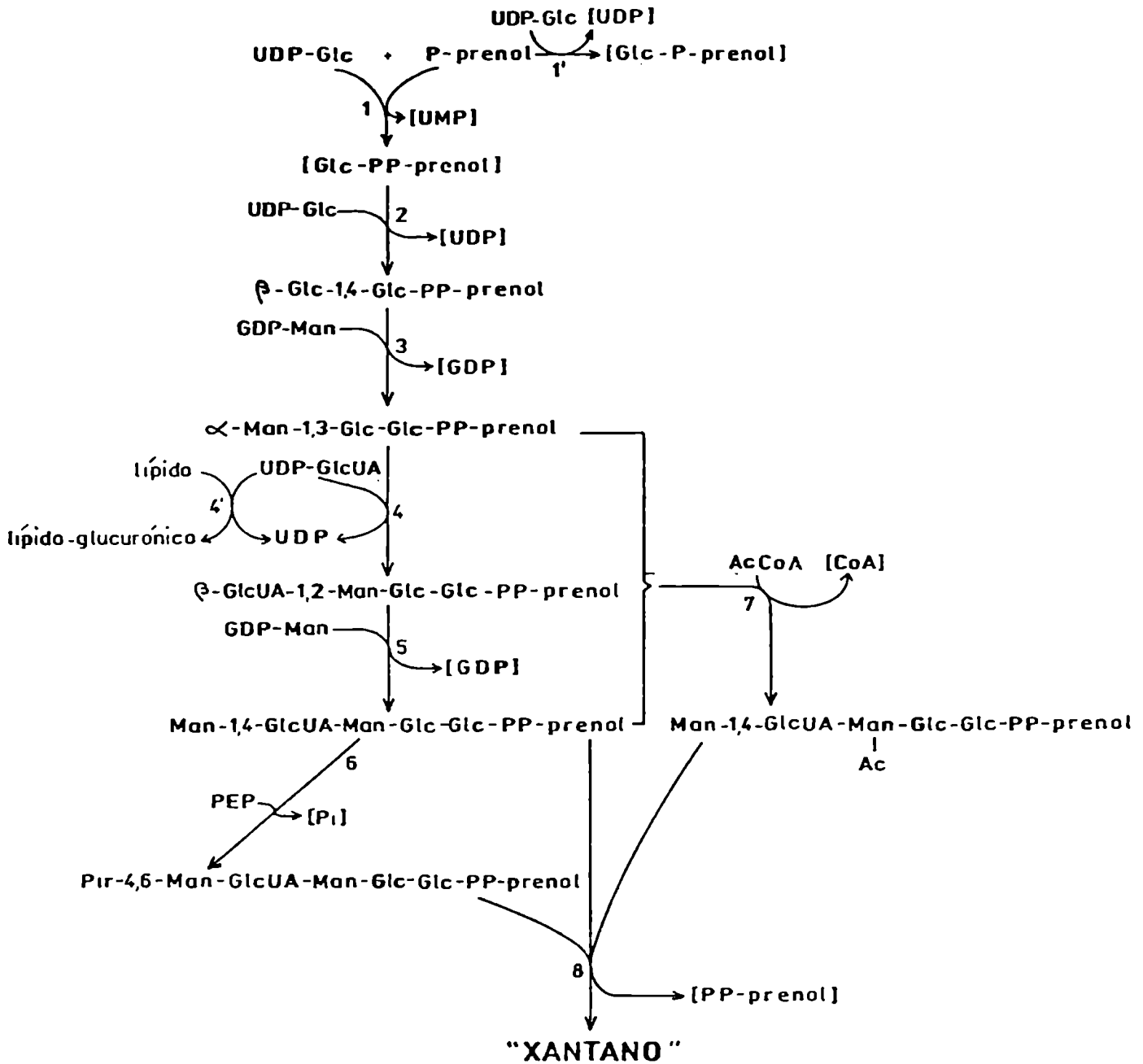


Figura 87: Resultados obtenidos con el sistema de *Xanthomonas campestris*

La presencia de la unión difosfato se confirmó además en el caso de los productos de las reacciones 2 a 6 mediante la caracterización del producto de ruptura alcalina como el correspondiente éster fosfórico cíclico (Figs.41, 47, 67, 53 y 72).

La naturaleza de la porción lipídica de los intermediarios aislados se estudió en el caso del producto de la reacción 2, celobiosa-PP-prenol. Este compuesto mostró ser lábil tanto al tratamiento con fenol, como a la reducción catalítica con H_2 (Figs.42, 43 y sección 5.2.2.4. respectivamente), los cuales son dos criterios usuales para distinguir derivados poliprenólicos α -insaturados (alílicos) de α -saturados (dolicoles) (129). Además como se demostró que celobiosa-PP-prenol es precursor de los productos de las reacciones 3, 4 y 5 (Fig.49, tabla 16 y Fig.55 respectivamente) se consideró que la porción lipídica era común a todos los intermediarios aislados. Una identificación más precisa de esta porción lipídica se logrará únicamente cuando se disponga de cantidades mucho mayores que las manejadas hasta el momento y se pueda obtener un espectro de masas.

Si bien de acuerdo al esquema de biosíntesis propuesto la primera reacción consiste en la transferencia de glucosa-1-P al prenol-P aceptor (reacción 1), incubaciones realizadas en presencia de UDP-glucosa solamente condujeron a la formación de celobiosa difosfato prenol. Este compuesto se caracterizó

en base a los siguientes criterios:

-El producto hidrosoluble obtenido por hidrólisis ácida suave del material extraído en solvente 1203 se caracterizó como celobiosa (β -glucosa-1,4-glucosa) (Fig.40). Por otra parte y como ya se mencionó un lípido-azúcar similar había sido descrito en nuestro laboratorio, y sus propiedades (82) y biosíntesis (75) eran conocidas.

