

Tesis de Posgrado

Mecanismo de glicosilación de proteínas en organismos de la familia Trypanosomatidae

Mendelzon, Daniel Hugo

1986

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:

Mendelzon, Daniel Hugo. (1986). Mecanismo de glicosilación de proteínas en organismos de la familia Trypanosomatidae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1947_Mendelzon.pdf

Cita tipo Chicago:

Mendelzon, Daniel Hugo. "Mecanismo de glicosilación de proteínas en organismos de la familia Trypanosomatidae". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1947_Mendelzon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMO DE GLICOSILACION DE PROTEINAS
EN ORGANISMOS DE LA FAMILIA TRYPANOSOMATIDAE

Autor: DANIEL HUGO MENDELZON

Director: ARMANDO J. PARODI

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

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN QUIMICA

AÑO 1986

Excmo. 1984
Pg. 2

A mis padres

A mis hermanos

A Marta

AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas e instituciones que de uno u otro modo colaboraron en la realización de este trabajo de tesis. Quiero expresar aquí mi especial agradecimiento:

Al Dr. Armando J. Parodi, director de tesis. Sus enseñanzas, críticas, estímulo y ejemplo fueron invaluable para la realización de este trabajo, y dejaron una profunda huella en mi formación profesional.

A la Fundación Campomar, en la persona de los miembros de su Comisión Directiva, por haberme permitido la realización de este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A todos los colegas y compañeros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por su apoyo y colaboración; en especial, a mis amigos Daniel Boscoboinik, Raúl Andino, Marcela Ferrer y Alberto Ochoa, por los gratos momentos compartidos durante los cinco años que demandó este trabajo.

A Laura de la Canal y Gerardo Lederkremer, compañeros de laboratorio, por el agradable clima de confianza y compañerismo.

A todo el personal técnico y administrativo del Instituto, por su eficaz y cordial colaboración.

A Irene Cangiano, por su excelente disposición y eficiencia en el manejo del procesador de textos utilizado para la edición de este trabajo.

A Norberto Malarini, por su dedicación y esmero en la confección de las figuras e ilustraciones de esta tesis.

ABREVIATURAS

Asn	asparagina
cpm	cuentas por minuto
DEAE-celulosa	dietilaminoetil celulosa
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dol	dolicol
Dol-P	dolicol monofosfato
Dol-P-P	dolicol difosfato
Endo-H	endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
Fuc	fucosa
Gal	galactosa
GalNac	N-acetilgalactosamina
GDP	guanosina 5' difosfato
Glc	glucosa
GlcNac	N-acetilglucosamina
GlcNac-P	N-acetilglucosamina 1-fosfato
h	hora
Hyl	hidroxilisina
Hyp	hidroxiprolina
Man	manosa
Man-6-P	manosa 6-fosfato
min	minuto
NeuAc	ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico)
Ser	serina
Thr	treonina

Tris

tris-(hidroximetil)aminometano

UDP

uridina 5' difosfato

UMP

uridina 5' monofosfato

undecaprenol-P

undecaprenol monofosfato

INDICE

	Página
RESUMEN	1
1.INTRODUCCION	6
1.1.GLICOPROTEINAS	6
1.1.1.Generalidades, clasificación y estructura	6
1.1.2.Glicosilación de proteínas	10
1.1.3.Procesamiento de glicoproteínas	19
1.1.4.Glicosilación de proteínas en eucariotes inferiores	25
1.1.5.Funciones de la porción sacarídica de las glicoproteínas	27
1.2.TRIPANOSOMATIDOS	30
1.2.1.Generalidades, taxonomía y biología	30
1.2.2.Glicoconjugados y glicoproteínas en tripanosomátidos	35
1.3.ANTECEDENTES INMEDIATOS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	36
1.3.1.Glicosilación de proteínas en tripanosomátidos	36
1.3.2.Objetivos del presente trabajo de tesis	39
2.MATERIALES Y METODOS	40
2.1.Materiales	40
2.1.1.Organismos	40
2.1.2.Radioactivos	41
2.1.3.Enzimas	41
2.2.Marcación radioactiva de microorganismos	42
2.2.1.Marcación de <u>C. fasciculata</u> con (U- ¹⁴ C)glucosa	42
2.2.2.Marcación de otros tripanosomátidos con (U- ¹⁴ C)glucosa	43
2.2.3.Marcación de <u>C. fasciculata</u> con (2- ³ H)manosa	43
2.2.4.Marcación de <u>C. fasciculata</u> con (U- ¹⁴ C)glucosa en presencia de antibióticos	44

2.3. Aislamiento de compuestos radioactivos	45
2.3.1. Dol-P-monosacáridos	45
2.3.2. Dol-P-P-oligosacáridos	45
2.3.3. Glicopéptidos	46
2.3.4. Oligosacáridos sensibles a Endo-H	47
2.4. Tratamientos químicos	47
2.4.1. Saponificación	47
2.4.2. Hidrólisis ácida suave de derivados de dolicol	48
2.4.3. Hidrólisis ácida suave de oligosacáridos y glicopéptidos	48
2.4.4. Hidrólisis ácida fuerte	48
2.4.5. Reducción de oligosacáridos con NaBH ₄	49
2.4.6. Oxidación suave con NaIO ₄ , reducción e hidrólisis	49
2.4.7. Acetólisis	49
2.5. Tratamientos enzimáticos	50
2.5.1. Endo-H	51
2.5.2. α -manosidasa	51
2.5.3. β -manosidasa	51
2.5.4. β -galactofuranosidasa	52
2.6. Métodos	52
2.6.1. Determinación de proteínas	52
2.6.2. Cromatografía	52
2.6.2.1. Cromatografía de exclusión con deoxicolato	52
2.6.2.2. Cromatografía en papel	53
2.6.3. Electroforesis en papel	53
2.6.4. Determinación de radioactividad	54
2.7. Standards	54
3. RESULTADOS	56

3.1.Caracterización de Dol-P-monosacáridos	56
3.1.1.Caracterización de la porción sacarídica	56
3.1.2.Tamaño de la porción lipídica	58
3.2.Caracterización de oligosacáridos unidos a Dol-P-P	60
3.2.2.Sensibilidad a endo N-acetilglucosaminidasa H	63
3.2.3.Sensibilidad a α - y β -manosidasa	65
3.2.4.Acetólisis	66
3.2.5.Electroforesis en molibdato de fragmentos de acetólisis	68
3.2.6.Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos en presencia de glucosa	70
3.2.7.Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas	72
3.3.Caracterización de oligosacáridos unidos a proteínas	75
3.3.1. <u>Crithidia fasciculata</u>	75
3.3.1.1.Obtención de glicopéptidos. Sensibilidad a Endo-H	75
3.3.1.2.Tamaño de oligosacáridos sensibles a Endo-H	76
3.3.1.3.Sensibilidad a α -manosidasa. Composición de azúcares	76
3.3.1.4.Detección de residuos de galactofuranosa	79
3.3.1.5.Análisis estructural de oligosacáridos sensibles a Endo-H	83
3.3.1.6.Oligosacáridos de existencia transitoria	86
3.3.1.7.Marcación de oligosacáridos sensibles a Endo-H con (2- ³ H)manosa	89
3.3.1.8.Oligosacáridos resistentes a Endo-H	91
3.3.2.Oligosacáridos unidos a proteína en <u>Crithidia hamosa</u>	93
3.3.3.Oligosacáridos unidos a proteína en <u>Leptomonas samueli</u>	97
3.3.3.1.Perfil de oligosacáridos sensibles a Endo-H	97
3.3.3.2.Sensibilidad a α -manosidasa. Composición de azúcares	99
3.3.3.3.Presencia de residuos galactofuranósicos	102
3.3.4.Oligosacáridos unidos a proteína en <u>Herpetomonas samuelpessoai</u> ..	104

3.3.5.Oligosacáridos unidos a proteína en <u>Trypanosoma dionisii</u> y <u>Trypanosoma conorhini</u>	107
3.3.5.1.Análisis estructural	109
3.3.6.Oligosacáridos unidos a proteína en <u>Leishmania adleri</u>	114
3.3.7.Oligosacáridos unidos a proteína en <u>Blastocrithidia culicis</u>	118
4.DISCUSION Y CONCLUSIONES	123
4.1.Derivados de dolicol en tripanosomátidos	123
4.2.N-glicosilación de proteínas en tripanosomátidos	128
4.3.Procesamiento de glicoproteínas en tripanosomátidos	129
4.3.1.Glicosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteína ...	129
4.3.2.Demanosilación de oligosacáridos unidos a proteína	131
4.3.3.Galactofuranosa en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas	135
4.3.4.Otras reacciones de procesamiento	137
4.3.4.1.Elongación de oligosacáridos sensibles a Endo-H	137
4.3.4.2.Incorporación de otros sustituyentes	138
4.3.5.Secuencias de procesamiento de glicoproteínas en tripanosomátidos	139
4.3.6.Consideraciones finales	139
REFERENCIAS	142

RESUMEN

La N-glicosilación de proteínas en la mayoría de las células eucarióticas ocurre por transferencia co-traduccional de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, de dolicol difosfato a un residuo de asparagina en el péptido. Después de la transferencia, los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas sufren una serie de reacciones de procesamiento, consistentes en la remoción de los residuos de glucosa y algunos residuos de manosa, y la adición de otros residuos de azúcar, tales como ácido siálico, N-acetilglucosamina, galactosa y fucosa, y de otros sustituyentes, como fosfato o sulfato.

Se ha demostrado que en los casos de los tripanosomátidos Crithidia fasciculata, Trypanosoma cruzi y Leishmania mexicana, el oligosacárido transferido de dolicol difosfato a proteína no contiene residuos de glucosa, y su composición es $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en el caso de C. fasciculata, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ en el caso de L. mexicana y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en el caso de T. cruzi. Células de T. cruzi incubadas "in vivo" con (^{14}C)glucosa sintetizan dolicol monofosfato (^{14}C)manosa pero no dolicol monofosfato (^{14}C)glucosa. Estos fueron los primeros casos en que se observó la transferencia de dolicol difosfato a proteínas de oligosacáridos carentes de glucosa. Con el objeto de ampliar y generalizar estas observaciones, se estudió el mecanismo de N-glicosilación de proteínas y procesamiento de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas en los siguientes organismos de la familia Trypanosomatidae: Blastocrithidia culicis, Crithidia fasciculata, Crithidia hamosa, Herpetomonas muscarum, Herpetomonas samuelpessoai, Leishmania adleri, Leptomonas samueli, Trypanosoma conorhini y Trypanosoma dionisi. Los

resultados obtenidos se resumen a continuación.

- Después de incubar células "in vivo" con (U-¹⁴C)glucosa, ninguno de los tripanosomátidos mencionados sintetizó oligosacáridos unidos a dolicol difosfato que contuvieran glucosa. En el caso de C. fasciculata, la adición de concentraciones elevadas de glucosa o de inhibidores de la síntesis proteica no modificó este resultado.

- Células de C. fasciculata, T. dionisii y L. samueli sintetizaron dolicol monofosfato (¹⁴C)manosa pero no dolicol monofosfato (¹⁴C)glucosa, luego de ser incubadas en presencia de (U-¹⁴C)glucosa. En cambio, en idénticas condiciones, células de L. adleri y H. muscarum produjeron dolicol monofosfato (¹⁴C)manosa y dolicol monofosfato (¹⁴C)glucosa.

- El dolicol de C. fasciculata es un poliisoprenol que contiene sólo 11 unidades de isopreno, en base a su comportamiento cromatográfico en columnas de exclusión en presencia de deoxicolato de sodio. El reducido tamaño del lípido concuerda con la tendencia al acortamiento de la cadena isoprenoide del dolicol a medida que se desciende en la escala evolutiva.

- El oligosacárido unido a dolicol difosfato de mayor tamaño que se sintetiza "in vivo" es el mismo para un mismo género. La composición de dicho oligosacárido es Man₆GlcNAc₂ para Blastocrithidia y Leishmania, Man₇GlcNAc₂ para Crithidia y Man₉GlcNAc₂ para Trypanosoma, Leptomonas y Herpetomonas.

- La estructura de los oligosacáridos unidos a dolicol difosfato es idéntica a la estructura de los oligosacáridos unidos a dolicol difosfato de igual composición de células animales, los cuales son intermediarios en la síntesis del oligosacárido final (Glc₃Man₉GlcNAc₂).

- Los oligosacáridos unidos a dolicol difosfato mencionados más arriba fueron

transferidos a proteínas en todos los casos, ya que su presencia pudo ser detectada en la población de oligosacáridos radioactivos que fueron liberados de glicoproteínas por tratamiento secuencial con proteasa y endo- β -N-acetilglucosaminidasa H.

- Se describen varias reacciones de procesamiento de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas en estos organismos. La demanosilación de oligosacáridos sensibles a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H se observó en todos los casos, si bien el número de residuos de manosa que podían perderse varió según el organismo (T. conorhini y T. dionisii perdieron hasta 4 residuos de manosa, L. samueli hasta tres, C. harmosa hasta dos y C. fasciculata, B. culicis, L. adleri y H. samuelpessoai sólo uno).

- En todos los organismos se detectó la presencia de oligosacáridos sensibles a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H glucosilados. Los residuos de glucosa se incorporaron a los oligosacáridos después de la transferencia de éstos a la proteína. En los casos de C. fasciculata, C. harmosa, T. dionisii, T. conorhini, B. culicis y L. adleri, se demostró que los residuos de glucosa son posteriormente retirados de los oligosacáridos, ya que no se detectaron compuestos glucosilados radioactivos luego de realizar un "chase" prolongado con azúcar no radioactivo.

- Se detectó también la presencia de oligosacáridos sensibles a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H que contenían galactosa en C. fasciculata, C. harmosa, L. samueli y H. samuelpessoai. Los residuos de galactosa se encontraban en configuración furanósica, lo cual fue demostrado por su sensibilidad a la hidrólisis ácida, oxidación con NaIO₄ e hidrólisis enzimática con β -galactofuranosidasa.

- En los casos de L. samueli y H. samuelpeessoai, los oligosacáridos transferidos a proteínas fueron elongados por adición de residuos de azúcar, para dar compuestos de mayor peso molecular.

- Por último, se detectó en C. fasciculata, C. harmosa y B. culicis la existencia en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas, de otros sustituyentes, los cuales no fueron caracterizados. En los casos de C. fasciculata y C. harmosa, dichos sustituyentes confirieron resistencia a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H a los oligosacáridos.

En base a todos los resultados mencionados, se propone una secuencia de N-glicosilación de proteínas y procesamiento de glicoproteínas para varios de los tripanosomátidos estudiados en esta tesis. Asimismo, se discute la posibilidad de que los tripanosomátidos configuren una familia de "mutantes naturales" en la N-glicosilación de proteínas.

Parte de los resultados presentados en esta tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

"N-linked, high mannose-type oligosaccharides in the protozoa Crithidia fasciculata and Crithidia harmosa contain galactofuranose residues". D.H. Mendelzon & A.J. Parodi (1986) The Journal of Biological Chemistry, 261, 2129-2133.

"Characterization of dolichol monophosphate- and dolichol diphosphate-linked saccharides in trypanosomatid flagellates". J.O. Previato, D.H. Mendelzon & A.J. Parodi (1986) Molecular and Biochemical Parasitology, 18, en prensa.

"Characterization of protein-linked oligosaccharides in trypanosomatid flagellates". D.H. Mendelzon, J.O. Previato & A.J. Parodi (1986) Molecular

and Biochemical Parasitology, 18, en prensa.

1. INTRODUCCION

1.1. GLICOPROTEINAS

1.1.1. Generalidades, clasificación y estructura

La definición de glicoproteína corrientemente aceptada es debida a Gottschalk (1). Según la misma, las glicoproteínas son proteínas conjugadas conteniendo como grupo prostético uno o más heterosacáridos, generalmente ramificados, con un número de residuos de azúcar relativamente pequeño, carentes de una unidad repetitiva y unidos covalentemente a la cadena polipeptídica. Esta definición establece una clara distinción entre las glicoproteínas y los demás compuestos conteniendo una unión covalente azúcar-aminoácido, denominados genéricamente proteoglicanos. Estos últimos se caracterizan, contrariamente a las glicoproteínas, por poseer una unidad repetitiva en la porción sacarídica, un número relativamente alto de residuos de azúcar por molécula y la carencia (generalmente) de ramificación.

La clasificación de las glicoproteínas se realiza en base a la naturaleza de la unión azúcar-aminoácido. En base a este criterio, las glicoproteínas se dividen en dos grandes grupos: O-glicosídicas y N-glicosídicas.

Las glicoproteínas O-glicosídicas pueden a su vez, dividirse en tres subgrupos, de acuerdo con el aminoácido involucrado en la unión (Fig. 1): el primer grupo está formado por aquellas que involucran al -OH de un residuo serina o treonina, llamadas glicoproteínas de tipo mucina (2). El azúcar involucrado en la unión puede ser N-acetilgalactosamina o xilosa en células animales. Se han detectado en levaduras y otros hongos, glicoproteínas de

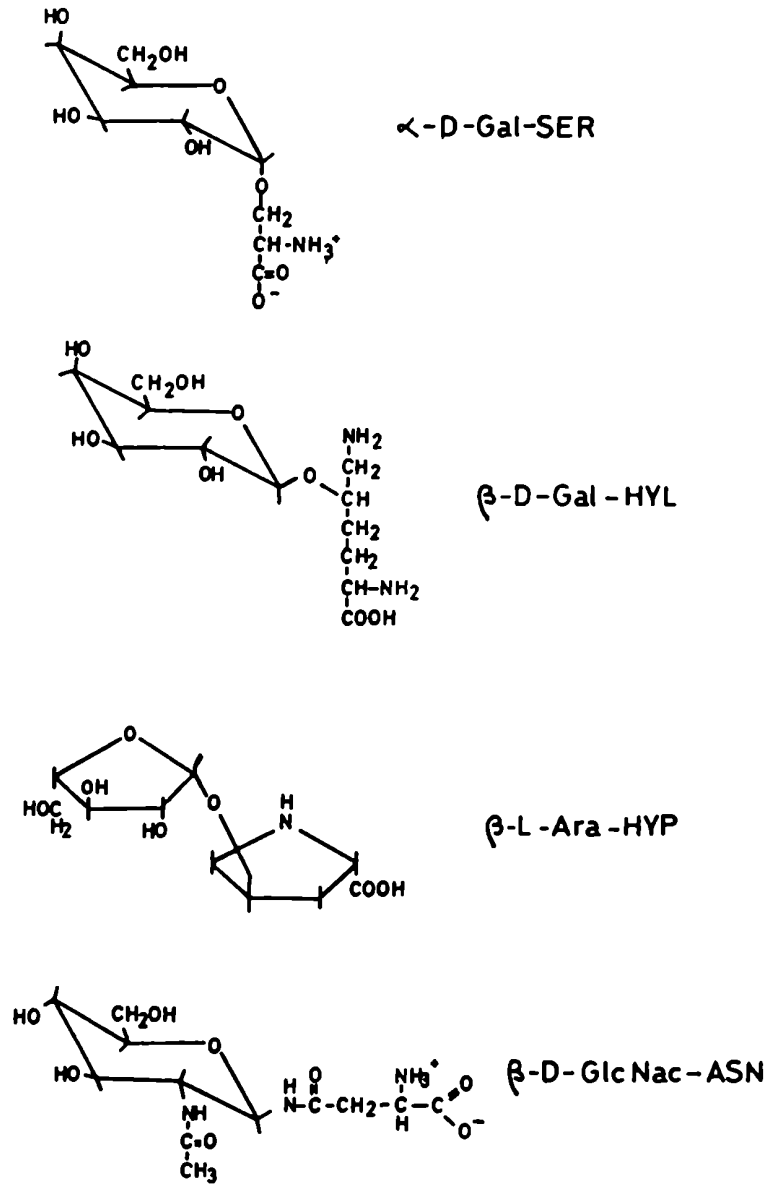


Figura 1. Uniones azúcar-aminoácido características de las glicoproteínas.

este tipo en las cuales el azúcar involucrado en la unión a la proteína es manosa o galactosa (3).

El segundo grupo de glicoproteínas O-glicosídicas está formado por los colágenos de las membranas basales de organismos animales. En estas sustancias la unión azúcar-aminoácido está formada entre un residuo de galactosa y el grupo -OH de un residuo de hidroxilisina en el péptido (3) (Fig. 1).

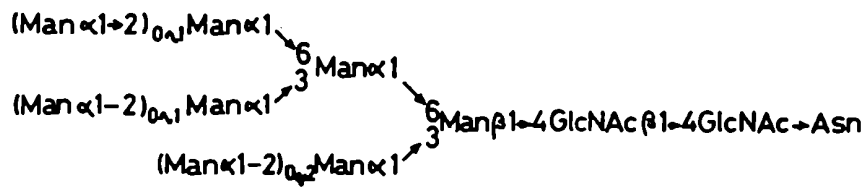
Por último, la pared celular de células vegetales contiene glicoproteínas denominadas extensinas, en las cuales la unión azúcar-aminoácido está formada por un residuo de arabinosa unido O-glicosídicamente a un residuo de hidroxiprolina (3) (Fig. 1).

La unión azúcar-aminoácido característica de las glicoproteínas N-glicosídicas está formada por un residuo de N-acetilglucosamina unido N-glicosídicamente al grupo -NH₂ de la cadena lateral de un residuo de asparagina (Fig. 1). Estas glicoproteínas se subdividen a su vez, de acuerdo con la estructura de la cadena oligosacáridica unida a la proteína, en tres grupos (2) (Fig. 2):

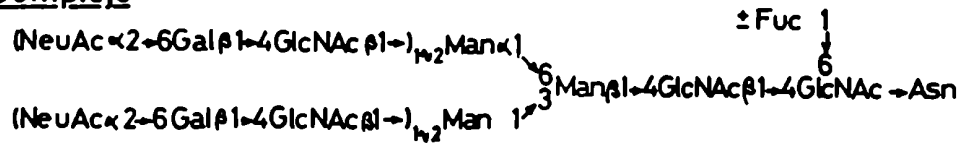
a) Glicoproteínas de "alta manosa". Son aquellas que contienen solamente manosa y N-acetilglucosamina. Los oligosacáridos de estas glicoproteínas poseen un "núcleo" heptasacáridico común; la variabilidad está dada por el número y posición de residuos de manosa en unión $\alpha 1 \rightarrow 2$ unidos a los residuos de manosa de los extremos no reductores del "núcleo".

b) Glicoproteínas complejas. Los oligosacáridos de estas glicoproteínas contienen un núcleo pentasacáridico, y la variación estructural viene dada por el número de cadenas externas unidas a los residuos de manosa de los extremos no reductores. Frecuentemente, en células animales las cadenas externas están

Alta manosa



Complejo



Híbrido

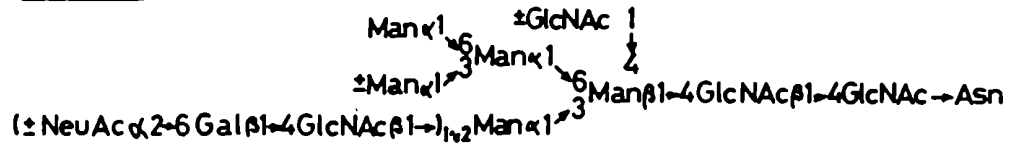


Figura 2. Glicoproteínas N-glicosídicas. Los residuos señalados con \pm pueden estar ausentes.

formadas por el trisacárido NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc, aunque se ha registrado considerable variabilidad estructural (2). Por otra parte, es frecuente encontrar un residuo α -fucosilo unido al C-6 del residuo de N-acetilglucosamina proximal (Fig. 2).

c)Glicoproteínas híbridas. Como su nombre lo indica, los oligosacáridos de estas glicoproteínas presentan rasgos estructurales característicos de los dos grupos antes descritos (Fig. 2).

La notable conservación estructural de los "núcleos" de los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas en los tres grupos descritos, sugiere que todos ellos son sintetizados a través de una ruta metabólica común. Este mecanismo se describirá en detalle en la próxima sección.

1.1.2.Glicosilación de proteínas

La biosíntesis de oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a residuos de serina o treonina, ocurre por glicosilación secuencial, de modo que el producto de la reacción catalizada por una glicosil transferasa es el sustrato aceptor para la siguiente glicosiltransferasa (4). La primera reacción consiste en la transferencia de un residuo de N-acetilgalactosamina a partir de UDP-N-acetilgalactosamina, al grupo -OH de un residuo serina o treonina en la cadena polipeptídica.

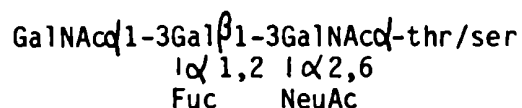


La elongación del oligosacárido se producirá por adición secuencial de residuos de azúcar, a partir de los nucleótido-azúcares correspondientes, a la glicoproteína.

La estructura final del oligosacárido está determinada por varios factores. En primer lugar, es evidente que la misma se encuentra bajo control genético a nivel de la expresión del número y tipo de glicosil transferasas que serán producidas en una célula determinada. Un ejemplo bien documentado de esto lo constituye la base genética de los grupos sanguíneos A, B y O, los cuales están determinados por la estructura de los carbohidratos presentes en glicoproteínas y glicolípidos de la superficie del eritrocito (4, 5).

Otro factor que influye sobre la estructura final del oligosacárido unido O-glicosídicamente a proteínas es la proporción relativa de las diferentes glicosil transferasas presentes en la célula. Al llegar a un punto de ramificación en la secuencia biosintética del oligosacárido, la ruta metabólica seguida preferencialmente dependerá de la cantidad relativa de las glicosil transferasas involucradas en dicho punto. Un interesante ejemplo de este fenómeno ha sido informado por Schachter y col. (6), al estudiar las diferencias estructurales entre los oligosacáridos de las mucinas submaxilares ovina y porcina.

En el caso de la mucina submaxilar ovina, el 95% de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a la proteína tiene la estructura NeuAc α 2 \rightarrow 6GalNac-ser/thr, mientras que la correspondiente glicoproteína porcina contiene oligosacáridos más complejos, con la siguiente estructura:

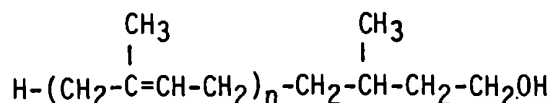


La diferencia en las estructuras de los oligosacáridos de las dos mucinas se debe a la siguiente razón: la transferencia de ácido siálico al residuo de N-acetilgalactosamina más interno impide la transferencia de galactosa

al mismo residuo (2). En glándula submaxilar ovina, la relación sialil transferasa/galactosil transferasa es 10-30 veces mayor que en la glándula porcina. Por ello, la mayoría de los residuos de N-acetilgalactosamina unidos O-glicosídicamente a la proteína recibirá antes un residuo de ácido siálico, impidiendo de este modo la elongación del oligosacárido.

Por último, la disponibilidad de sustratos dadores de azúcar y la accesibilidad de las enzimas a los sitios de glicosilación también pueden ser de importancia en la determinación de la estructura final de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a proteínas (4,5).

La glicosilación de proteínas del tipo N-glicosídico ocurre por un mecanismo totalmente diferente. Un gran cúmulo de evidencias experimentales (7-9) ha demostrado la intervención de un intermediario lipídico, el dolicol (Dol) unido a restos de azúcar mediante puentes de fosfato o pirofosfato, en la glicosilación de residuos de asparagina. La estructura del dolicol es la siguiente:



El número de unidades de isopreno varía entre 16 y 24 según la especie (9). La α -saturación es una característica invariable de los poliprenoles de células eucarióticas, lo cual los diferencia del compuesto análogo bacteriano, el undecaprenol, que tiene 11 unidades de isopreno y es α -insaturado (las halobacterias constituyen una excepción, ya que en estos organismos se ha demostrado la existencia de un poliisoprenol α -saturado es decir un

dolicol).

El dolicol no interviene en la glicosilación de proteínas como tal, sino a través de sus derivados fosforilados, dolicol monofosfato (Dol-P) y dolicol difosfato (Dol-P-P). La vía metabólica para la N-glicosilación de proteínas, denominada "ciclo del dolicol", se esquematiza en la Fig. 3 y será descripta a continuación.

El primer paso consiste en la adición de un resto de GlcNAc-P a partir de UDP-GlcNAc, al Dol-P.



Esta reacción es inhibida por la tunicamicina, un antibiótico muy utilizado como inhibidor de la N-glicosilación de proteínas (10). A continuación, se produce la adición de un residuo de N-acetilglucosamina y un residuo de manosa, a partir de los nucleótido-azúcares correspondientes, UDP-GlcNAc y GDP-Man (10) (Fig. 3). Ambos residuos se encuentran en configuración anomérica β . La síntesis continúa con la adición de otros cuatro residuos de manosa, en configuración α , a partir de GDP-Man, para dar origen a un compuesto de composición $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Seguidamente, se adicionan otros cuatro residuos más de manosa, pero en este caso el dador de manosa es Dol-P-Man, formado a través de la reacción:



Por último, el oligosacárido resultante, de fórmula $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ recibe tres residuos de glucosa. Nuevamente en este caso, el dador de glucosa

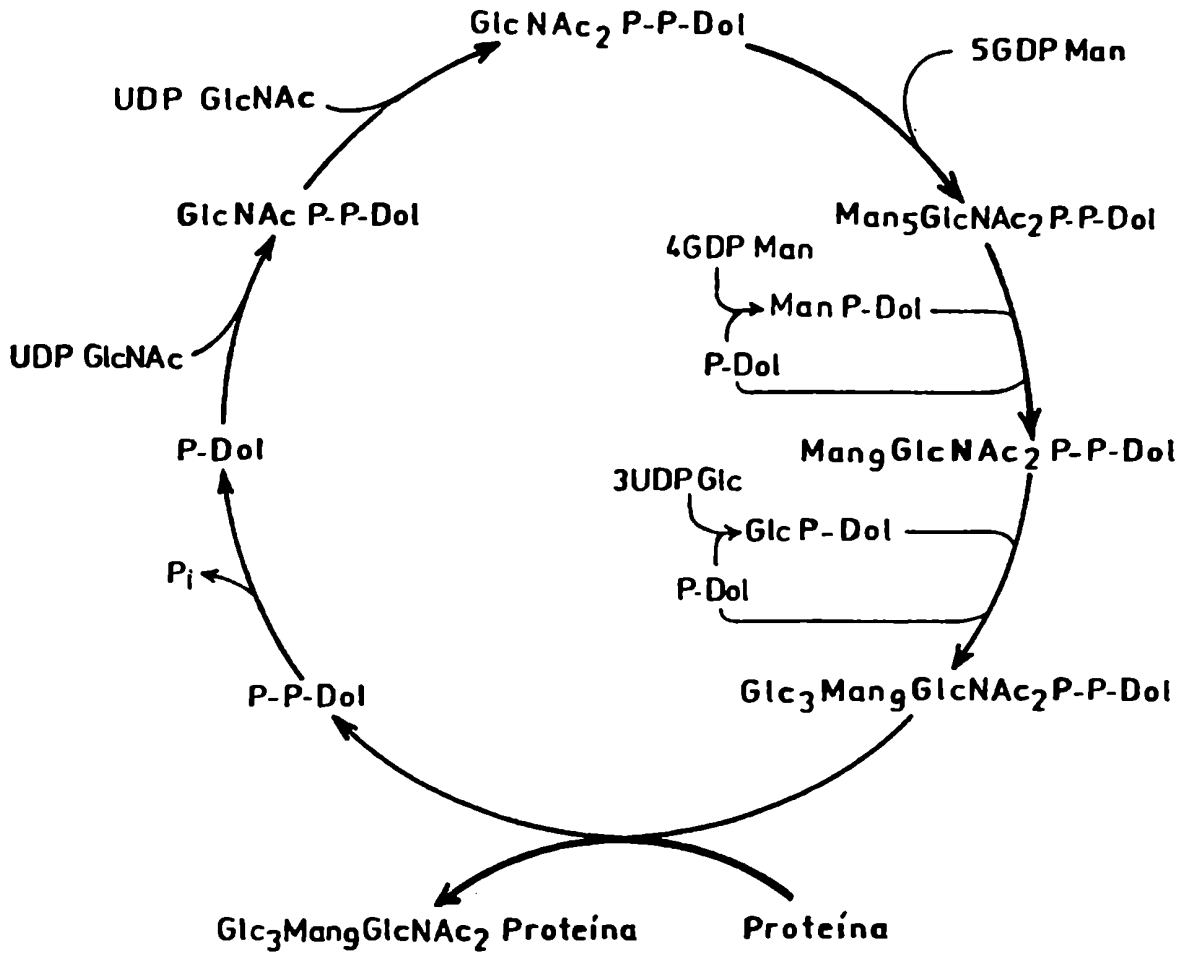


Figura 3. El ciclo del dolicol.

no es el nucleótido azúcar sino Dol-P-Glc (11), formado a partir de UDP-Glc según la reacción:



Se tiene entonces un compuesto de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2\text{-P-P-Dol}$. La estructura de este compuesto ha sido totalmente elucidada (12) y se presenta en la Fig. 4.

Los residuos de azúcar son adicionados al oligosacárido creciente en forma ordenada. Esta afirmación se basa en el hecho de que las estructuras de oligosacáridos unidos a Dol-P-P de tamaños menores que el del oligosacárido final ($\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAC}_2$, etc.) son únicas (13), y no se han detectado cantidades significativas de las demás estructuras posibles si la adición de azúcares fuera al azar. En base a estos resultados se ha propuesto la secuencia de biosíntesis que se muestra en la Fig. 5.

La intervención de Dol-P-Man en la adición de los últimos cuatro residuos de manosa ha sido demostrada de manera definitiva por Chapman y col. (14), quienes informaron que en una línea mutante de células de linfoma incapaz de sintetizar Dol-P-Man, el oligosacárido no glucosilado de mayor tamaño unido a Dol-P-P que se sintetiza "in vivo" es $\text{Man}_5\text{GlcNAC}_2$, con la estructura que se muestra en la Fig. 5. La incubación de preparaciones de membranas de estas células con Dol-P-(^3H)Man dio lugar a la formación de lípido-oligosacáridos radioactivos desde $\text{Man}_6\text{GlcNAC}_2\text{-P-P-Dol}$ hasta $\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2\text{-P-P-Dol}$.

Como se ve en la Fig. 5, la rama que habrá de recibir los tres residuos de glucosa se encuentra ya completa en el oligosacárido de composición

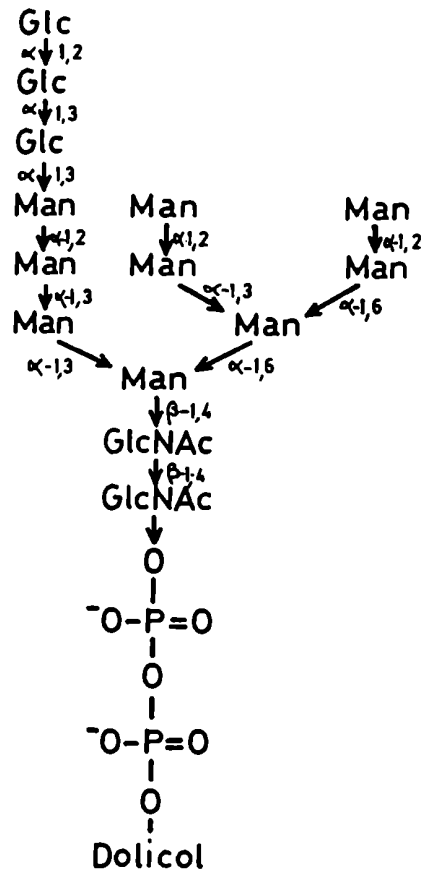


Figura 4. Estructura del oligosacárido transferido de Dol-P-P a proteína.

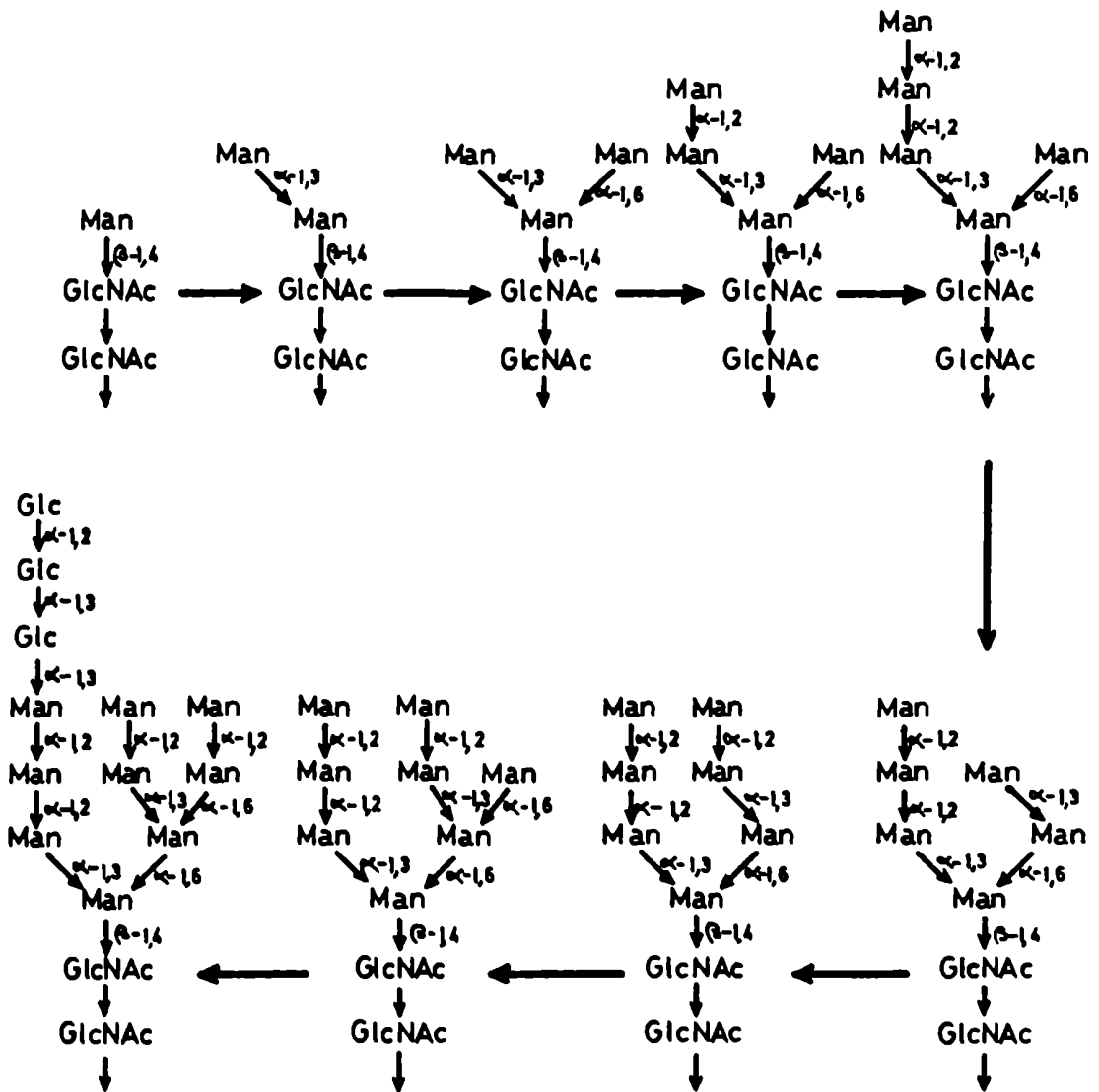


Figura 5. Secuencia de ensamblado del oligosacárido unido a Dol-P-P.

