

Tesis de Posgrado

Estudio de B-Glucanos pared celular en *Prototheca zopfii*. Biosíntesis, aislamiento y caracterización de un intermediario glucoproteico

Rivas, Liliana Angélica

1987

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

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

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

Cita tipo APA:

Rivas, Liliana Angélica. (1987). Estudio de B-Glucanos pared celular en *Prototheca zopfii*. Biosíntesis, aislamiento y caracterización de un intermediario glucoproteico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2006_Rivas.pdf

Cita tipo Chicago:

Rivas, Liliana Angélica. "Estudio de B-Glucanos pared celular en *Prototheca zopfii*. Biosíntesis, aislamiento y caracterización de un intermediario glucoproteico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2006_Rivas.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE B-GLUCANOS DE PARED CELULAR EN Prototheca zopfii.
BIOSINTESIS, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN INTERMEDIARIO
GLUCOPROTEICO.

AUTOR: Liliana Angélica Rivas

DIRECTOR: Dr. Rafael Pont Lezica

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Mar del Plata.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS.

AÑO 1986

*Basis 2006
p. 2*

a Jonatan, Ezequiel y Joel,

a Héctor,

a la memoria de mis padres.

	Página
INDICE	i
I. INTRODUCCION	1
1. Celulosa y pared celular	1
2. Celulosa y otros B-glucanos	2
3. Etapas en la síntesis de B-glucanos fibrilares	5
3.1. Polimerización, cristalización y orientación de las microfibrillas	5
3.2. Ubicación del complejo sintético	6
3.3. Aspectos regulatorios en la síntesis de B-glucanos	7
4. Síntesis <u>in vitro</u> de B-glucanos	7
4.1. Homogenización y disminución de la capacidad sintética	7
4.2. Homogenización y liberación de inhibidores	10
5. Mecanismo de iniciación en la síntesis de polisacáridos	10
5.1. Aceptores proteicos en la síntesis de homopolisacáridos	12
5.2. Antecedentes de aceptores proteicos en la síntesis de B-glucanos y objetivos del presente trabajo	13
II. MATERIAL Y METODOS	16
1. Productos químicos	16

	Página
1.1. Compuestos radiactivos	16
1.2. Enzimas auxiliares	16
2. Organismo y cultivo	17
3. Preparación de membranas	17
4. Ensayos enzimáticos	18
4.1. Incubación <u>in vivo</u> y aislamiento de AI1	18
4.2. Incubación <u>in vitro</u>	18
4.2.1. Condiciones de ensayo y aislamiento para el estudio de distintos produc tos durante el ciclo biológico	18
4.2.2. Incubación standard	19
5. Aislamiento de TCAI, AI2 y AI3	19
6. Purificación de glicosidasas y tratamientos enzi máticos	20
7. Métodos analíticos	22
7.1. Tratamientos degradativos	22
7.1.1. Degradación alcalino-reductora	22
7.1.2. Reducción con borohidruro de Na	22
7.1.3. Oxidación con periodato	22
7.1.4. Metilación	23
7.1.5. Hidrólisis ácida	23
7.2. Cromatografías y electroforesis	24
7.2.1. Filtración en gel	24
7.2.1.1. Cromatografías en geles Sephadex G-75, G-50 y G-25	24
7.2.1.2. Cromatografías en Biogel P-6 y P-2	24

	Página
7.2.2. Cromatografía y electroforesis en papel	25
7.2.3. Cromatografía en capa delgada	26
7.2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida	26
7.3. Determinaciones cuantitativas	27
7.3.1. Concentración de ácidos nucleicos y proteínas	27
7.3.2. Métodos para cuantificar proteínas y azúcares	27
7.3.3. Medida de la radiactividad	28
 III. RESULTADOS Y DISCUSION	 29
 <u>Capítulo 1. Sincronización</u>	 29
1. Inducción de la sincronización	29
2. Variaciones en el contenido de ácidos nucleicos y proteínas	32
3. Formación de polímeros de (^{14}C)-glucosa <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u>	36
4. Identificación de ^{14}C -AI1	38
 <u>Capítulo 2. Demostración de la presencia de actividades glucosil transferasa en membranas. Estudio comparativo de las propiedades cinéticas y fisiológicas</u>	 42
1. Efecto de cationes divalentes	43
2. pH óptimo y estabilidad enzimática	45

	Página
3. Actividades glucosil transferasa en función de la concentración de sustrato	47
4. Efecto de incubaciones prolongadas sobre la síntesis de AI2	49
5. Especificidad de las glucosil transferasas	52
6. Identificación de ^3H -AI2 y ^{14}C -AI3	55
7. Acción de inhibidores y activadores sobre la síntesis de AI2	61
<u>Capítulo 3. Evidencias para la formación de un precursor durante la síntesis de AI2</u>	68
1. Productos de fraccionamiento	68
2. Formación de TCAI y AI2 en el tiempo	69
3. TCAI y celodextrinas como precursores en la síntesis de AI2	71
4. Localización del precursor de AI2	77
<u>Capítulo 4. Aislamiento y caracterización de un intermediario glucoproteico</u>	81
1. Preparación de ^{14}C - ^3H -TCAI	81
2. Purificación de GP	83
3. Naturaleza de la unión aminoácido-azúcar de GP	87
4. Identificación del ^3H -oligosacárido de GP	93
4.1. Grado de polimerización	93
4.2. Posición y configuración anomérica de las ligaduras glicosídicas	93
IV. CONCLUSIONES	98

	Página
V. CITAS BIBLIOGRAFICAS	102
VI. ABREVIATURAS	125
VII. AGRADECIMIENTOS	126

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

La celulosa es uno de los polímeros más abundantes del planeta, sin embargo, su biogénesis continúa siendo un enigma por resolver.

En las dos últimas décadas, herramientas sofisticadas como difracción de rayos X, técnicas citológicas, resonancia magnética nuclear, criofractura y microscopía electrónica han revelado perfiles nuevos de la estructura macromolecular y citológica de la celulosa. No obstante este progreso, la comprensión del mecanismo biosintético aún necesita de la conjunción de experimentos ingeniosos originados en campos tan distintos como la Genética y Biología Moleculares, la Física y Bioquímica con el aporte de la nueva tecnología. En tanto, la oportunidad de sintetizar industrialmente el polímero continuará postergada.

1. Celulosa y pared celular.

La celulosa, definida por sus funciones biológicas, es el marco estructural de la célula vegetal y un reservorio de energía y nutrientes en la biósfera. Químicamente, la celulosa nativa es un polímero lineal de residuos D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos B(1,4), con un grado de polimerización variable¹.

En la naturaleza, la celulosa está presente como un conjunto de cadenas paralelas de B-(1,4)-glucanos, unidas por

múltiples puentes de hidrógeno^{2,3}, y organizadas en microfibrillas cristalinas altamente insolubles⁴⁻⁶. Las fibras, responsables de la fuerza ténsil de la pared, están generalmente incrustadas en una matriz amorfa de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos no celulósicos de organización muy compleja⁷⁻¹¹.

Innumerables estudios sobre composición de la pared vegetal, a distintos niveles evolutivos, permiten concluir que no hay una pared celular típica. Las variaciones cuali y cuantitativas del esqueleto celulósico y de la matriz son rasgos importantes en la clasificación taxonómica. Algas^{12,13}, hongos¹⁴⁻¹⁸ y plantas superiores¹⁹⁻²³ tienen paredes muy diferentes. Sin embargo, los componentes nativos de la pared primaria de Angiospermas muestran cierta constancia en todos sus representantes. En la Tabla I se resumen esos elementos. Por el contrario, tal resumen sería imposible de confeccionar para algas, dada la heterogeneidad manifiesta a nivel de especie²⁵⁻²⁷. En algunas algas, por ejemplo la Chlorophyta Codium, la celulosa está completamente reemplazada por un B-(1,4)-manano^{28,29} o por quitina como en Chrysophyta³⁰. En forma similar, en la mayoría de los hongos el componente fibrilar es quitinoso^{31,32} y, excepcionalmente, en Comycetales se describen B-glucanos fibrilares¹⁸.

La celulosa no es privativa de organismos eucariotas. Bacterias, de las cuales la más estudiada es Acetovacter xylinum, la producen en forma de película flotante³³⁻³⁵. También, la celulosa se encuentra en Tunicados³⁶, aunque son pocos los es

TABLA I. Constituyentes de la pared primaria de Angiospermas.

Clase (extracción ^a)	Ejemplos
-Pectinas (agua caliente y agentes quelantes)	* Ramnogalactouronanos (dico) * Arabinanos y arabinogalactanos
-Hemicelulosas (solubles en álcali)	* Xiloglucanos (dico) * Arabinoxilanos (mono) * Glucomananos * Polisacáridos metilados y acetilados
- α -celulosa (insoluble en álcali caliente)	* No pura (c/trazas de azúcares distintos de Glc y proteínas)
-Otros carbohidratos (solubles o insolubles en álcali)	* Mezcla de B-(1,3) y B-(1,4)-glucanos * Homopolisacáridos de Gal y Ara (dico) * B-(1,3)-glucanos (callosa) inducidos por daño
-Proteínas y glicoproteínas (urea, LiCl, TCA y fenol:ác. acético:H ₂ O)	* Glicoproteínas ricas en Hypr: hypr-arabinósidos/galactósidos y Ser-galactósidos
-Lignina y sus precursores	* Normalmente no se encuentran en la pared primaria

^aLas extracciones no producen fracciones puras. Tabla construida en base a datos de Willison & Klein²⁴ que no incluye componentes de semillas, raíz ni tubérculos.

tudios estructurales realizados en estos animales.

2. Celulosa y otros B-glucanos.

Es difícil definir, en estudios de síntesis de B-(1,4)-glucanos in vivo y, más frecuentemente in vitro, cuándo el producto formado es genuina celulosa. En un típico experimento de síntesis un precursor radiactivo como mono y disacáridos³⁷⁻⁴¹ o NDP-glucosa⁴² marcado con ³H o ¹⁴C se incuba con material biológico tal como protoplastos^{37,43-45}, células plasmolizadas⁴⁶⁻⁴⁸, secciones delgadas de un órgano en crecimiento⁴⁰⁻⁵¹, extractos libres de células⁵²⁻⁵⁴ o B-glucan sintetasas parcialmente purificadas^{55,56}. La completa caracterización del B-glucano requiere la identificación de glucosa como única hexosa, la determinación del tipo y configuración anomérica de la ligadura glicosídica presente y el grado de polimerización de la cadena⁵⁷⁻⁶⁰. Sin embargo, la incorporación de glucosa radiactiva en B-(1,4)-glucanos no prueba la formación de celulosa. La determinación de microfibrillas al microscopio y un patrón de difracción de rayos X, idéntico al de celulosa I o II, son decisivos^{61,62}. Pero, en experimentos in vivo, identificaciones exhaustivas de "celulosa purificada" han puesto en evidencia mínimas contaminaciones con azúcares distintos de glucosa⁶³⁻⁶⁵.

Las interpretaciones de resultados, en ensayos in vitro, son aún más confusas por los bajos niveles de síntesis y del grado de polimerización de los B-glucanos. Semejantes resul

tados hacen dudar de la naturaleza celulósica del producto⁶⁶⁻⁶⁸ y es razonable preguntarse si el B-glucano es un precursor celulósico en estadios iniciales^{69,70}, parte de algún polímero de la matriz⁷¹⁻⁷⁴ o callosa^{75,76}. Luego, faltan pruebas inequívocas de que la celulosa haya sido sintetizada in vitro.