En los experimentos realizados no se detectó la presencia de glucosa difosfato preno1, posiblemente debido a que la reacción es muy rápida y aunque no se hicieron muchos esfuerzos para aislarlo, no se descarta la posibilidad de obtenerlo variando las condiciones de incubación (pH, tiempos de reacción, etc.). De todas maneras la transferencia de glucosa-1-P a partir de UDP-glucosa a un preno1-P acceptor endógeno quedó confirmada al aislar celobiosa- ^{32}P -P-preno1 a partir de incubaciones realizadas en presencia de (β - ^{32}P)UDP-glucosa (Fig.64).

La reacción siguiente es la formación de α -manosil-1,3-celobiosa-PP-preno1, a partir de celobiosa-PP-preno1 y GDP-manosa (reacción 3). Varias evidencias confirmaron la estructura propuesta para la porción azúcar del compuesto. Su comportamiento cromatográfico es idéntico al obtenido para el trisacárido manosilcelobiosa de A. xylinum (Figs.46 A y 47 E). La obtención de celobiosa a partir de los productos de oxidación con periodato del éster fosfórico cíclico del trisacárido

(Fig.51) indicó que la manosa está unida al carbono 3 de la glucosa no reductora de la celobiosa, es decir, que el trisacárido es lineal. Este resultado estructural fue el primer indicio que nos permitía descartar a la unidad repetitiva ramificada (Fig.36) como fisiológica. La configuración anomérica de la manosa se estableció por tratamiento del trisacárido con α -manosidasa libre de β -manosidasa (Fig.52).

La relación entre el trisacárido y celobiosa-PP-prenol se estableció mediante incubaciones en dos etapas: Celobiosa-PP-prenol formado "in situ" (sección 5.3.4.) en una primera incubación produjo manosilcelobiosa-PP-prenol al ser reincubado con GDP-manosa (Fig.49). Como en el caso anterior un lípido-azúcar similar había sido descrito en nuestro laboratorio, y sus propiedades eran conocidas (75).

La subsiguiente transferencia de ácido glucurónico a partir de UDP-glucurónico a manosilcelobiosa-PP-prenol conduce a la formación de glucuronil-manosilcelobiosa-PP-prenol (reacción 4) (sección 5.6.). Este compuesto se pudo obtener únicamente por medio de incubaciones realizadas en dos etapas, pues como se explicó en la sección 5.4. al incubar en presencia de UDP-glucurónico, GDP-manosa y UDP-glucurónico se formaba pentasacárido difosfato prenol.

Hidrólisis ácida suave del material obtenido en dos etapas liberó un producto hidrosoluble cuyas propiedades (movili-

dad electroforética (Fig.67 A) y comportamiento cromatográfico (Fig.68)) correspondieron a un tetrasacárido cargado negativamente.

Además el compuesto se pudo obtener marcado en glucosa, en manosa ó en ácido glucurónico según el nucleótido-azúcar radioactivo utilizado (Tablas 15 y 16), siempre que en la primera incubación se permitiera la formación de manosil-celobiosa difosfato prenil y la segunda se realizara en presencia de UDP-glucurónico solamente.

La reacción 5 consiste en la transferencia de manosa, a partir de GDP-manosa, al carbono 4 del ácido glucurónico del lípido tetrasacárido para formar la unidad repetitiva (sección 5.4.). La identidad del compuesto formado se estableció mediante varios criterios. Se lo pudo obtener marcado en cualquiera de las hexosas que lo componen (Tabla 11).

Cromatografiado en columna de DEAE-celulosa se eluyó a una concentración AcONH_4 0,95 M (Fig.54). Esta concentración es alta considerando que los prenil-fosfo-azúcares neutros se eluyen con AcONH_4 0,3-0,4 M, pero justificable por el tamaño y por la presencia de una carga negativa provista por el grupo carboxilo del ácido glucurónico. El AX_6 -PP-prenol (obtenido de A. xylinum) cromatografiado en este mismo sistema se eluye recién con AcONH_4 1,25 M (94,118).

Hidrolizado en condiciones ácidas suaves, el producto hi-

rosoluble obtenido se comportó como un pentasacárido cargado negativamente, a juzgar por su movilidad electroforética (Fig. 53) y por su comportamiento cromatográfico (Fig.59).

La similitud de este pentasacárido con la unidad repetitiva propuesta por Jansson y colaboradores (120) se confirmó de varias maneras.

Por ejemplo, el aislamiento del disacárido β -glucuronil-manosa, marcado en cualquiera de los dos azúcares, a partir de los productos de hidrólisis ácida parcial del pentasacárido, indicó que una manosa interna estaba substituída por un residuo de ácido glucurónico (sección 5.4.6.2.). Se estableció que el carbono de la manosa involucrado en dicha unión era el 2 por estudios de permetilación del pentasacárido marcado en (^{14}C)manosa. Se obtuvo 3, 4, 6-tri-Me-(^{14}C)manosa y 2, 3, 4, 6-tetra-Me-(^{14}C)manosa (Fig.61) indicando la presencia de una manosa substituída en posición 2 y de una manosa terminal como era de esperar. La unión de esta manosa al C-4 del ácido glucurónico se estableció de manera indirecta. El grupo carboxilo del ácido glucurónico presente en el pentasacárido marcado en dicho ácido fue reducido a un grupo alcohol formando un pentasacárido neutro marcado en (^{14}C)glucosa y este compuesto fue sometido a una degradación de Smith (Fig.62 A y B). Se obtuvo únicamente ^{14}C -eritritol indicando que el C-4 del ácido glucurónico original estaba substituído. Finalmente se estable-

ció que la unidad repetitiva fisiológica era la lineal y no la ramificada (Fig.36), confirmando lo visto con el trisacárido. Se llegó a esta conclusión pues los productos obtenidos por permetilación del pentasacárido marcado en (^{14}C)glucosa fueron dos trimetil derivados (2,3,6- y 2,4,6-tri-Me-glucosa, Fig.63) y no un dimetil y un tetrametil derivados (2,6-di- y 2,3,4,6-tetra-Me-glucosa) como se hubiese encontrado si la unidad repetitiva analizada hubiera sido ramificada. No se estudió la configuración anomérica de la manosa terminal.