$\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Sin embargo, las evidencias experimentales indican que el sustrato preferido para la transferencia de glucosa es $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Oligosacáridos glucosilados de menor tamaño se han detectado sólo en muy pequeña cantidad (8).

Una vez completada la síntesis, el oligosacárido es transferido del Dol-P-P a un residuo de asparagina en una proteína (2). Por último, la remoción de un grupo fosfato del Dol-P-P regenera el Dol-P y cierra el ciclo (15) (Fig. 3). Todas las reacciones del ciclo ocurren en el retículo endoplásmico rugoso (2). Se ha demostrado en muchos casos (8) que la transferencia del oligosacárido a la proteína ocurre simultáneamente con la traducción, antes de que la síntesis de la cadena polipeptídica haya finalizado.

La presencia del ciclo del dolicol se ha detectado en una impresionante cantidad de sistemas eucarióticos (9); hoy en día es considerado una característica universal de este tipo de células. Más aún, el oligosacárido que es transferido de Dol-P-P parece tener siempre la misma estructura (9). Si bien se han descrito casos (tales como las mutantes de linfoma descritas más arriba, o ciertas líneas celulares en condiciones de ayuno energético) en los cuales el oligosacárido transferido a proteínas tiene un contenido menor de manosa (16-19), la presencia de los tres residuos de glucosa ha sido considerada durante mucho tiempo como un requisito imprescindible para la transferencia eficiente a proteínas. Como se verá más adelante, los tripanosomátidos constituyen una notable excepción a esta regla.

1.1.3. Procesamiento de glicoproteínas

Inmediatamente después de ser transferidos de Dol-P-P a la proteína aceptora, los oligosacáridos comienzan a sufrir una serie de modificaciones que habrán de conducir finalmente a la gran diversidad estructural de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas. Estas reacciones se denominan genéricamente "procesamiento" y serán descritas en el orden cronológico en que ocurren en la célula. En la Fig. 6 se presenta un esquema ilustrativo de las reacciones de procesamiento más importantes que ocurren en células animales.

La primera etapa del procesamiento consiste en la remoción de los tres residuos de glucosa del oligosacárido precursor (8) (etapa 2, Fig. 6). Dos enzimas participan de esta reacción (20-23). La primera, denominada glucosidasa I, remueve sólo el residuo de glucosa terminal. La segunda actividad (glucosidasa II), es inactiva con $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, pero actúa sobre $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ para dar $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Ambas glucosidasas son proteínas de membrana que están localizadas en la superficie luminal de los retículos endoplásmicos liso y rugoso (20).

El paso siguiente en el procesamiento es la remoción de los residuos de manosa que se encuentran unidos por uniones $\alpha 1 \rightarrow 2$ (etapa 3a, Fig. 6). El número de residuos de manosa hidrolizados puede variar entre 0 y 4, dependiendo de la glicoproteína (8). Las α -manosidasas responsables de esta etapa del procesamiento se encuentran en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi (24, 25). Contrariamente a lo observado durante la síntesis, el orden de remoción de los residuos de manosa no es único, sino que puede

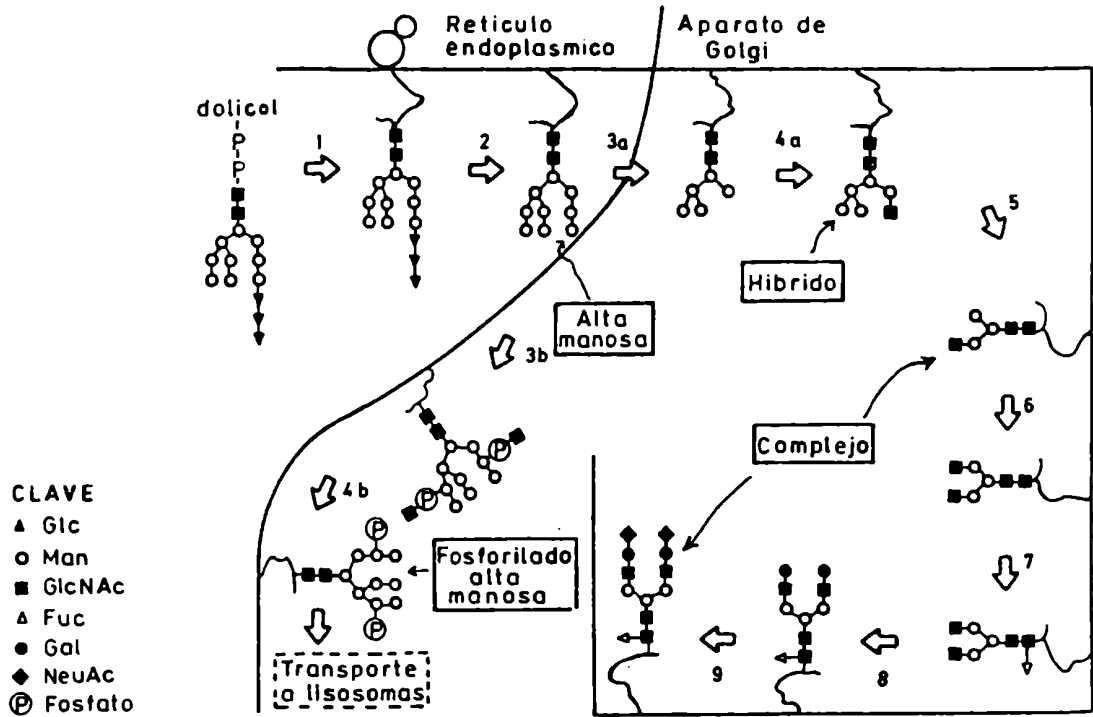


Figura 6. Procesamiento de glicoproteínas.

mostrar cierta variación, dependiendo de la glicoproteína y de la célula involucrada.

Puede observarse en la Fig. 7 que la remoción de residuos de manosa no se realiza necesariamente en el orden inverso al de su adición; en otras palabras, la estructura de los oligosacáridos unidos a proteína conteniendo menos de nueve residuos de manosa puede ser diferente de la de los respectivos compuestos unidos a Dol-P-P.

El procesamiento descrito hasta aquí habrá de dar como producto glicoproteínas conteniendo oligosacáridos de "alta manosa". La continuación del procesamiento requiere obligatoriamente la adición de un residuo de N-acetilglucosamina al residuo de manosa expuesto del "núcleo" (etapa 4a, Fig. 6) (2,8). Seguidamente una manosidasa (manosidasa II), distinta de las que hidrolizan los residuos de manosa en unión $\alpha 1 \rightarrow 2$, retira los dos últimos residuos de manosa que no pertenecen al "núcleo" (etapa 5, Fig. 6) (27, 28). La adición posterior de residuos de N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y fucosa, a partir de sus nucleótido-azúcares correspondientes, dará origen a los oligosacáridos "complejos", tal como se muestra esquemáticamente en las etapas 6 a 9 de la Fig. 6 (2).

En caso de no ser hidrolizados los dos últimos residuos de manosa, los oligosacáridos resultantes serán del tipo "híbrido" (ver Fig. 6). Se cree que la adición de un residuo de N-acetilglucosamina al residuo de manosa más interno (ver Fig. 2) bloquea la acción de la manosidasa, estabilizando de esta manera las estructuras "híbridas" (28). La manosidasa II y la N-acetilglucosaminil transferasa se encuentran en la parte "cis" del aparato de Golgi (o sea, la parte más cercana al núcleo celular), mientras que la galac-

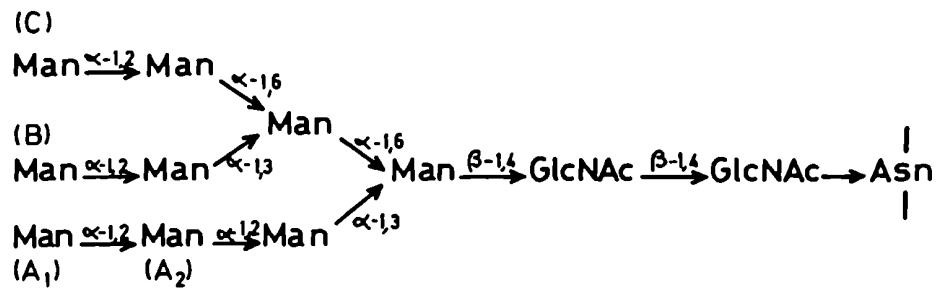


Figura 7. Secuencia de remoción de residuos de manosa. El orden de hidrólisis más frecuente es BA₁CA₂ y, menos frecuentemente, A₁CA₂B (8).

tosil transferasa y sialil transferasa están localizadas en la parte "trans" del mismo aparato, más cercana a la membrana plasmática.

Una interesante ramificación del camino principal de procesamiento es la formación de oligosacáridos fosforilados en enzimas lisosomales exclusivamente. El primer paso consiste en la transferencia de un residuo de GlcNAc-P, a partir de UDP-GlcNAc, a un oligosacárido de "alta manosa" (etapa 3b, Fig. 6). Seguidamente, el residuo de N-acetilglucosamina es retirado por acción de una N-acetilglucosaminil fosfodiesterasa (etapa 4b, Fig. 6), de modo de exponer uno o más residuos de Man-6-P (29-32). Tanto la N-acetilglucosaminil fosfotransferasa como la N-acetilglucosaminil fosfodiesterasa parecen estar localizadas en el aparato de Golgi (31,32). La Man-6-P es un marcador específico para el reconocimiento de enzimas lisosomales y su transporte a lisosomas (29,33). En la membrana del aparato de Golgi existen receptores específicos para Man-6-P que se unen a las glicoproteínas que contienen estos residuos. Se forman entonces vesículas que se funden con la membrana lisosomal. Los complejos enzima lisosomal-receptor se disocian entonces, liberando a la enzima lisosomal al interior del lisosoma (33).

Otro caso curioso de reacción de procesamiento lo constituye la glucosilación transitoria de oligosacáridos de "alta manosa". Esta reacción consiste en la transferencia de un residuo de glucosa a partir de UDP-Glc, a un oligosacárido de "alta manosa". Dicho residuo será posteriormente hidrolizado. Esta reacción, descrita originalmente en Trypanosoma cruzi (34), ha sido también observada en células de animales y vegetales superiores (35,36), ocurre en el retículo endoplásmico rugoso y se esquematiza en la Fig. 8. La función de esta reacción de procesamiento es desconocida.

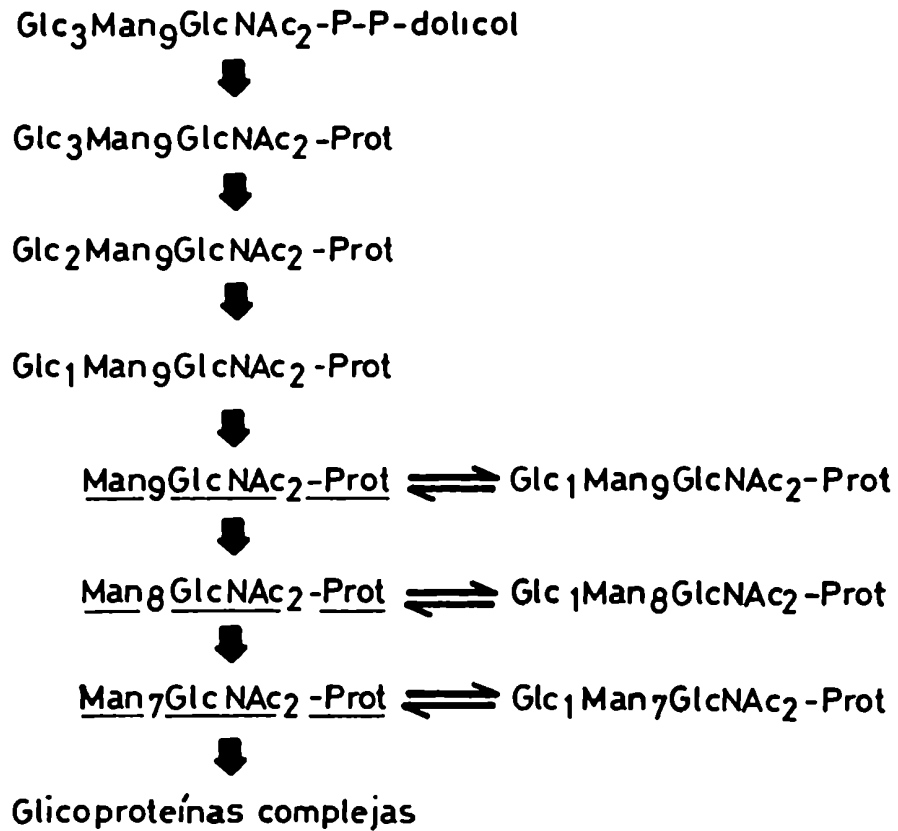


Figura 8. Glucosilación transitoria de glicoproteínas.

1.1.4. Glicosilación de proteínas en eucariotes inferiores

Como se mencionó anteriormente, la presencia del ciclo del dolicol ha sido demostrada en numerosos sistemas eucarióticos superiores, incluyendo mamíferos, insectos y plantas (9). La presencia de todas o algunas de las reacciones del ciclo ha sido detectada también en varios organismos eucarióticos inferiores, entre ellos los hongos Aspergillus niger (37) y Neurospora crassa (38), los protozoarios Tetrahymena pyriformis (39) y Euglena gracilis (40), el hongo mucilaginoso Dictyostelium discoideum (41) y el hongo dimórfico Mucor rouxii (42).

La levadura Saccharomyces cerevisiae es sin duda el eucariote inferior que ha sido más estudiado en este aspecto (43). Así, se ha detectado en este organismo la formación de Dol-P-P-GlcNAc (44), Dol-P-Man (45) y Dol-P-Glc (46), así como de Dol-P-P-oligosacáridos a partir de los mismos (47-49). Se ha demostrado también la transferencia de Dol-P-P a proteína de un oligosacárido (50). La composición de dicho oligosacárido es, al igual que en células animales, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Otra observación interesante ha sido la demostración del rol de Dol-P-Man como dador de manosa para la glicosilación de residuos de serina y treonina, los cuales son posteriormente elongados por adición de residuos de manosa a partir de GDP-Man (51,52).

Si bien el ciclo del dolicol presenta en eucariotes inferiores las mismas características que en eucariotes superiores, se han descrito reacciones de procesamiento de oligosacáridos unidos a proteína que son exclusivas de eucariotes inferiores. Por ejemplo, en S. cerevisiae, después de ser transferido a proteína, el oligosacárido sufre la pérdida de los tres resi-

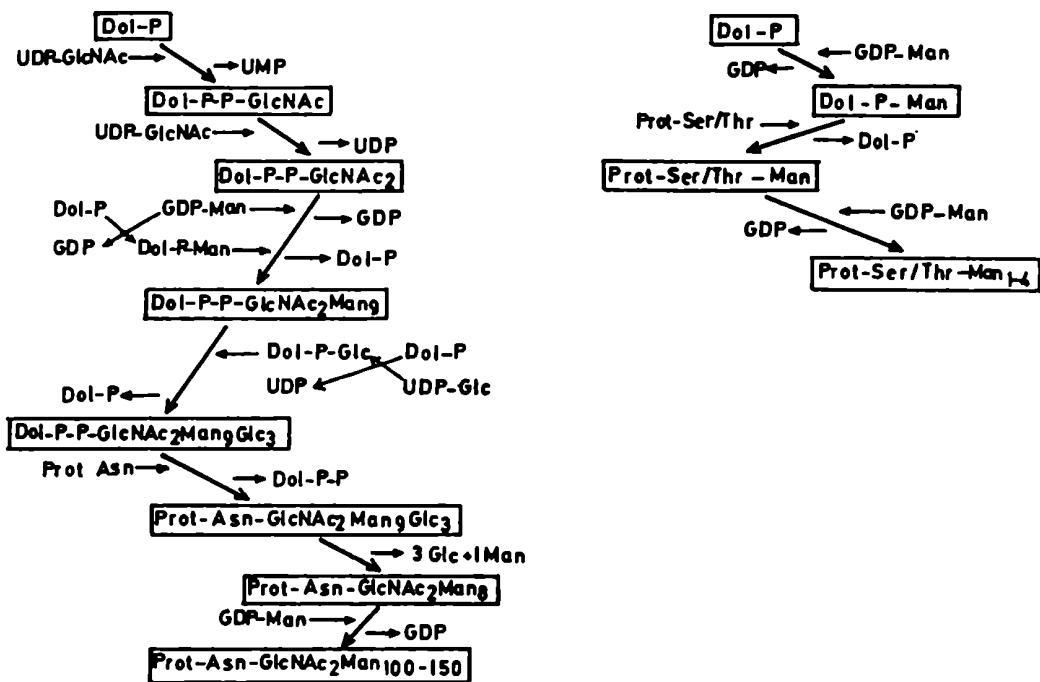


Figura 9. Glucosilación y procesamiento de glicoproteínas en *Saccharomyces cerevisiae*.

duos de glucosa y uno de manosa, para ser luego elongado por adición de un gran número de residuos de manosa (53), y dar origen al manano, uno de los polisacáridos constituyentes de la pared celular. El camino completo para la síntesis de manano en S. cerevisiae se presenta en la Fig. 9.

Otros ejemplos de reacciones de procesamiento descritas exclusivamente para eucariotes inferiores son la 3-O-metilación de residuos de manosa, descrita en glicoproteínas del hongo dimórfico Mucor rouxii (54), y la introducción de grupos metil fosfato en residuos de manosa, en el hongo mucilaginoso Dictyostelium discoideum (55).

1.1.5. Funciones de la porción sacarídica de las glicoproteínas

El enfoque experimental más adecuado para el estudio del rol fisiológico de la porción sacarídica de las glicoproteínas consiste, obviamente, en modificar en condiciones controlables y reproducibles, la composición o estructura de los oligosacáridos unidos a la proteína, para luego observar qué propiedades varían en la glicoproteína así modificada. En ese sentido, las técnicas más utilizadas han sido las siguientes (56):

- a) Inhibición total de la glicosilación de proteínas, mediante el empleo de inhibidores del ciclo del dolicol (ej.: tunicamicina).
- b) Destrucción o modificación de la porción sacarídica de la glicoproteína por acción de glicosidasas o NaIO_4 .
- c) Utilización de inhibidores del procesamiento para modificar la estructura de los oligosacáridos unidos a proteínas.
- d) Aislamiento de mutantes celulares con alteraciones en el mecanismo de glicosilación o procesamiento de glicoproteínas. En estrecha relación con este

último punto puede incluirse el estudio de las enfermedades congénitas producidas por trastornos en el metabolismo de glicoproteínas.

La masa de bibliografía acumulada en relación con este tema es inmensa, y será imposible citarla aquí, siquiera someramente. Por lo tanto, nos limitaremos a brindar un esquema resumido y compacto de los conocimientos que se tienen actualmente, mencionando algunos ejemplos ilustrativos, y haciendo referencia a los artículos de revisión publicados más recientemente (2,56-59).

La información disponible permite asignar a los oligosacáridos de las glicoproteínas las funciones siguientes:

a) Modulación de propiedades fisicoquímicas. La glicosilación representa un cambio significativo en el tamaño, carga e hidrofobicidad de una proteína y por lo tanto puede influir sobre propiedades tales como solubilidad, viscosidad y estructura terciaria (conformación).

Son muchos los ejemplos de este fenómeno (56): la invertasa de levadura deglicosilada es mucho más sensible a la desnaturalización por calor o pH que la enzima glicosilada; la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular puede ser solubilizada en buffers conteniendo detergentes, mientras que la proteína G no glicosilada es insoluble en estas condiciones; anticuerpos sintetizados contra proteínas no glicosiladas de la envoltura del virus Semliki Forest no reaccionan con las mismas proteínas glicosiladas, indicando que la glicosilación induce un cambio conformacional en la proteína.

b) Estabilización contra proteólisis. La idea de que el carbohidrato protege a la proteína contra la degradación proteolítica está apoyada por numerosas evidencias experimentales (56,58): la remoción enzimática de los oligo-

sacáridos de una variedad de glicoproteínas tales como deoxirribonucleasa, ribonucleasa B, invertasa, carboxipeptidasa Y, etc., aumenta su sensibilidad a proteasas; la fibronectina producida en cultivos de fibroblastos tratados con tunicamicina se degrada mucho más rápidamente que en cultivos control; la degradación proteolítica de la mucina submaxilar por enzimas lisosomales, ocurre sólo después de que la mayor parte de sus oligosacáridos han sido degradados.

Muchas proteínas son sintetizadas en forma de precursores de mayor peso molecular, que son procesados proteolíticamente para dar el producto maduro. Existen evidencias de que los oligosacáridos de algunas glicoproteínas son necesarios para un correcto procesamiento proteolítico, evitando una degradación excesiva, tal como se ha demostrado en el caso de la hemaglutinina del virus de influenza.

c) Secreción y transporte intracelular (56,58). La glicosilación no es generalmente necesaria para la secreción de una proteína. Sin embargo se han descrito algunas excepciones, tales como la inhibición de la secreción de invertasa en células de levadura tratadas con tunicamicina.

La estructura del oligosacárido parece tener influencia en el transporte intracelular de las glicoproteínas hasta el sitio subcelular donde habrán de desempeñar su función; si bien los mecanismos de transporte no están aún aclarados del todo, el caso de los receptores de Man-6-P para el reconocimiento de enzimas lisosomales (ver sección 1.1.3.) es un interesante ejemplo de este fenómeno.

Las evidencias experimentales disponibles (56) parecen indicar que el oligosacárido no es necesario para el correcto desempeño de la actividad

biológica de una glicoproteína. Así, la inhibición de la glicosilación no tiene efecto sobre la capacidad de la fibronectina de promover adhesión celular, ni sobre la actividad antiviral del interferón, ni sobre la unión de la gonadotrofina coriónica humana a su receptor, ni sobre la actividad enzimática de invertasa, deoxirribonucleasa, ribonucleasa o carboxipeptidasa Y.

1.2. TRIPANOSOMATIDOS

1.2.1. Generalidades, taxonomía y biología

Los tripanosomátidos son protozoarios flagelados cuyas características comunes son la posesión de un solo flagelo libre o unido al cuerpo celular a través de una membrana ondulante, y la presencia de una prominente organela subcelular ubicada en la base del flagelo, conectada a la mitocondria y que contiene DNA en cantidades que exceden largamente las encontradas normalmente en las mitocondrias de otras células. Esta estructura se denomina kineoplasto, y todos los protozoarios flagelados que los contienen se clasifican dentro de un mismo orden taxonómico, el orden Kinetoplastida. Dentro del orden Kinetoplastida, el suborden Trypanosomatina reúne a aquellos que poseen un solo flagelo; dentro del suborden, la familia Trypanosomatidae es la única descrita hasta el momento (60). Una característica común de los tripanosomátidos consiste en que todos ellos son parásitos, y no se encuentran en la naturaleza en forma libre, si bien muchos de ellos han podido ser cultivados axénicamente en el laboratorio. El "árbol" taxonómico de los tripanosomátidos puede resumirse, entonces, de la siguiente manera (61):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Géneros: Blastocrithidia, Crithidia, Endotrypanum, Herpetomonas, Leishmania, Leptomonas, Phytomonas, Rynchoidomonas, Trypanosoma.

Como ya se mencionó, los tripanosomátidos son parásitos obligados, y no se han encontrado en la naturaleza en estado libre. Algunos géneros, denominados tripanosomátidos inferiores o monogenéticos, desarrollan todo su ciclo de vida en un único huésped invertebrado, generalmente un insecto. Tal es el caso de los géneros Blastocrithidia, Crithidia, Herpetomonas, Leptomonas y Rynchoidomonas, los cuales han sido aislados solamente de insectos, y no se ha descrito el caso de ningún vertebrado que sea capaz de hospedarlos (62). Los demás géneros, denominados tripanosomátidos superiores o digenéticos, alternan su ciclo de vida entre dos huéspedes: un insecto vector y un vertebrado. En esta categoría se incluyen los géneros Trypanosoma, Leishmania, Endotrypanum y Phytomonas (60). Los tripanosomátidos digenéticos se caracterizan por los cambios morfológicos que sufren a lo largo de su ciclo de vida. Así por ejemplo, Trypanosoma cruzi se multiplica en el intestino del insecto vector (Triatoma infestans, vulg. vinchuca) en forma de epimastigote, y se diferencia a tripomastigote (forma infectiva, no replicativa), el que es

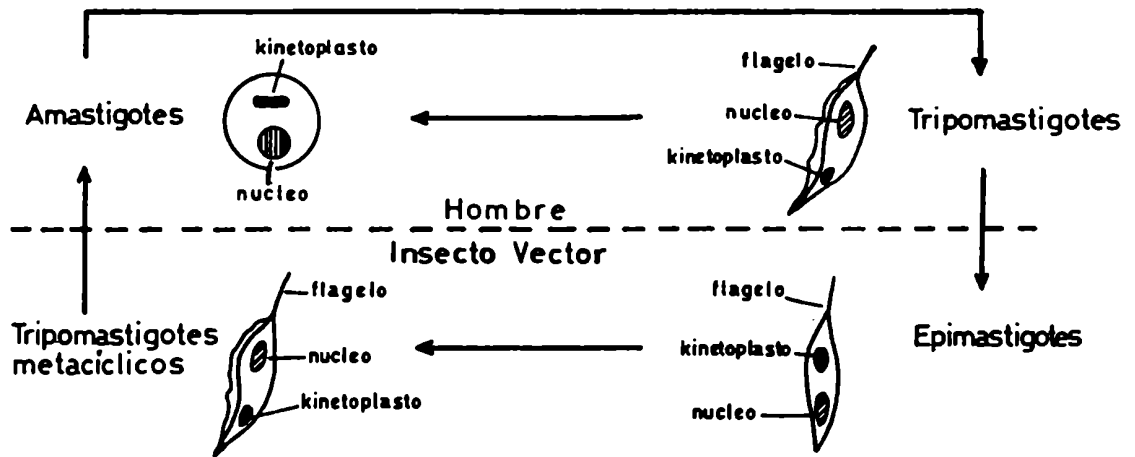


Figura 10. Ciclo de vida de T. cruzi.

eliminado en las heces del insecto; el tripomastigote penetra en la circulación del huésped vertebrado a través de mucosas o lesiones cutáneas, y es la forma capaz de penetrar las células del huésped; en el interior de la célula huésped, el tripomastigote se diferencia a amastigote, forma replicativa intracelular. Luego de varias divisiones, los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes, los cuales son liberados a la circulación luego de la lisis celular. Finalmente, los tripomastigotes reinfectan al insecto vector, (por succión de sangre del vertebrado infectado), en cuyo intestino vuelven a diferenciarse a epimastigotes, cerrando de este modo el ciclo (63). En la Fig. 10 se presenta un esquema del ciclo de vida de T. cruzi. En la Fig. 11 puede observarse una representación esquemática de las distintas morfologías descritas en los tripanosomátidos.

Existe una extraordinaria variedad de vertebrados que pueden ser huéspedes de tripanosomátidos. Se han descrito tripanosomátidos en peces (Trypanosoma gargantua, Trypanosoma danilewskyi) (64), anfibios (sapos, ranas) (Trypanosoma inopinatum, Trypanosoma bocagei) (60), reptiles (cocodrilos, lagartijas) (Trypanosoma mega, Leishmania adleri, Leishmania tarentolae) (60, 65), aves (Trypanosoma corvi, Trypanosoma avium) (66), murciélagos (Trypanosoma evansi, Trypanosoma dionisi) (67), roedores (Trypanosoma conorhini, Leishmania enriettii) (60), primates (Trypanosoma rangeli, Trypanosoma brucei) (68), etc. El género Phytomonas presenta la particularidad de parasitar plantas superiores (60). Por último, varias especies de tripanosomátidos son capaces de infectar al ser humano. Si bien algunas especies no son dañinas, tales como T. rangeli (60), otras especies son altamente patogénicas. La tripanosomiasis africana, conocida como enfermedad del

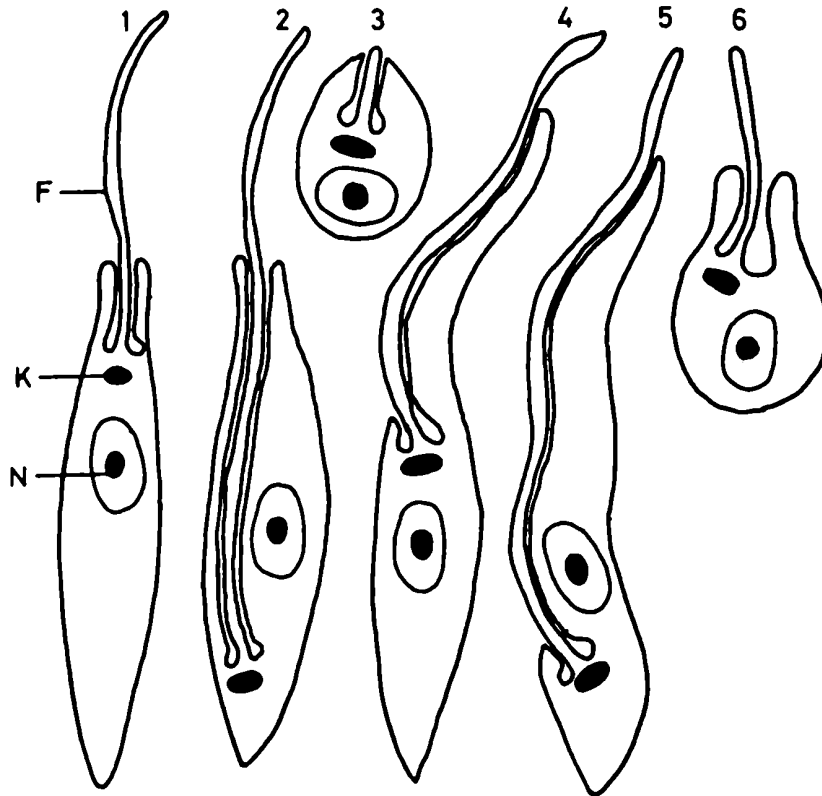


Figura 11. Estadios morfológicos de los tripanosomátidos.

- 1.- Promastigote (Leptomonas, formas infectivas de Leishmania).
 - 2.- Opisthomastigote (Herpetomonas).
 - 3.- Amastigote (formas intracelulares de Leishmania y Trypanosoma).
 - 4.- Epimastigote (formas de cultivo de Trypanosoma).
 - 5.- Tripomastigote (formas infectivas de Trypanosoma).
 - 6.- Coanomastigote (Crithidia).
- F, flagelo; N, núcleo; K, kinetoplasto.

sueño, es una enfermedad letal producida por las especies Trypanosoma brucei gambiense y Trypanosoma brucei rhodesiense (60,69). La tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas, producida por T. cruzi, causa lesiones cardíacas e intestinales severas, y puede ser fatal. Varias especies de Leishmania (Leishmania braziliensis, Leishmania tropica, Leishmania donovani, etc.), producen diferentes patologías, que pueden ir desde lesiones cutáneas leves, hasta graves ulceraciones de piel y mucosas, produciendo deformidades permanentes, o lesiones viscerales severas, generalmente letales (69).

1.2.2. Glicoconjugados y glicoproteínas en tripanosomátidos

El objetivo global de encontrar determinantes antigénicos capaces de producir inmunidad contra la infección por tripanosomátidos patógenos, ha provocado un considerable interés en el estudio de la estructura y propiedades de polisacáridos y glicoconjugados de tripanosomátidos. Así por ejemplo, se han descrito varios polisacáridos, entre ellos un galactomanano en T. cruzi (70,71) y un β -D-manano y un arabinogalactano en Crithidia fasciculata y varias otras especies de Crithidia (72,75). Un glicoconjugado complejo (lipopéptidofosfoglicano) ha sido aislado de epimastigotes de T. cruzi (76). Varios glicoconjugados han sido aislados y parcialmente caracterizados en Crithidia oncopelti (77). El receptor para macrófagos de una cepa de Leishmania major ha sido caracterizado como un glicolípido (78).

En cuanto a las glicoproteínas propiamente dichas, su rol en la infectividad, diferenciación e inmunidad contra la infección por tripanosomátidos ha sido demostrado en muchos casos. Los tripanosomas africanos están recubiertos de una envoltura compuesta por una única glicoproteína, contra la

cual se dirige la respuesta inmune del huésped. La variación en la secuencia de aminoácidos de esta glicoproteína de superficie permite al parásito escapar al sistema inmune de su huésped. Este interesante fenómeno se denomina variación antigénica y ha sido objeto de intensa investigación (79,80). Estas glicoproteínas parecen tener dos tipos de cadenas oligosacáridicas; una de ellas está unida al extremo C-terminal de la cadena polipeptídica por una unión aún no caracterizada (79) y la otra parece ser una unión N-glicosídica a asparagina, puesto que su síntesis es inhibida por tunicamicina (81). Varias glicoproteínas han sido aisladas de la superficie de células de T. cruzi (82,86), y se ha demostrado la existencia de glicoproteínas específicas para distintos estadios (83,85). Anticuerpos monoclonales sintetizados contra una glicoproteína de superficie de epimastigotes de T. cruzi inhiben la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes (84). Asimismo se ha demostrado la necesidad de la presencia de determinadas glicoproteínas de superficie para que tripomastigotes de T. cruzi puedan penetrar en células animales en cultivo (86).

1.3. ANTECEDENTES INMEDIATOS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.3.1. Glicosilación de proteínas en tripanosomátidos

A pesar de la importancia asignada a las glicoproteínas de tripanosomátidos en distintas etapas de su ciclo biológico (ver sección anterior) los estudios sobre el mecanismo de glicosilación de proteínas en estos organismos han comenzado sólo recientemente. En 1981, Parodi y col. (87) demostraron que el Dol-P-P-oligosacárido de mayor tamaño que se sintetizaba

en células de C. fasciculata incubadas con (^{14}C)glucosa tenía la composición $\text{Man}_7\text{GlcNAC}_2$. Asimismo se demostró que este oligosacárido era transferido a proteínas. Este fue el primer caso en que se describió la transferencia de Dol-P-P a proteínas de un oligosacárido que no contenía glucosa. La estructura de este oligosacárido ha sido totalmente elucidada (87,88) y se presenta en la Fig. 12. La incubación de membranas de C. fasciculata con $\text{GDP-(}^{14}\text{C)Man}$ o $\text{UDP-(}^{14}\text{C)Glc}$ y Dol-P de hígado de rata dio como resultado la formación de Dol-P-($^{14}\text{C)Man}$ pero no de Dol-P-($^{14}\text{C)Glc}$ (89). Más adelante, el mismo grupo estudió el mecanismo de glicosilación de proteínas en epimastigotes de T. cruzi (90,91) y observó que en este organismo el oligosacárido transferido de Dol-P-P a proteínas tenía la composición $\text{Man}_6\text{GlcNAC}_2$. La estructura de este oligosacárido ha sido también elucidada (34) y se observa en la Fig. 12. Tampoco en este caso se observó formación de Dol-P-($^{14}\text{C)Glc}$, aunque sí de Dol-P-($^{14}\text{C)Man}$, luego de incubar células con (^{14}C)glucosa durante tiempos superiores a 10 min. También en Leishmania mexicana se observó la transferencia de Dol-P-P a proteína de un oligosacárido que no contenía residuos de glucosa, en este caso $\text{Man}_6\text{GlcNAC}_2$ (92). Las evidencias acumuladas hasta el momento parecen indicar que la incapacidad de sintetizar derivados glucosilados de dolicol es una característica común a los tripanosomátidos, que los diferencia de los demás sistemas eucarióticos estudiados hasta la fecha. La ausencia de residuos de glucosa en los oligosacáridos transferidos de Dol-P-P a proteínas, permitió detectar por primera vez la existencia de un mecanismo de glicosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteínas (ver sección 1.1.3.). Este mecanismo ha sido observado en T. cruzi y L. mexicana (34,92).

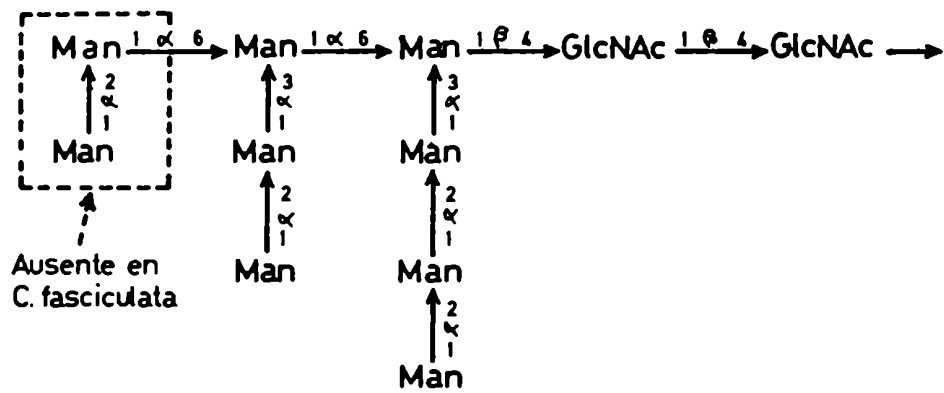


Figura 12. Estructura de los oligosacáridos transferidos de Dol-P-P a proteínas en C. fasciculata y epimastigotes de T. cruzi.

Recientemente, Engel y Parodi (93) informaron un interesante hallazgo: durante la diferenciación de epimastigote a amastigote de un cultivo de T. cruzi, el oligosacárido transferido de Dol-P-P a proteínas pasaba de ser $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, para la forma epimastigote, a ser mayoritariamente $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ para la forma amastigote. Este es el primer caso en que se observa una modificación en el mecanismo de N-glicosilación de proteínas asociada a un fenómeno de diferenciación.