3. Etapas en la síntesis de B-glucanos fibrilares.

3.1. Polimerización, cristalización y orientación de microfibrillas.

Las cadenas de B-(1,4)-glucanos forman regiones cristalinas por múltiples puentes de hidrógeno pero, se acepta que por polimerización y cristalización puedan ocurrir en dos eventos sucesivos o parcialmente superpuestos^{77,78}. En apoyo a esta hipótesis varios investigadores⁷⁹⁻⁸¹, usando colorantes como Calcofluor y rojo Congo muestran que, la polimerización de B-glucanos en bacterias y algas, puede ser desacoplada de la cristalización in vivo, demorándose la aparición de fibrillas.

La uniformidad en el tamaño de las fibrillas, la orientación de las mismas en la pared y su aparición en un momento particular del desarrollo celular indican que estas etapas están bajo control celular⁸²⁻⁸⁴. Ya en la década del 60, Marx Figini sugirió que la polimerización de polisacáridos, en algas y plantas superiores⁸⁵, toma lugar por medio de un proceso en el que interviene una "estructura matriz". Esta controlaría el número de unidades glicosídicas que integran la molécula de polisacárido, resultando un grado de polimerización mo

nodisperso.

Con insistencia, investigadores del tema^{67,68} establecen analogías entre el conocido mecanismo biosintético de la quitina y el de la celulosa, aún en estudio. La quitina ya se sintetiza in vitro^{86,87} pero, sin duda que la polimerización, cristalización y orientación de B-glucanos en la pared, son operaciones complejas, que requieren de integridad y correcta interacción entre membranas, microtúbulos, complejo enzimático y fibrillas⁸⁸⁻⁹². Existen abundantes pruebas de que tal organización, mayor o diferente que la necesaria para sintetizar quitina, se pierde experimentalmente^{24,93}.

3.2. Ubicación del complejo enzimático.

Con excepción del alga Pleurochrysis que sintetiza escamas celulósicas en el aparato de Golgi⁹³⁻⁹⁵, bacterias^{77,96}, algunas algas⁹⁷⁻¹⁰¹ y plantas superiores¹⁰²⁻¹⁰⁵ sintetizan fibras de celulosa en la membrana plasmática.

La síntesis de polisacáridos de la matriz se localiza en el sistema de membranas internas¹¹. No se descarta que esas membranas transporten glucan sintetasas hasta la interfase pared-membrana plasmática, donde depositen los complejos enzimáticos por exocitosis. Esta hipótesis se apoya en estudios con fracciones de membrana enriquecidas que sintetizan B-glucanos solubles^{53,101,106-108}. La obtención de esos precursores in vitro podría interpretarse como una consecuencia de la desactivación de un mecanismo de control de síntesis, provocado por

la homogenización. In vivo, las glucan sintetasas serían movilizadas en forma potencialmente activa (zimógeno).

Colvin, desde una posición opuesta, postula un mecanismo físico por el cual, cadenas con grado de polimerización discreto, cristalizan en fibrillas. En tal evento no participa complejo enzimático alguno, siendo la formación de fibrillas el resultado de fuerzas fisicoquímicas externas¹⁰⁹⁻¹¹¹. Las causas de la controversia tienen origen en problemas técnicos de la microscopía de luz y electrónica, ya que la apariencia de las membranas fracturadas por congelamiento, dependen del tratamiento previo con fijadores y crioprotectores. Estas sustancias, como glicerol y glutaraldehído, alteran la distribución de partículas intermembranosas²⁴.

3.3. Aspectos regulatorios en la síntesis de B-glucanos.

Es escasa la información referida a la regulación biosintética de B-glucanos. Las chances de que ese control se ejerza a nivel de transcripción y/o traducción de glucan sintetasas^{112,113}, por activadores y/o inhibidores¹¹⁴⁻¹²⁸, por niveles de sustrato^{50,129,130} o por hormonas¹³¹⁻¹³⁸, tienen igual peso hasta el presente.

4. Síntesis in vitro de B-glucanos.

4.1. Homogenización y disminución de la capacidad sintética.

Experimentos in vitro usualmente se inician con el aislamiento de membranas provenientes de tejidos en activa síntesis

de B-glucanos^{42,139}. A esas fracciones microsomales contribuyen cisternas de Golgi, vesículas secretorias verdaderas y porciones de membrana plasmática reselladas en vesículas^{140,141}.

Qué consecuencias tiene la homogenización sobre un sistema celular sabiendo que las glucan sintetasas son proteínas integrales de membrana?

Las técnicas habituales de homogenización rompen membranas y, por su posición periférica en la célula, la membrana plasmática es la más dañada. Aunque los fragmentos se vesiculen, el tratamiento puede desmembrar o inactivar los complejos sintéticos o "rosetas"^{99,104,108}.

Respecto al resellado de los fragmentos de membrana, cabe preguntarse si es importante que la cara citoplasmática de los mismos conserve su posición en las vesículas. Teniendo en cuenta que experimentos con secciones de tejido^{142,143} muestran que sólo las células cortadas sintetizan B-glucanos a partir de NDP-glucosa, no sería conveniente un sellado con la membrana en posición correcta.

Por otro lado, el Ca^{+2} es sacado de la célula por bombas localizadas en la membrana plasmática¹⁴⁴ y, observando que muchos ensayos de síntesis requieren ese ión^{51,145,146}, podría interpretarse que la orientación de las caras se ha alterado. Obviamente, las superficies de la membrana no son simétricas y, desde el punto de vista de la accesibilidad del sustrato, sería conveniente que la cara aceptora del precursor, la inter

na, quedara en contacto con el medio de incubación. Hasta el presente no hay evidencias experimentales que muestren qué ocurre realmente.

En la homogenización de tejidos se emplean buffers con alta concentración de sacarosa^{124,147} que vuelven hipertónico al medio de extracción. Es posible que la hipertonicidad afecte los complejos sintéticos si, como se sabe, en la célula viva la membrana plasmática está turgente^{148,151}.

Componentes habituales en las extracciones y/o incubaciones son los iones. Estos, bajo ciertas condiciones, alteran el "mosaico fluído" ocasionando la rigidez del mismo^{152,153}. También, algunos iones como K^+ y Na^+ , crean gradientes electroquímicos a través de las membranas¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Si la situación in vitro no refleja las condiciones in vivo, probablemente se comprometa la actividad sintética de enzimas localizadas en cualquiera de las vesículas mencionadas precedentemente.

Los aspectos planteados en esta sección perderían importancia si los B-polisacáridos se sintetizaran a partir de enzimas solubilizadas. Varias referencias en la bibliografía informan de este suceso^{55,56,157-159}, sin lograr una purificación a homogeneidad de la(s) enzima(s) que, además, son muy inestables bajo esas condiciones. El empleo de vesículas lipídicas artificiales^{141,160,161} podría constituir el recurso necesario para que las enzimas, en un ambiente semejante al natural, conserven la actividad catalítica.

4.2. Homogenización y liberación de inhibidores.

La homogenización destruye la compartimentalización celular, quedando ciertos factores inhibidores en libertad de interaccionar con los complejos sintéticos ubicados en membranas de cualquier origen. En algunos casos^{123,162}, esos factores resultan ser proteasas. Su exclusión de los homogenatos, por centrifugación a alta velocidad, no impide el efecto nocivo que ocasionan durante la extracción. Con acción contraria, Kauss y colaboradores informan de una B-(1,3)-glucan sintetasa activada por proteólisis limitada de una tripsina en extractos de soja¹⁴⁵.

En un grupo diferente se ubican aquellas enzimas que no son separadas de la fracción membranosa por centrifugación. Algunas, como nucleotidasas^{114,163,164} y glicosidasas^{55,165}, pueden degradar sustrato y producto respectivamente. In vivo estas enzimas cumplen un rol regulatorio¹⁶⁶.

5. Mecanismo de iniciación en la síntesis de polisacáridos.

Durante la síntesis de polisacáridos, el alargamiento de la cadena ocurre por adición de unidades glicosídicas al extremo no reductor del polisacárido en crecimiento. Se describen, sin embargo, casos en que el polímero crece por su extremo reductor¹⁶⁷. Las sustancias reconocidas como dadoras de glicosilos son azúcares activados: los NDP-azúcares.

Si bien este esquema mantiene vigencia, se reconoce que muchos polisacáridos tienen otros requerimientos en la etapa inicial de síntesis. El más importante de ellos es la participación de una molécula receptora de la primera unidad glicósídica. De este descubrimiento, muy bien documentado, se infiere que la señal de iniciación conlleva un reconocimiento de la estructura del receptor por las glicosiltransferasas. Luego, un aceptor glicosilado o intermediario es el polisacárido en sí mismo ya que constituye una expresión menor del polímero final.

Cabe preguntarse si la formación de ese intermediario es transiente o la asociación persiste hasta la degradación del polisacárido. Se manejan varias posibilidades al respecto y son:

1. que el aceptor forme parte del polisacárido terminado,
2. que un aceptor transfiera glicosilos, individuales o en bloc, a un segundo aceptor sobre el cual se complete el tamaño molecular genéticamente establecido y
3. que el aceptor libere polímeros con grado de polimerización discreto que, en un paso posterior, sean ensamblados mediante ligasas hasta obtener el grado de polimerización característico.

En varios laboratorios se intentó el aislamiento y caracterización de los aceptores, que se identificaron principalmente como lípidos y proteínas aunque en algunos casos se sugirió que son oligosacáridos de cadena corta¹⁶⁸⁻¹⁷². Lípidos

y proteínas son de especial interés porque no son polisacáridos y son componentes del sistema de membranas con el que, de una u otra forma, están relacionados los complejos enzimáticos que sintetizan polisacáridos.

Las evidencias son claras en el sentido de que los glicolípidos son intermediarios en la síntesis de lipopolisacáridos, glicoproteínas y polisacáridos en procariotas¹⁷³⁻¹⁷⁶ y eucariotas^{118,125,177-182}. Las demostraciones más convincentes de tal participación se realizaron usando aceptores endógenos, solubilización y separación de las enzimas individuales^{183,184}, en combinación con inhibidores de la glicosilación^{185,186} y material biológico que presentaba alteraciones genéticas en el camino metabólico del polisacárido a nivel del aceptor¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Como se mencionara en una sección precedente, el mayor obstáculo se centra en la regeneración del sistema in vitro.

5.1. Aceptores proteicos en la síntesis de homopolisacáridos.

Whelan ha sugerido que un aceptor proteico puede ser un requerimiento universal para la síntesis de polisacáridos, incluyendo a los de pared celular¹⁸⁹. Esta hipótesis implica que toda cadena polisacárida naciente está asociada covalentemente con un péptido. En ese caso las glicosil transferasas iniciadoras de homopolisacáridos deben reconocer una secuencia de aminoácidos específica del péptido. Luego, una proteína aceptora asociada a membranas, probablemente pase por una se

cuencia temporal de procesos de traducción, inserción, traslocación y glicosilación semejante a aquella postulada para proteínas secretadas^{190,191}.

Una ruta metabólica que incluya glicoproteínas intermedias provee además un mecanismo adicional de control de síntesis sobre distintos polisacáridos con un sustrato común. El nivel de proteínas catalíticas yceptoras puede estar sincrónicamente regulado desde el núcleo.