La relación precursor-producto entre el lípido pentasacárido y los lípidos intermediarios anteriormente descritos se estableció mediante incubaciones en dos etapas. Así (^{14}C)celobiosa difosfato preno1, formado en una primera incubación fue transformado en una segunda incubación realizada en presencia de GDP-manosa y UDP-glucurónico en (^{14}C -Glc)pentasacárido difosfato preno1 (Tabla 12 y Fig.55). Similarmente (^{14}C)manosilcelobiosa difosfato preno1 fue capaz de aceptar un residuo de ácido glucurónico y otro de manosa, al ser reincubado en presencia de UDP-glucurónico y GDP-manosa, para formar el lípido pentasacárido (Tabla 19, sección 5.7.2.2.). Finalmente el tetrasacárido (^{14}C)glucuronil-manosilcelobiosa difosfato preno1, en presencia de GDP-manosa, también aceptó un residuo manosa, para formar, como era de esperar, el lípido pentasacárido (Fig.69, sección 5.6.4.).

Formación del xantano "in vitro"

En primer lugar se estudió la formación de xantano "in vitro" utilizando UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico (Tabla 8). La identidad del producto, que se pudo obtener marcado en cualquiera de los tres azúcares, se estableció por cromatografía en columna de tamizaje molecular, cocromatografiando en los tres casos con xantano nativo (Figs.32, 33 y 34), y por aislamiento de 2,6-di-Me-glucosa a partir de los productos de permetilación del polisacárido marcado en glucosa (Fig. 35).

Este último resultado es importante pues confirma, en el producto obtenido "in vitro", la existencia de una glucosa disustituída o ramificada, como se había propuesto para el xantano natural (120) (121). Debe destacarse que esta glucosa ramificada está ausente en la unidad repetitiva asociada al lípido (Fig.63) y por lo tanto la ramificación es consecuencia directa del proceso de polimerización.

Se encontró también que para que ocurriera la polimerización era necesaria la presencia de los tres nucleótido-azúcares (Tabla 9), descartando, en un principio, la formación inicial de una cadena de celulosa y el posterior agregado de ramas laterales.

El hecho de poder obtener polisacárido "in vitro" a partir de los nucleótido-azúcares fue un buen resultado, ya que

frecuentemente células tratadas con EDTA pierden la capacidad de producir exopolisacáridos (81, 94, 95).

La participación de pentasacárido-PP-prenol en la síntesis del xantano se estableció mediante una incubación en dos etapas. En la primera parte se incubó en presencia de los tres nucleótido-azúcares (uno de ellos radioactivo) necesarios para formar pentasacárido-PP-prenol. Luego de lavar para eliminar el exceso de sustrato y el posible polisacárido formado se reincubó sin ningún agregado. Los resultados (Tabla 17) mostraron que el lípido-azúcar formado en la primer incubación disminuyó en la segunda, al tiempo que se observó incorporación de radioactividad en xantano. Esta radioactividad solo pudo provenir del lípido intermediario y no fue producto de la primera incubación, pues un control que no fue reincubado mostró ausencia de radioactividad en la fracción polisacárido.

Se determinó también que solo pentasacárido-PP-prenol era utilizado como sustrato para la formación de xantano "in vitro", es decir que ninguno de los restantes lípido-azúcares puede ser polimerizado directamente. Se llegó a esta conclusión efectuando incubaciones en dos etapas. En un caso se acumuló (^{14}C)celobiosa-PP-prenol en la primera etapa y se comprobó que no se formaba polisacárido a menos que durante la segunda incubación se agregara GDP-manosa y UDP-glucurónico simultáneamente (Tabla 18). El polisacárido así obtenido fue caracteri-

zado como tal, filtrándolo por una columna de Bio-Gel (Fig.70).

También se comprobó que ni manosilcelobiosa- ni glucuronil-manosilcelobiosa difosfato preno1 polimerizaban directamente y solo lo hacían al ser reincubados en presencia de los nucleótido-azúcares necesarios para completar pentasacárido-PP-preno1 (Tabla 19).

Se concluyó entonces que la formación de xantano "in vitro" era producto de la polimerización de las unidades repetitivas unidas al preno1, como se indica en la Fig.87, reacción 8.

Este es el primer sistema descrito en el que un exopolisacárido libremente excretado al medio se logra sintetizar "in vitro" y en el que , como era de esperar, participan prenil-fosfo-azúcares, Esto permitirá estudiar en el futuro el mecanismo de polimerización con más detalle.

Es interesante destacar, sin embargo, que la rama lateral que contiene manosa-ácido glucurónico-manosa, surge como consecuencia del mecanismo de polimerización. Esto lo hace más parecido al esquema de biosíntesis del polisacárido-O de *Salmonella typhimurium* (Fig.15) que al de *Salmonella minneapolis*, donde las ramas laterales de glucosa son agregadas a partir de un preno1-P-glucosa (Fig.16).

Incorporación de (^{14}C)piruvato

El siguiente paso estudiado en el esquema propuesto fue la transferencia de piruvato a los carbonos 4 y 6 del residuo manosa terminal del pentasacárido difosfato prenil (reacción 6).

Como dador de grupos piruvato se utilizó ácido (^{14}C)fosfoenolpirúvico [$(^{14}\text{C})\text{PEP}$] pues pareció el compuesto más indicado. En realidad Sutherland ya había sugerido esta posibilidad, pero sin lograr demostrarlo (16).

Se encontró buena estimulación de la incorporación de radioactividad a material liposoluble solamente cuando la incubación se realizó en presencia de los tres nucleótido-azúcares simultáneamente (Tabla 20). Estudiando el efecto de la temperatura de incubación se encontró que a 20°C se incorporaba 4 veces más (^{14}C)piruvato que a 0°C ó a 12°C (Tabla 21).