1.3.2. Objetivos del presente trabajo de tesis

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que los tripanosomátidos presentan rasgos comunes en cuanto al mecanismo de N-glicosilación de proteínas, que los diferencian de los demás sistemas eucarióticos. Con el objeto de ampliar y generalizar estas observaciones se decidió encarar un estudio sistemático del mecanismo de N-glicosilación de proteínas en varias especies pertenecientes a distintos géneros de la familia Trypanosomatidae. Para ello, se han aislado Dol-P-monosacáridos, Dol-P-P-oligosacáridos y oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas, se ha establecido su composición y elucidado total o parcialmente su estructura, y se ha determinado el mecanismo de glicosilación y procesamiento de glicoproteínas en los siguientes organismos: Crithidia fasciculata, Crithidia hamosa, Blastocrithidia culicis, Herpetomonas samuelpessoai, Herpetomonas muscarum, Leishmania adleri, Leptomonas samueli, Trypanosoma conorhini y Trypanosoma dionisii.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Organismos

Leishmania adleri (LV-30) fue cedida por el Dr. M.L. Chance (Liverpool School of Tropical Medicine). Leptomonas samueli fue cedida por el Dr. J. Angluster (Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro). Herpetomonas samuelpessoai (ATCC 30252), Crithidia hamosa y Herpetomonas muscarum fueron cedidas por los Dres. J.O. Previato y L. Mendonca-Previato (Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro). Blastocrithidia culicis (ATCC 14806) y Trypanosoma dionisii fueron cedidas por el Dr. W. de Souza (Instituto de Biofísica, Universidad Federal de Río de Janeiro). Trypanosoma conorhini fue cedida por la Dra. M.P. Deane (Fundación Oswaldo Cruz, Río de Janeiro). Los organismos pertenecientes a los géneros Trypanosoma y Leishmania fueron cultivados en un medio conteniendo 3,7% infusión de cerebro y corazón (Brain-Heart Infusion, Difco), 0,001% hemina (Sigma) y 10% suero fetal bovino (Gen S.A., Buenos Aires). Los demás organismos fueron cultivados en 2% sacarosa, 2% KCl, 0,3% Trypticase (Difco), 0,3% extracto de levadura (Difco), 0,002% ácido fólico (Merck) y 0,001% hemina (Sigma). Crithidia fasciculata (ATCC 11745) fue cultivada y mantenida en el medio complejo descrito en (94). Todos los tripanosomátidos fueron cultivados a 28°C, con excepción de C. hamosa, que fue cultivada a 26°C. La cepa de Penicillium charlesii (ATCC 1887) fue cultivada y mantenida en las condiciones descritas en (95).

2.1.2. Radioactivos

Las siguientes sustancias radioactivas fueron utilizadas en esta tesis:

(U-¹⁴C)Glucosa (284 Ci/mol)

(2-³H)Manosa (14 Ci/mmol)

(³⁵S)Metionina (550 Ci/mmol)

(1-³H)Glucosa (3 Ci/mmol)

Todo el material radioactivo fue adquirido a New England Nuclear.

UDP-(U-¹⁴C)Glc (284 Ci/mol) y UDP-(1-³H)Glc (3 Ci/mol) fueron preparados por Susana Raffo y Marta Eirin (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar") según la técnica de Thomas y col. (96).

2.1.3. Enzimas

Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo-H) de Streptomyces griseus fue adquirida a Miles; α -manosidasa ("jack bean") y proteasa (tipo XIV, de S. griseus), de Sigma. Una preparación enzimática de oviducto de gallina conteniendo actividades de α - y β -manosidasas fue obtenida como se describe en (97), hasta el paso de precipitación por sulfato de amonio. El precipitado fue luego resuspendido y dializado contra buffer citrato de sodio 50 mM, pH 4,5, conteniendo acetato de zinc 0,01 mM. β -galactofuranosidasa fue preparada a partir del sobrenadante de un cultivo de P. charlesii según la técnica descripta en (98).

2.2. Marcación radioactiva de microorganismos

2.2.1. Marcación de C. fasciculata con (U-¹⁴C)glucosa

Células de C. fasciculata fueron cultivadas en las condiciones descritas más arriba, y cosechadas en fase exponencial temprana por centrifugación a 1500 x g durante 10 min a 4°C. Las células (5 g peso húmedo) fueron lavadas 3 veces con 25 ml cada vez de solución de Eagle (99) carente de glucosa (solución de marcación), y conteniendo piruvato de sodio 5 mM. Las células fueron resuspendidas en 2 volúmenes (volumen/peso húmedo) de la misma solución, y colocadas a 28°C con agitación. 500 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa disueltos en 0,5 ml de la solución de marcación se agregaron al sistema. A los 10, 30, 60 y 180 min de incubación se retiraron alícuotas de 4 ml. Las incubaciones se detuvieron por agregado de 5 volúmenes de Cl₃CH:CH₃OH (3:2), de modo de obtener una partición Cl₃CH:CH₃OH:H₂O (3:2:1). Las condiciones de la marcación variaron ligeramente de experimento en experimento, en cuanto a la masa de células, volúmenes y tiempos de incubación o cantidad de precursor radioactivo. En los casos pertinentes, dichas variaciones se indican en las leyendas de las correspondientes figuras.

En los casos indicados en el texto, el piruvato de sodio en el medio de lavado y marcación fue reemplazado por glucosa 5,5 mM (sección 3.2.6. y Fig. 20A), o bien la temperatura de incubación fue reducida de 28°C a 5°C (sección 3.3.1.6. y Fig. 25D).

2.2.2. Marcación de otros tripanosomátidos con (U-¹⁴C)Glucosa

Células de T. dionisii, T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpessoai, B. culicis, L. samueli y L. adleri (2-6 g peso húmedo, según el organismo) fueron cosechadas en fase exponencial tardía, lavadas 3 veces con la solución de marcación descrita más arriba y resuspendidas en 2 volúmenes de la misma solución a 28°C. Se agregaron 300 µCi de (U-¹⁴C)glucosa y se retiraron alícuotas a los 5 min (4/9 del volumen total), 10 min (2/9) y 20 min (2/9). El resto del cultivo (1/9) fue diluido 20 veces con medio de crecimiento completo e incubado 180 min más a 28°C. Cada una de las alícuotas fue mezclada con 5 volúmenes de Cl₃CH:CH₃OH (3:2) de modo de obtener una partición Cl₃CH:CH₃OH:H₂O (3:2:1).

Células de C. hamosa (2,5 g) fueron resuspendidas en 7 ml de solución de marcación a 26°C y se agregaron al cultivo 100 µCi de (U-¹⁴C)glucosa. Se retiró una alícuota de 5 ml a los 10 min, y a los 20 min se agregaron 3 ml del medio de crecimiento completo y se continuó la incubación por 80 min más. Ambas alícuotas fueron mezcladas con 5 volúmenes de Cl₃CH:CH₃OH (3:2) de modo de obtener una partición Cl₃CH:CH₃OH:H₂O (3:2:1).

2.2.3. Marcación de C. fasciculata con (2-³H)manosa

6 g de células de C. fasciculata fueron resuspendidas en 11 ml (volumen final) de la solución de marcación descrita anteriormente, conteniendo 2 mCi de (2-³H)manosa. Se retiraron alícuotas de 3 ml a los 2,5 y 5 min, y de 2 ml a los 10 y 15 min de marcación. Cada alícuota fue mezclada con 5 volúmenes de

$\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:2) de modo de obtener una partición $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1).

2.2.4. Marcación de *C. fasciculata* con (U-¹⁴C)glucosa en presencia de anti-bióticos

Células de *C. fasciculata* (1 g) fueron incubadas a 28°C en 2 ml de la solución de marcación en presencia de 150 μCi de (U-¹⁴C)glucosa. A los 5 min de incubación, se agregó al cultivo cicloheximida y puromicina (ambas de Sigma) hasta una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 50 μM , respectivamente, y se continuó la incubación durante 5 min más. Como control, la misma cantidad de células fue incubada en idénticas condiciones durante 10 min, pero en ausencia de antibióticos. Luego de la incubación, ambas muestras fueron mezcladas con 5 volúmenes de $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:2) de modo de obtener una partición $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1).

Para medir incorporación de aminoácidos en estas condiciones, 35 mg de células fueron suspendidas en 35 μl de medio de Eagle carente de metionina, y conteniendo puromicina y cicloheximida en las concentraciones indicadas más arriba. Se agregaron 4 μCi de (³⁵S)metionina y se incubaron las células durante 10 min a 28°C. Se realizó un control incubando células en idénticas condiciones en ausencia de antibióticos. Las incubaciones se detuvieron por agregado de 1 ml de ácido tricloroacético 10%. Luego de calentar 5 min a 100°C, los precipitados se recogieron por centrifugación y se lavaron 3 veces con 1 ml del mismo ácido. Finalmente, los precipitados fueron disueltos en Soluene (Packard), neutralizados y contada su radioactividad en un contador de centelleo.

2.3. Aislamiento de compuestos radioactivos

2.3.1. Dol-P-monosacáridos

Las fases inferiores de las particiones $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1) correspondientes a los tiempos más breves de marcación (10 y 30 min para C. fasciculata, 5, 10 y 20 min para los demás) fueron reunidas y evaporadas al vacío hasta sequedad. El residuo fue sometido a saponificación (ver sección 2.4.1.) y el insaponificable fue sembrado en una columna (0,5 x 5 cm) de DEAE-celulosa, forma acetato, equilibrada con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). La columna fue lavada con 10 ml de $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), y posteriormente eluida con 10 ml de soluciones de formiato de amonio 5, 10, 20 y 50 mM en $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). Se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones radioactivas eluidas con la solución de formiato de amonio 20 mM contenían los Dol-P-monosacáridos. Las mismas fueron reunidas, llevadas a sequedad y sometidas a una partición $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1). La fase inferior de esta partición fue lavada varias veces con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:16:16) para eliminar las sales. Los Dol-P-monosacáridos se conservaron a -20°C hasta su uso.

2.3.2. Dol-P-P-oligosacáridos

Las interfases de las particiones $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1) fueron recuperadas y sometidas a una segunda partición $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1). De esta segunda partición se recuperaron las interfases, las cuales fueron lavadas con 5 ml de agua y extraídas 3 veces con 5 ml cada vez de $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$

(1:1:0,3). Los extractos fueron reunidos y evaporados a sequedad. El residuo fue tomado en 1 ml del mismo solvente y sembrado en una columna (0,5 x 5 cm) de DEAE-celulosa, forma acetato, equilibrada con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,3). La columna se lavó con 10 ml del mismo solvente, y posteriormente se eluyó con 10 ml de soluciones de formiato de amonio 10, 30 y 50 mM en el mismo solvente. Se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones radioactivas eluidas con formiato de amonio 30 mM fueron reunidas. Los Dol-P-P-oligosacáridos fueron conservados a -20°C hasta su uso.

2.3.3. Glicopéptidos

Después de ser extraídas con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,3), las interfases de las particiones $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1) fueron lavadas dos veces con 5 ml de CH_3OH y tres veces con 5 ml de agua. Los precipitados fueron suspendidos en 5 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, conteniendo CaCl_2 1 mM. Se agregó una punta de espátula de proteasa a la suspensión y se incubó a 37°C durante 4 días, con agregados diarios de enzima. La proteólisis fue detenida por calentamiento a 100°C durante 10 min y el sobrenadante de la incubación fue concentrado a 2 ml y sembrado en una columna (120 x 1,25 cm) de Bio-Gel P-6 (100 - 200 "mesh") equilibrada con buffer acetato-piridina 0,1 M, pH 5,0. La columna fue eluida con el mismo buffer, y se recogieron y reunieron las fracciones cuyo volumen de elución correspondió a glicopéptidos conteniendo entre 3 y 20 residuos de azúcar aproximadamente (87). Este material fue sometido a electroforesis en papel en ácido fórmico 5%. Las sustancias que migraron hacia el cátodo fueron eluidas y llevadas a sequedad. Esta fracción será designada "glicopéptidos purificados".

2.3.4. Oligosacáridos sensibles a Endo-H

Los glicopéptidos purificados fueron incubados con Endo-H (ver sección 2.5.1.). Luego de la incubación, la muestra se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 5%. Las sustancias que no migraron en esta electroforesis se designarán "oligosacáridos sensibles a Endo-H". El material que migró hacia el cátodo constituye los "glicopéptidos resistentes a Endo-H".

2.4. Tratamientos químicos

2.4.1. Saponificación

Las fases inferiores de las particiones $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1) fueron evaporadas a sequedad en corriente de N_2 a temperatura ambiente. Al residuo se agregaron 2 ml de Cl_3CH , 0,7 ml de CH_3OH y 50 μl de NaOH 10 N. Después de incubar 10 min a 37°C , se agregaron 0,6 ml de CH_3OH y 0,66 ml de agua. La fase superior de la partición formada fue eliminada por aspiración, y la fase inferior se lavó dos veces con 0,6 ml de $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:16:16), descartándose las fases superiores de los lavados. Finalmente, el insaponificable fue evaporado a sequedad en corriente de N_2 a temperatura ambiente y disuelto en 1 ml de $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1).

2.4.2. Hidrólisis ácida suave de derivados de dolicol

Las muestras fueron evaporadas a sequedad en corriente de aire a 50°C. A las muestras secas se agregaron 0,5 ml de HCl 0,02 N y se incubó a 100°C durante 10 min. A continuación se agregaron 2,5 ml de Cl₃CH:CH₃OH (3:2) y se recuperó la fase superior, que contenía los monosacáridos previamente unidos a Dol-P o los oligosacáridos previamente unidos a Dol-P-P según el caso. Las muestras se llevaron a sequedad en corriente de aire a 50°C.

2.4.3. Hidrólisis ácida suave de oligosacáridos y glicopéptidos

Oligosacáridos sensibles a Endo-H o glicopéptidos resistentes a Endo-H fueron disueltos en 0,5 ml de HCl 0,02 N e incubados a 100°C durante 150 min. A continuación se agregaron 2,5 ml de Cl₃CH:CH₃OH (3:2). Las fases superiores de las particiones fueron recuperadas y evaporadas a sequedad en corriente de aire a 50°C.

2.4.4. Hidrólisis ácida fuerte

Las muestras fueron disueltas en 0,5 ml de HCl 1 N e incubadas a 100°C durante 4 h. Luego de la hidrólisis se agregó 1 ml de agua y 1 g (aproximadamente) de una resina aniónica (Dowex AG-X-1, forma acetato). La solución fue recuperada y evaporada a sequedad en corriente de aire a 50°C.

2.4.5. Reducción de oligosacáridos con NaBH₄

Las muestras fueron disueltas en 1 ml de NaBH₄ 0,1 M e incubadas durante 16 h a temperatura ambiente. Se agregó luego una resina catiónica (Dowex 50, forma H⁺) y se evaporó la solución a sequedad. El ácido bórico fue eliminado por evaporación reiterada con metanol, en corriente de aire a 50°C.

2.4.6. Oxidación suave con NaIO₄, reducción e hidrólisis

Se utilizó el procedimiento descrito por Lederkremer y col. (100) con ligeras modificaciones. Las muestras fueron disueltas en 0,5 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, y se agregaron 0,34 ml de solución de NaIO₄ 50 mM. Después de 30 min a temperatura ambiente, se destruyó el exceso de NaIO₄ por agregado de 5 µl de etilenglicol, se agregó exceso de NaBH₄ sólido, y se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. El exceso de NaBH₄ fue destruido mediante el agregado de ácido acético glacial, y las muestras fueron tratadas con una resina catiónica (Dowex 50, forma H⁺), llevadas a sequedad y evaporadas reiteradamente con metanol para eliminar el ácido bórico. Finalmente, las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida fuerte (sección 2.4.4.).

2.4.7. Acetilisis

Se empleó el procedimiento de Kocourek y Ballou (101), con algunas modificaciones. Las muestras fueron acetiladas en 1 ml de piridina:anhídrido acético (1:1) durante 3 h a 100°C. El solvente se eliminó por evaporación,

seguida de dos evaporaciones sucesivas con 1 ml de metanol anhidro.

La acetólisis se llevó a cabo en 1 ml de anhídrido acético/ácido acético/H₂SO₄ (1:1:0,1) durante 16 h a 30°C. La reacción se detuvo por agregado de 2 ml de piridina y evaporación en corriente de aire a 50°C. A continuación se agregaron 2,5 ml de CHCl₃ y 2,5 ml de agua. La fase clorofórmica se evaporó a sequedad, y la fase acuosa fue reextraída con 2,5 ml de cloroformo. La fase clorofórmica de la segunda extracción fue reunida con el residuo de la evaporación de la primera fase clorofórmica, se lavó con 2 ml de agua y se evaporó a sequedad en corriente de aire a 50°C.

Los productos de acetólisis fueron de-O-acetilados de la siguiente forma: se agregaron a las muestras 0,9 ml de CH₃OH y 0,1 ml de NaOCH₃ 1 M (preparado disolviendo sodio metálico en CH₃OH). Las muestras se dejaron 20 min a temperatura ambiente, después de lo cual se agregó 1 ml de agua y se trató la solución con una resina catiónica (Dowex 50, forma H⁺). La solución fue recuperada de la resina y evaporada a sequedad en corriente de aire a 50°C.

2.5. Tratamientos enzimáticos

Las condiciones de incubación con proteasa han sido descritas en la sección 2.3.3.

2.5.1. Endo-H

Las muestras fueron disueltas en 200 μ l de buffer trietilamina-acetato 50 mM pH 5,5. Se agregaron 0,01 unidades de Endo-H y se incubó a 37°C durante 24 h. La incubación se detuvo evaporando las muestras a sequedad en corriente de aire a 50°C.

2.5.2. α -manosidasa

100 μ l de la suspensión enzimática (8 unidades) fueron dializados contra 500 ml de buffer citrato de sodio 0,1 M, pH 4,5, conteniendo acetato de zinc 0,1 mM. La solución enzimática se agregó a tubos de ensayo conteniendo las muestras secas, y se incubó 16 h a 37°C. Finalizada la incubación se agregó 1 ml de agua y se calentó durante 3 min a 100°C. Se centrifugó para eliminar la proteína desnaturalizada, y el sobrenadante se trató con una resina mixta (Amberlite MB-3, forma acetato). Finalmente, se evaporó a sequedad en corriente de aire a 50°C.

2.5.3. β -manosidasa

Las condiciones de incubación con la preparación enzimática de α - y β -manosidasa de oviducto de gallina (ver sección 2.1.3.) fueron las mismas que las descritas en la sección anterior para la incubación con α -manosidasa de "jack bean", excepto que la incubación duró 120 min a 37°C.

2.5.4. β -galactofuranosidasa

Las muestras fueron disueltas en 100 μ l de buffer acetato de sodio 66 mM, pH 4,0, a los que se agregaron 5 μ l de solución enzimática (15 mg de proteína/ml). Se incubó a 37°C durante 16 h. Bajo las condiciones del ensayo, la preparación estaba libre de actividades de α -manosidasa y α - y β -galactopiranosidasa. Las muestras fueron procesadas como se describió en la sección 2.5.1. para las incubaciones con α -manosidasa.

2.6. Métodos

2.6.1. Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Lowry y col. (102), utilizando albúmina sérica bovina como standard.

2.6.2. Cromatografía

2.6.2.1. Cromatografía de exclusión con deoxicolato

Una muestra de Dol-P-(14 C)Man de C. fasciculata fue mezclada con un standard de Dol-P-(3 H)Glc de hígado de rata, y evaporada en corriente de N₂ a temperatura ambiente. La muestra fue resuspendida en 1 ml de buffer fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,3 conteniendo deoxicolato de sodio 0,5%. La muestra se sembró en una columna (1,7 x 76 cm) de Sephadex G-75 equilibrada con el mismo buffer. La columna se mantuvo a 37°C mediante una camisa de agua. Se reco-

gieron fracciones de 2,3 ml, que fueron analizadas para determinar su contenido de radioactividad de ^3H y ^{14}C en un contador de centelleo.

En idénticas condiciones fue cromatografiada una mezcla de Dol-P-(^3H)Glc de hígado de rata y undecaprenol-P-(^{14}C)galactosa. El Dol-P-(^3H)Glc eluyó exactamente en la misma posición que en la corrida anterior.

2.6.2.2. Cromatografía en papel

Los siguientes fueron los solventes utilizados para cromatografía en papel:

- A, 1-butanol:piridina:agua (6:4:3)
- B, 1-butanol:piridina:agua (10:3:3)
- C, 1-propanol:nitrometano:agua (5:2:4)
- D, 1-butanol:piridina:agua (4:3:4)

Se utilizó papel SS 2043a (Schleicher & Schuell) en todos los casos.

2.6.3. Electroforesis en papel

Los siguientes fueron los solventes y condiciones de las corridas electroforéticas en papel:

Acido fórmico 5%: 30 V/cm, 120 min.

Molibdato de sodio 0,1 M, pH 5,0: 17 V/cm, 60 min.

Bórax 1,9%, pH 9,4: 25 V/cm, 180 min.

Se utilizó papel SS 2043a (Schleicher & Schuell) en todos los casos.

2.6.4. Determinación de radioactividad

Para la determinación de radioactividad en cromatogramas y electroferogramas, los mismos fueron cortados en tiras de 1 cm ó 0,5 cm de largo, según la resolución deseada. Cada tira fue sumergida en líquido de centelleo (0,5% 2,5 difeniloxazol, 0,025% 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil) benceno en tolueno) y la radioactividad contada en un contador de centelleo.

Para la determinación de la radioactividad de los eluidos de la columna de Sephadex G-75 con deoxicolato (sección 2.6.2.1.) y de las columnas de DEAE-acetato (secciones 2.3.1. y 2.3.2.), las fracciones fueron mezcladas con 3 volúmenes del líquido de centelleo descrito por Bray (103) y contadas en el mismo instrumento.

2.7. Standards

$\text{Man}_6\text{-}_9\text{GlcNAc}_2$ se obtuvieron a partir de los Dol-P-P-oligosacáridos de cortes de oviducto de gallina incubados con (U- ^{14}C)glucosa (50). El tratamiento de estos oligosacáridos con α -manosidasa ("jack bean") produjo el standard de ManGlcNAc_2 . Asimismo, standards de $\text{Man}_5\text{-}_9\text{GlcNAc}$ se obtuvieron por tratamiento con Endo-H de glicopéptidos de oviducto de gallina incubados con (U- ^{14}C)glucosa (50). Por tratamiento de estos oligosacáridos con α -manosidasa ("jack bean") se obtuvo el standard de ManGlcNAc .

$\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ se obtuvo por hidrólisis ácida suave e incubación con Endo-H del Dol-P-P-derivado sintetizado "in vitro" por microsomas de hígado

de rata incubados en presencia de UDP-(¹⁴C)Glc (104). La incubación de Glc₁Man₉GlcNAc con α-manosidasa ("jack bean") produjo los standards de Glc₁Man₅GlcNAc y Glc₁Man₄GlcNAc.

Gal₁Man₅GlcNAc y Gal₁Man₄GlcNAc se obtuvieron por digestión con α-manosidasa ("jack bean") de Gal₁Man₉GlcNAc. Este último compuesto, preparado según la técnica descrita en (105), fue provisto por la Dra. N. Iñón de Iannino.

Undecaprenol-P-(¹⁴C)Gal, preparado según la técnica descrita en (42), fue provisto por la Dra. N. Iñón de Iannino.

Dol-P-(³H)Glc fue obtenido por incubación de microsomas de hígado de rata con UDP-(³H)Glc según la técnica descrita en (106).

Man₂, Man₃ y Man₄ fueron preparados por acetólisis del manano de Saccharomyces cerevisiae (105).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de Dol-P-monosacáridos

3.1.1. Caracterización de la porción sacarídica

Se ha demostrado (90) que células de T. cruzi incubadas en presencia de (^{14}C)glucosa sintetizan Dol-P-(^{14}C)Man pero no Dol-P-(^{14}C)Glc. Asimismo, una preparación de membranas de C. fasciculata resultó incapaz de producir Dol-P-(^{14}C)Glc a partir de UDP-(^{14}C)Glc y Dol-P de hígado de rata, si bien en las mismas condiciones de incubación sí se sintetizó Dol-P-(^{14}C)Man a partir de GDP-(^{14}C)Man y el derivado lipídico (89). Estos resultados parecían sugerir que los tripanosomátidos son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc. A efectos de generalizar esta hipótesis, se aislaron los Dol-P-monosacáridos producidos por varias especies de tripanosomátidos y se analizó su porción sacarídica. Para ello, células de C. fasciculata, T. dionisii, L. samueli, L. adleri y H. muscarum fueron incubadas con (U- ^{14}C)glucosa durante 5, 10 y 20 min (10 y 30 min en el caso de C. fasciculata), y los Dol-P-monosacáridos radioactivos de todas las alícuotas fueron mezclados y aislados, según la técnica descrita en la sección 2.3.1. Los monosacáridos fueron obtenidos por hidrólisis ácida suave de los derivados de Dol-P y caracterizados por cromatografía en papel con solventes A o B. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 13. Puede observarse que el único derivado de Dol-P producido por C. fasciculata, T. dionisii y L. samueli es Dol-P-Man (Fig. 13A-C). En cambio, L. adleri produce además de Dol-P-Man, Dol-P-Glc, según se observa en la Fig. 13D. La formación de Dol-P-Man y Dol-P-Glc ha sido observada también en

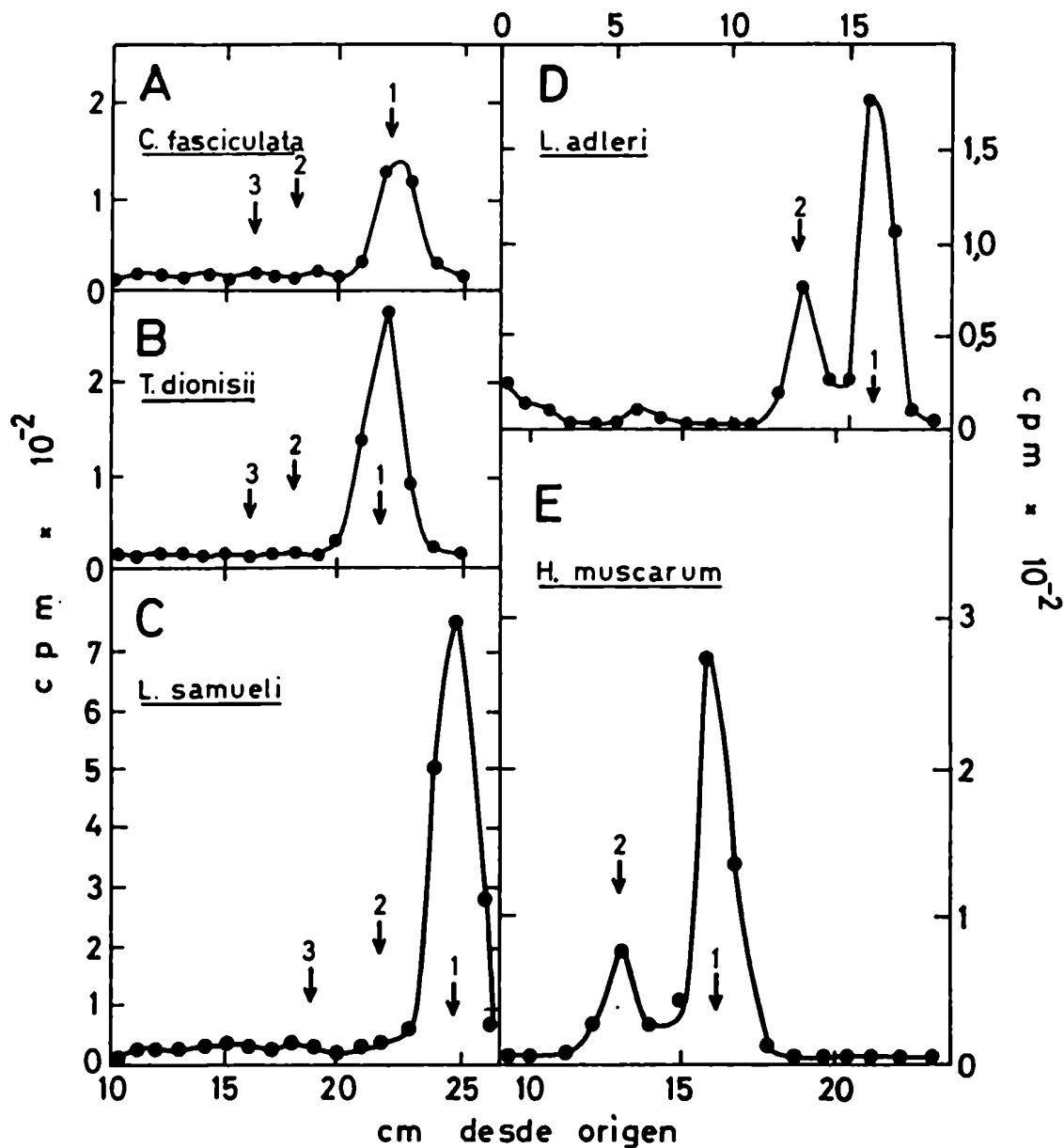


Figura 13. Dol-P-monosacáridos de tripanosomátidos. Los Dol-P-monosacáridos radioactivos de distintas especies de tripanosomátidos fueron obtenidos según se describe en la sección 2.3.1. Los monosacáridos fueron liberados por hidrólisis ácida suave y analizados por cromatografía en papel con solvente A (paneles A-C) o B (paneles D-E). A, *C. fasciculata*; B, *T. dionisii*; C, *L. samueli*; D, *L. adleri*; E, *H. muscarum*.

Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, galactosa.

H. muscarum (Fig. 13E).

3.1.2. Tamaño de la porción lipídica

Como ya se mencionó anteriormente (ver sección 1.1.2.), la longitud de los dolicoles de células eucarióticas es variable; la especie predominante tiene 19 unidades de isopreno en células animales (107), y 17 en levaduras (108). La longitud del dolicol de Tetrahymena pyriformis es de 14 unidades de isopreno (109) y la del dolicol de T. cruzi, de 13 unidades (89). Parece existir una tendencia al acortamiento de la cadena isoprenoide a medida que se desciende en la escala evolutiva.

Una técnica sencilla para determinar la longitud de la cadena isoprenoide del dolicol consiste en realizar una cromatografía de exclusión en presencia de deoxicolato de sodio. El deoxicolato forma complejos de inclusión con ácidos grasos y poliprenoles; el número de moléculas de detergente unidas depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada (110). De este modo, en presencia de deoxicolato, el dolicol y sus derivados formarán complejos cuyos pesos moleculares dependerán de la longitud de la cadena isoprenoide; la elución de estos compuestos a través de columnas de Sephadex equilibradas con deoxicolato de sodio ha sido utilizada para determinar el tamaño del dolicol de hígado de rata y de T. cruzi (90, 111).

Esta técnica fue utilizada para determinar el largo del dolicol de C. fasciculata. Dol-P-(¹⁴C)Man de este organismo fue cromatografiado a través de una columna de Sephadex G-75 en presencia de 0,5% deoxicolato de sodio, juntamente con un standard de Dol-P-(³H)Glc de hígado de rata (19 unidades de isopreno). Este último compuesto fue también cromatografiado en las mismas

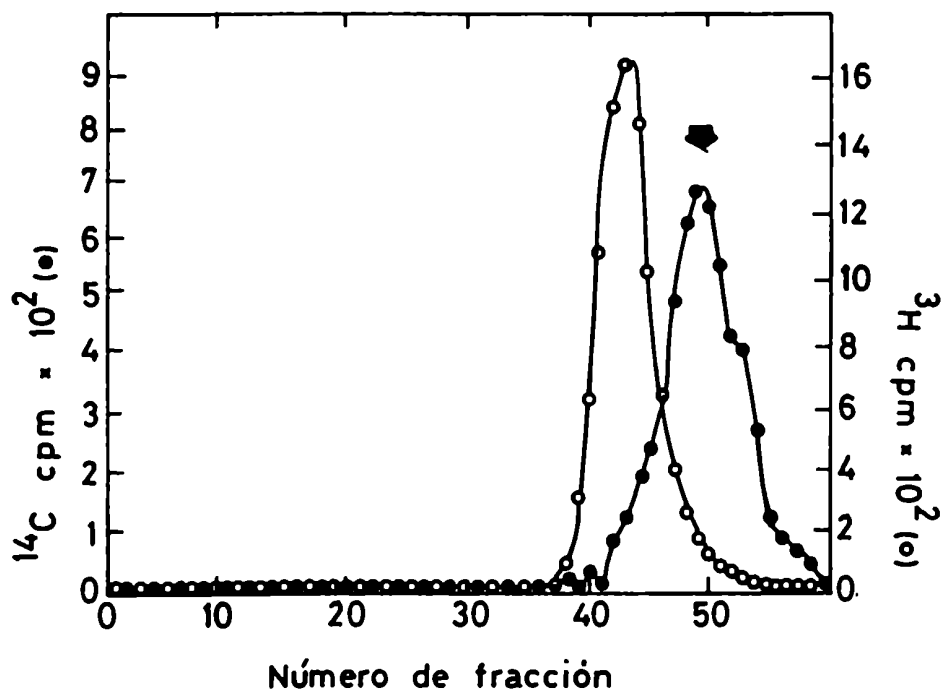


Figura 14. Tamaño de la porción lipídica. Dol-P-(^{14}C)Man de *C. fasciculata* (círculos negros) y Dol-P-(^3H)Glc de hígado de rata (círculos blancos) fueron cromatografiados en una columna de Sephadex G-75 en presencia de 0,5% deoxicolato de sodio. La flecha indica la posición de elución en idénticas condiciones de un standard de undecaprenol-P-(^{14}C)Gal.

condiciones juntamente con undecaprenol-P-(^{14}C)Gal de Acetobacter xylinum (11 isoprenos) (112). Como se observa en la Fig. 14, el Dol-P-Man de C. fasciculata eluye exactamente en la misma posición que undecaprenol-P-Gal, lo cual indica que el dolicol de C. fasciculata tiene 11 unidades de isopreno. Este resultado concuerda con la tendencia al acortamiento de la cadena isoprenoide observada a medida que se desciende en la escala evolutiva.

3.2. Caracterización de oligosacáridos unidos a Dol-P-P

Células de varias especies de tripanosomátidos fueron incubadas en presencia de ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa durante 5, 10 y 20 min (10 y 30 min en el caso de C. fasciculata). Después de la incubación, las células fueron sometidas a una partición $\text{Cl}_3\text{CH:CH}_3\text{OH:H}_2\text{O}$ (3:2:1). De la interfase de dicha partición se extrajeron los Dol-P-P-oligosacáridos con $\text{Cl}_3\text{CH:CH}_3\text{OH:H}_2\text{O}$ (1:1:0,3), los cuales fueron purificados por cromatografía de intercambio iónico según se describe en la sección 2.3.2. Los oligosacáridos fueron obtenidos por hidrólisis ácida suave de los Dol-P-P-derivados y se determinó su tamaño por cromatografía en papel con solvente C. Los resultados se presentan en las Figs. 15 y 16. A excepción de L. adleri, los perfiles cromatográficos obtenidos para cada organismo no se modificaron con el tiempo de incubación. Como se observa en la Fig. 15A-B, T. dionisii y H. samuelpessoai producen un único compuesto cuya migración cromatográfica coincide con la de un standard de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. El mismo compuesto se detecta en los casos de H. muscarum, T. conorhini y L. samueli (Fig. 15C-E). De acuerdo con lo descrito por Parodi y col. (87) C. fasciculata produce un único pico que corre como $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 16A). B. culicis produce un compuesto que comigra con

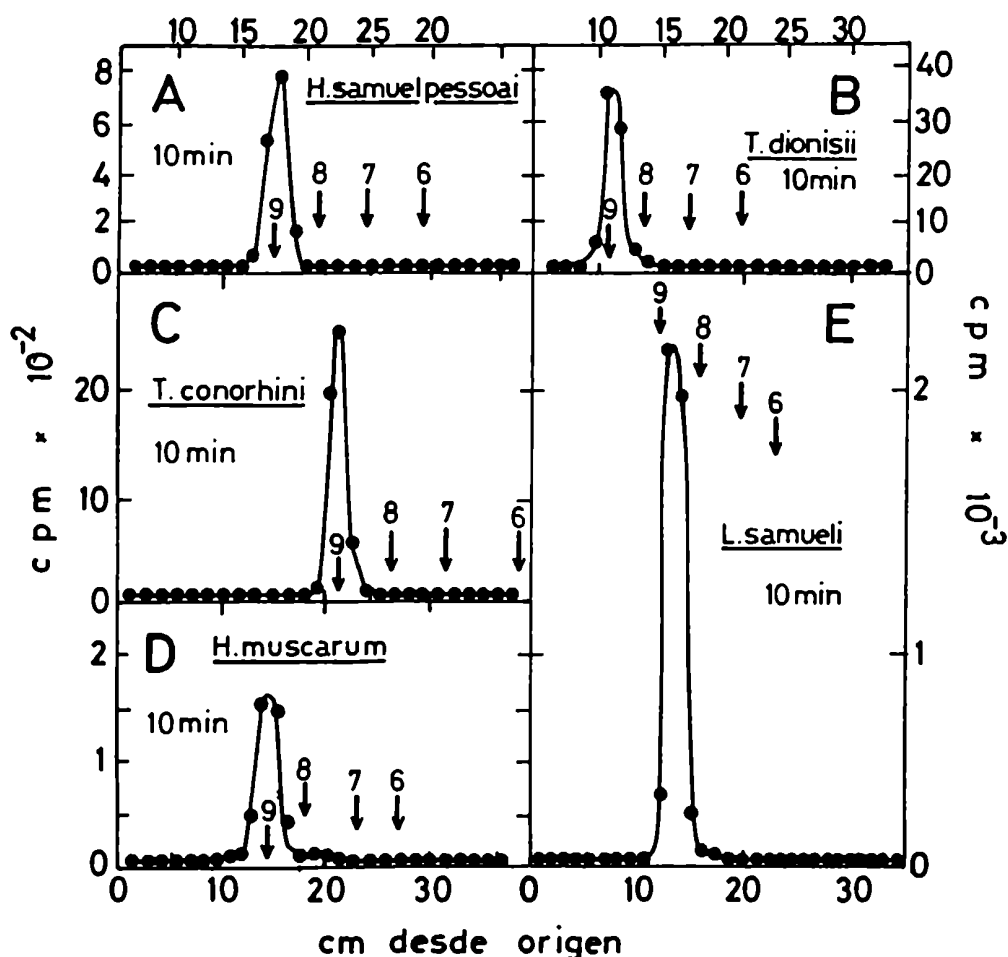


Figura 15. Dol-P-P-oligosacáridos de tripanosomátidos. Los Dol-P-P-oligosacáridos radioactivos de distintas especies de tripanosomátidos incubados con (U- 14 C)glucosa fueron obtenidos según se describe en la sección 2.3.2. Los oligosacáridos fueron liberados por hidrólisis ácida suave y analizados por cromatografía en papel con solvente C. Los tiempos indicados en los paneles son los tiempos de incubación de los parásitos con (U- 14 C)glucosa. A, *H. samuelpessoai*; B, *T. dionisii*; C, *T. conorhini*; D, *H. muscarum*; E, *L. samueli*.

Standards: 6, $\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$; 7, $\text{Man}_7\text{GlcNac}_2$; 8, $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$; 9, $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$.