Usando sistemas libres de células y un dador de glicosilos, varios grupos de trabajo lograron glicosilar aceptores proteicos usando para ello organismos tan diferentes como los que se ilustran en la Tabla II. En todos los casos se demostró un requerimiento absoluto de la proteína. Para quitina, se informa la detección de una quitino-proteína en artrópodos²²¹⁻²²⁴, pero no se demuestra la función aceptora de la proteína.

Por su estrecha analogía estructural con los polisacáridos que se investigan en esta tesis, los sistemas que sintetizan mananos y glucanos de reserva constituyen un marco de referencia interesante para una investigación similar en B-glucanos de pared celular.

5.2. Antecedentes de aceptores proteicos en la síntesis de B-glucanos y objetivos del presente trabajo.

La idea de que una proteína juegue un rol aceptor en la síntesis de B-glucanos es motivo de controversia. Hay evidencias, algunas incompletas y otras indirectas, de su formación

TABLA II. Sistemas en los que se describen aceptores proteicos.

Polisacáridos	Sistema	Referencias
Paramilón	<i>Euglena gracilis</i>	193
Dextranos	<i>Streptococcus mutans</i>	194
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	195
Glucógeno	<i>Aerobacter aerogenes</i>	196
	<i>Escherichia coli</i>	197-199
	<i>Saccharomyces</i>	200
	<i>Neurospora crassa</i>	201,202
	Invertebrados	203
	Hígado de rata	204-209
	Retina bovina	210
Corazón de rata	211	
Almidón	<i>Solanum tuberosum</i>	212-217
	Maíz dulce germinado	218
	<i>Oriza sativa</i>	219
Mananos	Hongos	220

en bacterias^{39,225}, algas^{181,226}, hongos²²⁷⁻²²⁹ y plantas superiores^{179,230}. En ningún caso las pruebas presentadas han sido decisivas. Sigue faltando la caracterización de la estructura del intermediario.

Trabajos previos con Prototheca zopfii dieron evidencias preliminares para el rol de una proteína como aceptora en la síntesis de B-glucanos¹⁸¹, observándose que el agregado de cu marina bloquea la reacción de glucosilación del aceptor¹²⁵.

Resulta de interés entonces estudiar en detalle los pasos iniciales de la síntesis de B-glucanos en este mismo organismo. Los objetivos propuestos son:

1. Obtención de un cultivo homogéneo o sincrónico y determinación del momento óptimo de síntesis de B-glucanos. A partir de ese sistema se estudian in vitro los siguientes aspectos:
2. Aislamiento del producto final y su caracterización.
3. Requerimientos y propiedades de las enzimas intervinientes.
4. Posibles mecanismos regulatorios de las glucan sintetasas.
5. Rol fisiológico del intermediario.
6. Aislamiento del intermediario y análisis de su estructura.

II. MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS

1. Productos químicos.

1.1. Compuestos radiactivos.

UDP-(U-¹⁴C)-glucosa (284,5 mCi/mmol), GDP-(U-¹⁴C)-glucosa (269 mCi/mmol), NaB(³H)H₄ (9,7 Ci/mmol), D-(U-¹⁴C)-glucosa (268 mCi/mmol), D-[6-³H(N)]-glucosa (31 Ci/mmol) y L-(U-¹⁴C)-prolina (285 mCi/mmol) fueron obtenidos en Radiochemical Center, Amersham, UK. UDP-(³H)-glucosa (4,43 mCi/umol) provino del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar.

1.2. Enzimas auxiliares.

α-amilasa (tipo II-A; 700 U/mg)(EC 3.2.1.1) de Bacillus subtilis, β-amilasa (tipo I-B; 765 U/mg)(EC 3.2.1.2) de batata, α-glucosidasa (tipo I; 9 U/mg)(EC 3.2.1.20) de levadura, celulasa (tipo II; 1 U/mg)(EC 3.2.1.4) de Aspergillus niger, pronasa inespecífica (tipo VI; 1000 U/mg)(EC 3.4.4.-) de Streptomyces griseus, tripsina (tipo III; 10000 U/mg)(EC 3.4.4.4) de páncreas bovino e inhibidor de tripsina (tipo I-S; 10000 U/mg) de soja se obtuvieron en Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA. El resto de los compuestos químicos proviene de diferentes fuentes comerciales.

2. Organismo y cultivo.

Prototheca zopfii Kruger, cepa PR-5 N^o 16533, proviene de American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA. Las células se cultivaron en medio basal conteniendo peptona 0,2% y glucosa 0,8% y en medio de sincronización conteniendo peptona 0,05%, glucosa 0,6% y EDTA 1,5-2 mM, pH 7,0, a 25^oC con agitación constante. El número de células se determinó por:

a) turbidimetría, usando un colorímetro Klett (A.H. Thomas Co., Philadelphia, P.A., USA); b) por conteo directo de células al microscopio usando cámara de Neubauer (C.A. Hausser & Son., Philadelphia); c) porcentaje de número de colonias crecidas en caja de Petri después de sembrar muestras en diluciones apropiadas.

3. Preparación de membranas.

Se partió de células cosechadas en distintos momentos del ciclo biológico pero, rutinariamente, se emplearon células en la tercera hora del ciclo. El homogenato se obtuvo por abrasión del pellet celular con alúmina y buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 conteniendo sacarosa 250 mM y ME 5 mM, en relación 1:2:0,5 (v/v), a 0^oC, en mortero. El homogenato se centrifugó a 5000 xg, 15 min y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100000 xg, 1,5 h. El precipitado se resuspendió en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 conteniendo ME 10 mM y glicerol 20% y una concentración de 4,5 mg de proteínas/ml. Las membranas

radiactivas se obtuvieron dando un pulso de L-(U- ^{14}C)-prolina (1×10^6 cpm) o de D-(^3H)-glucosa (1×10^6 cpm) a un cultivo en la 3ra h del ciclo celular, durante 15 min. Las células lavadas en forma exhaustiva se procesaron como se indicó precedentemente.

4. Ensayos enzimáticos.

4.1. Incubación in vivo y aislamiento de AI1.

A células suspendidas en agua en una concentración de $2,4 \times 10^6$ células/ml, se agregó (^{14}C)-glucosa (2×10^6 cpm). Las células se incubaron 15 min con agitación constante y se agregó glucosa 100 mM. Transcurridos 45 min, las células se centrifugaron, lavaron exhaustivamente con agua y calentaron a 100°C indistintamente en el reactivo de Updegraff²³¹, en NaOH 4,4 M²³² o en KOH 30%, durante 1 h. El residuo lavado se consideró polisacáridos insolubles en álcali caliente (AI1) de la pared celular.

4.2. Incubaciones in vitro.

4.2.1. Condiciones de ensayo y aislamiento para estudio de distintos productos durante el ciclo biológico.

.La formación de glicolípidos se siguió midiendo la radiactividad incorporada según la metodología de Hopp et al^{106,181}. La glicosilación de proteínas se determinó por la incorporación de glucosa radiactiva siguiendo el método de Mans & Novelli²³³ modificado de acuerdo a Datema et al¹¹⁸. La actividad GDP-glu

cosa: glucan sintetasa se ensayó preincubando, a 30°C y durante 30 min, una mezcla conteniendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, ME 10 mM, MgCl₂ 5 mM, UDP-glucosa 20 mM y 100-200 ug de proteína en un volúmen de 55 ul. La preincubación concluyó agregándose GDP-(¹⁴C)-glucosa (2,4 x 10⁵ cpm) y la incubación se prolongó por 1 h. La reacción finalizó con la incorporación de 0,4 ml de etanol 80% y celulosa carrier. Se centrifugó y resuspendió el pellet resultante en NaOH 0,2 M que se calentó a 100°C, 10 min. El residuo se lavó varias veces y contó la radiactividad en el mismo.

4.2.2. Incubación standard.

Se efectuó a 30°C durante los tiempos que se indican en cada experimento. El volúmen de incubación (55 ul) contuvo 150-200 ug de proteína, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, ME 10 mM, 5 ug de celulosa amorfa, UDP-(³H)-glucosa 30 uM (72000 cpm) y CaCl₂ 5 mM para medir la actividad UDP-glucosa:glucan sintetasa. Para medir la actividad GDP-glucosa:glucan sintetasa, los dos últimos compuestos se reemplazaron por GDP-(¹⁴C)-glucosa 40 uM (85000 cpm) y CoCl₂ 5 mM. La incubación se detuvo con el agregado de un volúmen de TCA 20% frío y, en los casos que se indican, diluyendo con buffer frío.

5. Aislamiento de TCAI, AI2 y AI3.

Después de agregar un volúmen de TCA 20% frío igual al volúmen de ensayo, se dejó precipitar la fracción TCA-insoluble

(TCAI) durante 30 min, a 4°C. El precipitado se lavó con etanol:éter:cloroformo (2:2:1, v/v) 3 veces y se secó con aire caliente. La radiactividad de TCAI se midió en el precipitado resuspendido en NaOH 0,15 M o en ácido fórmico 80%. Por otro lado, al sobrenadante neutralizado se agregó etanol, en concentración final de 66%, y 1 mg de celulosa amorfa como carrier, que se sometió en extracciones masivas. Después de centrifugar a 5000 xg, 10 min, el precipitado se resuspendió en NaOH 0,2 M e hirvió a B.M. 10 min. El residuo neutralizado y lavado se consideró la fracción álcali insoluble (AI2). Productos insolubles en álcali caliente formados a partir de GDP-(¹⁴C)-glucosa (AI3) se aislaron como se describe para AI2.

6. Purificación de glicosidasas y tratamientos enzimáticos.

Distintas glicosidasas se incubaron con distintos p-nitrofenil glicósidos para detectar la presencia de actividades contaminantes. Celulasa de Aspergillus se purificó según el método de Hurst et al²³⁴, obteniéndose una actividad específica de 1,25 U/mg de proteína. B-glucosidasa (EC 3.2.1.21) se obtuvo de la misma preparación de Aspergillus y se purificó según Umezurike²³⁵. La actividad específica resultante fue de 10 U/mg de proteína. Pronasa contuvo actividad amilolítica que no fue eliminada completamente por incubación en cloruro de guanidinio²³⁶. Glicosidasas y pronasa se ensayaron sobre los siguientes sustratos: AI1, AI2, AI3, GP y celulosa amorfa. Las muestras se incubaron en buffer Mc Ilvaine²³⁷ con 2 mg de cada

una de las siguientes glicosidasas: α -amilasa (pH 6,8), B-ami-
lasa (pH 4,8), α -glucosidasa (pH 6,8), B-glucosidasa (pH 5,0)
y celulasa (pH 4,5). Para el tratamiento con pronasa se empleó
buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 conteniendo CaCl_2 10 mM. Las
incubaciones se realizaron a 35°C , bajo atmósfera de tolueno,
durante 4 días, con agregados diarios de 2 mg de las enzimas
correspondientes. Las enzimas se inactivaron por calentamien-
to a 100°C durante 5 min. A las muestras de AI1, AI2 y AI3 se
agregó etanol frío hasta una concentración de 66% final. Con
las muestras de GP se procedió como se indicó para obtener TCAI
(sección 5) o se filtró la muestra por columnas de Sephadex
G-25. La radiactividad o hidratos de carbono detectados en el
sobrenadante o en el Ve, según fuera el caso, se consideró pro-
ducto de hidrólisis.