Se confirmó que el PEP y no el piruvato era el dador efectuando incubaciones con (^{14}C)PEP en ausencia y en presencia de exceso de PEP no radioactivo. En este último caso se encontró importante disminución por dilución isotópica de la marca incorporada en extracto 1203. En cambio cuando se incubó con piruvato no radioactivo la disminución observada fue mucho menor (Tabla 22).

Varias evidencias permitieron caracterizar al lípido pentasacárido piruvilado.

En primer lugar se pudo obtener un compuesto con idénti-

cas propiedades, pero con marca en glucosa, en manosa, ó en ácido glucurónico. Esto se logró efectuando incubaciones en presencia de los tres nucleótido dadores (con uno de ellos radioactivo) y PEP no marcado (sección 5.8.1.3.).

Además cromatografiado en columna de DEAE-celulosa se eluyó recién a una concentración de AcONH_4 1,1 M (Fig.75). Esta concentración es justificable por la presencia de una carga negativa extra provista por el carboxilo del grupo piruvato, considerando que pentasacárido-PP-prenol se eluyó a una concentración de 0,95 M de dicha sal.

Finalmente la posición del grupo piruvato se determinó sometiendo a una degradación de Smith al piruvil-pentasacárido marcado en ambas manosas (sección 5.8.1.5.). Por dicho tratamiento se obtuvo (^{14}C)eritritol y (^{14}C)glicerol en proporción prácticamente equimolar (Fig.77) indicando que el piruvato estaba unido en posición 4, 6 a la manosa externa (ver explicación en Fig.76), similarmente a lo propuesto para el xantano nativo (120).

Aclarado que el PEP era el compuesto que actuaba como dador y que el pentasacárido-PP-prenol era el aceptor se estudió la forma de incorporación de grupos piruvato al polisacárido. Para ello se incubó xantano nativo, así como xantano libre de piruvato, en presencia de (^{14}C)PEP. En estas condiciones no se detectó incorporación de radioactividad en ninguno de los

dos casos. En cambio cuando se incubó en presencia de los tres nucleótido-azúcares se observó, como era de esperar, formación de piruvil-pentasacárido-PP-prenol y además incorporación de radioactividad en polisacárido, indicando que el lípido-azúcar piruvilado era un intermediario en la síntesis del polímero (Tabla 23).

Como en el xantano nativo no todas las manosas terminales están piruviladas (120,121) se estudió la posibilidad de obtener "in vitro" pentasacárido-PP-prenol totalmente piruvilado y de observar si este compuesto podía ser o no polimerizado. Para ello se efectuó una serie de incubaciones, en condiciones de formar lípido pentasacárido, con cantidades crecientes de PEP (Fig.78). Utilizando UDP-(¹⁴C)glucurónico, pudo comprobarse que la presencia de PEP entre 0 y 3 mM durante la incubación se tradujo en un aumento de piruvil-pentasacárido-PP-prenol a expensas de pentasacárido-PP-prenol, no detectándose diferencias en la incorporación de radioactividad a polisacárido. Probablemente con el aumento de PEP se forma polisacárido de mayor contenido en piruvato. Sutherland comunicó que xantano aislado de un único cultivo estaría compuesto de moléculas con distinto contenido en grupos piruvato (165).

En cambio cuando se aumentó la concentración de PEP a más de 3 mM se observó una progresiva disminución en la incorporación de radioactividad tanto a extracto 1203 como a polisacá-

rido. Por ejemplo en presencia de PEP 14 mM se observó una caída del 40% en la radioactividad incorporada a extracto 1203 (que resultó estar formado únicamente por piruvil-pentasacárido-PP-prenol) y de un 90% en polisacárido, indicando que probablemente piruvil-pentasacárido-PP-prenol no puede ser polimerizado si no se encuentra en presencia de pentasacárido-PP-prenol (Fig.78).

Esta suposición se vió confirmada efectuando una incubación en dos etapas, como se muestra en la Tabla 24. En la primera parte se incubó en condiciones de obtener piruvil-pentasacárido-PP-prenol como único compuesto. Y en la segunda etapa la mezcla se dividió en dos: una mitad se reincubó sin ningún agregado y la otra mitad en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-glucurónico, no radioactivos, para permitir la formación de pentasacárido-PP-prenol sin piruvilar. Solo en este último caso se observó transferencia de radioactividad del extracto 1203 a polisacárido. Esta exigencia concuerda con la estructura propuesta por el grupo de Lindberg (120) donde las manosas terminales están piruviladas alternadamente. Esto elevaría el tamaño de la "unidad repetitiva" a 10 azúcares. Debe aclararse sin embargo, que no es imprescindible la presencia del piruvil-pentasacárido-PP-prenol en la reacción de polimerización pues ésta puede ocurrir en ausencia del lípido

piruvilado. De todas maneras quedó claro que el grupo piruvato se incorporaba al pentasacárido a partir de PEP, como se muestra en la reacción 6 de la Fig.87 y que este compuesto era un intermediario en la síntesis del xantano como se ha pretendido representar en la reacción 8 de la misma figura.

Incorporación de (^{14}C)acetato

El compuesto utilizado como dador de grupos acetato fue acetil-coenzima A (acetil-CoA) pues existía el antecedente, como ya se comentó en la Introducción, que preparaciones particuladas de Salmonella anatum eran capaces de transferir grupos acetilo a partir de ese compuesto a oligosacáridos aceptores (109,110).

En nuestro sistema se encontró buena incorporación de radioactividad en "extracto 1203" a partir de (^{14}C)acetil-CoA solamente cuando se permitió formar manosilcelobiosa-PP-prenol o pentasacárido-PP-prenol (Tabla 25) y solamente en este último caso se encontró, además, incorporación de radioactividad a polisacárido.

Se confirmó que el acetil-CoA, y no el acetato, era el dador ya que un exceso de acetato no radioactivo no afectó significativamente la incorporación de acetato a partir de (^{14}C)acetil-CoA, en tanto que un exceso de acetil-CoA no marcado disminuyó notablemente la radioactividad incorporada

(Tabla 26).