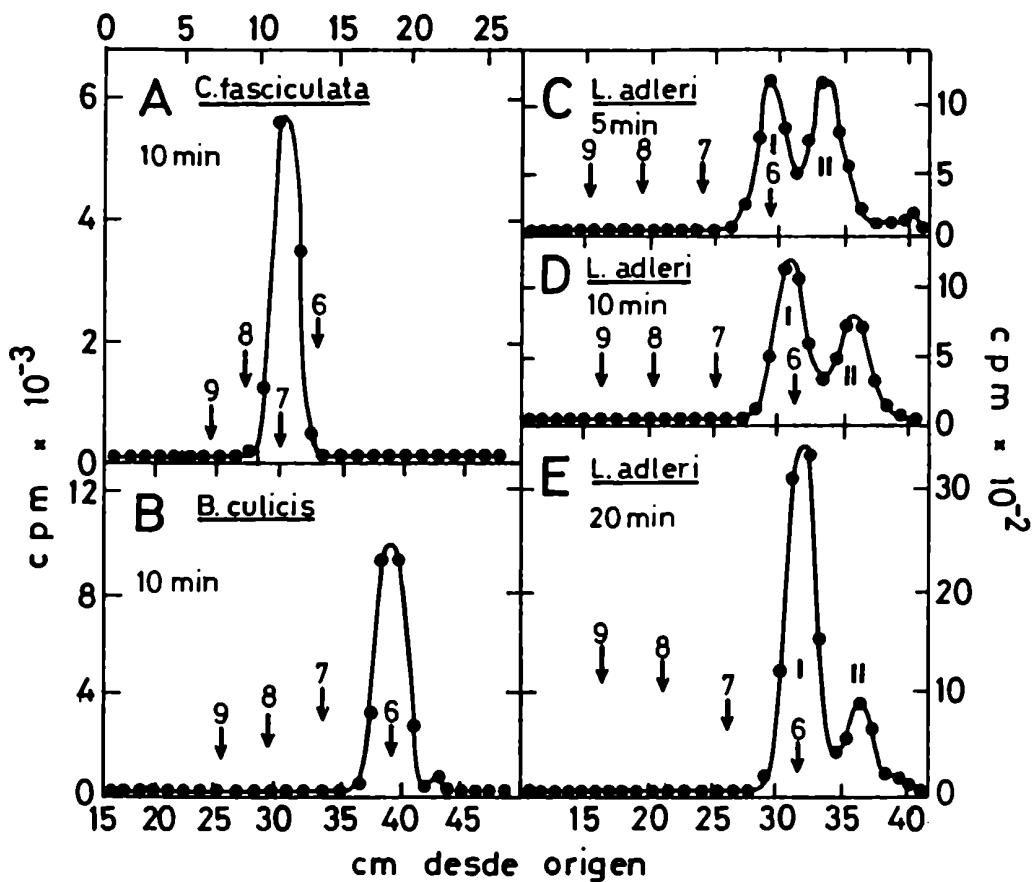


Figura 16. Dol-P-P-oligosacáridos de tripanosomátidos (cont.). A, *C. fasciculata*; B, *B. culicis*; C-E, *L. adleri*. Para mayores detalles, ver Fig. 15.

Man₆GlcNAc₂ (Fig. 16B). En el caso de L. adleri el perfil cromatográfico muestra dos picos cuyas proporciones relativas varían con el tiempo de marcación: el pico más lento (pico I) comigra con un standard de Man₆GlcNAc₂; el segundo pico (pico II) corre más rápido que el pico I, y como veremos más adelante se trata de Man₅GlcNAc₂. Su proporción se va haciendo minoritaria a medida que aumenta el tiempo de marcación (Fig. 16 C-E).

3.2.2. Sensibilidad a endo N-acetilglucosaminidasa H

La endo N-acetilglucosaminidasa H (Endo-H) hidroliza la unión glicosídica $\beta 1 \rightarrow 4$ entre los dos residuos de N-acetilglucosamina de oligosacáridos de alta manosa (113). Para verificar que los oligosacáridos unidos a Dol-P-P aislados de los distintos tripanosomátidos contienen la unidad GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc, los mismos fueron incubados con Endo-H, y los productos de la digestión fueron separados por cromatografía en papel con solvente D. En la Fig. 17 se observa el resultado obtenido con los picos I y II de L. adleri (ver sección anterior). Como se puede ver en la Fig. 17A, la Endo-H libera N-acetilglucosamina del oligosacárido I de L. adleri. Idéntico resultado se obtuvo al incubar con Endo-H a los oligosacáridos de todos los demás tripanosomátidos estudiados. La única excepción la constituyó el oligosacárido II de L. adleri, que resultó ser resistente a Endo-H, y no liberó N-acetilglucosamina por incubación con la enzima (ver Fig. 17B). Como se verá más adelante, la estructura de este oligosacárido justifica su resistencia a Endo-H.

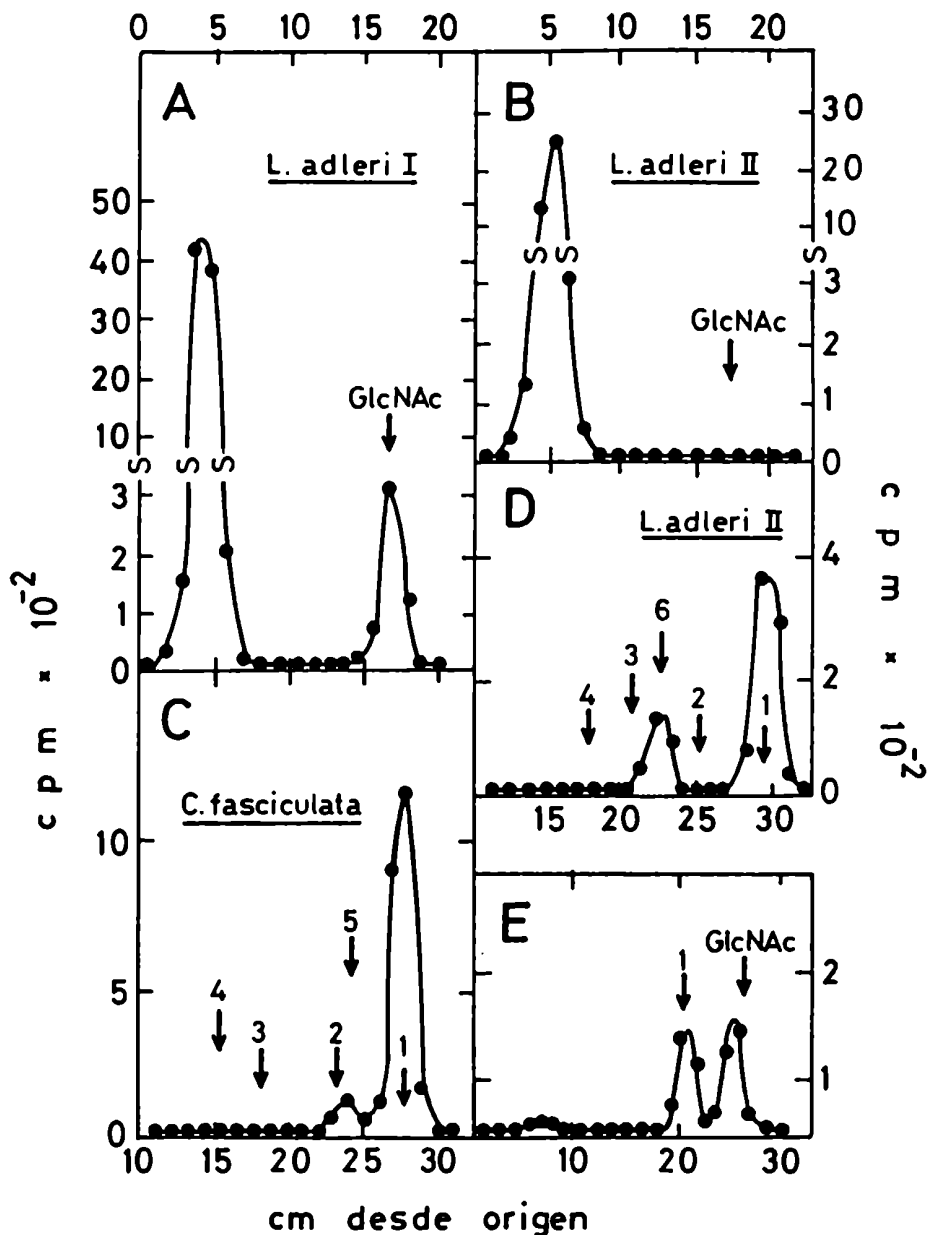


Figura 17. Degradación enzimática. Los oligosacáridos I (panel A) y II (panel B) de *L. adleri* previamente unidos a Dol-P-P (Fig. 16C) fueron digeridos con Endo-H. Los oligosacáridos previamente tratados con Endo-H de *C. fasciculata* (panel C) y *L. adleri* (panel D) fueron incubados con α -manosidasa. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente D. E. El pico que corrió detrás de manosa en C fue eluido, incubado con β -manosidasa y recromatografiado en papel con solvente A.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄; 5, ManGlcNAc; 6, ManGlcNAc₂.

3.2.3. Sensibilidad a α - y β -manosidasa

Los oligosacáridos resultantes del tratamiento con Endo-H fueron eluidos y tratados con α -manosidasa; los productos de la digestión fueron analizados por cromatografía en papel con solvente D. En la Fig. 17C se observa el resultado obtenido con el oligosacárido de C. fasciculata. Tal como se esperaba, se observa manosa y un pequeño pico que corre ligeramente detrás de manosa y que coincide con un standard de $\text{Man}(\beta\text{1}\rightarrow\text{4GlcNAc}$. El mismo resultado se obtuvo con los oligosacáridos de los demás organismos estudiados. La identidad del disacárido ManGlcNAc fue confirmada en el caso de C. fasciculata, eluyendo dicho compuesto e incubándolo con una preparación enzimática de oviducto de gallina que contenía actividades de α - y β -manosidasa, y analizando los productos por cromatografía en papel con solvente A. Como se ve en la Fig. 17E, este tratamiento liberó manosa y N-acetilglucosamina.

Como se discutió en la sección anterior, el oligosacárido II de L. adleri era resistente a Endo-H. En la Fig. 17D se presenta el perfil cromatográfico obtenido luego de incubar dicho oligosacárido con α -manosidasa. Se observa un pico de manosa y un segundo pico que comigra con un standard de ManGlcNAc_2 , entre standards de Man_2 y Man_3 .

3.2.4. Acetólisis

La acetólisis es un tratamiento que produce la ruptura preferencial de uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$ entre residuos de manosa (114). Los oligosacáridos unidos a Dol-P-P previamente tratados con Endo-H fueron sometidos a acetólisis, y los fragmentos obtenidos fueron analizados por cromatografía en papel con solvente D. Los resultados obtenidos con los oligosacáridos de B. culicis, L. adleri, L. samueli y C. fasciculata se presentan en la Fig. 18. Se sugiere al lector consultar la Fig. 45 para la mejor comprensión de lo que sigue. El producto de la acetólisis del oligosacárido Man₆GlcNAc de L. samueli se observa en la Fig. 18A. El mismo perfil se obtuvo para los oligosacáridos de T. conorhini, T. dionisii, H. muscarum y H. samuelpeessoai. Se observan tres picos que comigran con standards de Man₂, Man₃ y Man₄GlcNAc. Este resultado es compatible con la estructura propuesta en la Fig. 45 para estos oligosacáridos.

En el caso del compuesto de composición Man₆GlcNAc de B. culicis (Fig. 18B) se observan dos picos predominantes: Man₂ y Man₄GlcNAc. El mismo perfil se obtuvo para el oligosacárido I de L. adleri. La pequeña cantidad de manosa observada en las Figs. 18A-B se debe a acetólisis inespecífica y no debe ser tomada en cuenta para el análisis estructural.

El perfil cromatográfico de los productos de acetólisis del oligosacárido II de L. adleri muestra tres picos principales (Fig. 18C): manosa, Man₄GlcNAc y un compuesto que corre un poco menos que Man₄GlcNAc. Como se recordará (ver sección 3.2.2.), el oligosacárido II de L. adleri era resistente a Endo-H. Por lo tanto, habría que esperar la formación de

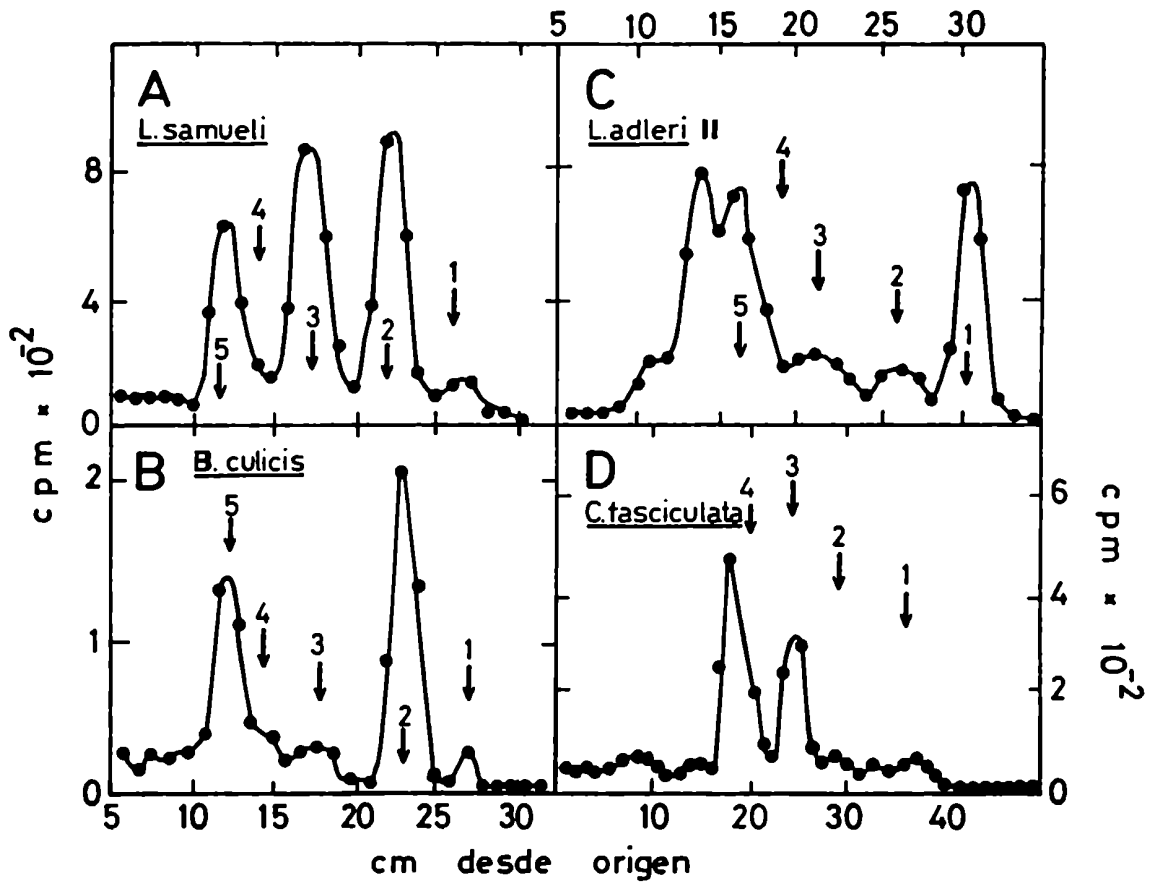


Figura 18. Acetólisis. Los oligosacáridos previamente unidos a Dol-P-P fueron incubados con Endo-H y luego de separar la N-acetilglucosamina por cromatografía en papel, sometidos a acetólisis. Los productos de acetólisis fueron separados por cromatografía en papel con solvente D. A, L. samueli; B, B. culicis; C, L. adleri II; D, C. fasciculata.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄; 5, Man₄GlcNAc.

Man₄GlcNAc₂ en vez de Man₄GlcNAc por acetólisis. El pico que corre detrás de Man₄GlcNAc es Man₄GlcNAc₂; la formación de Man₄GlcNAc se explica porque las condiciones de la acetólisis producen una ruptura parcial del enlace entre los dos residuos de N-acetilglucosamina.

Por último, la acetólisis del oligosacárido de C. fasciculata (Fig. 18D) produce Man₃ y Man₄GlcNAc, tal como ya ha sido descrito (87).

3.2.5. Electroforesis en molibdato de fragmentos de acetólisis

Si las estructuras propuestas en la Fig. 45 fuesen correctas, los di y trisacáridos obtenidos por acetólisis de los oligosacáridos deberían tener las siguientes estructuras: Man α 1 \rightarrow 2Man y Man α 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 3Man para Man₂ y Man₃ respectivamente de T. dionisii, T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpessoai y L. samueli; Man α 1 \rightarrow 2Man α 1 \rightarrow 3Man para Man₃ de C. fasciculata y Man α 1 \rightarrow 3Man para Man₂ de B. culicis y L. adleri (1). Un método para determinar la sustitución del azúcar del extremo reductor de un oligosacárido consiste en reducirlo y someterlo a electroforesis en molibdato de sodio (pH 5). Si la sustitución es en C3, el oligosacárido no migrará en la electroforesis; si la sustitución está en cualquier otra posición, el oligosacárido reducido migrará hacia el ánodo (115). Según este criterio, Man₃-01 de C. fasciculata y Man₂-01 de B. culicis y L. adleri (1) deberían ser neutros en molibdato, al igual que Man₃-01 de T. dionisii, T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpessoai y L. samueli, mientras que Man₂-01 obtenido de estos últimos deberá comportarse como un anión. Los di y trisacáridos obtenidos por acetólisis de los oligosacáridos previamente unidos a Dol-P-P fueron reducidos con NaBH₄ y sometidos a electroforesis en papel con molibdato de sodio a pH 5. Los

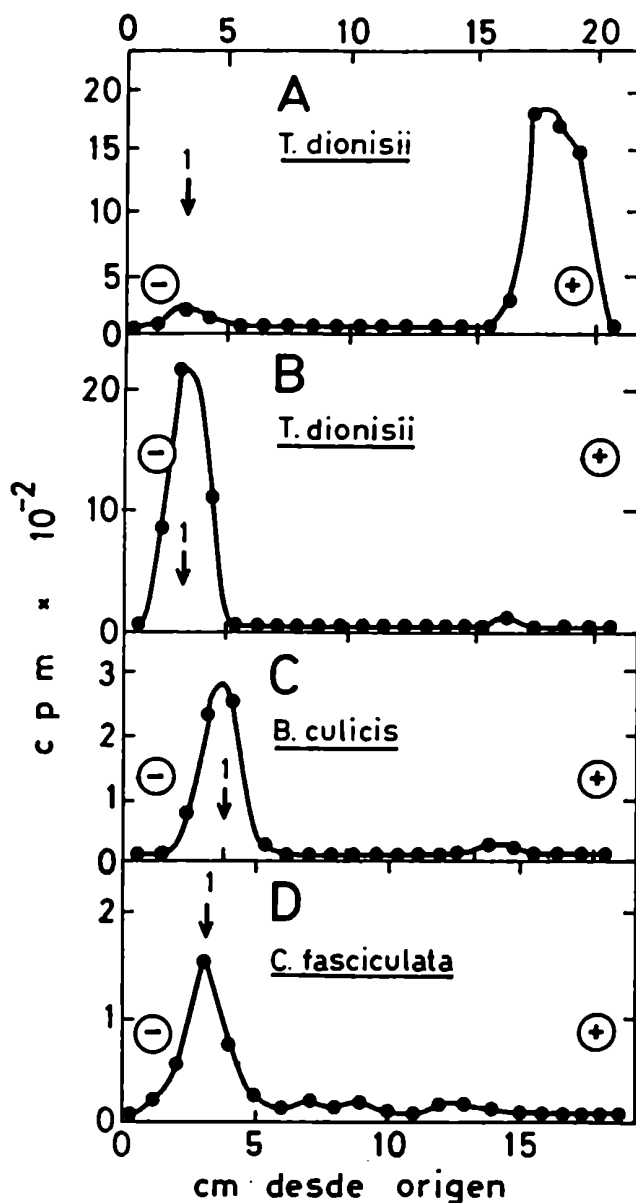


Figura 19. Electroforesis en molibdato. Los oligosacáridos obtenidos por acetólisis fueron reducidos con NaBH₄ y corridos en electroforesis en molibdato de sodio 0,1 M, pH 5. A, Man₂ de T. dionisii; B, Man₃ de T. dionisii; C, Man₂ de B. culicis; D, Man₃ de C. fasciculata.

Standard: 1, glucosa.

resultados se presentan en la Fig. 19. Como puede observarse en la Fig. 19A, Man₂-ol de T. dionisii migró hacia el ánodo, tal como se había predicho; lo mismo se observó para Man₂-ol de T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpeessoai y L. samueli; en cambio, Man₂-ol de B. culicis resultó neutro (Fig. 19C), al igual que Man₂-ol de L. adleri (I), de acuerdo con lo esperado. En cuanto a los trisacáridos, en las Figs. 19B y 19D se observa que Man₃-ol de T. dionisii y C. fasciculata, respectivamente, resultaron neutros. Idéntico resultado se obtuvo en los casos de T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpeessoai y L. samueli, como correspondería esperar según la estructura propuesta en la Fig. 45.

3.2.6. Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos en presencia de glucosa

Existen evidencias de que la carencia de glucosa o el ayuno energético en cultivos de ciertas células animales provoca la acumulación de un oligosacárido unido a Dol-P-P de menor tamaño (17-19). Este oligosacárido tiene la composición Man₅GlcNAc₂. Se observa también la formación de pequeñas cantidades de Glc₃Man₅GlcNAc₂, siendo este oligosacárido el transferido a proteínas.

El medio de cultivo utilizado para la marcación de células de tripanosomátidos contenía piruvato como fuente de carbono, aminoácidos, vitaminas y sales, pero carecía de glucosa. Podría argumentarse que la obtención de oligosacáridos unidos a Dol-P-P carentes de glucosa y de tamaños menores que los "normales" se debe al ayuno de glucosa a que son sometidas las células, análogamente a lo descrito en células animales. Para descartar esta posibilidad, células de C. fasciculata fueron lavadas y marcadas con (U-¹⁴C)glucosa

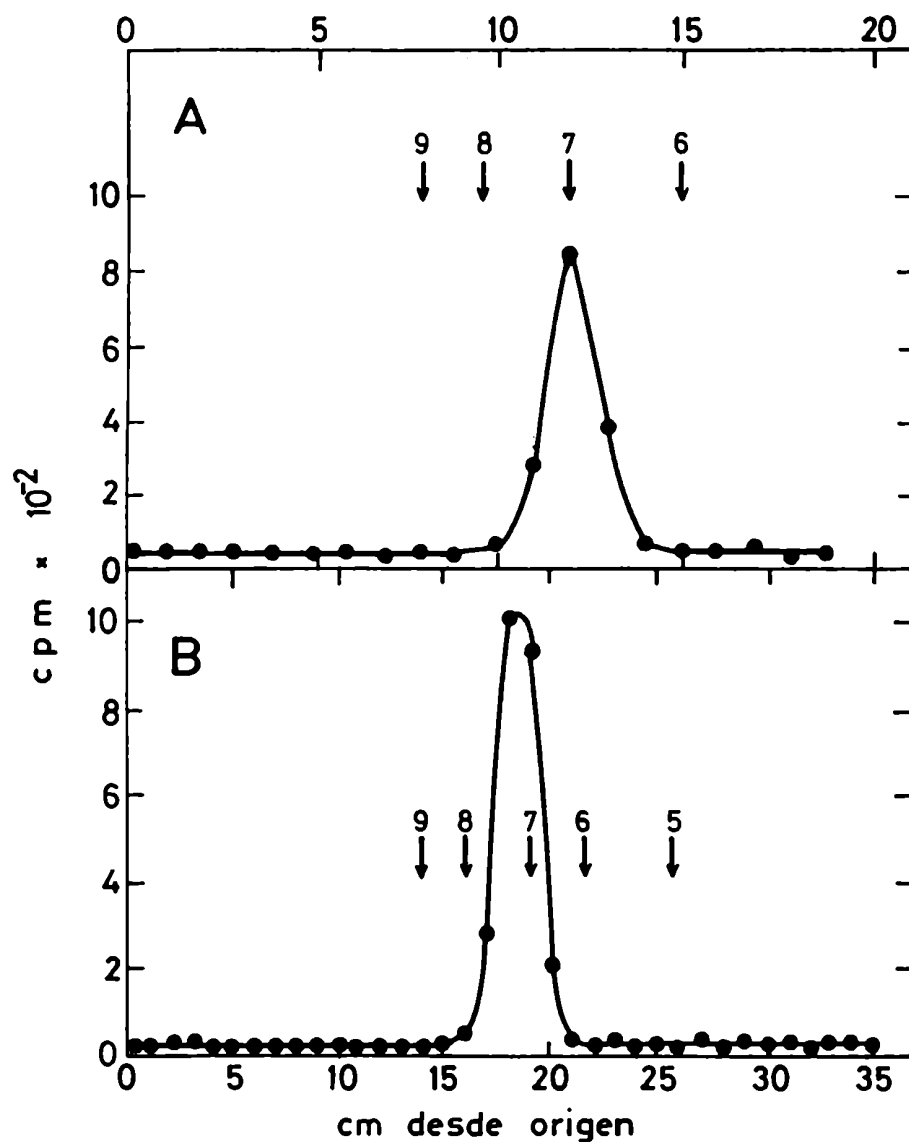


Figura 20. Dol-P-P-oligosacáridos sintetizados en presencia de glucosa y antibióticos. A. Células de C. fasciculata (1 g) fueron incubadas con 425 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa durante 10 min en 3,2 ml de medio de incubación conteniendo 5,5 mM glucosa. B. Células de C. fasciculata fueron incubadas durante 5 min con (U-¹⁴C)glucosa, después de lo cual se agregó al medio de incubación cicloheximida y puromicina (ver sección 2.2.4.), y la incubación se continuó por 5 min más. En ambos casos los oligosacáridos previamente unidos a Dol-P-P fueron aislados y analizados por cromatografía en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 15.

en un medio en el cual el piruvato de sodio fue reemplazado por glucosa 5,5 mM. Los oligosacáridos unidos a Dol-P-P fueron aislados y analizados por cromatografía en papel con solvente C. Como se ve en la figura 20A, aun en presencia de glucosa, el único oligosacárido sintetizado es $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Un tratamiento de este compuesto con Endo-H seguido por uno con α -manosidasa resultó en la formación de manosa y ManGlcNAc , confirmándose así que el oligosacárido no estaba glucosilado. Puede descartarse, entonces, un artificio debido a ayuno de glucosa.

3.2.7. Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas

Otra explicación posible para la ausencia de oligosacáridos glucosilados unidos a Dol-P-P podría ser la siguiente: la transferencia de residuos de glucosa al Dol-P-P-oligosacárido podría ser seguida de manera casi instantánea por la transferencia del oligosacárido a la proteína. De este modo, la vida media del oligosacárido glucosilado unido a Dol-P-P sería muy breve, y sus niveles intracelulares extremadamente bajos, haciendo imposible su detección.

Si bien esta explicación resulta poco verosímil, ya que parece poco probable que se de la misma situación en varios organismos diferentes, se realizó un experimento para descartarla, el cual será descrito a continuación.

Siendo la glicosilación de proteínas un proceso co-traducciona, la interrupción de la biosíntesis de proteínas mediante el empleo de inhibidores específicos debería producir una acumulación de Dol-P-P-oligosacáridos, ya

que no existirían aceptores proteicos para la glicosilación. De hecho este fenómeno ha sido observado en células animales, donde se acumula $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (116, 117). En nuestro caso, la inhibición de la síntesis proteica debería resultar en una acumulación de $\text{Dol-P-P-oligosacáridos}$, permitiendo la detección de oligosacáridos glucosilados en caso de que existieran.

Células de C. fasciculata fueron incubadas con ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa durante 5 minutos, al cabo de lo cual se agregó al cultivo cicloheximida y puromicina en concentraciones suficientes para inhibir totalmente la síntesis proteica en protozoarios (118, 119). La incubación se continuó durante 5 minutos más y luego se extrajeron y purificaron los $\text{Dol-P-P-oligosacáridos}$ de la muestra y de un control, que consistió en incubar células en idénticas condiciones con ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa durante 10 minutos en ausencia de antibióticos. La eficacia de la acción de los antibióticos fue verificada incubando células en un medio libre de metionina, midiendo la incorporación de (^{35}S)metionina a material insoluble en ácido tricloroacético en presencia y ausencia de los antibióticos.

En la tabla I se observa que los antibióticos produjeron un 90% de inhibición de la síntesis proteica. En esas condiciones, la radioactividad incorporada a la porción sacarídica de los $\text{Dol-P-P-oligosacáridos}$ aumentó 2,8 veces. Es decir, se logró el efecto de acumulación deseado. Como se ve en la Fig. 20B, el oligosacárido unido a Dol-P-P resultó tener la composición $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ independientemente de la presencia de inhibidores de la síntesis proteica. Puede concluirse entonces, que la ausencia de derivados glucosilados de Dol-P-P no se debe a la rapidez de su recambio en la célula, sino a

Tabla I. Efecto de antibióticos sobre la síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos en C. fasciculata.

Adición	Radioactividad incorporada a la parte sacarídica de Dol-P-P-oligosacáridos a partir de (U- ¹⁴ C)glucosa (cpm)	%	Radioactividad incorporada a proteínas a partir de (³⁵ S)Metionina (cpm)	%
Ninguna	22.000	100	2.570.000	100
Cicloheximida (50 µg/ml) + Puromicina (50 µM)	52.000	280	256.000	10

Para detalles experimentales, ver sección 2.2.4.

que estas células son incapaces de glucosilar oligosacáridos unidos a Dol-P-P.

3.3. Caracterización de oligosacáridos unidos a proteínas

3.3.1. Crithidia fasciculata

3.3.1.1. Obtención de glicopéptidos. Sensibilidad a Endo-H

Células de C. fasciculata fueron incubadas durante tiempos variables con (U-¹⁴C)glucosa y las incubaciones fueron detenidas mediante una partición CHCl₃:CH₃OH:H₂O (3:2:1). La interfase de dicha partición contenía la proteína desnaturalizada. Dicha interfase fue extraída con CHCl₃:CH₃OH:H₂O (1:1:0,3) para obtener los Dol-P-P-oligosacáridos y la interfase proteica delipidada fue digerida exhaustivamente con una proteasa. El proteolizado fue sometido a una cromatografía de exclusión en Bio-Gel P-6 y se recogieron las fracciones correspondientes a glicopéptidos de entre 3 y 15 residuos de azúcar aproximadamente. Las mismas fueron sometidas a electroforesis en papel en ácido fórmico 5%. El pico cargado positivamente se eluyó del papel. Las sustancias contenidas en dicho pico constituyen la fracción denominada "glicopéptidos purificados". Los glicopéptidos purificados fueron tratados con Endo-H y sometidos a una nueva electroforesis en medio ácido. El pico neutro de la segunda electroforesis contiene los oligosacáridos que fueron liberados del péptido por la enzima. Se denominarán "oligosacáridos sensibles a Endo-H". Aquellos que no fueron liberados por la enzima, continúan unidos al péptido y presentan carga positiva también en la segunda electroforesis. Se denominarán

"oligosacáridos resistentes a Endo-H".

Aproximadamente el 65% de los oligosacáridos unidos a proteína en C. fasciculata son sensibles a Endo-H. Esta proporción se alcanzó a partir de los 10 min de marcación con (U-¹⁴C)glucosa y se mantuvo constante para tiempos mayores. La incorporación de radioactividad a oligosacáridos sensibles a Endo-H fue lineal hasta las 3 horas de incubación. La aparición de la resistencia a Endo-H es un fenómeno sumamente rápido. Como se verá más adelante (Fig. 27B), a los 5 minutos de marcación ya se ha alcanzado la proporción final de resistencia a Endo-H.

Se presentará a continuación el análisis de los oligosacáridos sensibles a Endo-H. El estudio de los oligosacáridos resistentes a Endo-H se presentará en una sección posterior.

3.3.1.2. Tamaño de oligosacáridos sensibles a Endo-H

Los oligosacáridos sensibles a Endo-H aislados de células de C. fasciculata incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante tiempos superiores a 10 min fueron sometidos a cromatografía en papel con solvente C. Como se observa en la Fig. 21A, los mismos presentaron una migración cromatográfica ligeramente superior a la de un standard de Man₇GlcNAc.

3.3.1.3. Sensibilidad a α -manosidasa. Composición de azúcares

Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. fasciculata fueron incubados con α -manosidasa y los productos de la incubación fueron corridos en cromatografía en papel con solvente D. Como se observa en la Fig. 21B, se

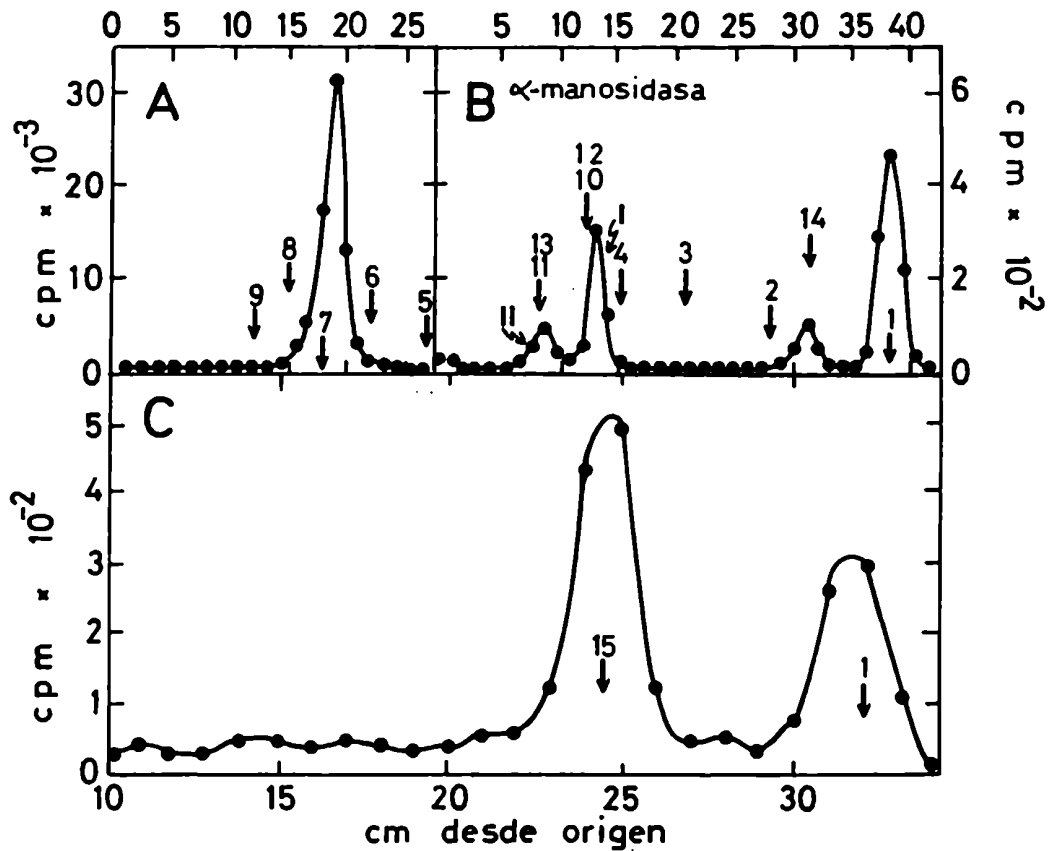


Figura 21. Oligosacáridos sensibles a Endo-H de *C. fasciculata*. A. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados de 6 g de células de *C. fasciculata* incubadas en 10 ml de medio de incubación conteniendo 300 μ Ci de (U - 14 C)glucosa durante 3 h y sometidos a cromatografía en papel con solvente C. B. El pico de A fue eluido y digerido con α -manosidasa. Los productos de la degradación fueron cromatografiados en papel con solvente D. C. El pico I de B fue eluido y sometido a hidrólisis ácida total. Los productos de la hidrólisis fueron corridos en papel con solvente A.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄; 5, Man₅GlcNAc; 6, Man₆GlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; 8, Man₈GlcNAc; 9, Man₉GlcNAc; 10, Glc₁Man₄GlcNAc; 11, Glc₁Man₅GlcNAc; 12, Gal₁Man₄GlcNAc; 13, Gal₁Man₅GlcNAc; 14, ManGlcNAc; 15, galactosa.

obtuvo manosa y el disacárido ManGlcNAc que corre entre Man y Man₂. Además, se observan dos picos de menor movilidad que corren detrás de un standard de Man₄ (designados I y II en la Fig. 21B). El pico designado en la Fig. 21B como II es en realidad un producto de degradación incompleta ya que al eluirlo, reincubarlo con α -manosidasa y recromatografiarlo, se obtuvo manosa y el pico I.

El pico I se eluyó del cromatograma y se sometió a hidrólisis ácida total. Los productos se corrieron en cromatografía en papel con solvente A. Como se observa en la Fig. 21C se obtuvo manosa y galactosa.

Puede observarse en la Fig. 21B que el compuesto presente en el pico I corre ligeramente delante de un standard de Gal₁Man₄GlcNAc. Como se verá más adelante, el compuesto presente en dicho pico tiene también la composición Gal₁Man₄GlcNAc. La diferencia entre la migración cromatográfica del standard y aquella del compuesto I se debe a que en este último caso, el residuo de galactosa se encuentra en configuración furanósica (ver la próxima sección), mientras que en el standard, dicho residuo está en configuración piranósica.

Los resultados obtenidos sugieren que el pico de oligosacáridos sensibles a Endo-H de la Fig. 21A está formado en realidad por dos compuestos: uno, de composición Man₇GlcNAc, totalmente sensible a α -manosidasa, y el segundo de composición probable Gal₁Man₆GlcNAc, parcialmente resistente a la enzima.

3.3.1.4. Detección de residuos de galactofuranosa

Para continuar con el análisis estructural se hacía necesario separar los oligosacáridos sensibles a Endo-H, es decir, el que contenía galactosa del que no la tenía. Para ello se intentó retener al oligosacárido galactosilado por medio de lectinas específicas para galactosa. Sin embargo, las lectinas de Ricinus communis o de soja fueron incapaces de ligar al oligosacárido; asimismo la lectina específica para galactósidos de corazón de buey (120) no reconoció al oligosacárido galactosilado. Por otra parte, los residuos de galactosa no fueron liberados por incubación con α - o β -galactosidasas, ni pudieron ser oxidados con galactosa oxidasa.

Todos estos resultados negativos llevaron a pensar que los residuos de galactosa podrían encontrarse en una configuración diferente de la piranósica, la cual es la más común, v.g. en configuración furanósica.

Los azúcares furanósicos pueden reconocerse en base a dos propiedades: elevada sensibilidad a hidrólisis ácida y elevada sensibilidad a la oxidación por NaIO_4 . Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. fasciculata fueron sometidos a un tratamiento ácido en condiciones en que los enlaces glicosídicos que involucran azúcares furanósicos se hidrolizan totalmente, mientras que las uniones glicosídicas de azúcares piranósicos son respetadas (100).