El ensayo de tripsinización se realizó en buffer fosfato
de Na 0,1 M, pH 7,6, a 35°C , 2,5 h. La relación de tripsina
(12 ug) a proteína de la muestra fue de 1:25 aproximadamente.
La muestra, denominada fracción membranosa, fue el precipitado
obtenido por centrifugación del volumen de ensayo a 100000 xg,
1 h, después de una incubación standard de 10 min. Las frac-
ciones, digerida y no digerida, se separaron de nuevo por cen-
trifugación a alta velocidad. En experimento paralelo, la frac-
ción membranosa fue digerida con celulasa (10 mg), siguiéndose
idéntico procedimiento pero en buffer Mc Ilvaine a pH 4,5.

7. Métodos analíticos.

7.1. Tratamientos degradativos.

7.1.1. Degradación alcalino-reductora.

Muestras de GP se trataron con:

- NaOH 0,15 M + NaBH₄ 1 M, 24 h, a 50°C (B-eliminación),
- NaOH 1 M + NaBH₄ 1 M, 5 h, a 100°C,
- Ba(OH)₂ 0,2 M + NaBH₄ 1 M, 6 h, a 120°C.

Los tratamientos se realizaron en tubos sellados. Los hidrolizados de NaOH se neutralizaron con HCl y los hidrolizados de Ba(OH)₂ con H₂SO₄, recuperándose las muestras, en el último caso, en el sobrenadante después de centrifugar a baja velocidad. Los productos se separaron por filtración en columnas de Sephadex G-25. Las muestras tratadas con Ba(OH)₂ se recromatografiaron sobre columnas de Biogel P-6 calibradas como se describe en la sección 7.2.1.2.

7.1.2. Reducción con borohidruro de Na.

La reducción de AI2 se efectuó en la forma descrita por García et al¹⁷⁵ y en reducciones con NaB(³H)H₄ (1 x 10⁶cpm) de hidrolizados ácidos de ¹⁴C-aminoacil-azúcares se siguió la metodología de Takasaki et al²³⁸.

7.1.3. Oxidación con periodato.

Muestras de ¹⁴C-AI1 se oxidaron con periodato y redujeron como describen Goldstein et al²³⁹.

7.1.4. Metilación.

Muestras radiactivas de AI1, AI2, AI3 y aminoacil-oligosacáridos se metilaron según el método de Hakomori²⁴⁰ modificado por Sanford & Conrad²⁴¹. Los AI metilados se dializaron contra agua y liofilizaron. Los aminoacil-oligosacáridos metilados se recuperaron en las fases clorofórmicas que se colectaron, lavaron y secaron en corriente de N₂. Todas las muestras se hidrolizaron como se describe en la sección siguiente.

7.1.5. Hidrólisis ácida.

Muestras de AI1, AI2 y AI3 se hidrolizaron con H₂SO₄ 30% durante 4 h, a 100°C y se neutralizaron con BaCO₃ o se hidrolizaron con HCl fumante, 5 h, a 4°C y se neutralizaron por evaporación repetida.

Celulosa y quitina amorfas se obtuvieron por hidrólisis con HCl fumante, 24 h, a 4°C, se neutralizó con NaOH y dializó extensivamente contra agua.

Muestras de AI2, AI3, GP y aminoacil-oligosacáridos se hidrolizaron con HCl 2-2,5 N o TFA 2,5 N, a 100°C, 3 h.

Aminoacil-oligosacáridos se sometieron a hidrólisis ácida suave o "peeling" con ácido oxálico 30 mM, pH 3,0²⁴², H₂SO₄ 0,1 N, a 100°C, 1,5 días²⁴³ y TFA 0,1 N, a 120°C, 1h²⁴⁴. Los productos de hidrólisis fueron separados por cromatografía en columnas de Biogel P-2 como se describe en la sección 7.2.1.4.

7.1.5) se cromatografiaron en columnas de Biogel P-2 (5-100 mesh) (0,9 x 80 cm) colectándose 0,7 ml/tubo. Las columnas se equilibraron y eluyeron con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 a temperatura ambiente. Para la calibración de las mismas se usaron PEG de distintos pesos moleculares, (^3H)-sacarosa y (^3H)-glucosa. El Ve del PEG fue ubicado por absorción a 230-360 nm.

7.2.2. Cromatografías y electroforesis en papel.

Las cromatografías se desarrollaron en forma descendente y, para ámbos métodos, se usó papel Whatman N^o1 y los siguientes solventes:

- A- n-butanol:piridina:HCl 0,1 N (5:3:2, v/v)²⁴⁵.
- B- acetato de etilo:piridina:agua (8:2:1, v/v)²⁴⁶.
- C- tetraborato de Na 50 mM, pH 9,4²⁴⁷.
- D- isopropanol:ácido fórmico 100%:agua (75:10:10, v/v)²⁴⁸.
- E- acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua (18:1:3:4, v/v)²⁴⁶.
- F- ácido fórmico 5%²⁴⁹.
- G- molibdato de Na 0,1 M, pH 5,0²⁵⁰.

Se empleó papel Whatman 3MM en cromatografías con solventes A y D. En las electroforesis se aplicaron 1000 V durante 2-3 h. La ubicación de standards se hizo con reactivo alcalino de AgNO_3 ²⁵¹ para revelado de azúcares reductores; glucosamina se reveló con ninhidrina 0,25% en etanol²⁵²; prolina e hidroxiprolina se localizaron con mezcla de ninhidrina/

acetato de Cd²⁵³.

7.2.3. Cromatografía en capa delgada.

Monosacáridos metilados se identificaron por cromatografía ascendente sobre placas de sílica gel G Eastman chromatogram sheet 13179, Kodak, con solvente H conteniendo benceno:acetona:amoníaco:agua (50:200:1,35:1, v/v)²⁵⁴. Como referencias se emplearon metil-monosacáridos de soforosa, gentiobiosa, laminaribiosa y celobiosa que se detectaron por exposición térmica y U.V.²⁵⁵.

7.2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se empleó el método descrito por Lugtenberg et al²⁵⁶. Muestras de TCAI y GP sometidas a condiciones disociantes se analizaron en geles conteniendo 13,5% de acrilamida. Paralelamente se corrieron como marcadores moleculares a SAB (Mr 66000), pepsina (Mr 34700) y lisozima (Mr 14300). Muestras de AI2 se corrieron en geles nativos con 7% de acrilamida. El tiempo de corrida para ámbos tipos de electroforesis fue de 6-7 h a 30 mA/gel. Los geles se tiñeron para proteínas con una mezcla conteniendo 2,5 g de Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml de agua, 30 ml de ácido acético y 450 ml de metanol. Se destiñeron con la misma solución sin colorante. Los hidratos de carbono se tiñeron con reactivo de Schiff/ácido periódico²⁵⁷.

7.3. Determinaciones cuantitativas.

7.3.1. Concentración de ácidos nucleicos y proteínas.

La determinación del contenido de RNA y DNA se hizo de acuerdo a Fleck & Munro²⁵⁸ con modificaciones para adaptar el método a algas. Células (0,5 g) se homogeneizaron con alúmina en Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5. Por cada ml de homogenato se agregó PCA hasta una concentración final de 0,2 N y se dejó precipitar toda la noche en frío. La mezcla se centrifugó a 2000 xg y el sobrenadante se descartó. Se agregó 0,5 ml de KOH 0,5 N fresco y se dejó precipitando a 37-40°C, 1 h. Alúmina y paredes celulares se eliminaron por centrifugación; el sobrenadante se mezcló con 1 ml de PCA 0,5 N frío y se dejó precipitar en frío 1 h. El sobrenadante se usó para medir RNA hidrolizado por tratamiento alcalino a 260 nm. El residuo insoluble se lavó con PCA 0,2 N y se agregó nuevamente PCA 0,5 N. La mezcla se calentó a 80-90°C 1 h. En las muestras enfriadas se midió el contenido de DNA por absorción a 260 nm. El pellet se usó para estimar el contenido de proteínas.

7.3.2. Métodos para cuantificar proteínas y azúcares.

La cantidad de proteínas se calculó por los métodos de Lowry et al²⁵⁹ y Biuret²⁶⁰, utilizándose SAB como patrón y por absorción a 280 y 240 nm. Azúcares reductores se determinaron por el método de Somogyi²⁶¹-Nelson²⁶². Azúcares totales se determinaron por el método de fenol-sulfúrico²⁶³. La curva pa

trón se construyó con glucosa. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro Zeiss PMQ 3.

7.3.3. Medida de la radiactividad.

Se efectuó en:

- papel con Paper Chromatogram Scanner LB 280,
- placas de sílica gel con un espectrómetro Berthold LB 2722-2,
- muestras acuosas y deshidratadas en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman LS-233.

Discriminación de ^3H y ^{14}C en una misma muestra se hizo según Kobayashi & Maudsley²⁶⁴ en espectrómetro de centelleo líquido con mezcla centelladora conteniendo 2,2 g PPO y 0,166 g de POPOP en 550 ml de tolueno para muestras deshidratadas que, se mezcló con 250 ml de Triton X-100 para medir muestras acuosas.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

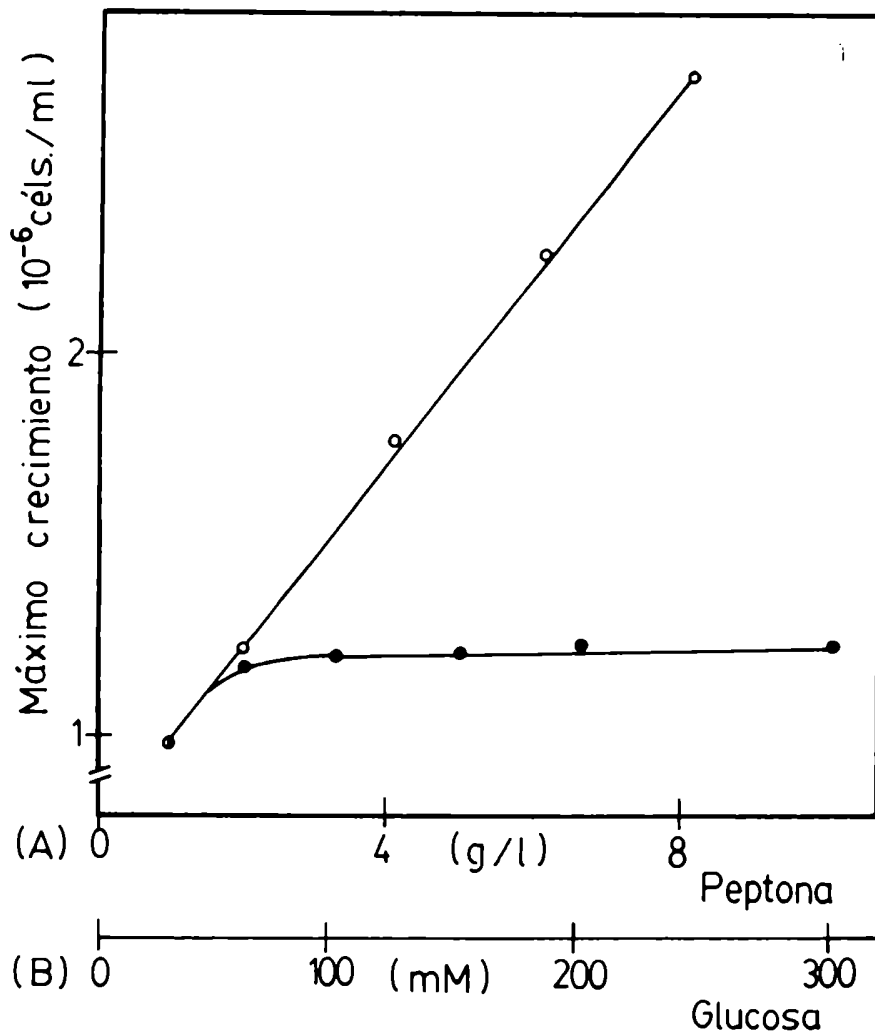
CAPITULO 1

SINCRONIZACION

1. Inducción de la sincronización.

En poblaciones que siguen un ritmo circadiano se observa que actividades fisiológicas y químicas difieren marcadamente según el estadio celular en que se miden esos parámetros. Cuando se trabaja con organismos unicelulares fotosintéticos basta suministrar al cultivo un régimen de luz-oscuridad, en combinación con diluciones seriadas del medio^{263,264}, para observar la aparición de un ritmo sincrónico. La inducción de divisiones sincrónicas en un alga clorótica como Prototheca requirió de una metodología distinta. Se recurrió a un "hambreado-realimentación", semejante al empleado para inducir sincronización en organismos heterotróficos^{265,266}. Primero se comenzó estudiando el efecto de los componentes del medio basal sobre el crecimiento. En la Figura 1 se muestra el crecimiento máximo obtenido con concentraciones crecientes de la fuente de carbono (glucosa) y la de nitrógeno (peptona). Se ve que la concentración de peptona es crítica para el crecimiento del cultivo. Cuando el cultivo en un medio basal fue transferido a otro con 0,5 g de peptona/l, durante 9 h y luego las células se transfirieron a un medio basal fresco, se observó un 60% de sincronización. Cuando este tratamiento fue seguido por diluciones seriadas, la sincronización fue casi total después