La identidad del acetil-manosilcelobiosa difosfato preno se estableció por diversos criterios.

En primer lugar porque este compuesto, que se obtenía marcado en (^{14}C)acetato a partir de (^{14}C)acetil-CoA y de UDP-glucosa y de GDP-manosa (ambos no radioactivos), se logró obtener también con marca en manosa realizando incubaciones en presencia de GDP-(^{14}C)manosa y UDP-glucosa y acetil-CoA no marcados (Fig.79).

Además, el compuesto obtenido con marca en acetato liberó (^{14}C)acetato cuando se lo trató con un medio alcalino suave (NaOH 60 mM, 10 min) (Fig.80 A). El mismo compuesto, pero obtenido con marca en manosa, rindió (^{14}C)manosil-celobiosa ante el mismo tratamiento (Fig.80 B).

Finalmente, en condiciones en que (^{14}C)manosil-celobiosa fue atacada por α -manosidasa liberando manosa radioactiva, acetil-(^{14}C)manosil-celobiosa resultó resistente (Fig.81).

Este resultado se tomó como una evidencia indirecta de la presencia del grupo acetilo en el residuo manosa del trisacárido.

No se estudió a que carbono de la manosa se incorpora el acetato, pero la estructura propuesta por el grupo de Lindberg (120) le asigna la posición 6.

Como se mencionó más arriba, también se encontró incorpo-

ración de radioactividad en extracto 1203 a partir de (^{14}C)acetil-CoA cuando se permitió formar, además de manosilcelobiosa, pentasacárido difosfato preno1. Se comprobó que el acetato estaba unido al pentasacárido efectuando una electroforesis con el producto obtenido por hidrólisis ácida suave del lípido-azúcar. Se observó un único pico de radioactividad cuya movilidad electroforética fue idéntica a la descrita para el pentasacárido libre (R_{UMP} : 0,6) (Fig.82). Además similarmente a lo visto con el trisacárido acetilado, el (^{14}C)acetil-pentasacárido liberó (^{14}C)acetato cuando fue tratado en medio alcalino suave (NaOH 60 mM, 10 min, temperatura ambiente). Tampoco en este caso se estudió la posición de acetilación.

En conclusión, empleando acetil-CoA se logró incorporación de acetato tanto a manosilcelobiosa como a pentasacárido difosfato preno1. Este hecho, deja abierto el interrogante de cual es el aceptor "fisiológico". Por este motivo la reacción de transferencia de acetato en la Fig.87 se ha representado con la llave que abarca los tres oligosacáridos.

La incorporación de grupos acetato al polisacárido se aclaró, como en el caso del piruvato, incubando (^{14}C)Ac-CoA en ausencia y en presencia de UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-galacturónico, así como en presencia de xantano nativo y xantano libre de piruvato. Como en el caso del piruvato, solo cuando hubo formación de acetil-pentasacárido se observó incorpo-

ración de radioactividad a polisacárido, indicando que el lípido-azúcar acetilado era un intermediario en la síntesis del xantano (Tabla 27), como trató de representarse en la reacción 8 de la Fig.87.

A diferencia del caso del piruvato, la polimerización del acetil-pentasacárido-PP-prenol no fue estudiada en detalle.

Finalmente debe aclararse que hasta el momento no se ha logrado incorporación conjunta de piruvato y de acetato en un lípido intermediario: aparentemente la entrada de un sustituyente excluye al otro. Estos resultados sumados a la inhibición de la polimerización causada por exceso de PEP (Fig.78) parecen indicar que complejos mecanismos de regulación intervienen en la formación del polímero completo.

Es la primera vez que aparecen efectos de este tipo y hacen falta estudios más detallados para aclararlos.

Lip el/7

Atwater

BIBLIOGRAFIA

1. Tipper, D.J., y Wright, A. (1979) en "The Bacteria" (Gunsalus, I.C. ed) 7, 291-426, Academic Press, N.York, San Francisco, London.
2. Mindich, L. (1973) en "Bacterial Walls and Membranes" (Ed. Leive, L.) pag. 1-27. M. Dekker, Inc. N.York.
3. Bayer, M.E. (1974) Ann. N.Y. Sci., 235, 6-28.
4. Glavert, A.M., y Thornley, M.J. (1969) en "The topography of the bacterial cell wall", Annu. Rev. Biochem., 23, 159-198.
5. Lo, T.C.Y. (1979) Can. J. Biochem., 57, 289-301.
6. Smit, J., Kamio, Y., y Nikaido, H. (1975) J. Bacteriol., 124, 942-958.
7. Nikaido, H. (1973) en "Bacterial Membranes and Walls" (Leive, L., ed.) 131-208, M. Dekker Inc., N.York.
8. Weidel, W., y Pelzer, H. (1964) Adv. Enzimol., 26, 193-232.
9. Tipper, D.J., Strominger, J.L., y Ensign, J.C (1967) Biochem., 6, 906-920.
10. Wilkinson, S.G. (1977) en "Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell" (Sutherland, I.W. ed.) 97-175, Academic Press, London, N.York, San Francisco.
11. Archibald, A.R. (1974) Adv. Microbiol. Physiol., 11, 53-95.
12. Ellwood, D.C., y Tempest, D.W. (1972) Adv. Microbiol. Physiol., 7, 83-117.
13. Glaser, L., and Loewy, A.. (1979) J. Biol. Chem., 254, 2184-2186.
14. Janczura, E., Perkins, H.R., y Rogers, H.J. (1961) Biochem. J., 80, 82-93.