Los productos de la hidrólisis fueron sometidos a cromatografía en papel con solvente A. Como se observa en la Fig. 22A este tratamiento liberó galactosa, pero no liberó manosa. Las sustancias que permanecieron en el origen en la Fig. 22A fueron eluidas y tratadas con α -manosidasa. En la Fig. 22B

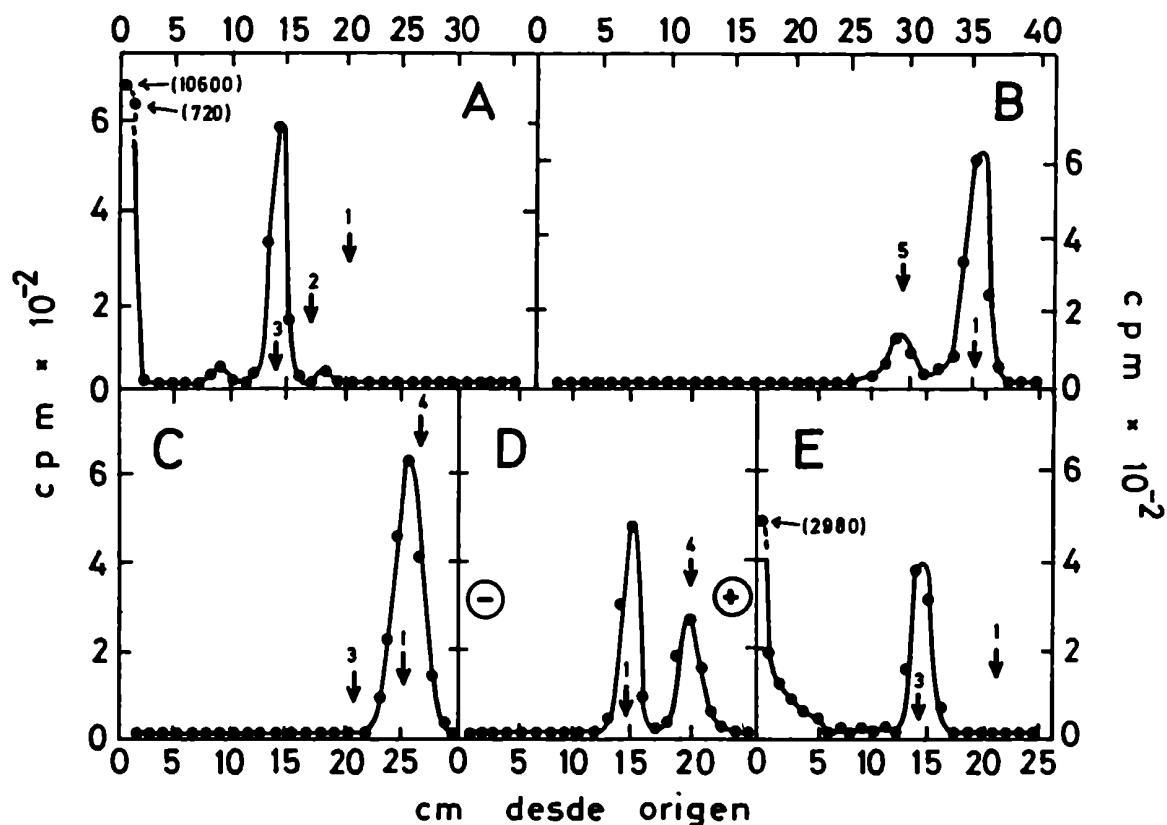


Figura 22. Detección de residuos de galactofuranosa. A. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de *C. fasciculata* (Fig. 21A) fueron sometidos a hidrólisis ácida suave, y los productos fueron cromatografiados en papel con solvente A. B. Las sustancias que permanecieron en el origen en A fueron eluidas, digeridas con α -manosidasa y cromatografiadas en papel con solvente D. C. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de *C. fasciculata* fueron sometidos a oxidación suave con NaIO_4 , reducción e hidrólisis. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente A. D. Las sustancias presentes en el pico de C, fueron eluidas y corridas en electroforesis en papel en bórax 1,9%, pH 9. E. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de *C. fasciculata* fueron incubados con β -galactofuranosidasa de *P. charlesii*, y los productos de la incubación fueron cromatografiados en papel con solvente A.

Standards: 1, manosa; 2, Man_2 ; 3, Man_3 ; 4, Man_4 ; 5, glucosa; 6, galactosa; 7, arabinosa.

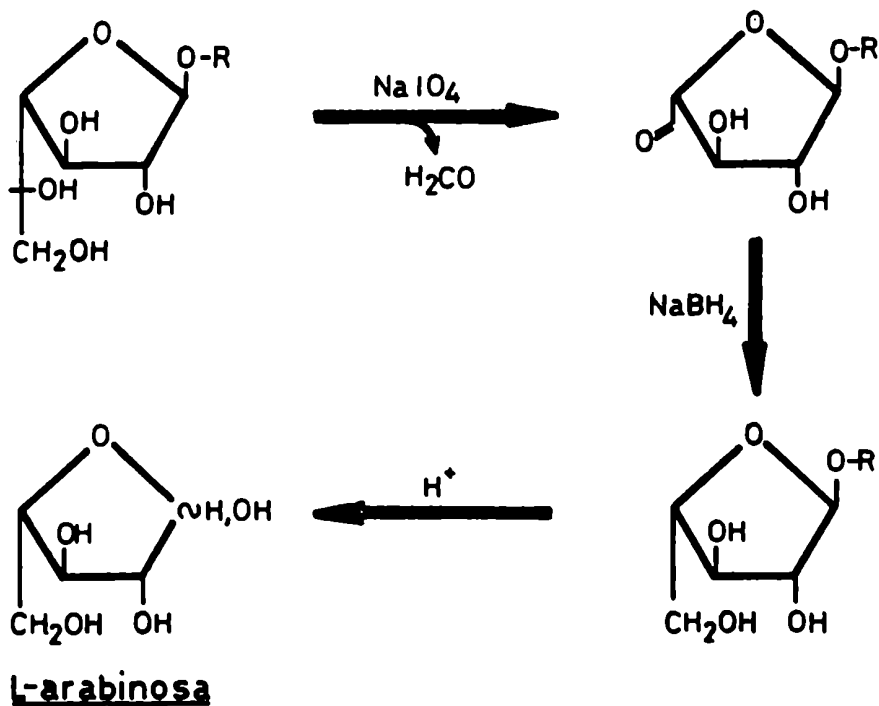


Figura 23. Esquema de la reacción de oxidación suave con NaIO₄ de galactofuranosa.

se observa el resultado: se obtuvo solamente manosa y ManGlcNAc, lo cual demuestra que la totalidad de los residuos de galactosa fue liberada por el tratamiento ácido suave.

Las aldohexosas en configuración furanósica presentan un diol exocíclico entre C5 y C6. Dicho diol exocíclico es más sensible a la oxidación por NaIO₄ que los dioles endocíclicos. De este modo, si la galactosa se encontrase en configuración furanósica, la oxidación suave por NaIO₄ debería remover el C6 produciendo formaldehído. La reducción del azúcar resultante deberá dar lugar a la formación de la pentosa correspondiente, en este caso L-arabinosa, la cual puede ser identificada luego de hidrólisis ácida. El esquema de la reacción se presenta en la Fig. 23.

Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. fasciculata fueron sometidos a oxidación con NaIO₄ en condiciones tales de producir solamente la oxidación del diol exocíclico de hexosas furanósicas (100). Después de la oxidación los productos fueron reducidos con NaBH₄, sometidos a hidrólisis ácida y cromatografiados en papel con solvente A. Como se observa en la Fig. 22C la galactosa desaparece luego de este tratamiento. Como en este sistema cromatográfico la manosa y la arabinosa comigran, el pico de monosacáridos fue eluido y corrido en electroforesis en papel en bórax 1,9%, pH 9 (Fig. 22D). Se observa claramente un pico de arabinosa.

Por último, la incubación de oligosacáridos sensibles a Endo-H con β -galactofuranosidasa de Penicillium charlesii (121) liberó galactosa (Fig. 22E). Todos estos resultados demuestran que los oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. fasciculata contienen residuos de galactosa furanósica, y que éstos se encuentran en configuración anomérica β .

3.3.1.5. Análisis estructural de oligosacáridos sensibles a Endo-H

Como se explicó en la sección anterior, un tratamiento ácido suave produce la degalactosilación de los oligosacáridos sensibles a Endo-H. Los oligosacáridos así tratados fueron sometidos a cromatografía en papel con solvente C. Como se observa en la Fig. 24A se observan dos picos, que comigran con standards de Man₇GlcNAc y Man₆GlcNAc. Idéntico resultado se obtuvo con los oligosacáridos resultantes del tratamiento con β-galactofuranosidasa. Este resultado confirma la suposición de que la composición de los oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. fasciculata es Man₇GlcNAc y Gal₁Man₆GlcNAc.

Los oligosacáridos sometidos a tratamiento ácido suave fueron eluidos y sometidos a acetólisis. Se sugiere consultar la Fig. 46 para la mejor comprensión de los resultados. En la Fig. 24B se observan los productos de acetólisis de Man₇GlcNAc. Se obtuvo el mismo perfil que en el caso de Man₇GlcNAc obtenido a partir del Dol-P-P-oligosacárido (ver Fig. 18D), es decir, Man₃ y Man₄GlcNAc.

En base a las estructuras de Man₇GlcNAc, hay dos estructuras posibles para Man₆GlcNAc, dependiendo de cuál de los dos extremos no reductores perdió un residuo de manosa. En uno de los casos los productos de acetólisis deberían ser Man₂ y Man₄GlcNAc, mientras que en el otro caso habría que esperar la formación de Man₃ y Man₃GlcNAc por acetólisis (ver Fig. 46). Como puede verse en la Fig. 24C, la acetólisis de Man₆GlcNAc produjo cuatro picos: Man₂, Man₃, Man₄GlcNAc y un pico que corre entre los standards de Man₃ y Man₄GlcNAc, como Man₃GlcNAc. Este resultado demuestra que estamos en presen-

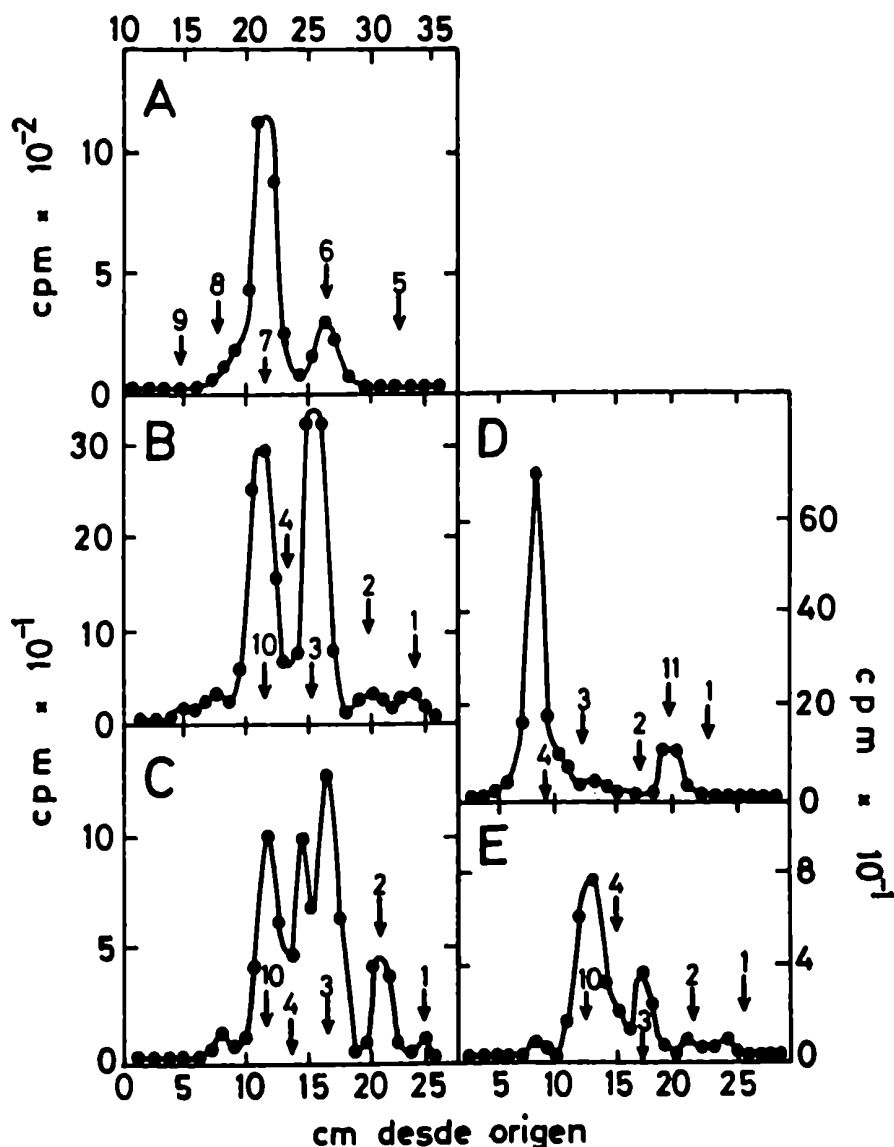


Figura 24. Análisis estructural. A. Los compuestos que permanecieron en el origen en la Fig. 22A fueron eluidos y cromatografiados con solvente C. B, C. Las sustancias que migraron como $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ en A (paneles B y C respectivamente) fueron eluidas y sometidas a acetólisis; los productos de acetólisis fueron cromatografiados en papel con solvente D. D. El pico I de la Fig. 21B fue sometido a hidrólisis ácida suave y cromatografía en papel con solvente D. E. El pico de menor movilidad cromatográfica de D fue eluido y acetolizado. Los productos de la acetólisis fueron cromatografiados en papel con solvente D.

Standards: 1, manosa; 2, Man_2 ; 3, Man_3 ; 4, Man_4 ; 5, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$; 6, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$; 7, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$; 8, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$; 9, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$; 10, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$; 11, galactosa.

cia de los dos isómeros posibles de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$.

El hecho de haber detectado dos oligosacáridos de composición $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ sugiere que deben ser dos los oligosacáridos de composición $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$. Para demostrar esto, los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron incubados con α -manosidasa y el material resistente a la enzima (Pico I, Fig. 21B) fue sometido a hidrólisis ácida suave y cromatografía en papel con solvente D. Como se observa en la Fig. 24D, se obtuvo galactosa y un compuesto que migró un poco menos que un standard de Man_4 , es decir como $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Esto demuestra que el residuo de galactofuranosa se encontraba en el extremo no reductor en los oligosacáridos de composición $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$, puesto que si hubiese estado en cualquier otra posición, el material resistente a α -manosidasa debería haber presentado una movilidad cromatográfica superior a la de $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ (ver Fig. 46). Si el residuo de galactosa hubiera estado unido a la rama del oligosacárido que no contiene uniones $\alpha 1 \rightarrow 6$, el $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ obtenido de este modo debería ser resistente a acetólisis. En cambio, si la galactosa hubiese estado unida a la otra rama, los productos de acetólisis de $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ deberían ser Man_3 y Man GlcNAc (ver Fig. 46).

El pico que corría como $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ en la Fig. 24D fue eluido y sometido a acetólisis, y los productos fueron corridos en cromatografía en papel con solvente D. Los resultados se presentan en la Fig. 24E. Se observan claramente un pico de $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y uno de Man_3 . Se ha observado con frecuencia que la recuperación del fragmento que contiene el residuo de N-acetilglucosamina después de la acetólisis es baja; por otra parte, el residuo de manosa más interno (o sea, el que debe aparecer en el disacárido

ManGlcNAc), se marca poco "in vivo". Debido a estas dos razones, el pico de ManGlcNAc, es apenas visible entre los standards de manosa y Man₂. Este resultado confirma la existencia de dos isómeros de Gal₁Man₆GlcNAc, cuyas estructuras pueden verse en la Fig. 46.

3.3.1.6. Oligosacáridos de existencia transitoria

Los resultados presentados hasta aquí se obtuvieron cuando las células de C. fasciculata fueron incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante tiempos relativamente largos (más de 10 min.).

Cuando la incubación se realizó durante tiempos más breves, o a baja temperatura, los oligosacáridos sensibles a Endo-H presentaron perfiles cromatográficos como los que se muestran en la Fig. 25A-D. Puede observarse que además del pico de Man₇GlcNAc + Gal₁Man₆GlcNAc ya descrito, aparece un nuevo pico de menor movilidad, que corre entre Man₇GlcNAc y Man₈GlcNAc. Como ya vimos, este pico no aparece en muestras de células incubadas por tiempos largos. Al eluir este nuevo pico e incubarlo con α -manosidasa, se obtuvo el perfil que se muestra en la Fig. 26A: manosa y dos oligosacáridos que corrieron como Glc₁Man₄GlcNAc y Glc₁Man₅GlcNAc. Debe destacarse que estos mismos productos se obtenían cuando oligosacáridos transitoriamente glucosilados de T. cruzi, L. mexicana, Phaseolus vulgaris, hígado de rata y tiroides bovina eran tratados con α -manosidasa (ver sección 1.1.3. y referencias 34-36 y 92). El oligosacárido de composición Glc₁Man₅GlcNAc es en realidad un producto de degradación incompleta, puesto que al eluirlo, reincubarlo con α -manosidasa y recromatografarlo, se obtuvo manosa y Glc₁Man₄GlcNAc.

La hidrólisis ácida de los oligosacáridos que corrían como

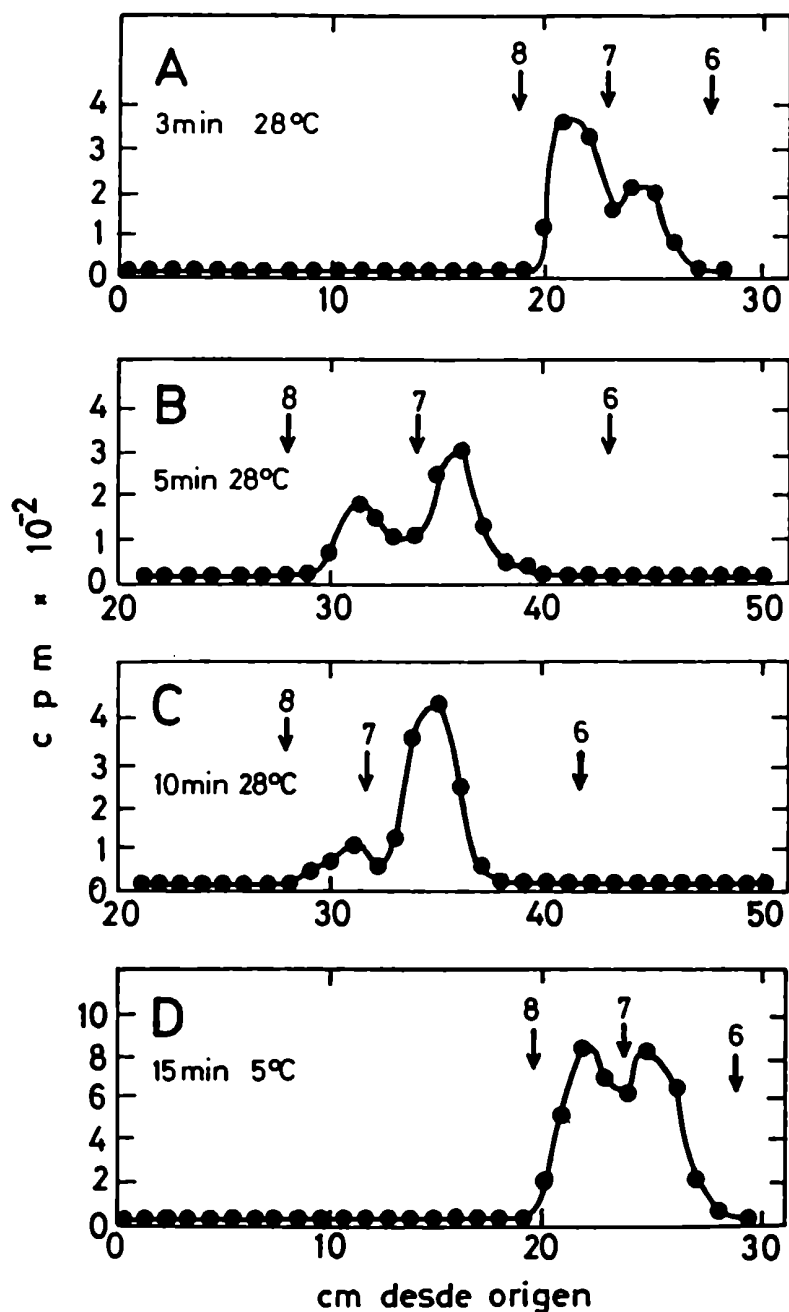


Figura 25. Oligosacáridos de existencia transitoria. Células de *C. fasciculata* (3,2 g) fueron resuspendidas en 8 ml de solución de marcación conteniendo 300 μCi de ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa; se retiraron alícuotas de 2 ml a los 3 min (A), 5 min (B), y 10 min (C) a 28°C. D. 1,2 g de células de *C. fasciculata* fueron resuspendidas en 3 ml de solución de marcación conteniendo 150 μCi de ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa e incubadas durante 15 min a 5°C. En todos los casos, los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y separados por cromatografía en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

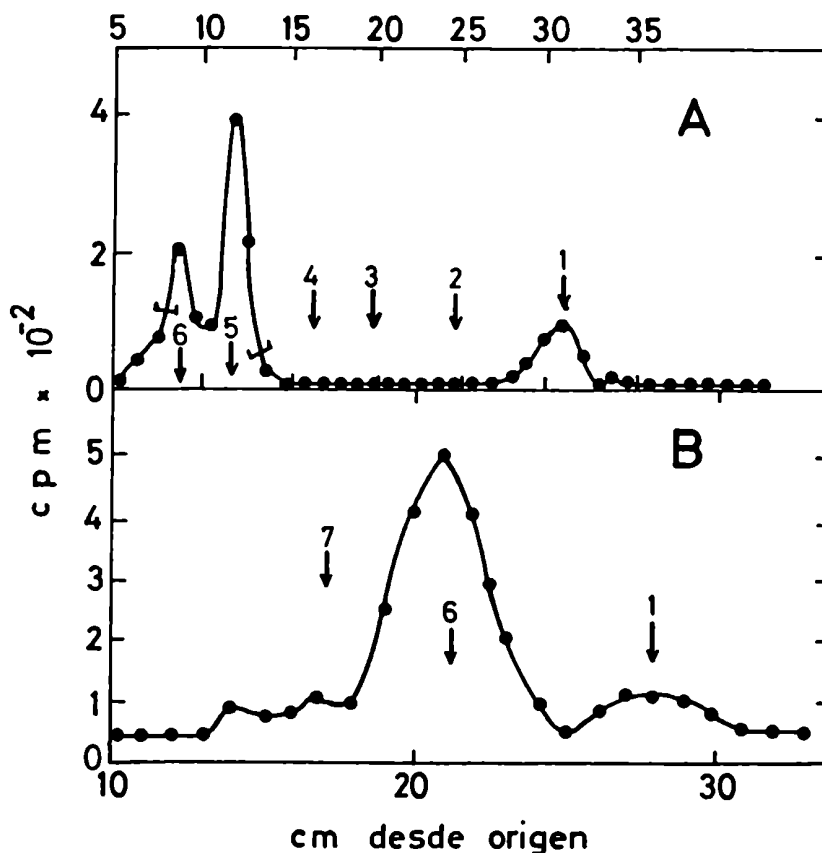


Figura 26. Composición del oligosacárido glucosilado. A. El compuesto que migró entre $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ en la Fig. 25A fue eluido y tratado con α -manosidasa. Los productos de la digestión fueron cromatografiados en papel con solvente D. B. Las sustancias señaladas entre corchetes en A fueron eluidas y sometidas a hidrólisis ácida total. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente B.

Standards: 1, manosa; 2, Man_2 ; 3, Man_3 ; 4, Man_4 ; 5, $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$; 6, glucosa; 7, galactosa.

Glc₁Man₄GlcNAc y Glc₁Man₅GlcNAc produjo glucosa (Fig. 26B). Este resultado demuestra que el mecanismo de glucosilación transitoria de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas funciona también en C. fasciculata.

3.3.1.7. Marcación de oligosacáridos sensibles a Endo-H con (2-³H)manosa

Cuando células de C. fasciculata fueron incubadas durante tiempos breves en presencia de (2-³H)manosa, se obtuvo un perfil cromatográfico de oligosacáridos sensibles a Endo-H como el que se muestra en la Fig. 27A. Prácticamente el mismo perfil se obtuvo luego de marcar las células durante 2,5 min, 5 min, 10 min y 15 min. Dos hechos merecen destacarse en esta figura; en primer lugar, el pico principal característico presenta una pequeña "cola" hacia la zona de menor movilidad. Esta "cola" podría contener al compuesto de composición Glc₁Man₇GlcNAc. Este hecho sugiere que los oligosacáridos transitoriamente glucosilados se encuentran en muy pequeña cantidad, y por eso sólo pueden ser detectados claramente cuando las células se incuban durante muy corto tiempo con (U-¹⁴C)glucosa, ya que en esas condiciones la actividad específica de los residuos de glucosa es mucho más alta que la de los residuos de manosa. En segundo lugar, se observa un pequeño pico que comigra con un standard de Man₆GlcNAc. Este compuesto podría ser el intermediario biosintético entre Man₇GlcNAc y Gal₁Man₆GlcNAc. Su escasa cantidad se explica suponiendo que la pérdida de un residuo de manosa del oligosacárido y la entrada de un residuo de galactosa son procesos casi simultáneos, de modo que nunca se acumula el compuesto intermedio de composición Man₆GlcNAc₂. No queda claro por qué no se detectó este compuesto cuando las células fueron marcadas con (U-¹⁴C)glucosa.

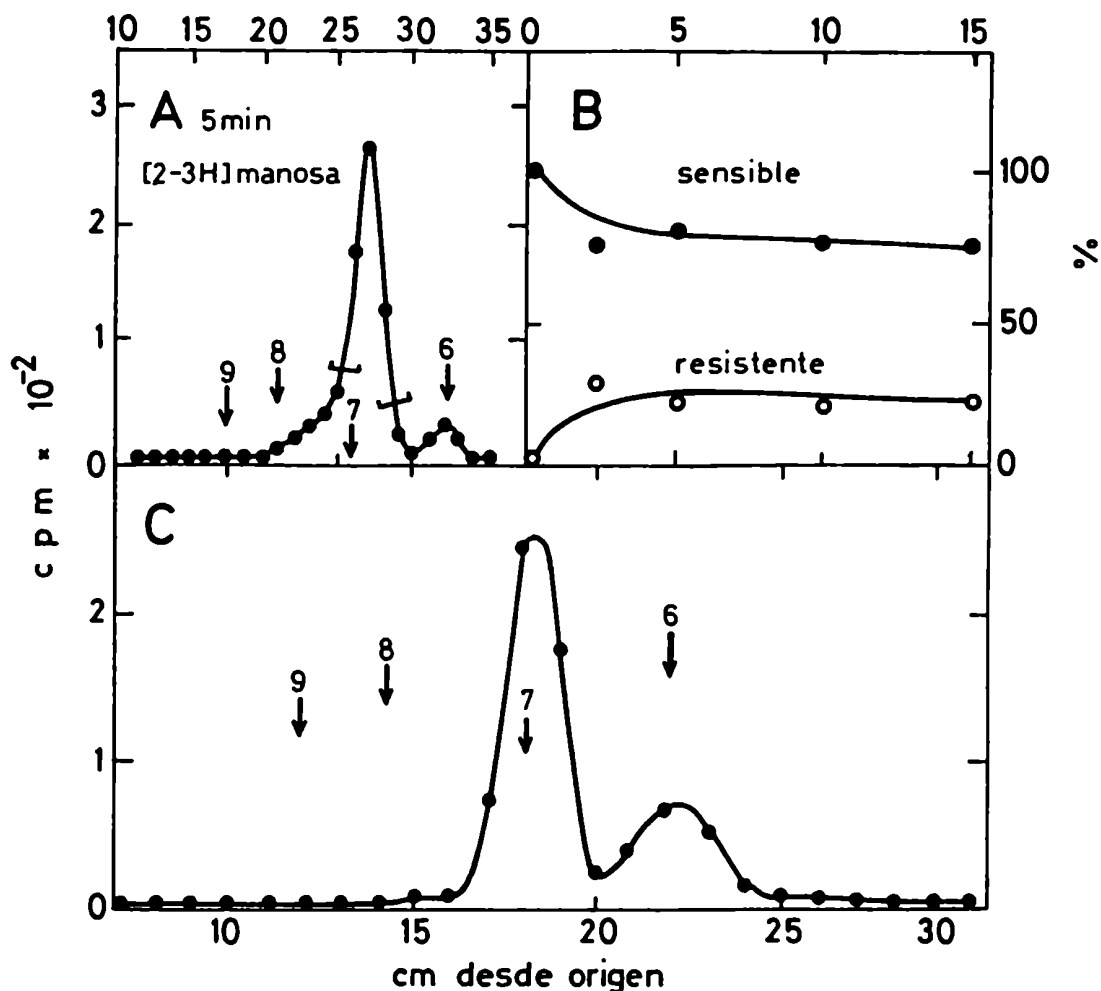


Figura 27. Marcación con (2-³H)manosa. Células de *C. fasciculata* (6 g) fueron resuspendidas en 11 ml de solución de marcación conteniendo 2 mCi de (2-³H)manosa a 28°C. Se retiraron alícuotas de 3 ml a los 2,5 y 5 min, y de 2 ml a los 10 y 15 min. El perfil cromatográfico en solvente C de los oligosacáridos sensibles a Endo-H de la muestra de 5 min se muestra en el panel A. B. Porcentaje de radioactividad sensible y resistente a Endo-H en cada una de las alícuotas. C. El material señalado entre corchetes en A fue eluido, sometido a hidrólisis ácida suave (sección 2.4.3.) y recromatografiado en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

Las sustancias presentes en el pico principal de la Fig. 27A fueron eluidas y sometidas a hidrólisis ácida suave. Como se recordará, este tratamiento produce la liberación de los residuos de galactofuranosa. Cuando el material así tratado se analizó por cromatografía en papel con solvente C, se observó la aparición de dos picos con movilidades correspondientes a $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (Fig. 27C). Esto demuestra que también en este caso estábamos en presencia de una mezcla de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$.

Como ya se mencionó (sección 3.3.1.1.), la aparición de la resistencia a Endo-H en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína en C. fasciculata es un hecho sumamente rápido. En la Fig. 27B se observa la cinética de aparición de resistencia a Endo-H luego de marcar células de C. fasciculata con $(2\text{-}^3\text{H})$ manosa. A los 5 min de marcación ya se ha alcanzado la proporción final. Aproximadamente el 70% de los oligosacáridos fueron sensibles a Endo-H en estas condiciones.

3.3.1.8. Oligosacáridos resistentes a Endo-H

Como se mencionó en la sección 3.3.1.1., después de marcar células de C. fasciculata con $(\text{U-}^{14}\text{C})$ glucosa durante tiempos superiores a 10 min, aproximadamente el 35% de los oligosacáridos unidos a proteína eran resistentes a Endo-H. Los glicopéptidos resistentes a Endo-H fueron totalmente resistentes a α -manosidasa y a β -galactofuranosidasa. Cuando estos compuestos fueron sometidos a hidrólisis ácida suave, se produjo liberación de material radioactivo que no migró en electroforesis en ácido fórmico 5% (Fig. 28A). Dicho material estaba constituido por galactosa y otra sustancia que no migraba en cromatografía en papel con solvente A (Fig. 28B). La oxidación

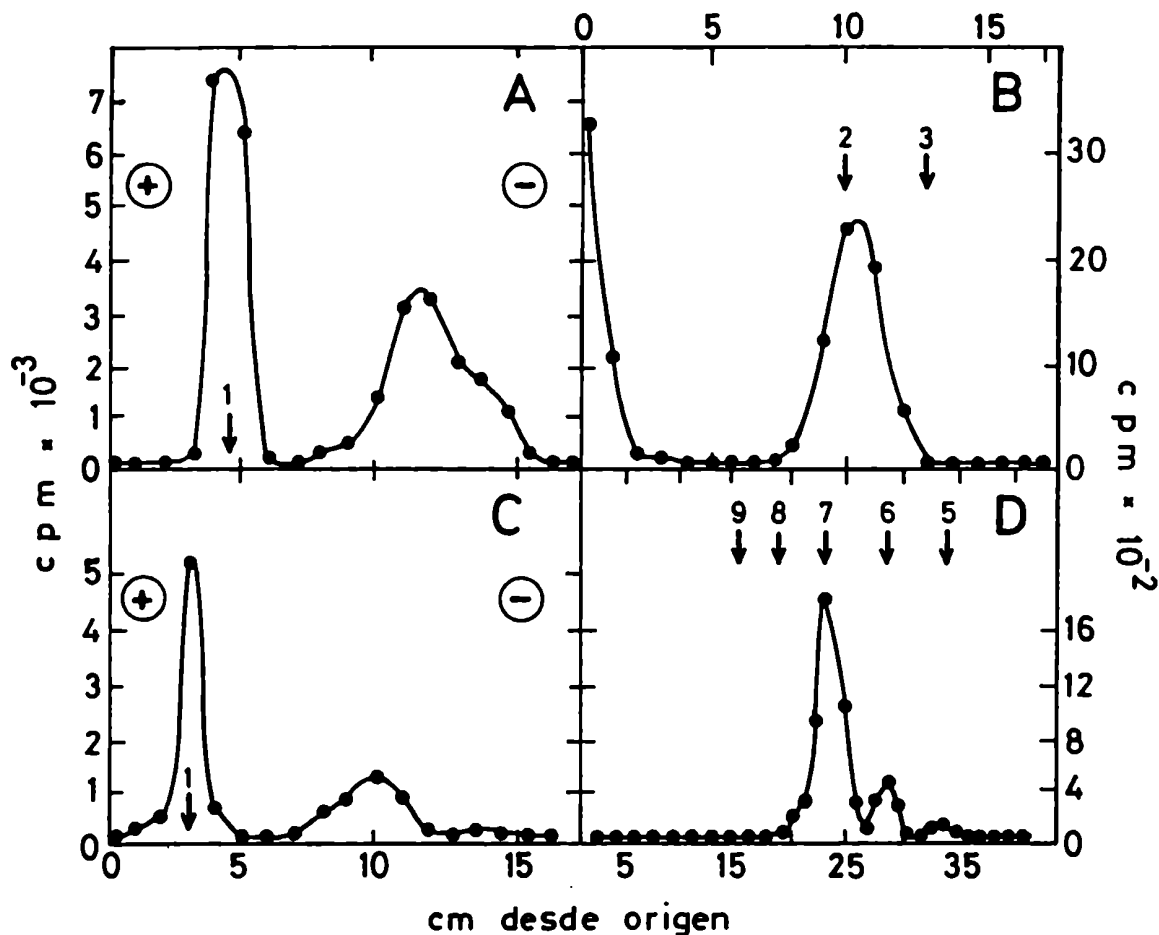


Figura 28. Oligosacáridos resistentes a Endo-H. A. Los glicopéptidos resistentes a Endo-H obtenidos de células de *C. fasciculata* incubadas en presencia de ($U-^{14}C$)glucosa en las condiciones de la Fig. 21A fueron sometidos a hidrólisis ácida suave y los productos fueron corridos en electroforesis en papel en ácido fórmico 5%. B. El pico neutro de A fue eluido y cromatografiado en papel con solvente A. C. El pico cargado de A fue eluido, incubado con Endo-H y sometido a una segunda electroforesis en papel en ácido fórmico 5%. D. El pico neutro de C fue eluido y cromatografiado en papel con solvente C.

Standards: 1, glucosa; 2, galactosa; 3, manosa; 5, $Man_5GlcNAc$; 6, $Man_6GlcNAc$; 7, $Man_7GlcNAc$; 8, $Man_8GlcNAc$; 9, $Man_9GlcNAc$.

suave de glicopéptidos resistentes a Endo-H con NaIO_4 y su posterior reducción e hidrólisis produjeron la transformación de la galactosa en arabinosa, demostrando que también en este caso los residuos de galactosa se encuentran en configuración furanósica. Los glicopéptidos que habían sido tratados con ácido se volvieron sensibles a Endo-H, tal como se observa por la aparición de un prominente pico neutro en electroforesis en ácido fórmico, luego de la incubación con la enzima (Fig. 28C). Los oligosacáridos liberados de esta forma corrieron como $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ en cromatografía en papel con solvente C (Fig. 28D), y fueron totalmente sensibles a α -manosidasa, liberando manosa y ManGlcNAc por digestión con la enzima. La acetólisis de estos compuestos produjo perfiles cromatográficos idénticos a los de la Fig. 24B,C, es decir, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ tiene la misma estructura que el oligosacárido aislado del Dol-P-P-derivado, y existen dos isómeros de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (sección 3.3.1.5.). Estos resultados sugieren que los oligosacáridos resistentes a Endo-H tienen la misma composición y estructura que los sensibles, pero que poseen además otro sustituyente, que es liberado por un tratamiento ácido suave, y que no migra en electroforesis en medio ácido ni en cromatografía en papel con solvente A. Este sustituyente conferiría a los oligosacáridos su resistencia a Endo-H, α -manosidasa y β -galactofuranosidasa. Su naturaleza química no ha sido establecida.

3.3.2. Oligosacáridos unidos a proteína en Crithidia hamosa

Los resultados obtenidos al marcar células de C. hamosa con $(\text{U}-^{14}\text{C})$ glucosa fueron muy similares a los obtenidos con C. fasciculata. En la Fig. 29A-B se observa el perfil cromatográfico de los oligosacáridos sen-

sibles a Endo-H obtenidos a partir de glicopéptidos de C. hamosa incubada con (U-¹⁴C)glucosa durante 10 minutos (Fig. 29A) o durante 20 min. + 80 min. de "chase" con medio de crecimiento completo (Fig. 29B). Se observa, como en el caso de C. fasciculata, un pico principal que corre apenas delante de un standard de Man₇GlcNAc. Otro pico más lento, que corre entre Man₇GlcNAc y Man₆GlcNAc, se observa en la muestra de 10 minutos de marcación. Este pico corresponde a Glc₁Man₇GlcNAc (ver más adelante) y es producto de la glucosilación transitoria de Man₇GlcNAc, ya que su proporción relativa disminuye marcadamente en la muestra del "chase". Se observa también un pico correspondiente a Man₆GlcNAc, y un pequeño pico mayor de movilidad en la muestra de "chase", que probablemente corresponda a Man₅GlcNAc.

Cuando los oligosacáridos sensibles a Endo-H se sometieron a hidrólisis ácida suave, se observó liberación de galactosa. Esto parece indicar que también en C. hamosa los residuos de galactosa se encuentran en configuración furanósica.