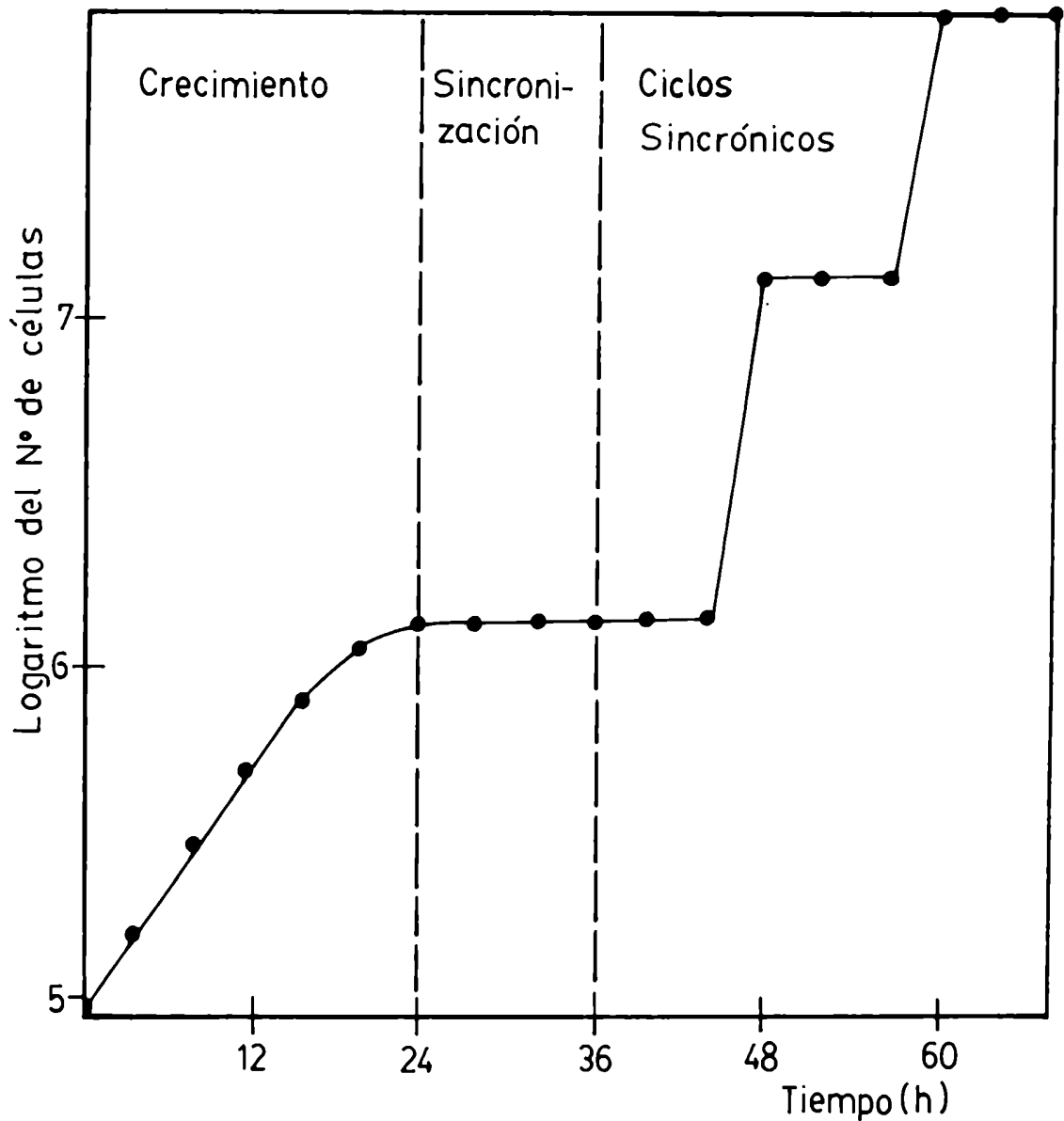
FIGURA 1. Crecimiento máximo de cultivos de Prototheca zopfii.



El medio de cultivo contiene diferentes concentra-
ciones de: (A) peptona y glucosa 45 mM (o) y (B)
glucosa y peptona 2 g/l (●).

de 3 ó 4 períodos. Sin embargo, el método más efectivo consis-
tió en el suministro, durante 12 h, de EDTA 1,5-2 mM. El efec-
to del EDTA se reforzó empleando un medio de cultivo pobre en
peptona. En estas condiciones y, después del primer período,

FIGURA 2. Sincronización de *Prototneca zopfii*.



Medio de cultivo		
Peptona 2 g/l	EDTA 15mM	Peptona 2 g/l
Glucosa 8/g l	Peptona 05g/l	Glucosa 8g/l
	Glucosa 6g/l	

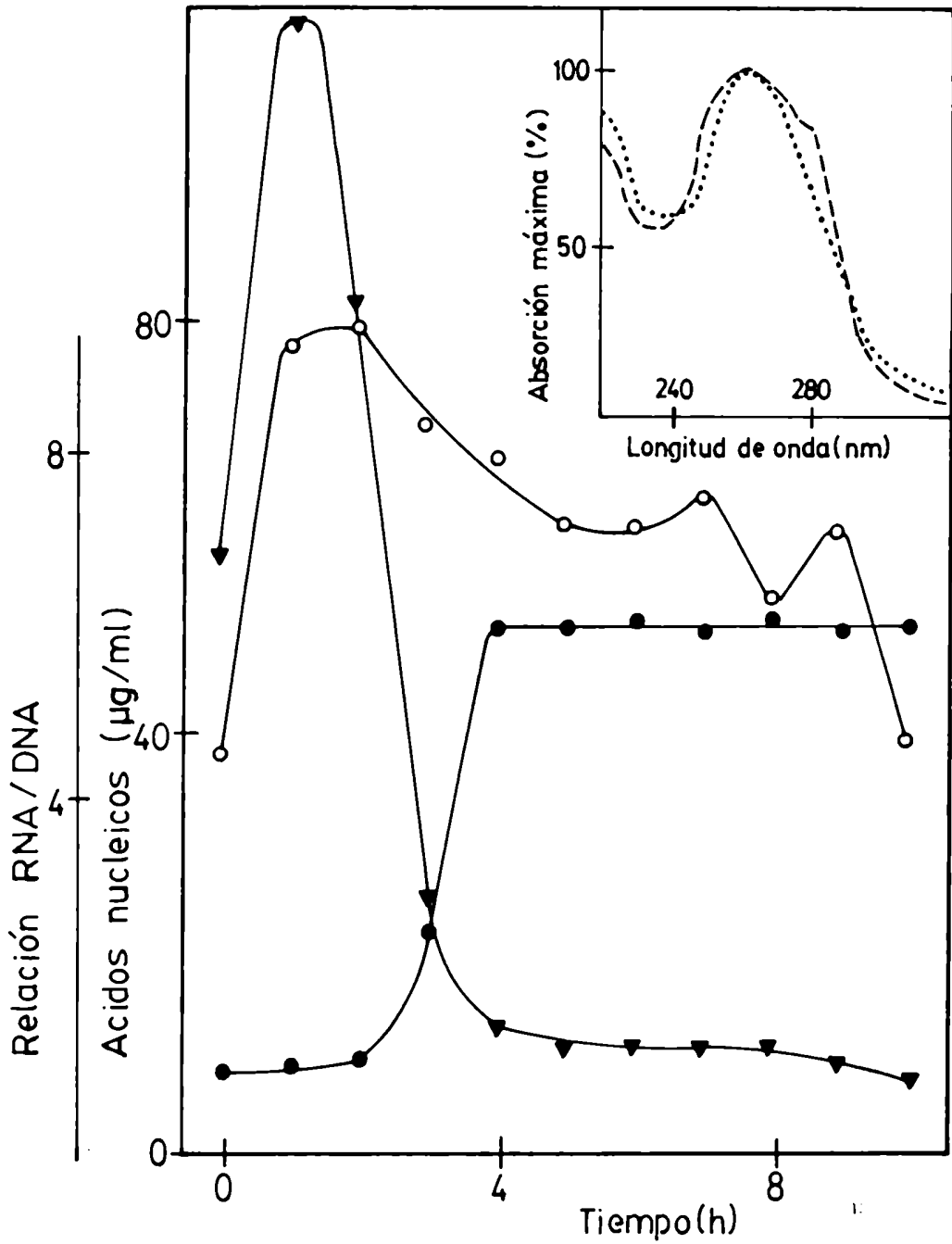
Al final de cada ciclo sincrónico se diluye el medio para mantener la sincronización.

se obtuvo una sincronización del 100%. Divisiones celulares sincrónicas se obtuvieron por dilución al final de cada ciclo (Figura 2). El efecto inhibitorio y reversible del EDTA no puede ser explicado satisfactoriamente aún. Sabiendo de su acción quelante, el resultado del tratamiento podría atribuirse a una privación de Mg, ya que una deficiencia del ión su primió fuertemente la síntesis de RNA en Chlorella pyrenoydosa²⁶³. Además, el EDTA se cita como responsable de la disrupción de complejos particulados asociados a la membrana plasmática los cuales son, probablemente, el sitio de ensamblaje de las fibrillas de celulosa²⁶⁷. Esto explicaría porqué las células en proceso de sincronización son incapaces de liberar autosporas y es necesario diluir el EDTA para levantar la acción inhibitoria del mismo.