15. Sanford, P.A. (1979) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 36, 265-313.
16. Sutherland, I.W. (1977) en "Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell" (Sutherland, I.W. ed.) 27-96. Academic Press, London, N.York, San Francisco.
17. Gotschlich, E.C., Fraser, B.A., Nishimura, O., Robbins, J.B., y Liu, T.Y. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 8915-8921.
18. Sutherland, J.W. (1970) *Nature*, 228, 280.
19. Harada, T. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 65-69.
20. Garegg, P.J., Lindberg, B., Onn, T., y Sutherland, I.W. (1971) *Acta Chem. Scand.*, 25, 2103-2108.
21. Kennedy, D.A., Buchanan, J.G., y Baddiley, J. (1969) *Biochem. J.*, 115, 37-45.
22. Hestrin, S. (1962) en "The bacteria" (Gunsalus, I.C., Stainer, R.I. eds.), 8, 373-388.
23. Cooper, E.A., y Preston, J.F. (1935) *Biochem. J.*, 29, 2267-2275.
24. Misaki, A., Saito, H., Ito, T., y Harada, T. (1970) *Biochem.*, 8, 4645-4650.
25. Harada, T., Misaki, A., y Saito, H. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 292-298.
26. Hestrin, S., y Schramm, M. (1954) *Biochem. J.*, 58, 345-352.
27. Dewitt, C.W., y Rowe, J.A. (1961) *J. Bacteriol.*, 82, 838-848.
28. Watson, R.G., y Scherp, H.W. (1958) *J. Immunol.*, 81, 331-336.
29. Sutherland, I.W. (1972) *Advan. Microbiol. Physiol.*, 8, 192-213.
30. Sutherland, I.W. (1972) *J. Gen. Microbiol.*, 70, 331-338.
31. Goebel, W.F. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 49, 464-471
32. Sapelli, R.V., y Goebel, W.F. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52, 265-271.
33. Grant, W.D, Sutherland, I.W., y Wilkinson, J.F. (1969) *J. Bacteriol.*, 100, 1187-1193.

34. Garegg, P.J., Lindberg, B., Onn, T., y Holme, T. (1971) *Acta Chem. Scand.*, ² 25, 1185-1194.
35. Zevenhuisen, L.T.P.M. (1973) *Carbohydr. Res.*, 26, 409-419.
36. Saito, H., Misaki, A., y Harada, T., *Agric. Biol. Chem.*, 34 (1970) 1683-1689.
37. Hisamatsu, M., Sauo, K., Amemura, A., y Harada, T., (1978) *Carbohydr. Res.*, 61, 89-96.
38. Harada, T., Amemura, A. (1979) *Carbohydr. Res.* 77, 285-288.
39. Jansoon, P.E., Kenne, L., Lindberg, B., Ljunggren, H., Lönngren, J., Rudén, U., Svensson, S. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 3812-3815.
40. Gorin, P.A., y Spencer, J.F.T. (1966) *Can. J. Chem.*, 44, 993-998.
41. Larsen, B., y Hang, A. (1971) *Carbohydr. Res.* 17, 287-296.
42. Evans, L.R., y Linker, A. (1973) *J. Bacteriol.*, 116, 915-924.
43. Erbing, C., Kenne, L., Lindberg, B., Lönngren, J., and Sutherland, I.W. (1976) *Carbohydr. Res.* 50, 115-120.
44. Gahan, L.C., Sandford, P.A., and Conrad, H.E. (1967) *Biochem.* 6, 2755-2766.
45. Dutton, G.G.S., and Yang, M.T. (1973) *Can. J. Chem.* 51, 1826-1832
46. Dutton, G.G.S., Stephen, A.M., and Churms, S.C. (1974) *Carbohydr. Res.*, 38, 225-237.
47. Sutherland, I.W. (1970) *Biochemistry* 9, 2180-2185.
48. Thurow, H., Choy, Y.M., Frank, N., Niemann, H., and Stirm, S. (1975) *Carbohydr. Res.*, 41, 241-255.
49. Bebauit, G.M., Choy, Y.M., Dutton, G.G.S., Furnell, N., Stephen, A.M., and Yang, M.T. (1973) *J. Bacteriol.*, 113, 1345-1347.
50. Choy, Y.M., and Dutton, G.G.S. (1973) *Can. J. Chem.*, 51, 198-207.

51. Choy, Y.N., Dutton, G.G.S., and Zanlungo, M. (1973) *Can. J. Chem.*, 51, 1819-1825.
52. Curvall, M., Lindberg, B., Lönngren, J., and Nimmich, W. (1975) *Carbohydr. Res.*, 42, 73-82.
53. Björndahl, H., Lindberg, B., Lönngren, J., Meszaros, M., Thompson, J.L., and Nimmich, W. (1973) *Carbohydr. Res.* 31, 93-100.
54. Conrad, H.E., Bamberg, J.R., Epley, J.D., and Kindt, T.J. (1966) *Biochemistry* 5, 2808-2817.
55. Lindberg, B., Lönngren, J., Rudén, U., and Nimmich, W. (1975) *Carbohydr. Res.*, 42, 83-93.
56. Wright, A., y Tipper, D.J. (1979) en "The Bacteria" (Gunsalus, I.C. ed.) 7, 427-285.
57. Armstrong, J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davison, A.L., Kelemen, M.V., y Neuhaus, F.C. (1959) *Nature (London)* 184, 247-248.
58. Ward, J.B. (1981) *Microbiol. Rev.* 45, 211-243.
59. Wright, A., Dankert, M., y Robbins, P.W. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 235-241.
60. Dankert, M., Wright, A., Kelley, W.S., y Robbins, P.W. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 425-435.
61. Wright, A., Dankert, M., Fennessey, P., y Robbins, P.W. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 1798-1803.
62. Troy, F.A., Freman, F.E., y Heath, E.C. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 118-133.
63. Yamamori, S., Murazami, N., Araki, Y., e Ito, E. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 6516-6522.
64. Sasak, W., y Chojnacki, T. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.*, 181, 402-410.
65. Umbreit, J.N., y Strominger, J.L. (1972) *J. Bacteriol.*, 112, 1306-1309.
66. Gough, D.P., Kirby, A.L., Richards, J.B., y Hemming, F.W.