Los oligosacáridos resultantes del tratamiento ácido suave fueron recromatografiados en papel con solvente C. El perfil obtenido para la muestra de 10 min de marcación se presenta en la Fig. 29C. Se observa que el tamaño del pico correspondiente a Man₇GlcNAc + Gal₁Man₆GlcNAc ha disminuido ligeramente, debido a la radioactividad perdida en forma de galactosa, y se observa además un aumento relativo en el tamaño del pico de Man₆GlcNAc. La variación en la proporción relativa de los picos es pequeña; esto se debe a que la cantidad de oligosacárido galactosilado presente en este caso es mucho menor que en C. fasciculata. Por ello, la cantidad de radioactividad que modifica su movilidad cromatográfica de la posición correspondiente a

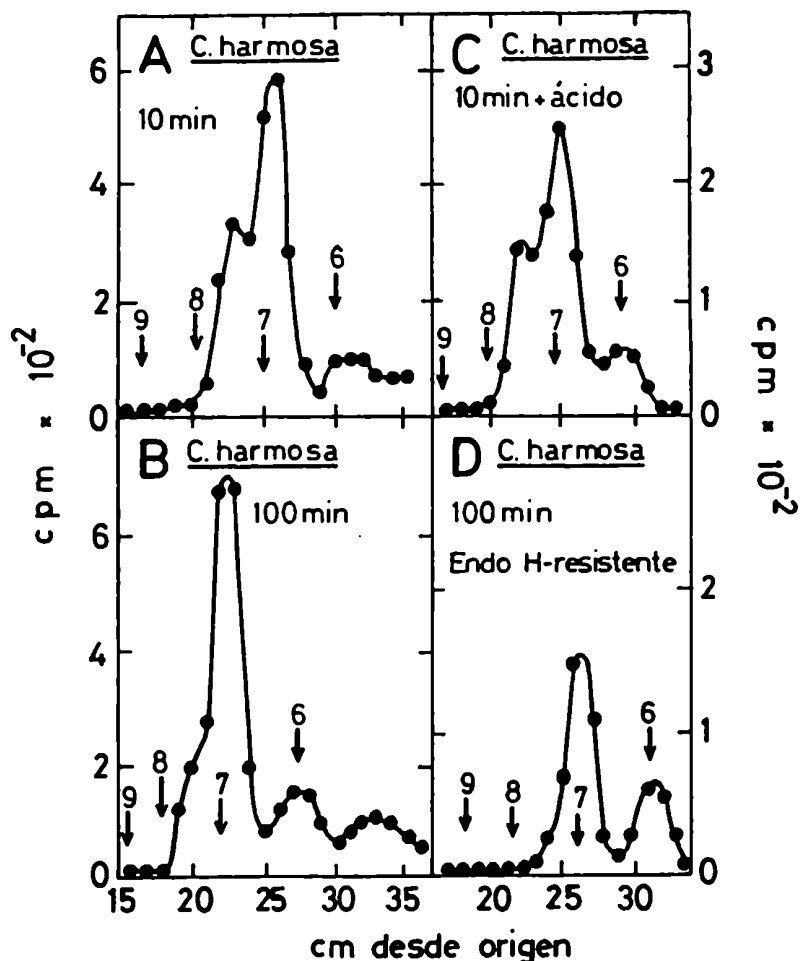


Figura 29. Oligosacáridos unidos a proteína en *C. hamosa*. Células de *C. hamosa* (2,5 g) fueron resuspendidas en 7 ml de solución de marcación conteniendo 100 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa a 26°C. A los 10 min se retiró una alícuota de 5 ml (panel A), y a los 20 min se agregaron 3 ml de medio de cultivo y se prosiguió la incubación por 80 min más (panel B). En ambos casos los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y cromatografiados en papel con solvente C. C. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H de la muestra de 10 min fueron sometidos a hidrólisis ácida suave. Parte de la radioactividad se liberó como galactosa. El resto fue cromatografiado en papel con solvente C. D. Los glicopéptidos resistentes a Endo-H de la muestra de 100 min fueron sometidos a hidrólisis ácida suave y posterior incubación con Endo-H. El material liberado por la enzima luego del tratamiento ácido fue cromatografiado en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

Man₇GlcNAc a aquella de Man₆GlcNAc es despreciable.

Cuando el compuesto que migró entre Man₇GlcNAc y Man₆GlcNAc en la Fig. 29A fue tratado con α -manosidasa, se obtuvieron dos oligosacáridos que migraron en cromatografía en papel como Glc₁Man₅GlcNAc y Glc₁Man₄GlcNAc. La hidrólisis ácida de estos últimos liberó glucosa radioactiva, confirmando la identidad del compuesto original como Glc₁Man₇GlcNAc. A diferencia de lo observado en C. fasciculata, en C. hamosa se observa la presencia de Glc₁Man₇GlcNAc aún en la muestra de "chase", si bien su cantidad se encuentra muy disminuida, y se detecta sólo como un "hombro" del pico principal (Fig. 29B).

Los oligosacáridos resistentes a Endo-H de C. hamosa presentaron un comportamiento idéntico a los compuestos correspondientes de C. fasciculata. Así, un tratamiento ácido suave liberó galactosa de los mismos y los volvió sensibles a Endo-H. El perfil cromatográfico de los oligosacáridos liberados por Endo-H luego del tratamiento ácido se presenta en la Fig. 29D. Tal como en el caso de C. fasciculata, se observa Man₇GlcNAc y Man₆GlcNAc. Tanto en los casos de Man₇GlcNAc y Man₆GlcNAc aislados de glicopéptidos sensibles a Endo-H o resistentes, su tratamiento con α -manosidasa produjo manosa y ManGlcNAc.

Si bien los oligosacáridos unidos a Dol-P-P no fueron estudiados, puede concluirse en base a los resultados obtenidos con los oligosacáridos unidos a proteína de C. hamosa, que el mecanismo de glicosilación y procesamiento de glicoproteínas en este organismo es muy similar al encontrado en C. fasciculata es decir, debe ser Man₇GlcNAc₂ el oligosacárido transferido de Dol-P-P a proteína. Las diferencias entre ambos organismos consisten en que en el caso

de C. hamosa se detectan $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (Fig. 29B) entre los oligosacáridos sensibles a Endo-H, y el oligosacárido $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ es aún detectable luego de un prolongado "chase".

3.3.3. Oligosacáridos unidos a proteína en Leptomonas samueli

3.3.3.1. Perfil de oligosacáridos sensibles a Endo-H

Células de L. samueli fueron incubadas en presencia de ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa durante 5, 10 y 20 min. Luego se hizo un "chase" con medio de crecimiento completo durante 180 min. Los glicopéptidos radioactivos fueron obtenidos según se describe en la sección 2.3.3. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H, obtenidos por incubación de los glicopéptidos con la enzima fueron corridos en cromatografía en papel con solvente C. Los resultados de las muestras de 5 y 10 min. y del "chase" se observan en la Fig. 30. El perfil obtenido es complejo y se modifica con el tiempo de marcación. En todos los casos se observan picos con la movilidad cromatográfica de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y en menor cantidad, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$. Eso indica que $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ fue transferido de Dol-P-P a proteínas, después de lo cual ha sufrido la pérdida de hasta tres residuos de manosa.

Debe destacarse la presencia de compuestos con movilidad cromatográfica mayor que la de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ en la Fig. 30C. Puede presumirse que dichos compuestos tienen existencia permanente y no transitoria, ya que permanecen luego de un prolongado "chase" con azúcar no marcado. La presencia de estos compuestos sugiere que en este organismo, el oligosacárido $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ es elongado por adición de residuos de azúcar después de su

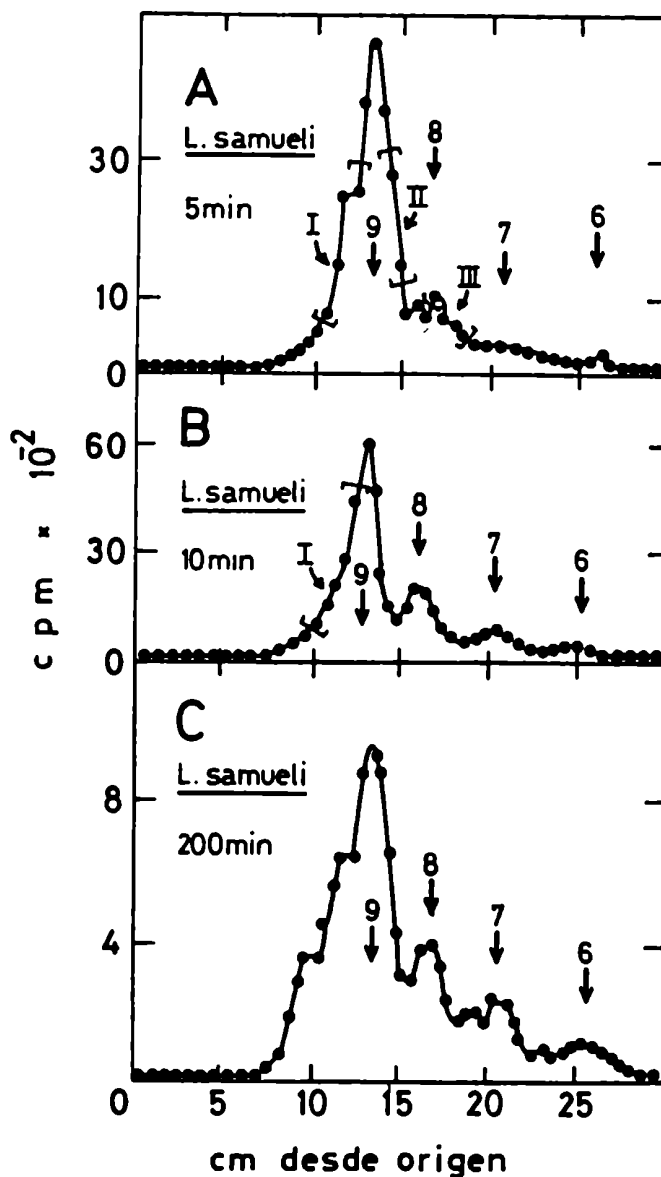


Figura 30. Oligosacáridos sensibles a Endo-H de *L. samueli*. Células de *L. samueli* fueron incubadas en presencia de (U-¹⁴C)glucosa durante 5 min (A), 10 min (B) y 20 min seguidos de 180 min de "chase" (C), en las condiciones descritas en la sección 2.2.2. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y cromatografiados en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

transferencia a proteínas.

Otro rasgo destacable de los perfiles cromatográficos de la Fig. 30 es la presencia de picos con movilidades cromatográficas intermedias entre aquellas de los standards de MangGlcNAc, MangGlcNAc, etc. Como se discutirá a continuación, dichos picos parecen estar constituidos por una mezcla de sustancias.

3.3.3.2. Sensibilidad a α -manosidasa. Composición de azúcares

Las sustancias con movilidades cromatográficas correspondientes a Glc₁MangGlcNAc, Glc₁MangGlcNAc y Glc₁Man₇GlcNAc en la Fig. 30A (es decir, aquellas que migraron detrás de MangGlcNAc, entre MangGlcNAc y MangGlcNAc y entre MangGlcNAc y Man₇GlcNAc, respectivamente), fueron eluidas y tratadas con α -manosidasa. Los productos de la degradación enzimática fueron separados por cromatografía en papel con solvente D. Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 31. Puede observarse, en todos los casos, un importante pico de manosa y un pequeño pico de ManGlcNAc. La presencia de este último demuestra la existencia de oligosacáridos totalmente sensibles a α -manosidasa en las tres muestras. Puede concluirse que MangGlcNAc₂ fue efectivamente transferido a proteínas y sufrió después demanosilación.

Puede observarse en la Fig. 31 que existen compuestos que son parcialmente resistentes a α -manosidasa. Cuando estos compuestos fueron eluidos y sometidos a hidrólisis ácida total, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Fig. 32. Puede observarse que la composición de los picos resistentes a α -manosidasa es variable, obteniéndose en unos casos manosa, glucosa y galactosa (Fig. 32B-D), mientras en otro caso sólo se obtuvo galac-

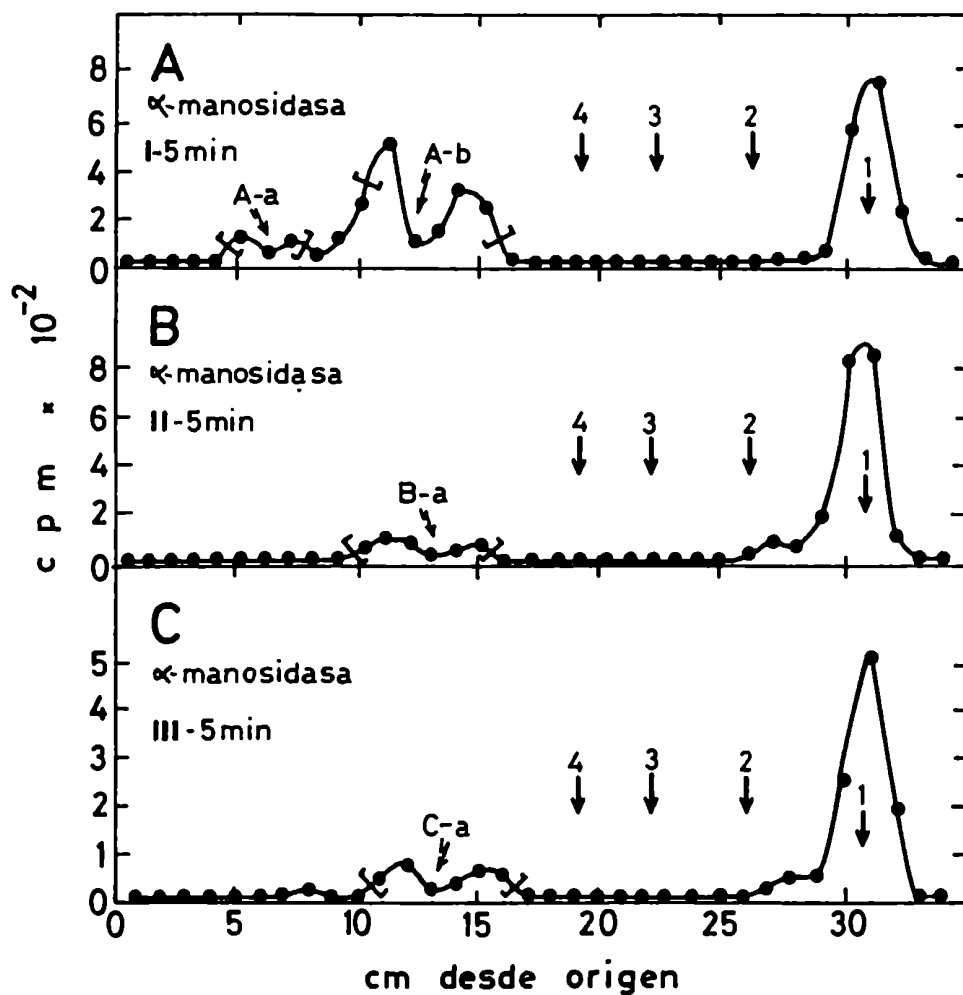


Figura 31. Sensibilidad a α -manosidasa. Las sustancias señaladas como I, II y III en la Fig. 30A (paneles A, B y C, respectivamente) fueron eluidas, digeridas con α -manosidasa y cromatografiadas en papel con solvente D.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄.

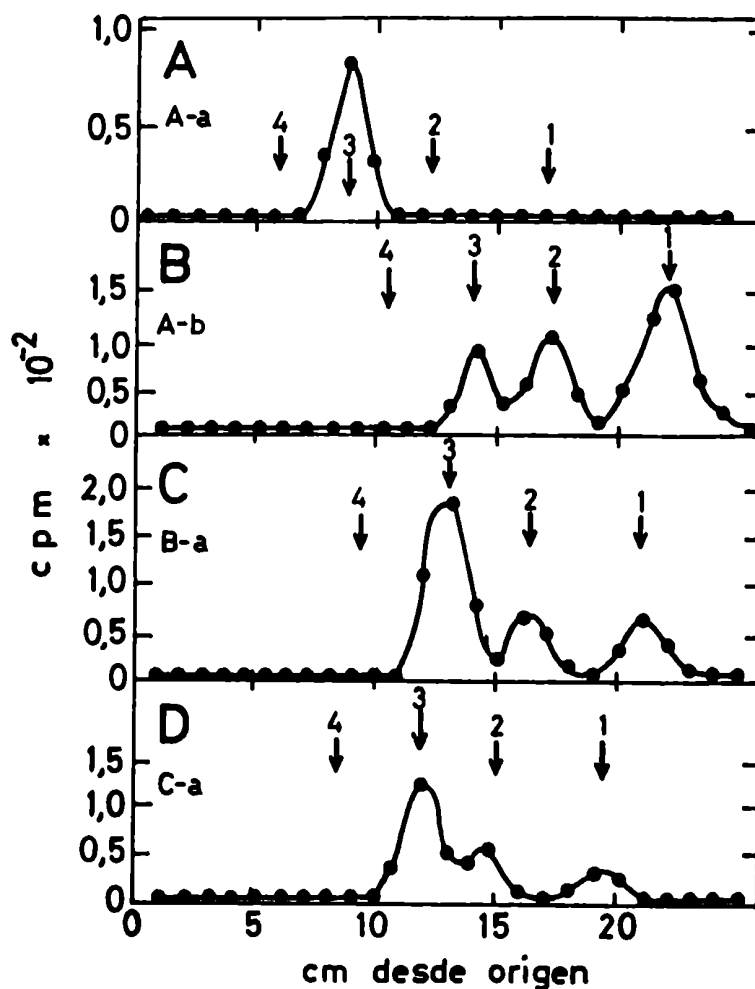


Figura 32. Composición de azúcares. Las sustancias señaladas como A-a, A-b, B-a y C-a en la Fig. 31 (paneles A, B, C y D, respectivamente), fueron eluidas, sometidas a hidrólisis ácida total y cromatografiadas en papel con solvente B.

Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, galactosa; 4, glucosamina.

tosa radioactiva (Fig. 32A). Puede concluirse que también en L. samueli se produce la glucosilación de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ para dar los respectivos compuestos glucosilados, ya que al tratar los compuestos con las correspondientes movilidades cromatográficas con α -manosidasa, se obtuvieron en todos los casos productos con movilidades cromatográficas correspondientes a $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, los cuales liberaron glucosa radioactiva por hidrólisis ácida. Otra reacción de procesamiento que ocurre en este organismo es la adición de residuos de galactosa a oligosacáridos sensibles a Endo-H. No pudo establecerse si los residuos de glucosa y galactosa estaban unidos a un mismo oligosacárido. Sin embargo, parece improbable que así sea, ya que en ese caso, los oligosacáridos resistentes a α -manosidasa deberían haber presentado movilidades cromatográficas menores.

3.3.3.3. Presencia de residuos galactofuranósicos

Las sustancias que migraban como A-a, A-b, B-a y C-a (Fig. 31A-C), pero obtenidas de células de L. samueli incubadas con ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa durante 20 min, fueron sometidas a un tratamiento ácido suave. El resultado de dicho tratamiento se observa en la Fig. 33A. Se produjo liberación de galactosa. Las sustancias resistentes a este tratamiento fueron sometidas a hidrólisis ácida total. Como se observa en la Fig. 33B, se obtuvo glucosa, manosa y algo de glucosamina, pero no se obtuvo galactosa. En otras palabras, todos los residuos de galactosa fueron liberados por el tratamiento ácido suave. Como ya se discutió (ver sección 3.3.1.4.), la labilidad al ácido es característica de azúcares en configuración furanósica. Para confirmar esto, el material que migró como I en la Fig. 30B fue sometido a una oxidación suave

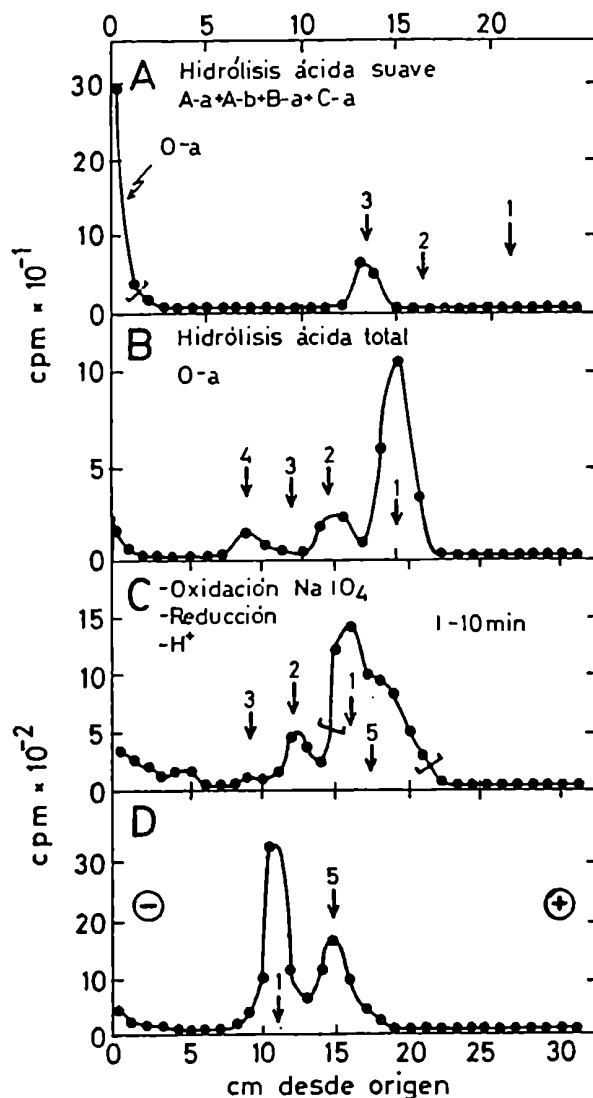


Figura 33. Presencia de residuos galactofuranósicos. El material señalado como A-a, A-b, B-a y C-a en la Fig. 31, pero obtenido de una muestra de células de *L. samueli* incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante 20 min fue eluido, reunido y sometido a hidrólisis ácida suave. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente D. **B.** El material que permaneció en el origen en A fue eluido, hidrolizado totalmente y cromatografiado en papel con solvente A. **C.** El material señalado como I en la Fig. 30B fue sometido a oxidación suave con NaIO₄, reducción e hidrólisis ácida total. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente A. **D.** El material señalado entre corchetes en C fue eluido y sometido a electroforesis en papel en bórax 1,9%, pH 9.

Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, galactosa; 4, glucosamina; 5, arabinosa.

con NaIO_4 y posterior reducción con NaBH_4 e hidrólisis ácida total. Como se observa en la Fig. 33C-D, este tratamiento convirtió a todos los residuos de galactosa en arabinosa. Por lo tanto, puede concluirse que en L. samueli, al igual que en C. fasciculata y C. hamosa, los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas contienen residuos de galactosa en configuración furanósica.

3.3.4. Oligosacáridos unidos a proteína en Herpetomonas samuelpeossoi

El perfil cromatográfico de los oligosacáridos unidos a proteína sensibles a Endo-H de H. samuelpeossoi se presenta en la Fig. 34. Pueden notarse algunas analogías con el caso de L. samueli discutido previamente: se observa la presencia de picos con movilidad menor que la de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, sugiriendo que el oligosacárido $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ es elongado luego de ser transferido a proteína; asimismo, a tiempos breves de marcación, se detectan compuestos con movilidades intermedias entre $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, que podrían corresponder a oligosacáridos transitoriamente glucosilados. A diferencia de lo observado con L. samueli, el compuesto de menor tamaño obtenido en H. samuelpeossoi corre como $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$. Aparentemente, en este organismo el oligosacárido transferido a la proteína puede perder sólo un residuo de manosa.

Los compuestos con movilidades iguales o mayores que $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (entre corchetes en la Fig. 34A) de la muestra de 5 min. de marcación fueron eluidos y tratados con α -manosidasa. El resultado se observa en la Fig. 35A. Nuevamente, se obtuvo manosa y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, demostrando que $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ se encontraba presente en la muestra. Se obtuvieron además varios picos de sustancias parcialmente resistentes a la enzima. Estos picos fueron eluidos

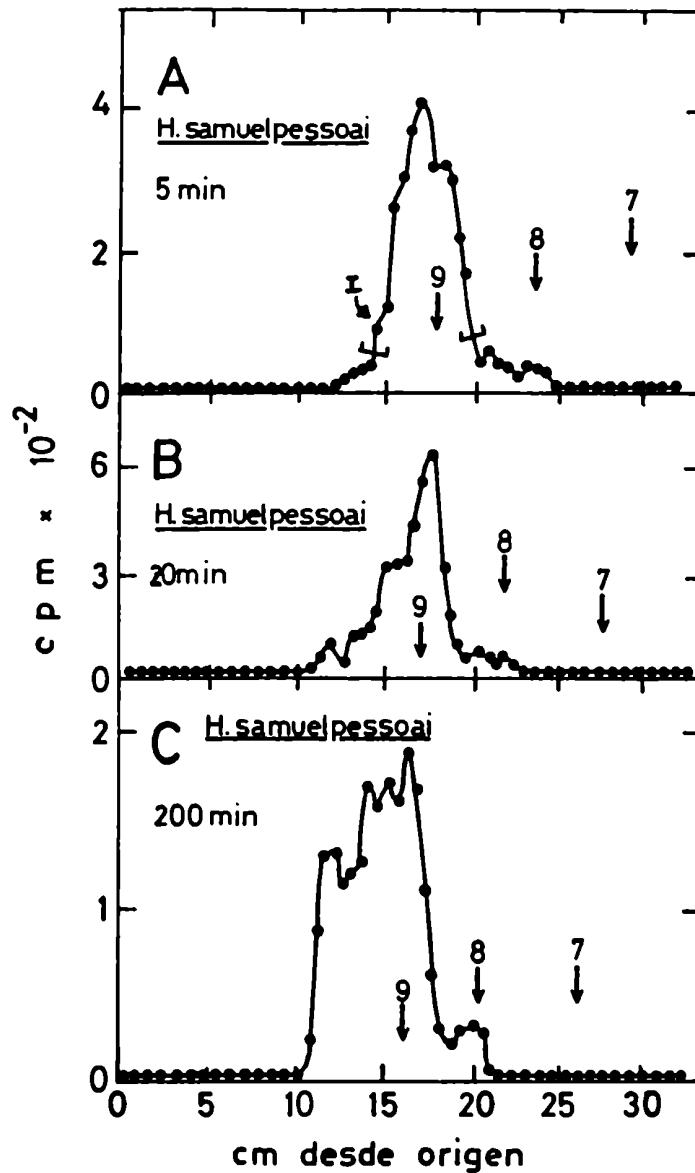


Figura 34. Oligosacáridos sensibles a Endo-H de *H. samuelpeessoai*. Células de *H. samuelpeessoai* fueron incubadas en presencia de (U-¹⁴C)glucosa durante 5 min (A), 20 min (B) y 20 min seguidos de 180 min de "chase" (C), en las condiciones descritas en la sección 2.2.2. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y cromatografiados en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

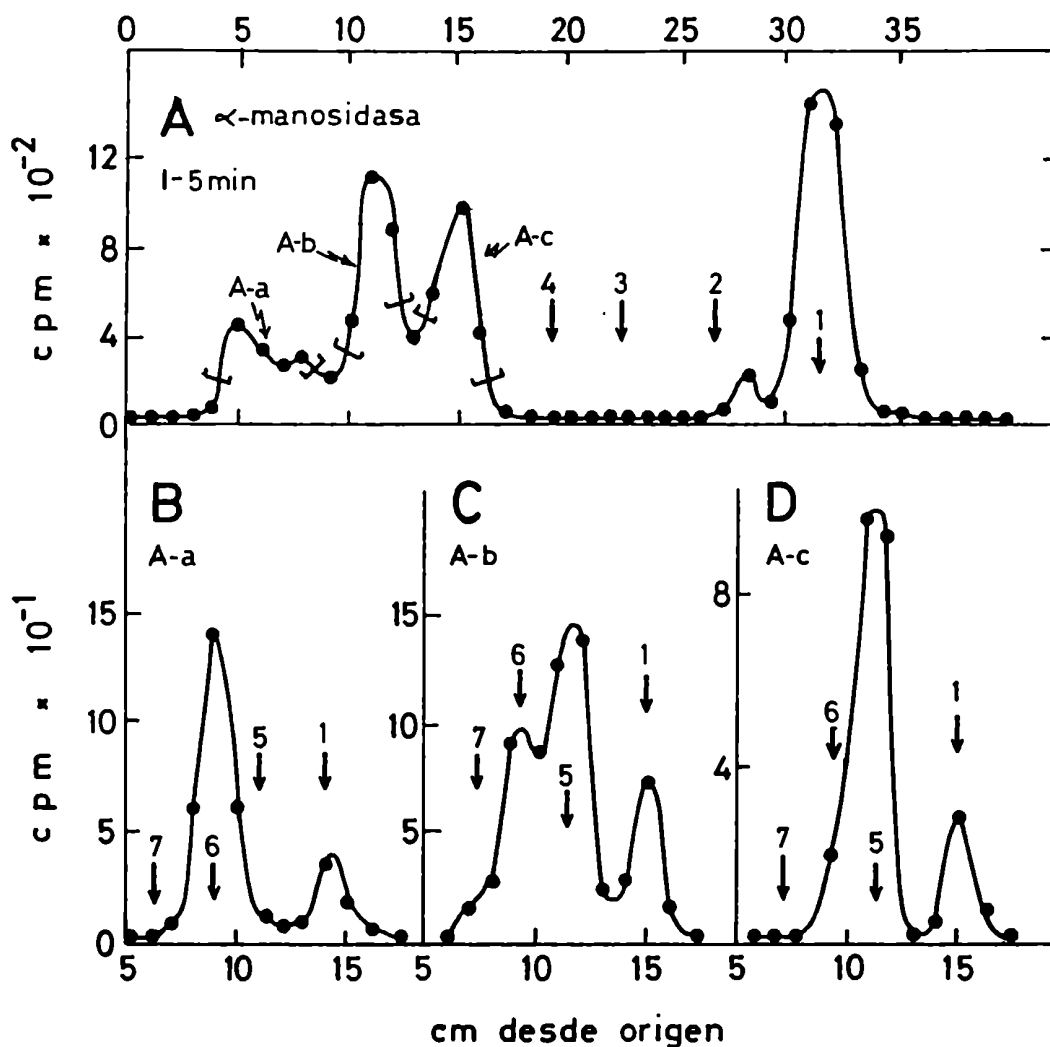


Figura 35. Composición de azúcares. A. El material señalado como I en la Fig. 34A fue eluido, digerido con α -manosidasa y cromatografiado en papel con solvente D. B-D. Los picos señalados en el panel A como A-a (panel B), A-b (panel C) y A-c (panel D) fueron eluidos y sometidos a hidrólisis ácida total. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente A.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄; 5, glucosa; 6, galactosa; 7, glucosamina.

separadamente y sometidos a hidrólisis ácida total. Como se observa en la Fig. 35, los monosacáridos obtenidos fueron manosa y glucosa en un caso (Fig. 35D), manosa y galactosa en otro caso (Fig. 35B) y manosa, glucosa y galactosa en otro (Fig. 35C). Este resultado prueba que la muestra original estaba compuesta por una mezcla compleja de oligosacáridos: uno de ellos totalmente sensible a α -manosidasa (Man₉GlcNAc) y otros parcialmente resistentes a la enzima que contenían, además de manosa y N-acetilglucosamina, glucosa y/o galactosa.

Cuando una muestra de las mismas características (compuestos de movilidad iguales o mayores que Man₉GlcNAc), pero obtenida de una muestra de células de H. samuelpessoai incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante 10 min fue sometida a una hidrólisis ácida suave, sólo se produjo liberación de galactosa (Fig. 36A). Los compuestos que permanecieron en el origen en la Fig. 36A, es decir, aquellos resistentes al tratamiento ácido suave, al ser sometidos a hidrólisis ácida total, sólo dieron glucosa y manosa (Fig. 36B). En otras palabras, también en H. samuelpessoai los residuos de galactosa presentes en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas son extremadamente ácido-lábiles, y probablemente también se encuentren en configuración furanósica.

3.3.5 Oligosacáridos unidos a proteína en Trypanosoma dionisii y Trypanosoma conorhini

Los resultados obtenidos con T. dionisii y T. conorhini fueron muy similares, de modo que serán presentados conjuntamente.

En la Fig. 37 se observa el perfil de oligosacáridos unidos a proteína

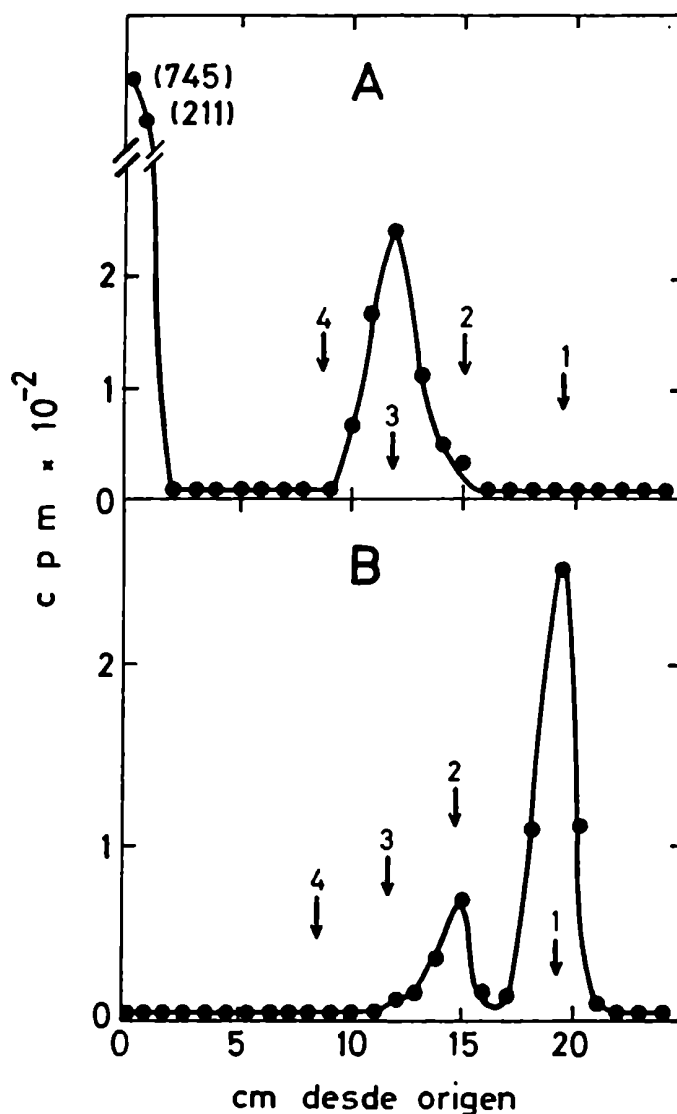


Figura 36. Presencia de residuos galactofuranósicos. A. El material señalado como I en la Fig. 34A, pero obtenido de una muestra de células de *H. samuelpessoai* incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante 10 min fue eluido y sometido a hidrólisis ácida suave. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente B. B. El material que permaneció en el origen en A fue eluido y sometido a hidrólisis ácida total. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente B.

Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, galactosa; 4, glucosamina.

y sensibles a Endo-H de células de T. dionisii incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante 5 minutos (Fig. 37A), o 20 minutos seguidos de 180 minutos de "chase" (Fig. 37B), y el perfil correspondiente a células de T. conorhini incubadas bajo estas últimas condiciones (Fig. 37C). Puede observarse que los paneles B y C de la Fig. 37 son sumamente semejantes, difiriendo sólo en la proporción relativa de algunos picos. Como se ve en la Fig. 37B-C, las muestras del "chase" presentan un perfil compuesto por picos con movilidades cromatográficas correspondientes a Mang₅GlcNAc, demostrando que MangGlcNAc₂ sufre un proceso de demanosilación después de su transferencia a proteínas. En las muestras correspondientes a tiempos breves de marcación se observa la presencia, además de MangGlcNAc, de tres picos: uno que corre detrás de MangGlcNAc, otro entre MangGlcNAc y MangGlcNAc y el tercero entre MangGlcNAc y Man₇GlcNAc. Estos compuestos son de existencia transitoria ya que no se detectan en las muestras de "chase". Debe destacarse que un perfil sumamente similar se obtiene con epimastigotes de T. cruzi (91).

3.3.5.1. Análisis estructural

Cuando cualquiera de los picos de las muestras de "chase", (Fig. 37B-C) fue sometido a degradación por α -manosidasa, se obtuvo un perfil cromatográfico como el que se muestra en la Fig. 38C, es decir, manosa y ManGlcNAc. Esto demuestra que la identidad de dichos compuestos coincide con la de los standards cromatográficos, y que MangGlcNAc₂ fue transferido de Dol-P-P a proteínas para ser luego demanosilado.