2. Variaciones en el contenido de ácidos nucleicos y proteínas.

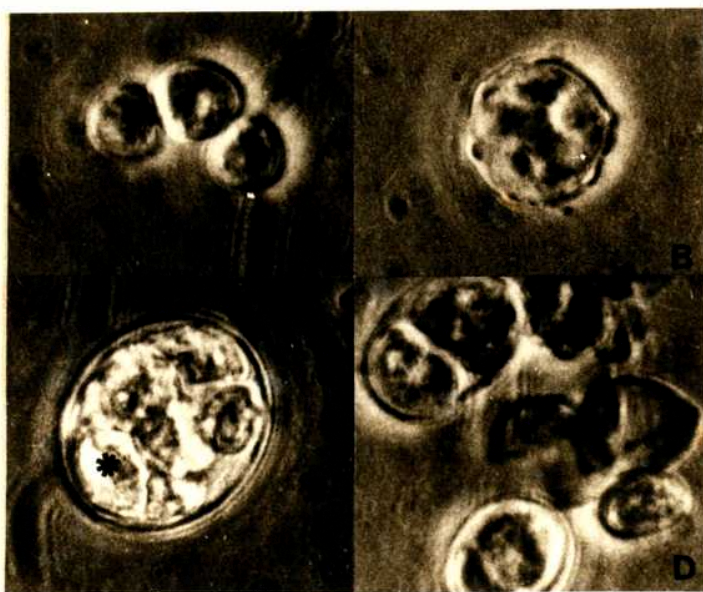
El nivel de ácidos nucleicos durante el ciclo celular se determinó después de la hidrólisis alcalina de RNA y de la hidrólisis ácida de DNA. La concentración de DNA indicó que su síntesis ocurrió entre la 2da y 4ta h de cultivo (Figura 3) aunque la división celular no se observó hasta la 5ta h del ciclo (Figura 4, C). El nivel de DNA aumentó 8 veces, incremento que fue coincidente con el número promedio de autosporas por cada generación, estimadas por distintos métodos (sección 2 de Material y Métodos). Este abrupto aumento en el contenido de DNA, en los estadios tempranos de la maduración, fueron descritos también para Chlorella y Euglena²⁶³.

FIGURA 3. Variaciones del contenido de ácidos nucleicos y proteínas durante el ciclo biológico de Prototheca.



Los símbolos significan: (●) contenido de DNA; (○) relación prot./DNA; (▼) relación RNA/DNA; (---) espectro de absorción de DNA y (...) espectro de absorción de RNA.

FIGURA 4. Aspecto de Prototheca durante distintos estadios del ciclo celular.



Micrografías tomadas en microscopio óptico Carl Zeiss NU-2, con contraste de fases (1000 X).

(A): 1ra h, (B): 3ra h, (C): 5-6ta h y (D): 10ma h.

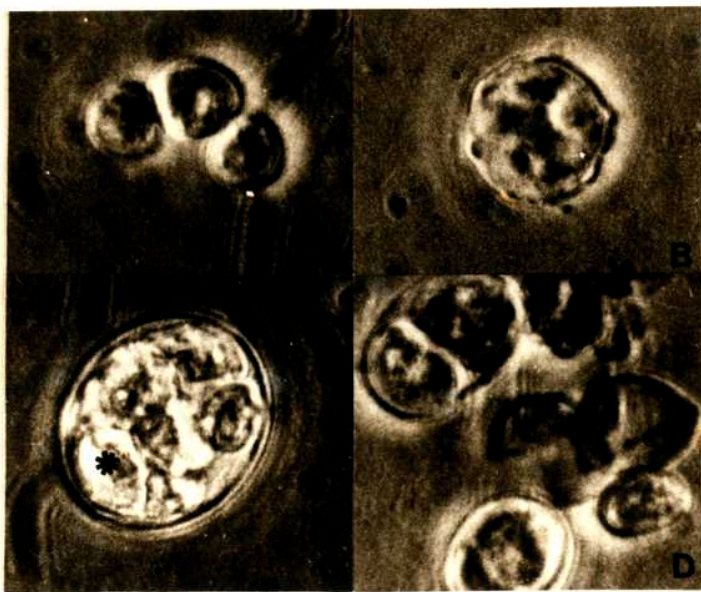
(*): autospora en formación.

Los espectros de DNA y RNA (Figura 3, inserto) estuvieron de acuerdo con los teóricos²⁶⁸. Consecuentemente, los métodos de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos fueron correctamente adaptados al sistema en estudio.

La relación RNA/DNA fue muy alta durante las primeras horas del ciclo celular, sugiriendo una activa síntesis de proteínas. Idéntico perfil se observó al graficar la relación proteína/DNA para el mismo período.

Variaciones en la concentración de proteínas totales

FIGURA 4. Aspecto de Prototheca durante distintos estadios del ciclo celular.



Micrografías tomadas en microscopio óptico Carl Zeiss NU-2, con contraste de fases (1000 X).

(A): 1ra h, (B): 3ra h, (C): 5-6ta h y (D): 10ma h.

(*): autospora en formación.

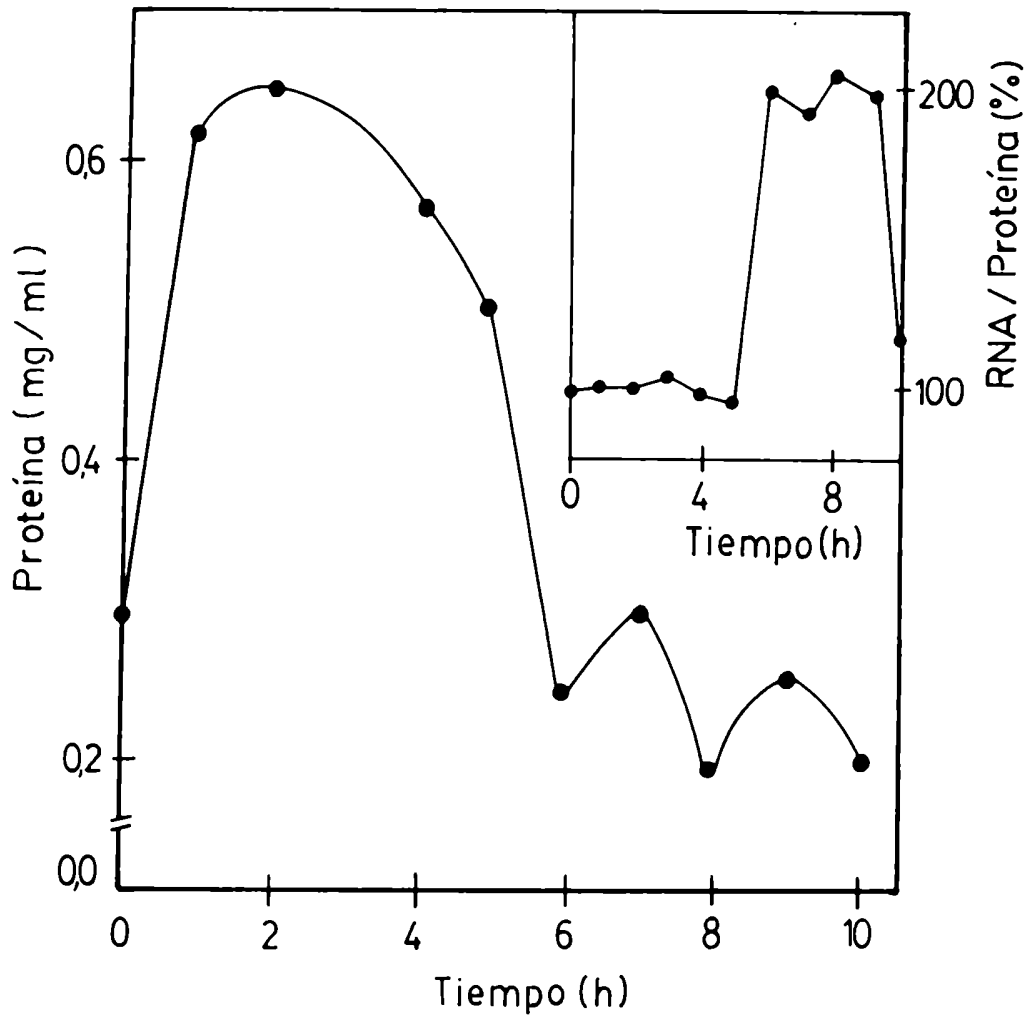
Los espectros de DNA y RNA (Figura 3, inserto) estuvieron de acuerdo con los teóricos²⁶⁸. Consecuentemente, los métodos de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos fueron correctamente adaptados al sistema en estudio.

La relación RNA/DNA fue muy alta durante las primeras horas del ciclo celular, sugiriendo una activa síntesis de proteínas. Idéntico perfil se observó al graficar la relación proteína/DNA para el mismo período.

Variaciones en la concentración de proteínas totales

(Figura 5) y la relación RNA/proteína (Figura 5, inserto) evidenciaron una síntesis proteica muy eficiente en la primera parte del ciclo.

FIGURA 5. Variaciones de la concentración de proteínas durante el ciclo celular de Prototheca.



Las proteínas totales (●) fueron extraídas como de indicó en la sección 7.3.1. de Material y Métodos; relación RNA/proteína (inserto).

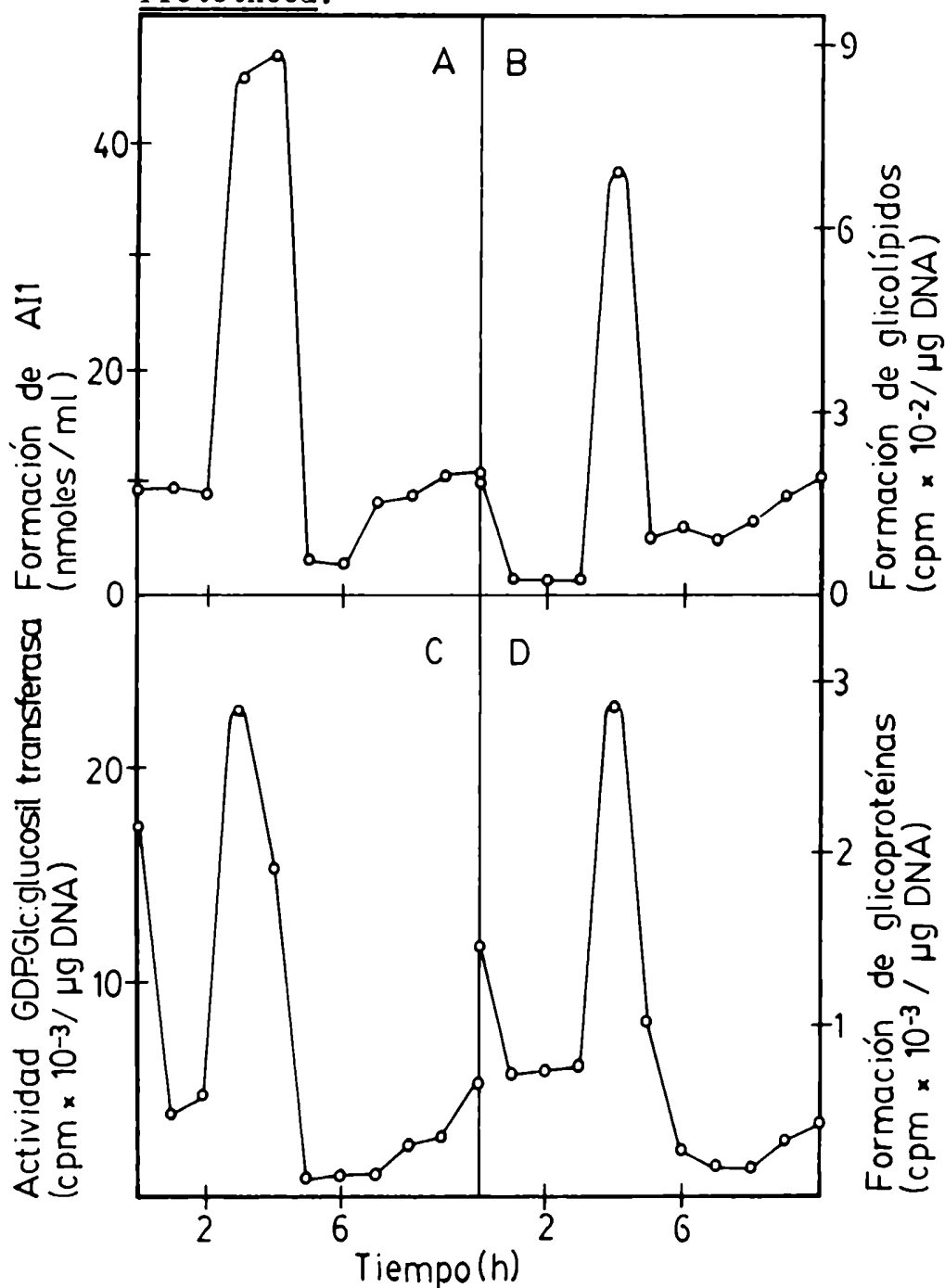
3. Formación de polímeros de (^{14}C)-glucosa in vivo e in vitro.