- (1970) *Biochem. J.*, 118, 167-170.
67. Scher, M., Lennarz, W.J., y Sweeley, C.C. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 39, 1313-1320.
68. Wright, A. (1971) *J. Bacteriol.*, 105, 927-936.
69. Higashi, Y., Strominger, J.L., y Sweeley, C.C. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3697-3702.
70. Umbreit, J.N., Stone, K.J., y Strominger, J.L., (1972) *J. Bacteriol.*, 112, 1302-1305.
71. Takayama, L., Schnoes, H.K., y Semmler, E.J. (1973) *Biochem. Biophys. Acta.*, 316, 212-221.
72. Takayama, K., y Goldman, B.S. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 6251-6257.
73. Takayama, K., y Armstrong, E.L. (1971) *FEBS Lett.*, 18, 67-69.
74. Schultz, J., y Elbein, A.D. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 311-322.
75. Couso, R.O., Ielpi, L., García, R.C., y Dankert, M.A. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 204, 434-443.
76. Mescher, F.M., Hansen, U., y Strominger, J.L. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 7289-7294.
77. Nikaido, H., Nikaido, K., Nakae, T., y Makela, P.M. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 3902-3911.
78. Nikaido, K., y Nikaido, H. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 3912-3919.
79. Jankowski, W., Mankowski, T., y Chojnacki, T., (1974) *Biochem. Biophys. Acta.*, 337, 153-162.
80. Anderson, R.G., Hussey, H., y Baddiley, J. (1972) *Biochem. J.*, 127, 11-25.
31. Johnson, J.G., y Wilson, D.B. (1975) *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 1095-1096.
82. García, R.C., Recondo, E., y Dankert, M. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 43, 93-105.
33. Romero, P., García, C.R., y Dankert, M. (1977) *Mol. Cell.*

- Biochem., 16, 205-211.
84. Chiu, T.H., y Saralkar, C. (1978) *J. Bacteriol.*, 113, 185-195.
 85. Troy, F.A., Vijay, I.K., y Tesche, N. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 156-163.
 86. Rohr, T.E., Levy, G.N., Stark, N.J., y Anderson, J.S. (1977) 252, 3460-3465.
 87. Tolmasky, M.E., Staneloni, R.J., Ugalde, R.A., y Leloir, L.F. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 203, 358-364.
 88. Lomax, J.A., Poxton, I.R., y Shuterland, I.W. (1973) *FEBS Lett.*, 34, 232-234.
 89. Hussey, H., y Baddiley, J. (1972) *Biochem. J.*, 127, 39-50.
 90. Mc Arthur, H.A.I., Hancock, I.C., Roberts, F.M., y Baddiley (1980) *FEBS Lett.*, 111, 317-323.
 91. Bettinger, G.E., Chatterjee, A.N., y Young, F.E. (1978) *J. Biol. Chem.*, 252, 4118-4124.
 92. Mc Arthur, H.A.I., Roberts, F.M., Hancock, I.C., Baddiley, J. (1978) *FEBS Lett.*, 86, 193-200.
 93. Sandermann Jr, H. (1977) *FEBS Lett.*, 81, 294-298.
 94. Couso, R.O., Ielpi, L., García, R.C., y Dankert, M.A. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 123, 617-627.
 95. Tolmasky, M.E., Staneloni, R.J., y Leloir, L.F. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 6751-6757.
 96. Anderson, J.S., Matsushashi, M., Haskin, M.A., y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 3180-3190.
 97. Katz, W., Matsushashi, M., Dietrich, C.P., y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 3207-3217.
 98. Matsushashi, M., Dietrich, C.P., y Strominger, J.L. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 3191-3206.
 99. Stark, N.J., Levy, G.N., Rohr, T.E., y Anderson, J.S. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 3466-3472.
 100. Weiner, I.M., Higuchi, T., Rothfield, Saltmarsh-Andrew, M.,

- Osborn, M.J., y Horecker, B.L. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54, 228-235.
101. Osborn, M.J., y Weiner, I.M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2631-2639.
102. Shibaev, V.N., Druzhinina, T.N., Popova, A.N., Rozhnova, S., y Killeso, V.A. (1979) Eur. J. Biochem., 101, 309-316.
103. Kanegasaki, S., y Wright, A. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 67, 951-958.
104. Bray, D., Robbins, P.W. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 334-339.
105. Goldman, R., y Strominger, J.L. (1972) J. Biol. Chem., 247, 5116-5122.
106. Wright, A., y Kanegasaki, S. (1971) Physiol. Rev., 51, 748-784.
107. Robbins, P.W., y Uchida, T. (1965) J. Biol. Chem., 240, 375-383.
108. Bray, D.C.H., (1967) Tesis Massachussets Institute of Technology, Cambridge.
109. Robbins, P.W., Keller, J.M., Wright, A., y Bernstein, R.I. (1964) J. Biol. Chem., 240, 384-390.
110. Keller, J.M. (1966) Tesis de Doctorado, Massachussets Inst. Technol., Cambridge, Massachussets.
111. Sutherland, I.W., y Norval, M. (1970) Biochem. J., 120, 567-576.
112. Sandford, P.A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., Watson, P.R., Cadmus, M.C., y Jeanes, A. (1977) en "Extracellular Microbial Polysaccharides" (Sandford, P.A., y Laskin, A. eds.) 192-210 ACS. Symp. ser., N° 45, Am. Chem. Soc., Washington, D.C.
113. Dudman, W.F., y Heidelberg, M. (1969) Science, 164, 954-955.
114. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, sixth edition pag. 181.
115. Glaser, L. (1958) J. Biol. Chem., 232, 627-636.
116. García, R.C., Recondo, E., y Dankert, M.A., Observaciones no

publicadas.