En la Fig. 38A se observa el perfil cromatográfico obtenido al incubarse con α -manosidasa al compuesto que migraba entre MangGlcNAc y Man₇GlcNAc

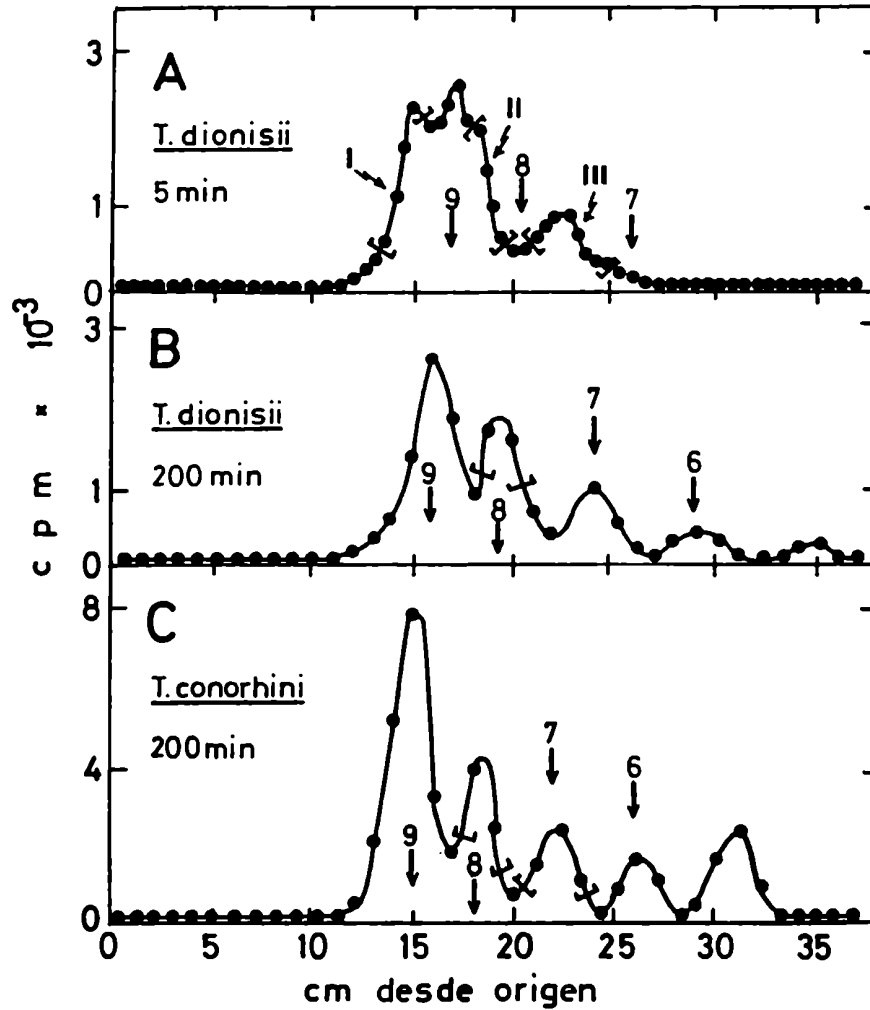


Figura 37. Oligosacáridos sensibles a Endo-H en *T. dionisii* y *T. conorhini*. Células de *T. dionisii* fueron incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante 5 min (A) y 20 min seguidos de 180 min de "chase" (B). C. Células de *T. conorhini* fueron incubadas en presencia de (U-¹⁴C)glucosa durante 20 min seguidos de 180 min de "chase". Las condiciones de la incubación se describen en la sección 2.2.2. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y cromatografiados en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

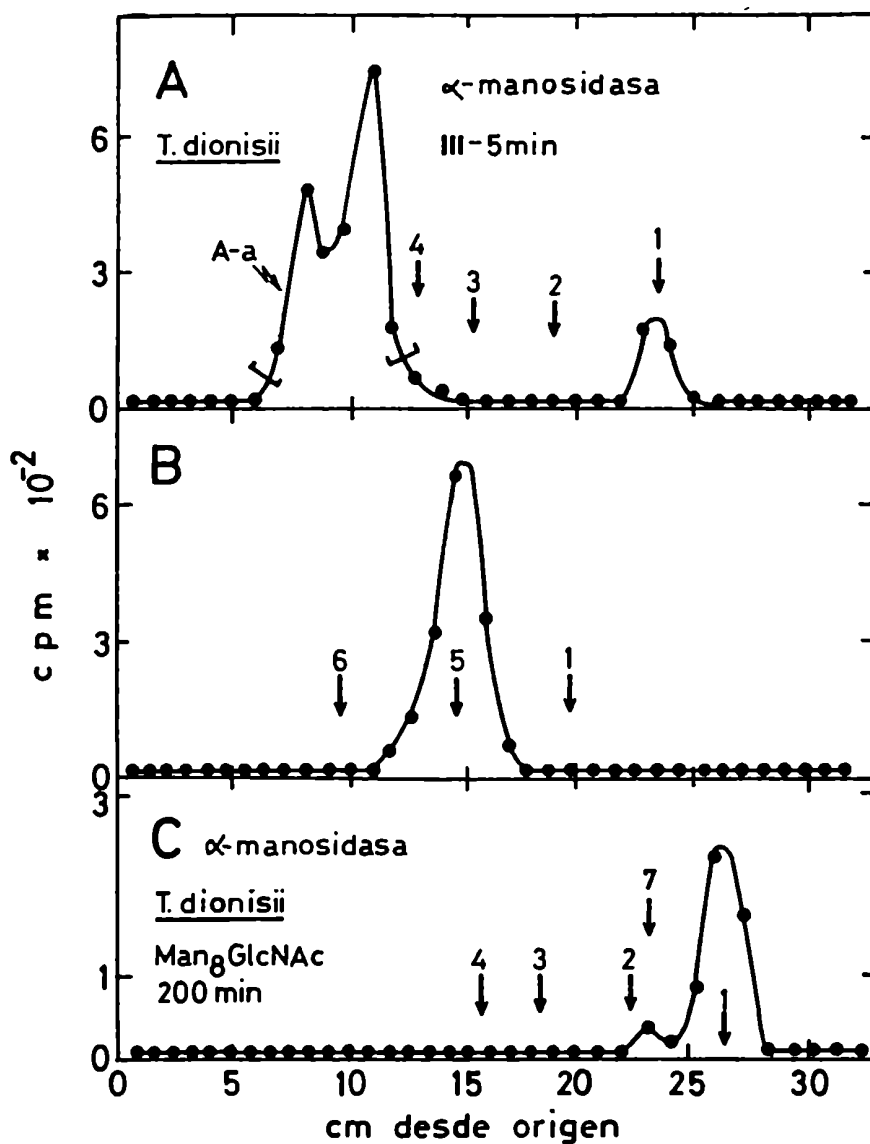


Figura 38. Composición de azúcares. A. El pico III de la Fig. 37A fue eluido, digerido con α -manosidasa y cromatografiado en papel con solvente D. B. El material señalado en A como A-a fue eluido, hidrolizado totalmente y cromatografiado en papel con solvente A. C. El pico que migraba como Man₈GlcNAc en la Fig. 37B fue eluido, digerido con α -manosidasa y cromatografiado en papel con solvente D.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄; 5, glucosa; 6, galactosa; 7, ManGlcNAc.

de la Fig. 37A. Se obtuvo manosa y dos picos que corren detrás de un standard de Man_4 , con movilidades correspondientes a $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Para confirmar su identidad, dicho material fue sometido a hidrólisis ácida total. El resultado se presenta en la Fig. 38B. Se observa un pico de glucosa. Este resultado demuestra que el oligosacárido se encontraba efectivamente glucosilado. Idéntico resultado se obtuvo al aplicar este tratamiento a los compuestos que migraban detrás de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y entre $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ en la Fig. 37A. Puede concluirse que la composición de estos oligosacáridos es $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$, y que el mecanismo de glucosilación transitoria opera también en T. dionisii y T. conorhini.

Los compuestos que migraban como $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ en la Fig. 37C, fueron eluidos y sometidos a acetólisis. Los resultados se presentan en la Fig. 39A y B, respectivamente. Se observa en ambos casos manosa, manobiosa, manotriosa, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y un pico que corre entre Man_3 y Man_4 , en la posición de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$. Por otra parte, cuando la manobiosa de la Fig. 39B fue eluida, reducida y corrida en electroforesis en molibdato, se obtuvieron dos picos, uno neutro y uno cargado (Fig. 39C), demostrando que el pico de manobiosa estaba formado necesariamente por dos isómeros, $\text{Man}_2\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ y $\text{Man}_2\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}$. Estos complejos perfiles pueden explicarse suponiendo que por demanosilación de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ se obtienen oligosacáridos de composición $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que son una mezcla de isómeros.

Pueden imaginarse tres isómeros de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y cinco isómeros de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$. Las estructuras probables de los isómeros de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ de T. conorhini se presentan en la Fig. 47. Debe destacarse que

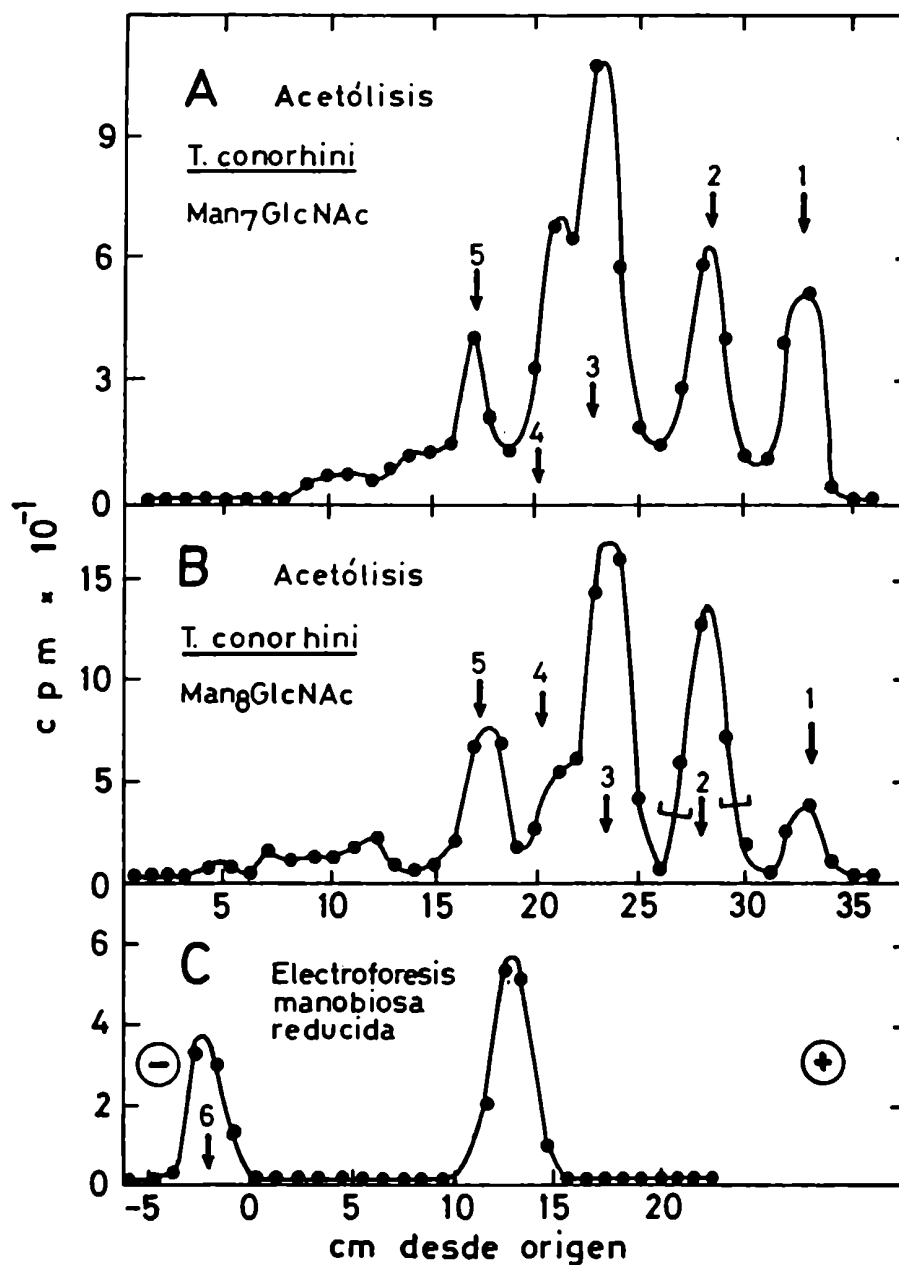


Figura 39. Acetólisis. Las sustancias que migraron como Man₈GlcNAc y Man₇GlcNAc en la figura 37C (paneles A y B, respectivamente) fueron eluidas, sometidas a acetólisis y los productos fueron cromatografiados en papel con solvente D. C. El pico que corrió como Man₂ en B fue eluido, reducido con NaBH₄ y sometido a electroforesis en papel en molibdato de sodio 0,1 M, pH 5.

Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₄; 5, Man₄GlcNAc; 6, glucosa.

este resultado difiere del informado para I. cruzi, en el cual parece haber una única secuencia de demanosilación (34).

3.3.6. Oligosacáridos unidos a proteína en Leishmania adleri

Los perfiles cromatográficos de los oligosacáridos unidos a proteínas y sensibles a Endo-H se presentan en la Fig. 40. En la muestra de 5 minutos de marcación (Fig. 40A) se observan dos picos: uno que corre como $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (pico II) y otro que corre entre $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (pico I). Al incubar las sustancias presentes en este último pico (junto con una muestra de migración cromatográfica similar obtenida de la muestra de 10 minutos de marcación) con α -manosidasa se obtuvo manosa y dos picos que se comportaron como $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (Fig. 41A). La identidad de estos últimos fue confirmada sometiéndolos a hidrólisis total e identificando glucosa como producto de hidrólisis (Fig. 41D). El compuesto que migró como $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ en la Fig. 40A, junto con un compuesto similar aislado de células incubadas con ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa durante 10 min, dio un perfil similar por degradación con α -manosidasa, pero en este caso se observó también la aparición del disacárido ManGlcNAc (Fig. 41B). También en este caso, la hidrólisis ácida de los compuestos que migraron como $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ produjo liberación de glucosa radioactiva. Esto indica que el pico II está formado por dos sustancias: $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$.

Cuando la marcación se realizó durante 20 minutos, se observó la desaparición del pico I y la aparición de un nuevo pico, que corría delante de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (pico III, Fig. 40B). La sustancia presente en este pico, aislada de la muestra de 20 min de marcación, resultó totalmente sensible a

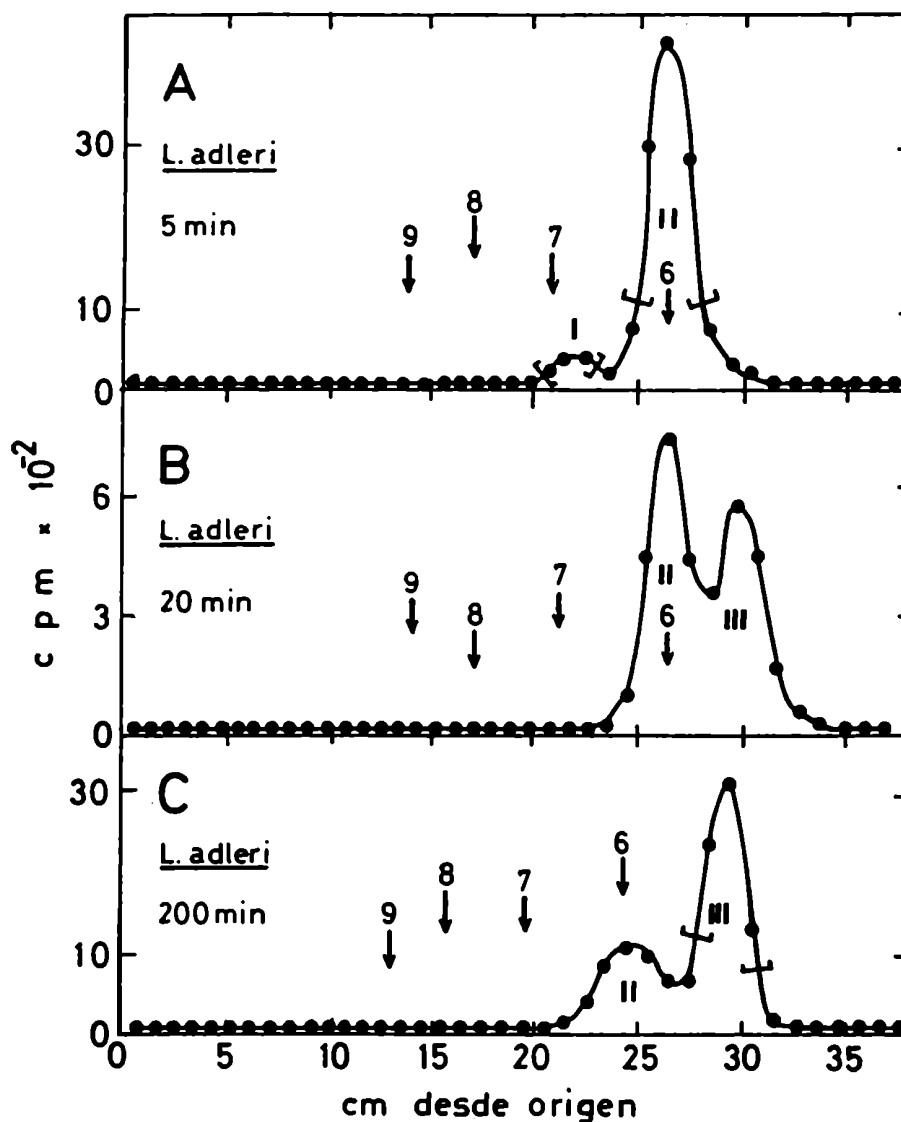


Figura 40. Oligosacáridos sensibles a Endo-H de *L. adleri*. Células de *L. adleri* fueron incubadas con (U-¹⁴C)glucosa durante 5 min (A), 20 min (B) y 20 min seguidos de 180 min de "chase" (C), en las condiciones descritas en la sección 2.2.2. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y cromatografiados en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

α -manosidasa (Fig. 41C), y por lo tanto debe tratarse de Man₅GlcNAc producido por demanosilación de Man₆GlcNAc. Un perfil similar se obtuvo en la muestra del "chase" (Fig. 40C), pero en este caso tanto el pico II como el pico III resultaron totalmente sensibles a α -manosidasa, produciendo manosa y ManGlcNAc por digestión con la enzima. Esto demuestra que en el caso del "chase" el oligosacárido Glc₁Man₅GlcNAc ha desaparecido del pico II, el cual quedó constituido sólo por Man₆GlcNAc. Puede concluirse, por lo tanto, que en L. adleri, el oligosacárido Man₆GlcNAc₂ es transferido de Dol-P-P a la proteína y puede perder un residuo de manosa para dar Man₅GlcNAc₂-proteína. Ambos oligosacáridos son transitoriamente glucosilados.

Como se explicó anteriormente (ver sección 3.2.1.), L. adleri producía dos oligosacáridos unidos a Dol-P-P: Man₆GlcNAc₂ y Man₅GlcNAc₂. El compuesto Man₅GlcNAc₂ era resistente a Endo-H debido a que el residuo de manosa que sustituye a la manosa más interna en la posición 6 carece de sustitución en C3 (ver Fig. 45) (122-124). Los perfiles presentados en la Fig. 40 corresponden a oligosacáridos sensibles a Endo-H. Por lo tanto, el compuesto Man₅GlcNAc aislado de glicoproteínas debe haberse producido por demanosilación de Man₆GlcNAc y no por transferencia de Man₅GlcNAc₂ a proteínas, ya que en este último caso, debería haber sido resistente a Endo-H. No puede descartarse, sin embargo, que Man₅GlcNAc₂ haya sido transferido de Dol-P-P a proteínas, ya que los oligosacáridos unidos a proteína y resistentes a Endo-H no fueron estudiados.

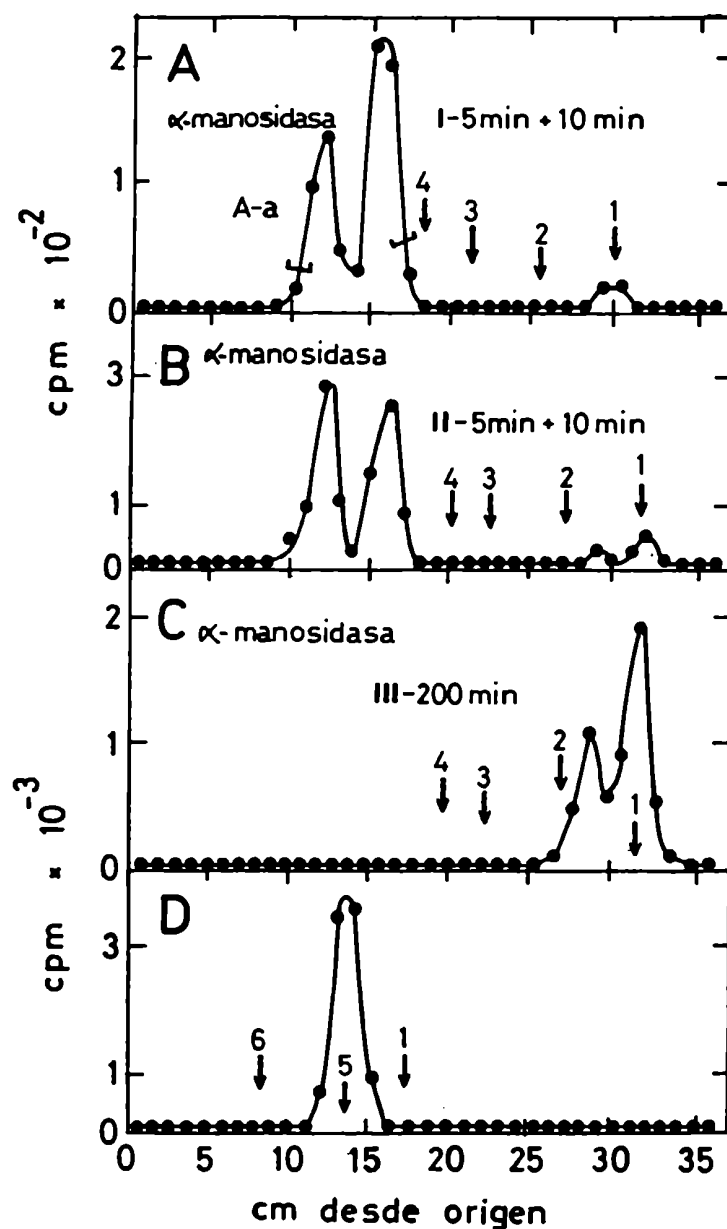


Figura 41. Composición de azúcares. Los picos señalados como I y II en la Fig. 40A (paneles A y B respectivamente) y el pico III de la Fig. 40C (panel C) fueron eluidos, digeridos con α -manosidasa y cromatografiados en papel con solvente D. D. El material señalado como A-a en A fue eluido y sometido a hidrólisis ácida total. Los productos fueron cromatografiados en papel con solvente B.

Standards: 1, manosa; 2, Man_2 ; 3, Man_3 ; 4, Man_4 ; 5, glucosa; 6, galactosa.

3.3.7. Oligosacáridos unidos a proteínas en *Blastocrithidia culicis*

Como se recordará (ver sección 3.2.1.), *B. culicis* produjo un único oligosacárido unido a Dol-P-P cuya composición era $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. Los perfiles cromatográficos de oligosacáridos unidos a proteínas y sensibles a Endo-H de este organismo se presentan en la Fig. 42. Se observa el mismo perfil, independientemente del tiempo de marcación: un pico que corre entre $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (pico I) y otro que corre como $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (pico II). Al tratar el pico I de la muestra de 5 minutos con α -manosidasa se obtuvo manosa y dos picos que corrieron como $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ (Fig. 43A). La hidrólisis ácida de estos últimos produjo manosa, glucosa y glucosamina (Fig. 44A), quedando demostrado entonces que el pico I era $\text{Glc}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$. El tratamiento con α -manosidasa del pico II de la Fig. 42A produjo manosa y ManGlcNAc (Fig. 43B), confirmando la identidad del pico II como $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$.

El análisis de los picos I y II de la muestra del "chase" (Fig. 42C) arrojó resultados diferentes. El tratamiento del pico I de la Fig. 42C con α -manosidasa produjo manosa y dos picos con movilidades cromatográficas correspondientes a $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ (Fig. 43C). Sin embargo, la hidrólisis ácida de estos últimos no produjo glucosa, sino glucosamina, manosa y una sustancia de $R_{\text{Man}}=1,80$ que no fue identificada (Fig. 44B). Del mismo modo, el pico II de la Fig. 42C produjo por tratamiento con α -manosidasa, manosa, ManGlcNAc y dos picos de menor movilidad (Fig. 43D). La hidrólisis ácida de estos últimos produjo manosa, glucosamina y dos sustancias no identificadas de R_{Man} 1,15 y 1,80 (Fig. 44C).

Puede especularse que el pico I de la muestra del "chase" es $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$

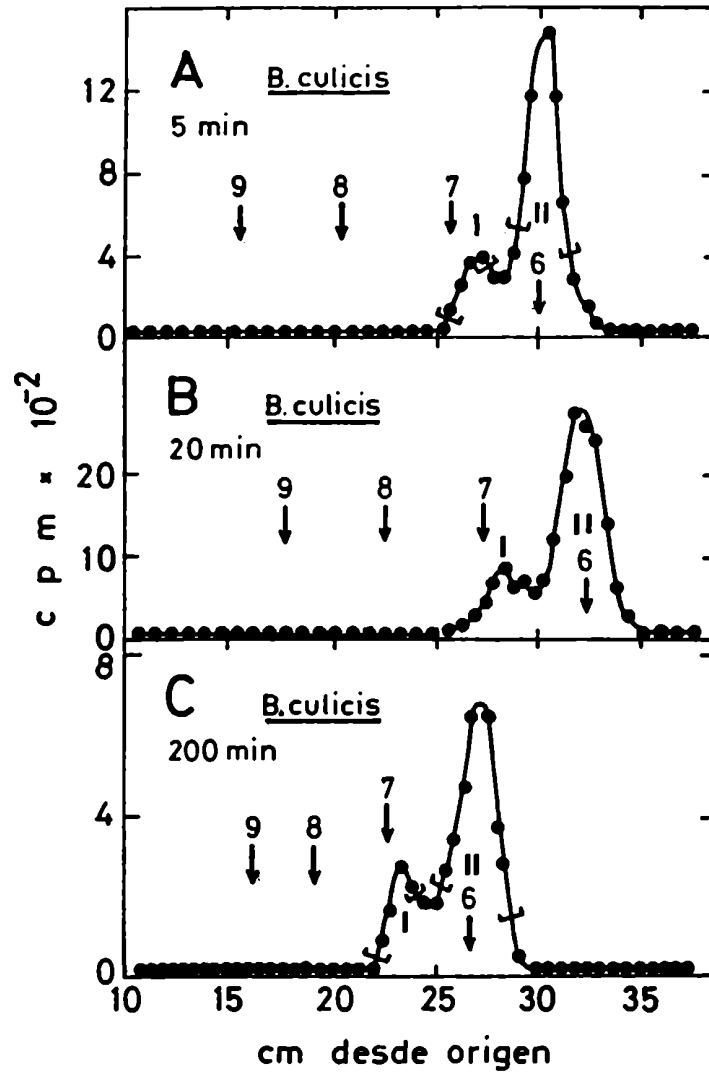


Figura 42. Oligosacáridos sensibles a Endo-H de *B. culicis*. Células de *B. culicis* fueron incubadas con ($U-^{14}C$) glucosa durante 5 min (A), 20 min (B) y 20 min seguidos de 180 min de "chase" (C), en las condiciones descritas en la sección 2.2.2. Los oligosacáridos sensibles a Endo-H fueron aislados y cromatografiados en papel con solvente C.

Standards como en la Fig. 21.

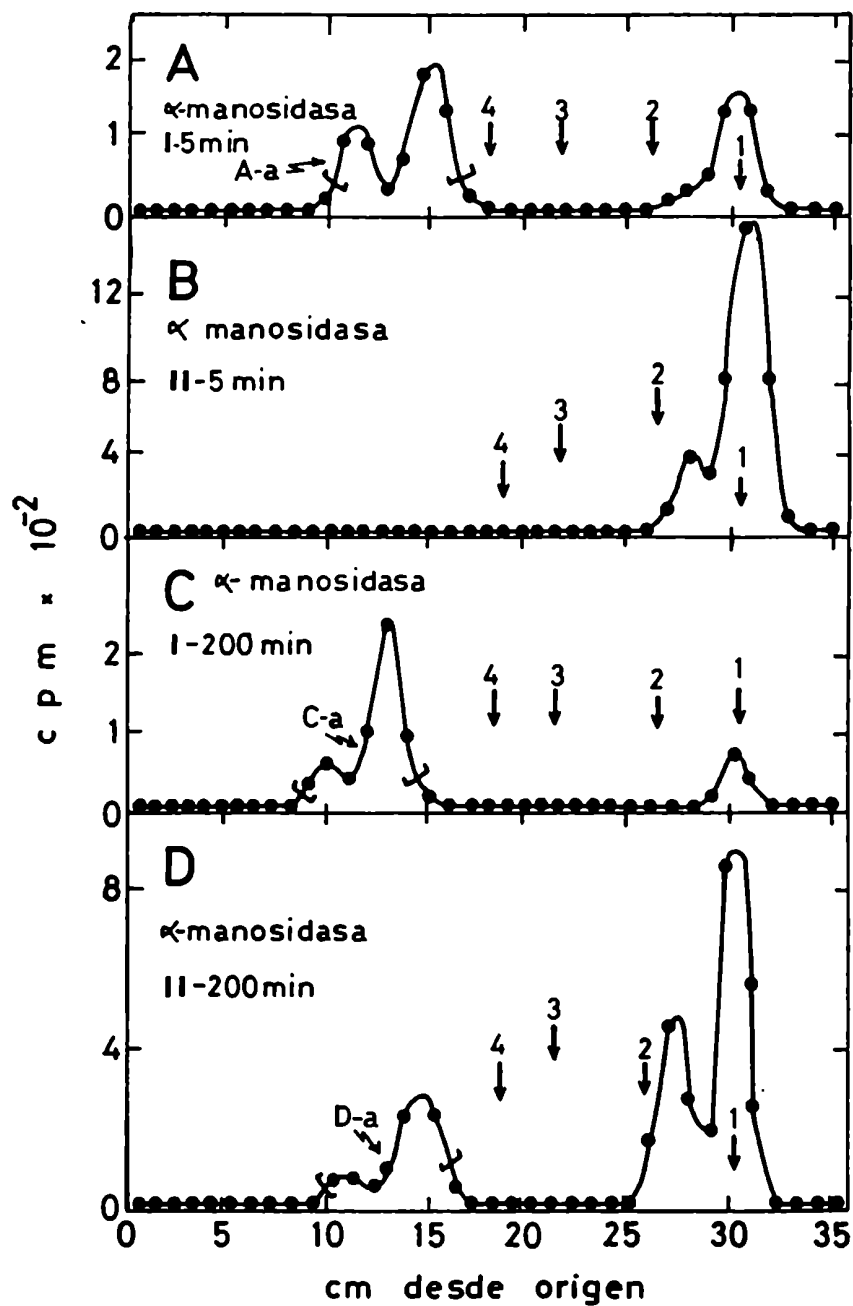


Figura 43. Sensibilidad a α -manosidasa. Los picos señalados como I y II en la Fig. 42A (paneles A y B respectivamente) y aquellos señalados como I y II en la Fig. 42C (paneles C y D respectivamente) fueron eluidos, digeridos con α -manosidasa y cromatografiados en papel con solvente D.

Standards como en la Fig. 41.

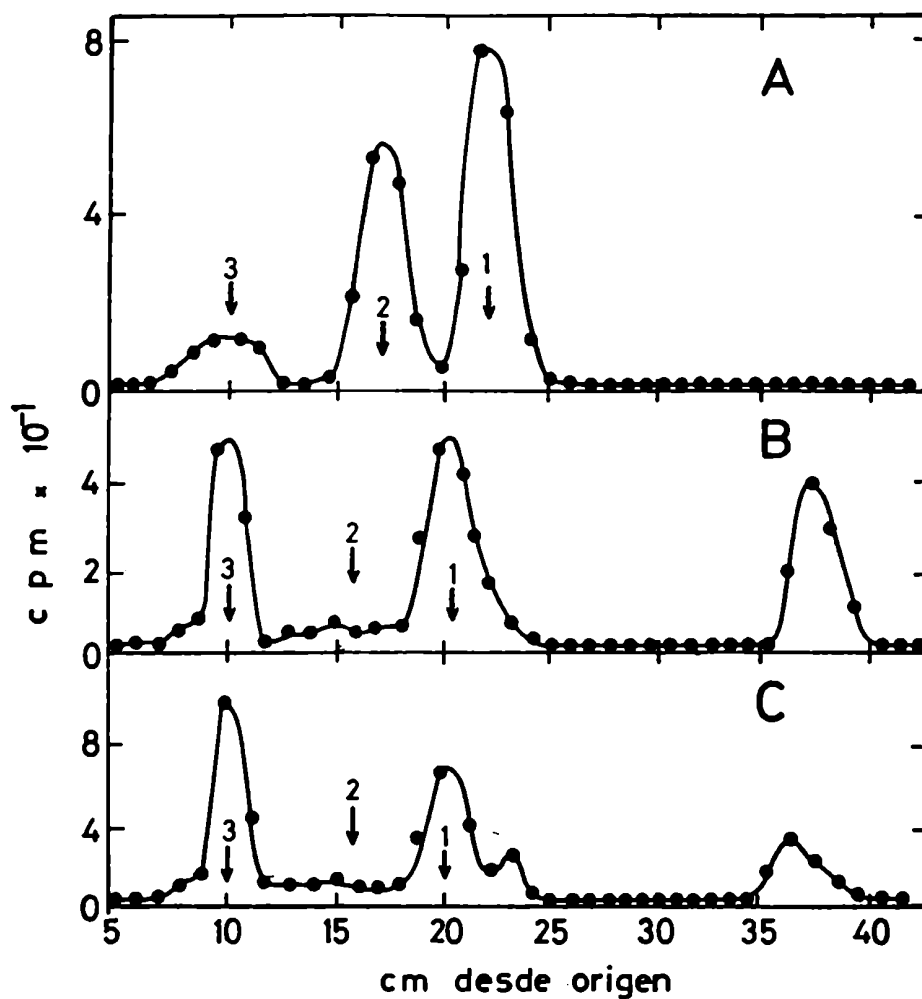


Figura 44. Composición de azúcares. Las sustancias señaladas como A-a, C-a y D-a en la Fig. 43 (paneles A, B y C respectivamente) fueron eluidas, sometidas a hidrólisis ácida total y cromatografiadas en papel con solvente B.

Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, glucosamina.

con un sustituyente desconocido, mientras que el pico II de la muestra podría ser una mezcla de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ sustituido este último con dos residuos no identificados. Los datos experimentales, sin embargo, son insuficientes para proponer una secuencia completa de procesamiento.

4.DISCUSION Y CONCLUSIONES

4.1.Derivados de dolicol en tripanosomátidos

En la tabla II se presentan en forma resumida los resultados obtenidos en cuanto a los Dol-P-P-oligosacáridos sintetizados por las distintas especies de tripanosomátidos utilizados en el presente trabajo de tesis y en otros estudiados previamente. Varios puntos merecen destacarse a partir de dichos resultados:

a) Ningún tripanosomátido sintetiza Dol-P-P-oligosacáridos que contengan glucosa. Esta aseveración fue cierta aún cuando las células fueron marcadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa, por lo cual debe descartarse la posibilidad de un artificio experimental provocado por el ayuno de glucosa durante la marcación. También cuando células de C. fasciculata fueron marcadas en presencia de inhibidores de la síntesis proteica fue imposible detectar la formación de Dol-P-P-oligosacáridos glucosilados, de modo que puede descartarse también la posibilidad de la existencia de un pequeño "pool" intracelular de Dol-P-P-oligosacáridos glucosilados de rápido recambio, ya que en condiciones de inhibición de la síntesis de proteínas dichos compuestos debían haberse acumulado debido a la falta de aceptores proteicos para la glicosilación.

b) Células de C. fasciculata, T. dionisii y L. samueli son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc, si bien sí son capaces de sintetizar Dol-P-Man. En cambio, L. adleri y H. muscarum sintetizan tanto Dol-P-Man como Dol-P-Glc. Estos resultados sugieren que la incapacidad de sintetizar Dol-P-P-oligosacáridos glucosilados no se debe a una única causa en todos los tripanosomátidos. En

Tabla II. Derivados de dolicol en tripanosomátidos.

Parásito	X _n -P-P-Dol	X-P-Dol
<u>Trypanosoma cruzi</u>	Man ₉ GlcNAc ₂	Man
<u>Trypanosoma conorhini</u>	Man ₉ GlcNAc ₂	N.D.
<u>Trypanosoma dionisii</u>	Man ₉ GlcNAc ₂	Man
<u>Herpetomonas samuelpessoai</u>	Man ₉ GlcNAc ₂	N.D.
<u>Herpetomonas muscarum</u>	Man ₉ GlcNAc ₂	Man-Glc
<u>Leptomonas samueli</u>	Man ₉ GlcNAc ₂	Man
<u>Crithidia fasciculata</u>	Man ₇ GlcNAc ₂	Man
<u>Crithidia hamosa</u>	Man ₇ GlcNAc ₂	N.D.
<u>Leishmania mexicana</u>	Man ₆ GlcNAc ₂	N.D.
<u>Leishmania adleri</u>	Man ₆ GlcNAc ₂	Man-Glc
<u>Blastocrithidia culicis</u>	Man ₆ GlcNAc ₂	N.D.

Los datos correspondientes a T. cruzi y L. mexicana están tomados de las referencias 90 y 92, respectivamente.

N.D., no determinado.

los casos de C. fasciculata, T. dionisii, L. samueli y T. cruzi (90), podría adjudicarse esta incapacidad a la ausencia de Dol-P-Glc. En cambio, puede especularse que L. adleri y H. muscarum, si bien sintetizan Dol-P-Glc, no pueden transferir glucosa de Dol-P-Glc al Dol-P-P-oligosacárido. La única conclusión definitiva que puede extraerse es que la incapacidad de sintetizar derivados glucosilados de Dol-P-P es una característica universal de los tripanosomátidos.

c) Aparentemente, el oligosacárido unido a Dol-P-P de mayor tamaño que se sintetiza es el mismo para un mismo género. La composición de dicho oligosacárido es $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ para Trypanosoma, Herpetomonas y Leptomonas, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ para Crithidia y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ para Leishmania y Blastocrithidia.

d) Las estructuras de los oligosacáridos unidos a Dol-P-P en cada uno de los tripanosomátidos estudiados en el presente trabajo de tesis se presentan en la Fig. 45. Dichas estructuras se proponen en base a estudios de sensibilidad a Endo-H, α - y β -manosidasas, productos de acetólisis y propiedades electroforéticas de los productos de acetólisis. Debe admitirse que las estructuras propuestas en la Fig. 45 no son las únicas posibles, y podrían imaginarse otras estructuras que concordarían igualmente con todos los datos experimentales. Sin embargo, teniendo en cuenta que las estructuras de los oligosacáridos unidos a Dol-P-P son las mismas para oligosacáridos con la misma composición en todos los eucariotes conocidos, incluyendo los tripanosomátidos C. fasciculata (88) y T. cruzi (34), es posible concluir que las estructuras propuestas son las correctas.