En los primeros trabajos sobre síntesis de B-glucanos realizados con esta alga, se había observado incorporación de (^{14}C)-glucosa en polisacáridos insolubles en álcali, glicolípidos y glicoproteínas¹⁸¹. En base a esos antecedentes se decidió medir estas actividades durante el ciclo celular de Protothera.

La capacidad de incorporar (^{14}C)-glucosa en polisacáridos de pared celular (AI1) mostró dos picos de intensa incorporación, el primero durante la fase de crecimiento y el segundo en la fase reproductiva. Cuando esos resultados se expresaron por número de células, se mantuvo sólo el pico correspondiente a la fase de crecimiento. En la Figura 6, A se observa como la incorporación inicial se cuadruplica entre la 3ra y 4ta h de cultivo. En Chlorella ellipsoidea la incorporación de ^{14}C en la pared rígida también ocurrió durante las fases de crecimiento y reproducción²⁶⁹ pero, hubo un incremento de peso seco, interpretado como incremento en número de células, sólo en la última fase^{27,270}. Este hecho podría significar que polímeros precursores de la pared son sintetizados durante la primera parte del ciclo y que, en una etapa posterior, se produce el traslado, ensamblaje y cristalización de los mismos⁷⁷⁻⁸¹.

La síntesis de glicolípidos y glicoproteínas se midió en extractos crudos, extraídos a partir de células en distintos estadios del ciclo utilizando UDP-(^{14}C)-glucosa como sustrato. En la Figura 6, B y D, se observa un incremento importante en

FIGURA 6. Determinación de la incorporación de (^{14}C)-glucosa en diferentes polímeros durante una generación de *Prototheca*.



(A) AI1; (B) glicolípidos; (C) polisacáridos formados a partir de GDP-(^{14}C)-glucosa y (D) glicoproteínas. Las divisiones celulares ocurren desde la 5ta h pero son liberadas recién desde la 8va h en adelante.

la formación de esos compuestos alrededor de la 4ta n. Un perfil similar se obtiene cuando la actividad glucosil transferasa se mide en presencia de GDP-(^{14}C)-glucosa (Figura 6C).

De los resultados presentados en la Figura 6 se desprende que las medidas de actividades enzimáticas in vitro reflejan las variaciones observadas in vivo.

4. Identificación de ^{14}C -AI1.

El ^{14}C -polisacárido obtenido in vivo, que resulta insoluble en el reactivo de Updegraff y en altas concentraciones de NaOH y KOH (sección 4.1 de Material y Métodos), se caracterizó por diferentes métodos. Los productos de hidrólisis ácida se identificaron por electroforesis y cromatografía en papel. Los resultados (Tabla III, A) muestran ausencia de compuestos radiactivos cargados y los compuestos neutros se reconocieron como (^{14}C)-glucosa, ^{14}C -disacárido y ^{14}C -oligosacáridos de alto peso molecular en el origen. La movilidad del ^{14}C -disacárido fue la misma de standards de celobiosa (B-1,4), soforosa (B-1,2) y nigerosa (q-1,3) en el mismo sistema. Entre los productos se identificó también manosa no radiactiva. La presencia de manosa junto con glucosa y glucosamina ya fueron descritas para esta fracción²⁷¹, por lo que no se descarta que estos tres monosacáridos puedan ser parte de un heteropolisacárido.

La determinación de los carbonos involucrados en las uniones glicosídicas se analizó oxidando con periodato a ^{14}C -AI1.

La Tabla III,B muestra que los productos formados fueron (^{14}C)-glucosa y (^{14}C)-eritritol, significando que un 77% de la glucosa marcada tenía ligaduras entre carbonos 1 y 4 y un 23% entre carbonos 1 y 3.

Otra porción de la muestra fue metilada. Por cromatografía en capa delgada de los metil-monosacáridos (Tabla III,C) se reveló la presencia de 2,3,4,6-tetra-Me-Glc, 2,3,6-tri-Me-Glc y 2,4,6-tri-Me-Glc radiactivos. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por oxidación con periodato al evidenciar que la (^{14}C)-glucosa está ligada principalmente entre carbonos 1 y 4, aunque con ambos métodos se detectó la presencia de (^{14}C)-glucosa con enlaces 1,3.

La configuración anomérica de los enlaces glicosídicos en ^{14}C -AI1 se obtuvo por digestión con glicosidasas purificadas como se describe en la sección 6 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla IV. Celulasa hidroliza un 73% de la radiactividad contenida en ^{14}C -AI1 y B-glucosidasa un 45%. Trabajando con el mismo sistema, Conte & Scott Pore encuentran que una fracción ácido-resistente, equivalente a AI1, es degradada por celulasa y quitinasa²⁷². En este trabajo no se identificó N-Acetil-glucosamina como producto de hidrólisis de AI1 pero, como se verá en el Capítulo 2, la quitina se solubiliza por incubación con las membranas (Tabla V).

Similares porcentajes de hidrólisis se obtuvieron usando celulosa amorfa como sustrato, sugiriendo que ^{14}C -AI1 contiene mayormente glucosas ligadas en posición B.

TABLA III. Análisis de ^{14}C -AI1 por diferentes métodos.

Tratamiento	Método de separación (solvente)	^{14}C -productos identificados	(%)
A- Hidrólisis ácida			
HCl fumante, 5 h, 4 $^{\circ}$ C	EP(F)	monosacáridos neutros polímeros en origen	(60) (40)
H ₂ SO ₄ 35% 8 h, 100 $^{\circ}$ C	CP(B)	glucosa disacárido polímeros en origen	(54) (14) (32)
B- Oxidación c/ <u>pe</u> riodato, reducción e hidrólisis ácida			
	CP(B)	glucosa eritritol	(23) (77)
C- Permetilación e hidrólisis ácida			
	CCP(H)	2,3,4,6-tetra-Me-Glc 2,3,6-tri-Me-Glc 2,4,6-tri-Me-Glc	(22) (65) (13)

La obtención de ^{14}C -AI1 se describe en la sección 4.1 de Material y Métodos. Antes de los tratamientos B y C las muestras se hidrolizaron parcialmente con ácido.

TABLA IV. Hidrólisis enzimática de ^{14}C -AI1.

Glicosidasa	Hidrólisis			
	^{14}C -AI1		Celulosa	
	cpm	%	mg	%
Control	ND	-	ND	-
α -amilasa	1440	7,2	42,3	11,4
B-amilasa	5360	26,8	51,3	13,8
α -glucosidasa	3830	19,1	27,5	7,4
B-glucosidasa	8880	44,4	203,5	55,0
Celulosa	14700	73,5	306,0	82,5

Muestras (20000 cpm= 100%) fueron tratadas con distintas glicosidasas como se describe en la sección 6 de Material y Métodos. Celulosa amorfa (370 mg= 100%) se usó como control de las actividades glicosidásicas. Después de la incubación, las muestras se precipitaron con etanol 80%. La radiactividad remanente en el sobrenadante o reacción positiva con fenol-sulfúrico se consideró material hidrolizado.

Los datos en conjunto permiten concluir que en la pared celular de Prototheca se sintetiza in vivo un B-(1,4)B-(1,3)-glucano.

El hallazgo de un momento óptimo de síntesis de B-glucanos en el ciclo biológico del alga, reflejado in vitro, transformó a Prototheca zopfii en el material ideal para iniciar la investigación propuesta en los objetivos de esta tesis.

CAPITULO 2

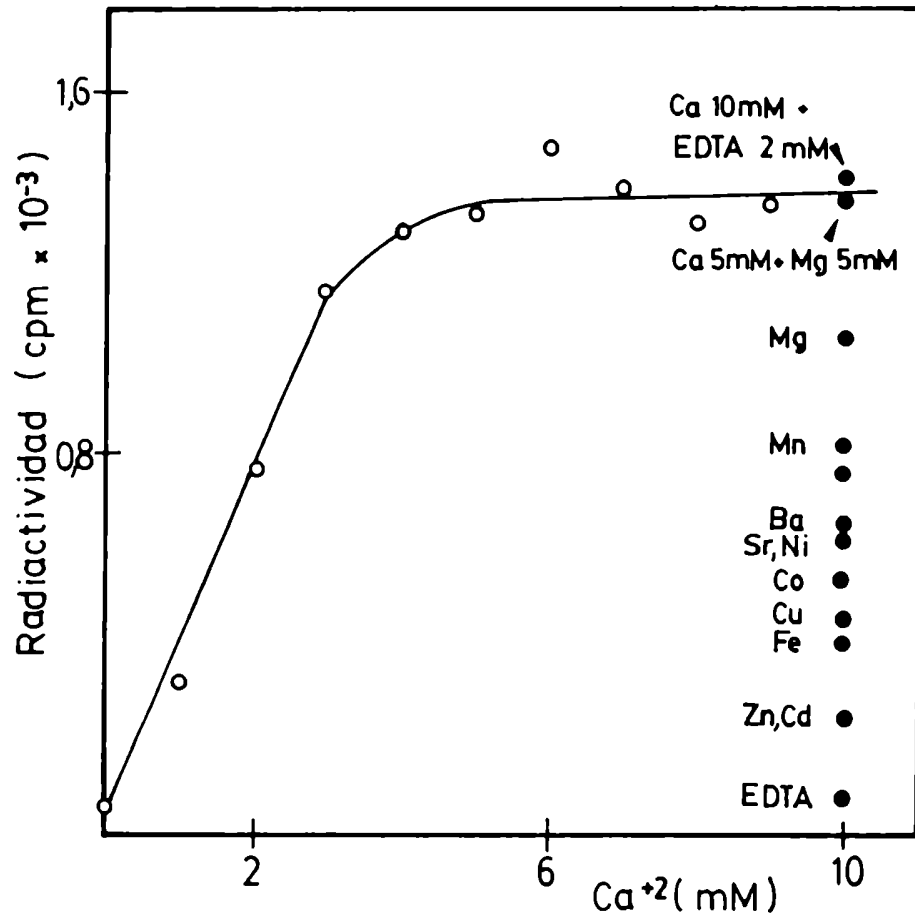
DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE ACTIVIDADES GLUCOSIL TRANSFERASA EN MEMBRANAS. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES CINETICAS Y FISIOLÓGICAS.