117. Romero Martínez, P. (1977) Tesis doctoral F.C.E. y N., U.B.A.
118. Couso, R.O. (1980) Tesis doctoral, F.C.E. y N., U.B.A.
119. Fernandez Valiela, M.V. (1975) Introducción a la fitopatología, 3era. ed., 2, 152-161. Colección científica del INTA, Bs. As.
120. Jansson, P.E., Kenne, L., y Lindberg, B. (1975) Carbohydr. Res., 45, 275-282.
121. Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D., y Sanderson, G. (1976) Carbohydr. Res., 46, 245-257.
122. Rogovin, S.P., Anderson, R.F., y Cadmus, M.C. (1961) J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 3, 51-63.
123. Sloneker, J.H., y Jeanes, A. (1962) Can. J. Chem., 40, 2066-2071.
124. Kidby, D., Sandford, P., Herman, A., y Cadmus, M. (1977) App. Environ. Microbiol. 33, 840-845.
125. Cadmus, M.C., Rogovin, S.P., Burton, K.A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., y Jeanes, A., (1976) Can. J. Microbiol. 22, 942-948.
126. Manual of Microbiological Methods by the Society of American Bacteriologists. 1957 Mc Graw-Hill, N.York-Londres.
127. Gherna, R.L. (1981) en Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhardt, P. ed.) 208-220. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
128. Davinson, E.A. (1966) Methods Enzymol. 3, 52-60.
129. Pont Lezica, R., Brett, C.T., Romero Martínez, P., y Dankert, M.A., (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 980-987.
130. Tarlov, A.R., y Kennedy, E.P. (1965) J. Biol. Chem. 240, 49-53.
131. Goldstein, I.J., Hay, G.W., Lewis, B.A., y Smith, F. (1975) Methods Carbohydr. Chem. 5, 361-370.
132. Taylor, L.R., y Conrad, H.E. (1972) Biochemistry, 11,

- 1383-1388.
133. Kocourek, J., y Ballou, C.E. (1969) *J. Bacteriol* 100, 1175-1181.
 134. Hakomori, S. (1964) *J. Biochem.* 55, 205-208
 135. Sandford, P.A., y Conrad, H.E. (1966) *Biochem.*, 5, 1508-1516.
 136. Smith, F., y Montgomery, R., (1956) en *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. Glick, D) Vol.III, Interscience, N.York, Londres, p. 154-157.
 137. Dische, Z., y Shettles, L.B. (1948) *J. Biol. Chem.* 175, 595-603.
 138. Spiro, R.G. (1966) en *Methods in Enzymology* (Ed. Neufeld, E. F., y Ginsburg, V.) Vol III, Academic Press, N.York y Londres p. 3-26.
 139. Blumenkrantz, N., y Asboe-Hansen, G. (1973) *Anal. Biochem.* 54, 484-489.
 140. Lloyd, J.B., y Whelan, W.J. (1969) *Anal. Biochem.* 30, 467-470.
 141. Ugalde, R.A. (1980) Tesis Doctoral F.C.E. y N. U.B.A., pag. 109-110.
 142. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
 143. Kennedy, E.P., y Barker, H.A. (1951) *Anal. Chem.* 23, 1033-1034.
 144. Paladini, A.C., y Leloir, L.F..(1952) *Biochem. J.*, 51, 426-430.
 145. Jeanes, A., Wise, C.S., y Dimler, R.J. (1951) *Anal. Chem.* 23, 415-420.
 146. Tung, K.K., y Nordin, J.H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta.* 158, 154-156.
 147. Leloir, L.F., Parodi, A.J., y Behrens, N.H. (1971) *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 47, 108-116.
 148. Forter, A.B. (1957) *Adv. Carbohydr. Chem.* (1957), 12, 81-115.

149. de Iannino, N.I., Staneloni, R.J., Behrens, N.H., y Dankert, M.A. (1979) FEBS Lett. 99, 73-76.
150. Recondo, E., Goncalvez, I.R.J., Dankert, M. (1964), J. Chromatogr. 16, 415-416.
151. Fales, F.W. (1959) Anal Chem., 31, 1898-1900.
152. Trevelyan, W.E., Procter, D.P., y Harrison, J.S. (1950) Nature (Lond.) 166, 444-445.
153. Burrows, S., Grylls, F.S.M., y Harrison, J.S. (1952) Nature (Lond.) 170, 800-801.
154. Chapman, A., Li, E., y Kornfeld, S. (1979). J. Biol. Chem. 254, 10243-10249.
155. Bray, G.A. (1960) Anal Biochem., 1, 279-285.
156. Cramer, F., y Böhm, W. (1959) Angew. Chem. 71, 775.
157. Stone, K.J., Wellburn, A.R., Hemming, F.W., y Pennock, J.F. (1967) Biochem. J. 102, 325-330.
158. Thomas, J.A., Schlender, K.K., y Larner, J. (1968) Anal. Biochem. 25, 486-499.
159. Conrad, H.E. (1972) Methods Carbohydr. Chem. 6, 154-157.
160. Holzwarth, G. (1976) Biochem. 15, 4333-4339.
161. Bourne, E.J., Hutson, D.H., y Weigel, H. (1961) J. Chem. Soc. Part.1, 35-38.
162. Algranati, I.D., y Cabib, E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1007-1013.
163. Lindberg, B., y Lönngren, J. (1978) Methods in Enzymol. 50, 4.
164. Stone, K.J., y Strominger, J.L. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 3223-3227.
165. Sutherland, I.W. (1981) J. Chromatogr. 231, 301-306.
166. Holzwarth, G., y Ogletree, J. (1979) Carbohydr. Res., 76, 277-280.
167. Markovitz, A. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2091-2098.
168. Hickman, J., y Ashwell, G. (1966) J. Biol. Chem. 241,

- 1424-1428.
169. Keglavic, D. (1979) en Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. (Eds. Tipson, R.S., y Horton, D.) Vol.36 Academic Press, N.York, San Francisco and London, 57-134.
170. Ross Colvin, J., Chéné, L., Sowden, L.C., Takai, M. (1977) Can. J. Biochem. 55, 1057-1063.