Un hecho notable debe destacarse en la Fig. 45: las estructuras de los oligosacáridos que contienen menos de 9 residuos de manosa son iguales a las

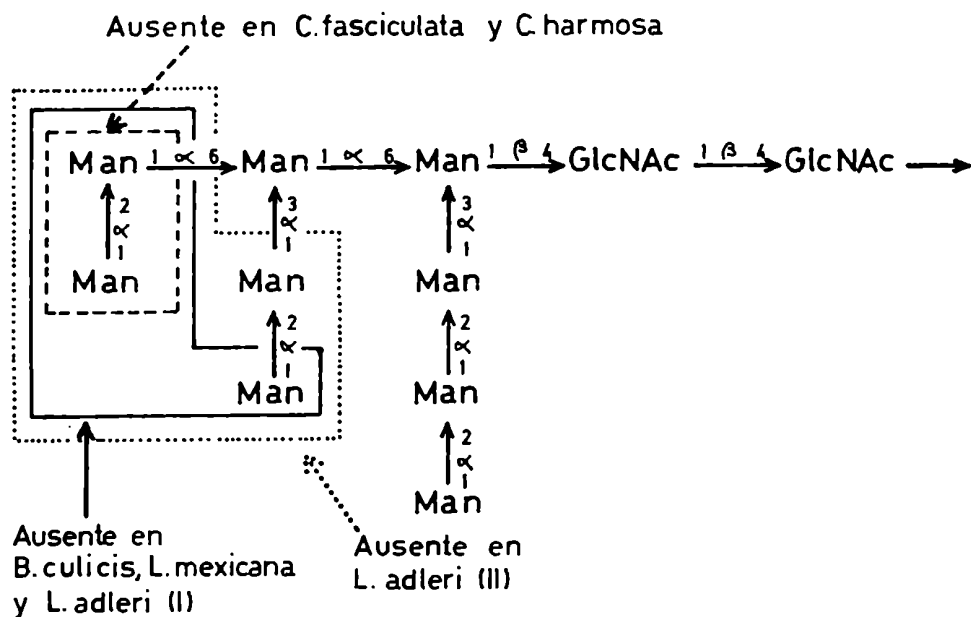


Figura 45. Estructuras de oligosacáridos unidos a Dol-P-P de tripanosomátidos. La estructura completa corresponde a los oligosacáridos de *T. cruzi*, *T. conorhini*, *T. dionisii*, *H. muscarum*, *H. samuelpessoai* y *L. samueli*. Los datos correspondientes a *T. cruzi* y *L. mexicana* fueron tomados de las referencias 90 y 92, respectivamente.

estructuras de los oligosacáridos de igual composición que son intermediarios en la biosíntesis de Dol-P-P-Glc₃Man₉GlcNAc₂ en otros sistemas eucarióticos (compárese la Fig. 45 con la Fig. 5). Recuérdese (ver sección 1.1.2. y ref. 13) que la síntesis del Dol-P-P-oligosacárido en células animales ocurre en forma ordenada y por ello las estructuras de los oligosacáridos intermediarios son únicas (Fig. 5). La identidad entre los oligosacáridos aislados de los Dol-P-P-derivados de tripanosomátidos con los correspondientes intermediarios de células animales sugiere que los tripanosomátidos se comportan como si la síntesis del oligosacárido "normal" (Glc₃Man₉GlcNAc₂) se hubiera bloqueado en algún punto. Así, Leishmania y Blastocrithidia serían incapaces de ir más allá de Man₆GlcNAc₂, Crithidia sólo llegaría hasta Man₇GlcNAc₂ y los demás (Trypanosoma, Herpetomonas y Leptomonas) llegarían hasta Man₉GlcNAc₂. Recientemente, el grupo de Robbins (125-128) describió mutantes de S. cerevisiae que sintetizan Dol-P-P-oligosacáridos de tamaños menores que el "normal" (Glc₃Man₉GlcNAc₂). Algunas de estas mutaciones fueron caracterizadas y se demostró que en un caso, la mutante era incapaz de sintetizar Dol-P-Glc; en otro caso, sintetizaba Dol-P-Glc pero no podía transferir glucosa de Dol-P-Glc al oligosacárido; en otros casos, la mutación implicaba la ausencia de una manosil transferasa específica, lo cual provocaba la acumulación de Dol-P-P-oligosacáridos sin glucosa y con menor contenido de manosa. En algunos casos, se demostró que oligosacáridos no glucosilados eran transferidos de Dol-P-P a proteínas. La semejanza entre las mutantes de S. cerevisiae descritas por Robbins y los tripanosomátidos estudiados en el presente trabajo de tesis es notable. Puede especularse que los tripanosomátidos configuran una familia de "mutantes naturales" en la N-glicosilación de pro-

teínas. Dicha mutación podría consistir en la incapacidad de sintetizar Dol-P-Glc (T. cruzi (90), C. fasciculata, L. samueli, T. dionisii), en la incapacidad de transferir glucosa de Dol-P-Glc a Dol-P-P-oligosacáridos (L. adleri, H. muscarum), o en la ausencia de una manosil transferasa específica, por ejemplo la $\alpha 1 \rightarrow 6$ manosil transferasa que transfiere manosa a $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ faltaría en Crithidia. Evidentemente, esta hipótesis es puramente especulativa por el momento y serán necesarias más evidencias experimentales para confirmarla o descartarla.

4.2. N-glicosilación de proteínas en tripanosomátidos

Los oligosacáridos que fueron caracterizados a partir de los Dol-P-P-derivados de los tripanosomátidos estudiados en el presente trabajo de tesis fueron transferidos a proteínas en todos los casos. Esto fue demostrado de la siguiente manera: los oligosacáridos sensibles a Endo-H de cada organismo fueron cromatografiados en papel y siempre se observó la presencia, entre otros, de un pico cuya movilidad cromatográfica coincidía con la de un standard del oligosacárido en cuestión. Esta evidencia, sin embargo, resultaba insuficiente, ya que esos picos frecuentemente estaban compuestos por mezclas resultantes del procesamiento posterior de los oligosacáridos. Por lo tanto, dichos picos eran eluidos y digeridos con α -manosidasa. La detección del disacárido ManGlcNAc entre los productos de degradación enzimática era tomada como evidencia de la presencia del oligosacárido buscado, ya que dicho disacárido sólo puede obtenerse a partir de la digestión enzimática de un oligosacárido que no esté sustituido. La digestión con α -manosidasa de los compuestos que migraron como $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ en L. adleri y B. culicis, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$

en C. fasciculata y C. harmosa y ManGlcNAc en T. dionisii, T. conorhini, H. samuelpessoai y L. samueli siempre produjo ManGlcNAc entre los productos de degradación, demostrando que los respectivos oligosacáridos se encontraban presentes en la muestra y que por lo tanto habían sido transferidos de Dol-P-P a la proteína.

4.3. Procesamiento de glicoproteínas en tripanosomátidos

4.3.1. Glucosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteína

El fenómeno de glucosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteína fue descrito originalmente en T. cruzi (34). Posteriormente, su presencia fue demostrada en células de animales y vegetales superiores (35,36) y en células de L. mexicana (92). En hígado de rata, esta reacción ocurre en el retículo endoplásmico rugoso, y el dador de glucosa para la reacción de glucosilación es UDP-Glc (36).

El mecanismo de glucosilación transitoria parece funcionar también en todos los tripanosomátidos estudiados en el presente trabajo de tesis. Dos evidencias experimentales son necesarias para demostrar esto: en primer lugar, debe detectarse la presencia de compuestos glucosilados entre los oligosacáridos sensibles a Endo-H. En segundo lugar, debe demostrarse el carácter transitorio de dichos compuestos.

El método experimental utilizado para demostrar la presencia de compuestos glucosilados fue el siguiente: el oligosacárido en cuestión era eluido del cromatograma y tratado con α -manosidasa. Este tratamiento sirve para eliminar otros oligosacáridos no glucosilados que son degradados

totalmente a manosa y ManGlcNAc. El compuesto glucosilado producía manosa y Glc₁Man₄GlcNAc (en realidad se obtenía también algo de Glc₁Man₅GlcNAc, producto de degradación incompleta). Este compuesto era sometido a hidrólisis ácida fuerte, y luego se procedía a la identificación de glucosa entre los productos de hidrólisis. Utilizando esta metodología, se demostró la presencia de Glc₁Man₉GlcNAc, Glc₁Man₈GlcNAc y Glc₁Man₇GlcNAc en T. dionisii y T. conorhini, Glc₁Man₆GlcNAc y Glc₁Man₅GlcNAc en L. adleri, Glc₁Man₆GlcNAc en B. culicis y Glc₁Man₇GlcNAc en C. fasciculata y C. hamosa. Asimismo, se demostró la presencia de oligosacáridos glucosilados en L. samueli y H. samuelpessoai, si bien en estos casos la caracterización de dichos compuestos fue más dudosa puesto que se encontraban mezclados con oligosacáridos galactosilados que también produjeron sustancias resistentes a α -manosidasa y complicaron el análisis.

El método para demostrar el carácter transitorio de los oligosacáridos consistió en incubar las células con (U-¹⁴C)glucosa y someterlas luego a un prolongado "chase" con medio de cultivo completo. Si los oligosacáridos glucosilados fuesen de existencia transitoria no deberían detectarse en las muestras de "chase". En efecto, los oligosacáridos glucosilados desaparecieron después de un "chase" prolongado, excepto en el caso de C. hamosa, donde aún se advierte un "hombro" en el pico principal correspondiente a Glc₁Man₇GlcNAc (en los casos de H. samuelpessoai y L. samueli este punto no fue estudiado). El caso de C. fasciculata presenta ciertas diferencias. En este organismo, el oligosacárido glucosilado fue detectado sólo a tiempos muy breves de marcación o marcando células a baja temperatura, y desaparecía cuando las células eran marcadas a 28°C durante tiempos superiores a 10 min.

Este resultado puede explicarse suponiendo que los oligosacáridos glucosilados constituyen tan solo una mínima fracción del total de oligosacáridos sensibles a Endo-H. De este modo, sólo podrían detectarse a tiempos muy breves de marcación, cuando la radioactividad específica de los residuos de glucosa fuese muy superior a la de los residuos de manosa. Para probar esto, las células fueron incubadas con (2-³H)manosa. En este caso sólo se marcarían los residuos de manosa, y la radioactividad específica de los distintos oligosacáridos debería ser la misma. Cuando las células de C. fasciculata fueron incubadas con (2-³H)manosa, el pico correspondiente al oligosacárido glucosilado se redujo a tan sólo una pequeña "cola" del pico principal, aun a tiempos muy breves de marcación. Esto demuestra que los oligosacáridos glucosilados se encontraban en muy pequeña cantidad. Un resultado similar ha sido informado en el caso de T. cruzi (34).

4.3.2. Demansilación de oligosacáridos unidos a proteína

Después de ser transferidos de Dol-P-P a proteínas, los oligosacáridos sufrieron la pérdida de entre 1 y 4 residuos de manosa, dependiendo del organismo. En C. fasciculata, el oligosacárido Man₇GlcNAc₂ unido a proteínas sufrió la pérdida de un residuo de manosa. Dicho residuo puede perderse a partir de cualquiera de los dos extremos no reductores, generando dos oligosacáridos isoméricos de composición Man₆GlcNAc₂. Estos últimos compuestos no pudieron ser detectados al marcar células "in vivo" con (U-¹⁴C)glucosa, ya que la demansilación es seguida casi instantáneamente por la adición de galactosa al extremo no reductor del oligosacárido que no ha perdido manosa (véase la próxima sección). La estructura de los oligosacáridos sensibles a

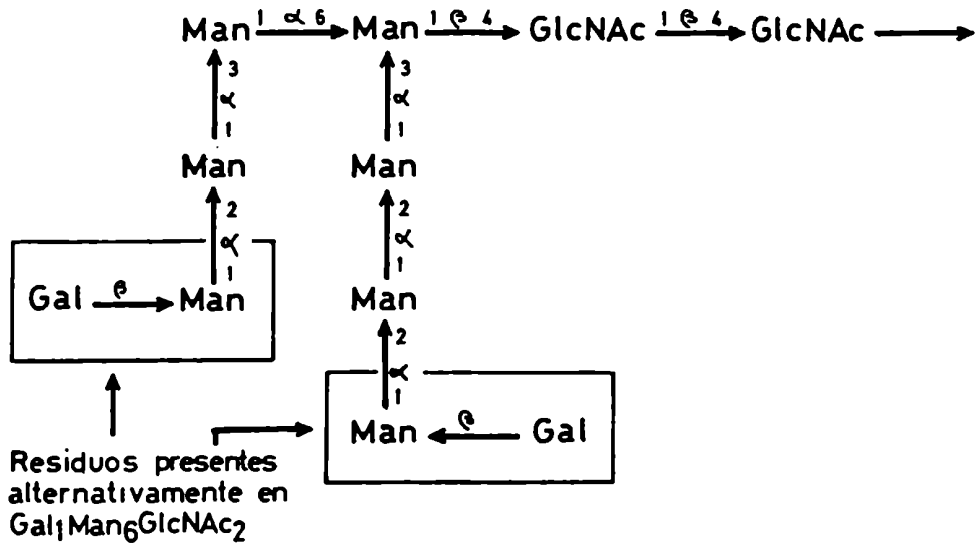


Figura 46. Estructuras de los oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. fasciculata.

Endo-H de C. fasciculata se presenta en la Fig. 46. Un mecanismo prácticamente idéntico (pérdida de un residuo de manosa y entrada de un residuo de galactosa) ha sido observado también en C. hamosa, aunque en este caso la estructura de los oligosacáridos procesados no fue establecida. En el caso de C. hamosa, se detectó también la presencia de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ entre los oligosacáridos sensibles a Endo-H, de modo que en este organismo pueden perderse hasta dos residuos de manosa.

En los casos de T. conorhini y T. dionisi, el oligosacárido transferido a proteínas puede perder hasta 4 residuos de manosa obteniéndose como producto oligosacáridos que contienen entre 9 y 5 residuos de manosa. Análogamente a lo observado en C. fasciculata, los residuos de manosa pueden perderse a partir de cualquiera de los extremos no reductores del oligosacárido original; de este modo se obtuvieron 3 isómeros de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y probablemente 5 isómeros de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$. Las estructuras probables de estos oligosacáridos se presentan en la Fig. 47. Debe destacarse que este resultado contrasta con el obtenido con T. cruzi, donde el orden de remoción de manosa es único (34).

También en L. samueli se produjo la pérdida de varios residuos de manosa, observándose la aparición de oligosacáridos de composición $\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}$. La escasa cantidad de radioactividad disponible impidió la realización de estudios estructurales sobre dichos oligosacáridos.

En L. adleri, el oligosacárido que fue transferido a la proteína ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$) sufrió la pérdida de un residuo de manosa. Como ya se mencionó antes (ver sección 3.3.6.) el pico de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ observado entre los oligosacáridos sensibles a Endo-H debió haberse originado a partir de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ y

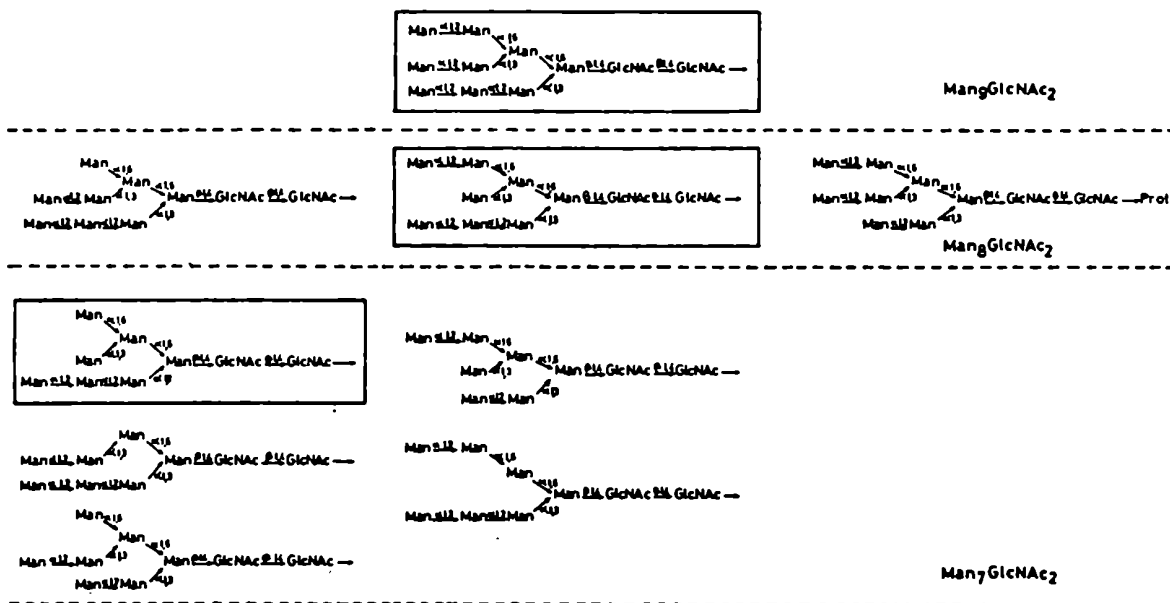


Figura 47. Estructuras posibles de los productos de procesamiento en *T. dionisi* y *T. conorhini*. Los compuestos recuadrados son los productos de procesamiento detectados en *T. cruzi* (34).

no por transferencia de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ de Dol-P-P a proteínas, ya que este último oligosacárido había sido resistente a Endo-H. La demanosilación del oligosacárido $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína en L. adleri contrasta con lo observado previamente en L. mexicana (92). En este último caso, la única reacción de procesamiento observada fue la glucosilación transitoria de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ unido a proteínas, y no se observó demanosilación.

Por último, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ unido a proteínas en H. samuelpessoai pudo perder sólo un residuo de manosa, detectándose una pequeña cantidad de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ entre los oligosacáridos sensibles a Endo-H; tal parece ser el caso también de B. culicis, si bien en este organismo la incorporación de sustituyentes de naturaleza desconocida (ver sección 3.3.7.) dificultó el análisis de los oligosacáridos sensibles a Endo-H.

4.3.3. Galactofuranosa en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas

La presencia de galactosa en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas en C. fasciculata fue informada en 1981 por Parodi et al. (87). Como ya se mencionó (ver sección anterior), el residuo de galactosa es incorporado a un extremo no reductor del oligosacárido inmediatamente después de la salida de un residuo de manosa del otro extremo no reductor, dando como resultado dos oligosacáridos isoméricos de composición $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 46). La presencia de galactosa ha sido detectada también en oligosacáridos sensibles a Endo-H de C. hamosa, L. samueli y H. samuelpessoai.

Los residuos de galactosa detectados en los oligosacáridos sensibles a Endo-H de los tripanosomátidos mencionados se encontraban en su totalidad en configuración furanósica. Los siguientes fueron los criterios utilizados para

demostrarlo: sensibilidad extrema a la hidrólisis ácida, sensibilidad a la oxidación por NaIO_4 del diol exocíclico del azúcar furanósico y sensibilidad a β -galactofuranosidasa, además de su resistencia a las reacciones características de galactopiranosas (α - y β -galactosidasas, galactosa oxidasa, lectinas).

La existencia de residuos de galactosa en configuración furanósica ha sido demostrada en varios sistemas, entre ellos en el polisacárido capsular de una especie de Pneumococcus (129), en polisacáridos de pared y exopolisacáridos de varias especies de hongos (130-135), en un galactomanano de T. cruzi (136), en un glicoconjugado de T. cruzi (100) y en un glicopéptido de C. oncopelti (137). Los resultados presentados en esta tesis demuestran la presencia de residuos de galactofuranosa en oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas, sensibles a Endo-H. A la lista de reacciones de procesamiento exclusivas de eucariotes inferiores (ver sección 1.1.4.) puede agregarse entonces, la sustitución por residuos de galactosa en configuración furanósica.

El dador de residuos de galactofuranosa no ha sido identificado, aunque podría tratarse de UDP-galactofuranosa, tal como se ha descrito para la síntesis del galactomanano de P. charlesii (138). Los intentos realizados para producir galactosilación "in vitro" de glicoproteínas utilizando preparaciones enzimáticas libres de células de C. fasciculata y UDP-(^{14}C)Gal o UDP-(^{14}C)Glc (piranósicas) resultaron infructuosas.

4.3.4. Otras reacciones de procesamiento

4.3.4.1. Elongación de oligosacáridos sensibles a Endo-H

Como se explicó en las secciones 3.3.3.1. y 3.3.4., el oligosacárido transferido de Dol-P-P a proteína en L. samueli y H. samuelpeessoai fue MangGlcNAc₂. Al estudiar los oligosacáridos sensibles a Endo-H aislados de glicoproteínas de estos dos tripanosomátidos, se observó la existencia de oligosacáridos de tamaños mayores que MangGlcNAc. Algunos de estos compuestos contenían glucosa, y podría tratarse de oligosacáridos transitoriamente glucosilados, como ya se discutió. Otros oligosacáridos contenían, además de manosa y N-acetilglucosamina, galactofuranosa. Aparentemente, en L. samueli y H. samuelpeessoai el oligosacárido transferido de Dol-P-P a la proteína podría servir como "núcleo" para la síntesis de un compuesto de mayor peso molecular, por adición de residuos de galactofuranosa (y tal vez también de manosa). Este proceso sería comparable a la síntesis del manano de S. cerevisiae (43). Debe mencionarse que la existencia de un galactomanano ha sido efectivamente detectada en H. samuelpeessoai (139), si bien el mismo ha sido muy pobremente caracterizado. Por otra parte, las condiciones drásticas empleadas para su purificación (extracción con álcali acuoso en caliente) habrían provocado la ruptura de cualquier unión a proteína que pudiera haber existido en dicho compuesto.

4.3.4.2. Incorporación de otros sustituyentes

Al estudiar los oligosacáridos resistentes a Endo-H de C. fasciculata (ver sección 3.3.1.8.), se encontró que los mismos tenían propiedades bastante similares a los sensibles a Endo-H (esto es, eran $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ con los residuos de galactosa en configuración furanósica) pero que poseían además otro sustituyente que les confería su resistencia a la enzima, además de hacerlos resistentes a α -manosidasa y β -galactofuranosidasa. Dicho sustituyente era liberado por un tratamiento ácido suave, no migraba en electroforesis en papel en medio ácido ni en cromatografía en papel. No pudo, sin embargo, establecerse la naturaleza química de esa sustancia. Un hecho importante es que entre los oligosacáridos resistentes a Endo-H no se observó la presencia de oligosacáridos glucosilados, sugiriendo que la incorporación del sustituyente desconocido ocurre en compuestos que no van a ser transitoriamente glucosilados o que ya han sido deglucosilados. Los oligosacáridos resistentes a Endo-H de C. hamosa presentaron un comportamiento idéntico a los de C. fasciculata (la existencia de otros sustituyentes en oligosacáridos resistentes a Endo-H en C. hamosa no fue investigada).

También en B. culicis se observó la presencia de sustituyentes de naturaleza química desconocida. Se detectaron dos compuestos con movilidades cromatográficas superiores a la de manosa. En este caso, sin embargo, la presencia de dichos sustituyentes no modificó la sensibilidad a Endo-H, ya que los mismos fueron detectados en oligosacáridos sensibles a Endo-H.

4.3.5. Secuencias de procesamiento de glicoproteínas en tripanosomátidos

Los datos experimentales reunidos en el presente trabajo de tesis permiten postular una secuencia de reacciones de procesamiento de glicoproteínas para algunos de los tripanosomátidos estudiados. Dichas secuencias se presentan en la Fig. 48. Los datos disponibles no permiten proponer secuencias de procesamiento completas para H. samuelpessoai y L. samueli (ver sección 4.3.4.1.) ni para B. culicis (ver sección anterior). Asimismo, en el caso de C. fasciculata, se ha omitido la reacción de incorporación del sustituyente presente en oligosacáridos resistentes a Endo-H (ver sección anterior). Como se ve en la Fig. 48, y como se ha mencionado a lo largo de esta discusión, todos los tripanosomátidos comparten rasgos comunes en cuanto al procesamiento de glicoproteínas, tales como demanosilación (excepto L. mexicana) y glucosilación transitoria.

4.3.6. Consideraciones finales

El estudio de los organismos de la familia Trypanosomatidae ha demostrado que estos protozoarios presentan un gran número de características sumamente peculiares que no se han observado en otros eucariotes, tanto en lo que respecta a su biología, como en cuanto a su genética, metabolismo, etc. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis agregan una más a la serie de peculiaridades presentadas por estos microorganismos. El mecanismo de glucosilación de proteínas en organismos de la familia Trypanosomatidae es diferente del descrito hasta la fecha en cualquier otra célula eucariótica.

Leishmania mexicana

Man₆GlcNAc₂-P-P-dolicol



Man₆GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot

Leishmania adleri

Man₆GlcNAc₂-P-P-dolicol



Man₆GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot



Man₅GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₅GlcNAc₂-Prot

Crithidia fasciculata

Crithidia hamosa

Man₇GlcNAc₂-P-P-dolicol



Man₇GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₇GlcNAc₂-Prot



Man₆GlcNAc₂-Prot → Gal₁Man₆GlcNAc₂-Prot

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma conorhini

Trypanosoma dionisii

Man₆GlcNAc₂-P-P-dolicol



Man₆GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot



Man₆GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot



Man₇GlcNAc₂-Prot ⇌ Glc₁Man₇GlcNAc₂-Prot



Man₆GlcNAc₂-Prot



Man₅GlcNAc₂-Prot

Figura 48. Mecanismo de glicosilación de proteínas y procesamiento de glicoproteínas en distintos tripanosomátidos. Los datos correspondientes a T. cruzi y L. mexicana han sido tomados de las referencias 90 y 92, respectivamente.

Distintos tripanosomátidos utilizan distintos mecanismos de N-glicosilación de proteínas y, aún más interesante, un mismo organismo puede modificar el mecanismo de glicosilación según el estadio de diferenciación (93).

La posibilidad de que los tripanosomátidos configuren una familia de "mutantes naturales" en la N-glicosilación de proteínas (ver sección 4.1.), si bien es aún especulativa, resulta atractiva. Los tripanosomátidos constituyen entonces un interesante modelo experimental para el estudio de ciertos puntos aún no del todo aclarados, tales como el número de glicosil transferasas involucradas en los procesos de ensamblado del oligosacárido y su transferencia a proteínas, su especificidad y la regulación de su expresión y/o actividad durante procesos de diferenciación celular.

A. Croda

D. M. F.

REFERENCIAS

- 1 - Gottschalk, A. (1972) en: "Glycoproteins. Their composition, structure and function". (Gottschalk, A., ed.) pp. 24-30, Elsevier, Amsterdam.
- 2 - Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) *Experientia* 38, 1129-1158.
- 3 - Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 1-34, Plenum Press, Nueva York.
- 4 - Schachter, H. & Roseman, S. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 85-160, Plenum Press, Nueva York.
- 5 - Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I. Paulson, J.C. & Hill, R.L. (1981) *Adv. Enzymol.* 52, 23-175.
- 6 - Schachter, H., McGuire, E.J. & Roseman, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5321-5328.
- 7 - Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 599, 1-37.
- 8 - Hubbard, S.C. & Ivatt, R.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50 555-583.
- 9 - Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1982) *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 12, 289-326.
- 10- Struck, D.K. & Lennarz, W.J. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 35-83, Plenum Press, Nueva York.
- 11- Staneloni, R.J., Ugalde, R.A. & Leloir, L.F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105, 275-278.
- 12- Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7762-7770.

- 13- Chapman, A., Li, E. & Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10243-10249.
- 14- Chapman, A., Fujimoto, K. & Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4441-4446.
- 15- Belocopitow, E. & Boscoboinik, D. (1982) Eur. J. Biochem. 125, 167-173.
- 16- Kornfeld, S., Gregory, E. & Chapman, A. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11649-11654.
- 17- Datema, R. & Schwartz, R.T. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11191-11198.
- 18- Gershman, H. & Robbins, P.W. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7774-7780.
- 19- Rearick, J.I., Chapman, A. & Kornfeld, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6255-6261.
- 20- Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8814-8818.
- 21- Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2255-2258.
- 22- Ugalde, R.A., Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 1174-1181.
- 23- Michael, J.M. & Kornfeld, S. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 199, 249-258.
- 24- Opheim, D.J. & Touster, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1017-1023.
- 25- Tabas, I. & Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11655-11663.
- 26- Kornfeld, S., Li, E. & Tabas, I. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7771-7778.
- 27- Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7779-7786.
- 28- Harpaz, N. & Schachter, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4894-4902.
- 29- Tabas, I. & Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6633-6639.
- 30- Hasilik, A., Klein, V., Waheed, A., Strecker, G. & von Figura, K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 7074-7078.
- 31- Waheed, A., Pohlmann, R., Hasilik, A. & von Figura, K. (1981) J. Biol.

- Chem. 256, 4150-4152.
- 32- Varki, A. & Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem. 256, 4150-4152.
- 33- Neufeld, E.F. & Ashwell, G. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 241-266, Plenum Press, Nueva York.
- 34- Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. & Mendelzon, D.H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 5589-5595.
- 35- Parodi, A.J., Mendelzon, D.H. & Lederkremer, G.Z. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8260-8265.
- 36- Parodi, A.J., Mendelzon, D.H., Lederkremer, G.Z. & Martín Barrientos, J. (1984) J. Biol. Chem. 259, 6351-6357.
- 37- Létoublon, R.C.P., Comte, J. & Got, R. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 95-101.
- 38- Gold, M.H. & Hahn, H.J. (1976) Biochemistry 15, 1808-1814.
- 39- Keehan, R., Kruczek, M. & Fusinato, L. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 697-705.
- 40- de la Canal, L. & Parodi, A.J. (1985) Comp. Biochem. Physiol. 81B, 803-805.
- 41- Crean, E.V. & Rossomando, E.F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 498, 439-441.
- 42- Lederkremer, G.Z. (1985) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 43- Parodi, A.J. (1981) en: "Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics and ultrastructure" (Arnold, W.N., ed.) vol. II, pp. 47-64, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 44- Reuvers, F., Habets-Willems, C., Reinking, A. & Boer, P. (1977) Biochim.

- Biophys. Acta 486, 541-552.
- 45- Palamarczyk, G. & Chojnacki, T. (1973) FEBS Lett. 34, 201-203.
- 46- Parodi, A.J. (1977) Eur. J. Biochem. 75, 171-180.
- 47- Lehle, L. & Tanner, W. (1975) Biochim. Biophys. Acta 399, 364-374.
- 48- Parodi, A.J. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 253-259.
- 49- Parodi, A.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8343-8352.
- 50- Parodi, A.J. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 210, 372-382.
- 51- Babczinski, P. & Tanner, W. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1119-1124.
- 52- Sharma, C.B., Babczinski, P., Lehle, L. & Tanner, W. (1974) Eur. J. Biochem., 46, 35-41.
- 53- Parodi, A.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10051-10060.
- 54- Lederkremer, G.Z. & Parodi, A.J. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12514-12518.
- 55- Gabel, C.A., Costello, C.E., Reinhold, V.N., Kurz, L. & Kornfeld, S. (1984) J. Biol. Chem. 259, 13762-13769.
- 56- Olden, K., Bernard, B.A., Humphries, M.J., Yeo, T-K, Yeo, K-T, White, S.L., Newton, S.A., Bauer, H.C. & Parent, J.B. (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 78-82.
- 57- Schwarz, R.T. & Datema, R. (1982) Adv. Carbohy. Chem. Biochem. 40, 287-379.
- 58- Olden, K., Parent, J.B. & White, S.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta 650, 209-232.
- 59- Schwarz, R.T. & Datema, R. (1984) Trends Biochem. Sci. 9, 32-34.
- 60- Vickerman, K. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 1, pp. 1-34, Academic Press, Londres.

- 61- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R.III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G. (1980) *J. Protozool.* 27, 37-58.
- 62- Wallace, F.G. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 213-240, Academic Press, Londres.
- 63- Miles, M.A. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 117-196, Academic Press, Londres.
- 64- Lom, J. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 269-338, Academic Press, Londres.
- 65- Wilson, V.C.L.C. & Southgate, B.A. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 241-248, Academic Press, Londres.
- 66- Baker, J.B. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol.1, pp. 131-174, Academic Press, Londres.
- 67- Marinkelle, C.J. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 1, pp. 175-216, Academic Press, Londres.
- 68- Marinkelle, C.J. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 1, pp. 217-256, Academic Press, Londres.
- 69- Third Annual Report, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, pp. 3-21, World Health Organization, Ginebra.
- 70- Gorin, P.A., Barreto-Bergter, E.M. & da Cruz, F.S. (1981) *Carbohydr. Res.* 88, 177-188.
- 71- Mendonça-Previato, L., Gorin, P.A., Braga, A.F., Scharfstein, J. & Pre-

- viato, J.O. (1983) *Biochemistry* 22, 4980-4987.
- 72- Gottlieb, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541, 444-458.
- 73- Gorin, P.A.J., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L. & Travassos, L.R. (1979) *J. Protozool.* 26, 473-478.
- 74- Previato, J.O., Mendonça-Previato, L. & Gorin, P.A.J. (1979) *Carbohydr. Res.* 70, 172-174.
- 75- Mendonça-Previato, L., Gorin, P.A.J. & Previato, J.O. (1970) *Biochemistry* 18, 149-154.
- 76- Lederkremer, R.M. de, Alves, M.J.M., Fonseca, G.C. & Colli, W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 444, 85-96.
- 77- Wolfenson, C. & Lederkremer, R.M. de (1984) *Comp. Biochim. Physiol.* 77B, 555-560.
- 78- Handman, E. & Goding, J.W. (1985) *EMBO J.* 4, 329-336.
- 79- Englund, P.T., Hajduk, S.L. & Marini, J.C. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 695-726.
- 80- Bernards, A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 824, 1-15.
- 81- Strickler, J.E. & Patton C.L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1529-1533.
- 82- Snary, D. & Hudson, L. (1979) *FEBS Lett.* 100, 166-170.
- 83- Nogueira, N., Unkeless, J. & Cohn, Z. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1259-1253.
- 84- Sher, A. & Snary, D. (1982) *Nature* 300, 639-640.
- 85- Katzin, A.M. & Colli, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 727, 403-411.
- 86- Andrews, N.W., Katzin, A.M. & Colli, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140, 599-604.

- 87- Parodi, A.J., Quesada-Allue, L.A. & Cazzulo, J.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6201-6205.
- 88- Katial, A., Prakash, C. & Vijay, I.K. (1984) Eur. J. Biochem. 141, 521-526.
- 89- Quesada-Allue, L.A. & Parodi, A.J. (1983) Biochem. J. 212, 123-128.
- 90- Parodi, A.J. & Quesada-Allue, L.A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7637-7640.
- 91- Parodi, A.J. & Cazzulo, J.J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7641-7645.
- 92- Parodi, A.J., Martín Barrientos, J. & Engel, J.C. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 1-7.
- 93- Engel, J.C. & Parodi, A.J. (1985) J. Biol. Chem. 260, 10105-10110.
- 94 - Bacchi, C.J., Lambros, C., Goldberg, B., Hutner, S.H. & de Carvalho, G.D.F. (1974) Antimicrob. Agents. Chemother. 6, 785-790.
- 95 - Preston, J.F.III & Gander, J.E. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 124, 504-512.
- 96 - Thomas, J.A., Schlender, K.K. & Larner, J. (1968) Anal. Biochem. 25, 486-499.
- 97 - Sukeno, T., Tarentino, A.L., Plummer, T.H. Jr. & Maley, F. (1972) Biochemistry 11, 1493-1501.
- 98 - Rietschel-Berst, M., Jentoft, N.H., Rick, P.D., Pletcher, C., Fang, F. & Gander, J.E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3219-3226.
- 99 - Eagle, M.H. (1959) Science 130, 432-437.
- 100- Lederkremer, R.M. de, Casal, O.L., Alves, M.J.M. & Colli, W. (1980) FEBS Lett. 116, 25-29.
- 101- Kocourek, J. & Ballou, C.E. (1969) J. Bacteriol. 100, 1175-1181.
- 102- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J.

Biol. Chem. 193, 265-275.

- 103- Bray, G.A. (1960) Anal. Biochem. 1, 279-285.
- 104- Parodi, A.J., Staneloni, R.J., Cantarella, A.I., Leloir, L.F., Carminatti, H. & Levy, J.A. (1973) Carbohydr. Res. 26, 393-400.
- 105- Iñón de Iannino, N. (1983) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 106- Behrens, N.H. & Leloir, L.F. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 153-159.
- 107- Dunphy, P.J., Kerr, J.D., Penock, J.F., Whittle, M.J. & Fenney, J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 136, 136-147.
- 108- Jung, P. & Tanner, W. (1973) Eur. J. Biochem. 37, 1-6.
- 109- Adrian, G.S. & Keenan, R.W. (1981) Biochim. Biophys. Acta 663, 637-644.
- 110- Herndon, W.C. (1967) J. Chem. Educ. 44, 724-729.
- 111- Behrens, N.H., Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2857-2860.
- 112- Romero, P., García, R.C. & Dankert, M. (1977) Mol. Cell. Biochem. 16, 205-212.
- 113- Kobata, A. (1979) Anal. Biochem. 100, 1-14.
- 114- Kocourek, J. & Ballou, C.E. (1969) J. Bacteriol. 100, 1175-1181.
- 115- Foster, A.B. (1962) en: "Methods in Carbohydrate Chemistry" (Whistler, E.L. & Wolfrom, M.L., eds.) vol. I., pp. 51-58, Academic Press, Nueva York y Londres.
- 116- Spiro, M.J., Spiro, R.G. & Bhojroo, V.D. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6400-6408.
- 117- White, D.A. & Speake, B.K. (1980) Biochem. J. 192, 297-301.
- 118- Nathans, D. (1967) en: "Antibiotics" (Gottlieb, D. & Shaw, P.D., eds.)

- vol. I, pp. 259-277, Springer-Verlag, Nueva York.
- 119- Sisler, H.D. & Siegel, M.R. (1967) en: "Antibiotics" (Gottlieb, D. & Shaw, P.D., eds.) vol. I, pp. 283-307, Springer-Verlag, Nueva York.
- 120- De Waard, A., Hickman, S. & Kornfeld, S. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7581-7587.
- 121- Rietschel-Berst, M., Jentoft, N.H., Rick, P.D., Pletcher, C., Fang, F. & Gander, J.E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3219-3226.
- 122- Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr. & Maley, F. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4508-4511.
- 123- Maley, F. & Trimble, R.B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1088-1090.
- 124- Li, E. & Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2754-2758.
- 125- Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3203-3210.
- 126- Couto, J.R., Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1984) J. Biol. Chem. 259, 378-382.
- 127- Runge, K.W., Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1984) J. Biol. Chem. 259, 412-417.
- 128- Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7466-7470.
- 129- Roberts, W.K., Buchanan J.G. & Baddiley, J. (1962) Biochem. J. 82, 42F.
- 130- Barker, S.A., Cruickshank, C.N.D. and Holden, J.H. (1963) Biochim. Biophys. Acta 74, 239-246.
- 131- Gander, J.E., Jentoft, N.H., Drewes, L.R. & Rick, P.D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2063-2072.
- 132- Mendonça, L., Gorin, P.A.J., Lloyd, K.O. & Travassos, L.R. (1976) Biochemistry 15, 2423-2431.

- 133- Barreto-Bergter, E.M., Travassos, L.R. & Gorin, P.A.J. (1980) Carbohyd. Res. 86, 273-285.
- 134- Nakajima, T., Yoshida, M., Nakamura, M., Hiura, N. & Matsuda, K. (1984) J. Biochem. 96, 1013-1020.
- 135- Groisman, J. (1985) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 136- Gorin, P.A.J., Barreto-Bergter, E.M. & da Cruz, F.S. (1981) Carbohyd. Res. 88, 177-188.
- 137- Wolfenson Band, C.F. (1985) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 138- Garcia Trejo, A., Haddock, J.W., Chittenden, J.F. & Baddiley, J. (1971) Biochem. J. 122, 49-57.
- 139- Mendonça-Previato, L., Gorin, P.A.J. & Previato, J.O. (1979) Biochemistry 18, 149-154.