Se ha demostrado en el Capítulo 1 que extractos crudos obtenidos a partir de cultivos sincrónicos de Prototheca zopfii catalizan la síntesis de polisacáridos insolubles en álcali caliente utilizándose GDP-(¹⁴C)-glucosa como sustrato. Por otra parte, en experimentos preliminares se observó que en presencia de UDP-(³H)-glucosa también se obtenían productos insolubles en álcali caliente radiactivos, no pudiendo discriminarse si se trataba de dos vías paralelas que conducían a distintos productos o si ámbos NDP-glucosa eran dadores de glucosilos para la misma vía. El estudio de parámetros cinéticos y requerimientos de las glucosil transferasas permitieron dilucidar la incógnita. Se presentan en este capítulo los resultados obtenidos y aquellos correspondientes al análisis de los productos insolubles en álcali caliente denominados AI2 y AI3 formados a partir de incubaciones en las que se emplearon UDP-(³H)-glucosa y GDP-(¹⁴C)-glucosa como sustratos. Respecto a las cinéticas de formación de productos insolubles en álcali versus tiempo, éstas se realizaron sólo para AI2 y se discutirán junto con las de TCAI en el Capítulo 3.

1. Efecto de cationes divalentes.

La influencia de iones sobre la cantidad de glucosa transferida a AI2 se ilustra en la Figura 7. La mayor incorporación

FIGURA 7. Requerimiento de cationes divalentes en la síntesis de AI2.



Los ensayos se efectuaron en condiciones standard de incubación (1h) y extracción del producto (sección 4.2.2. y 5 de Material y Métodos). Iones distintos de Ca⁺² se probaron en concentración 10 mM excepto donde se indica.

se logró con Ca^{+2} 5 mM seguida de Mg^{+2} . Cuando se suplementaron juntos iones Ca^{+2} y Mg^{+2} , en la misma concentración final cada uno, el efecto estimulador de los cationes no fue aditivo. No se observó incremento en la incorporación de radiactividad en AI2 por el agregado de EDTA 2 mM junto con Ca^{+2} 10 mM por lo que, aparentemente, no habría en el extracto iones metálicos capaces de inhibir la reacción enzimática. Antecedentes de estimulación por Ca^{+2} fueron informados para glucan sintetasas de Gossypium hirsutum⁷² y Phaseolus aureus⁵⁴ cuyas actividades se midieron en condiciones semejantes a las que se describen aquí.

El efecto de diferentes iones sobre la actividad glucosil transferasa en presencia de GDP-(¹⁴C)-glucosa se muestra en la Figura 8.

FIGURA 8. Requerimiento de cationes divalentes en la síntesis de AI3.

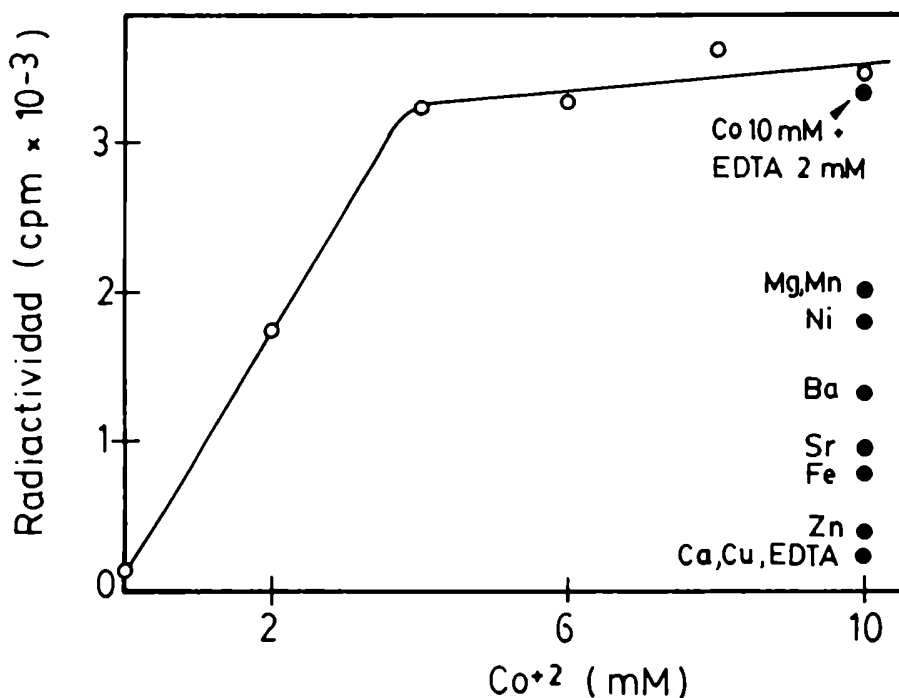


FIGURA 8.

Las condiciones de incubación y extracción son las mismas que se mencionan para la Figura 7.

La mayor incorporación de radiactividad en AI3 se obtuvo con Co^{+2} 5 mM. La acción del Ca^{+2} no modificó la actividad basal (sin agregado de sales) de la GDP-glucosa:glucosil transferasa, por lo que se deduce que no es cofactor de la enzima. El efecto de EDTA, ensayado solo o con Co^{+2} , sugiere que las membranas no contienen inhibidores salinos para la actividad medida. También, es importante mencionar que el estímulo que ejerce el Co^{+2} sobre la afinidad de la enzima por GDP-glucosa no ha sido descrito en otros sistemas análogos.

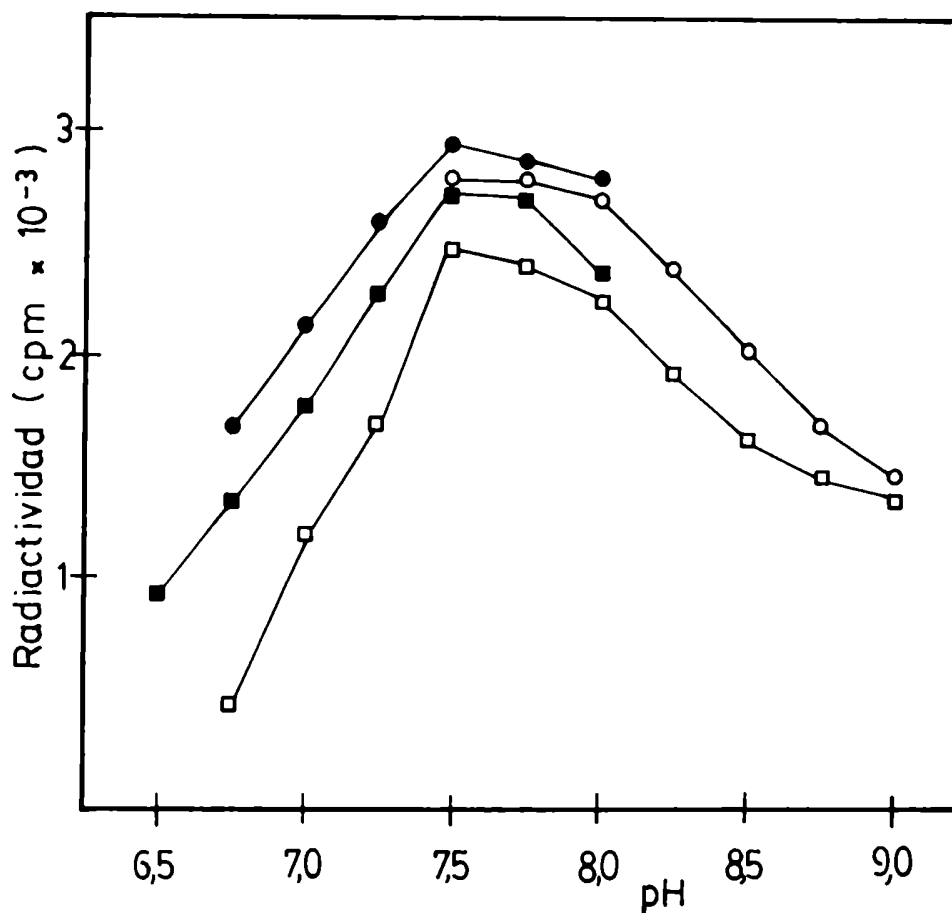
Las diferencias observadas en cuanto a requerimientos de cationes divalentes sugieren que hay por lo menos dos actividades enzimáticas fácilmente diferenciables.

2. pH óptimo y estabilidad enzimática.

La síntesis de AI2 y AI3 dependió de la selección del buffer y de la concentración de H^+ . En las Figuras 9 y 10 se observa que, con los buffers ensayados, el rango de pH adecuado para medir la síntesis de AI2 es entre 7,5 y 8,0 (Figura 8) mientras que el pH óptimo para medir AI3 es de 7,5 (Figura 9). La máxima incorporación en ambos casos se obtuvo con Tris-HCl 50 mM, a pH 7,5. Numerosos trabajos en el tema dan cuenta de que la síntesis in vitro de polisacáridos de pared celular

ocurre en un ambiente neutro o ligeramente alcalino^{55,69,273}.

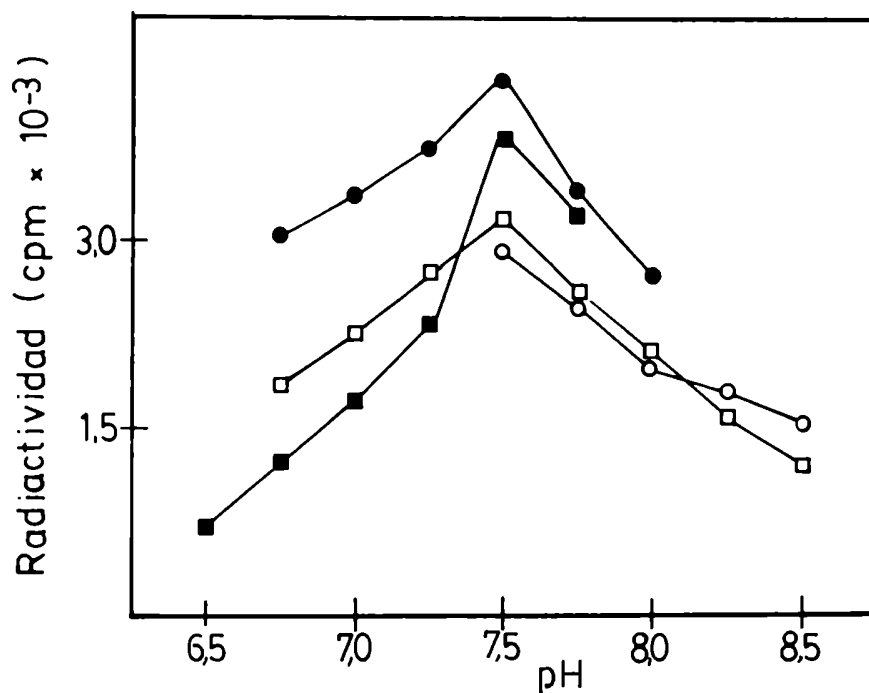
FIGURA 9. Efecto de pH sobre la incorporación de (³H)-glucosa en AI2.



En las condiciones de incubación (1h) y extracción que se describen en las secciones 4.2.2. y 5 de Material y Métodos se ensayaron los siguientes buffers: (●) Tris-HCl; (○) Dietil-barbitúrico; (□) Hepes y (■) Fosfato de Na. La concentración de todos los buffers fue de 50 mM.

Respecto a las glucosil transferasas en relación a su estabilidad y el medio seleccionado para conservarlas, se ob

FIGURA 10. Efecto de pH sobre la incorporación de (^{14}C)-glucosa en Al_3 .



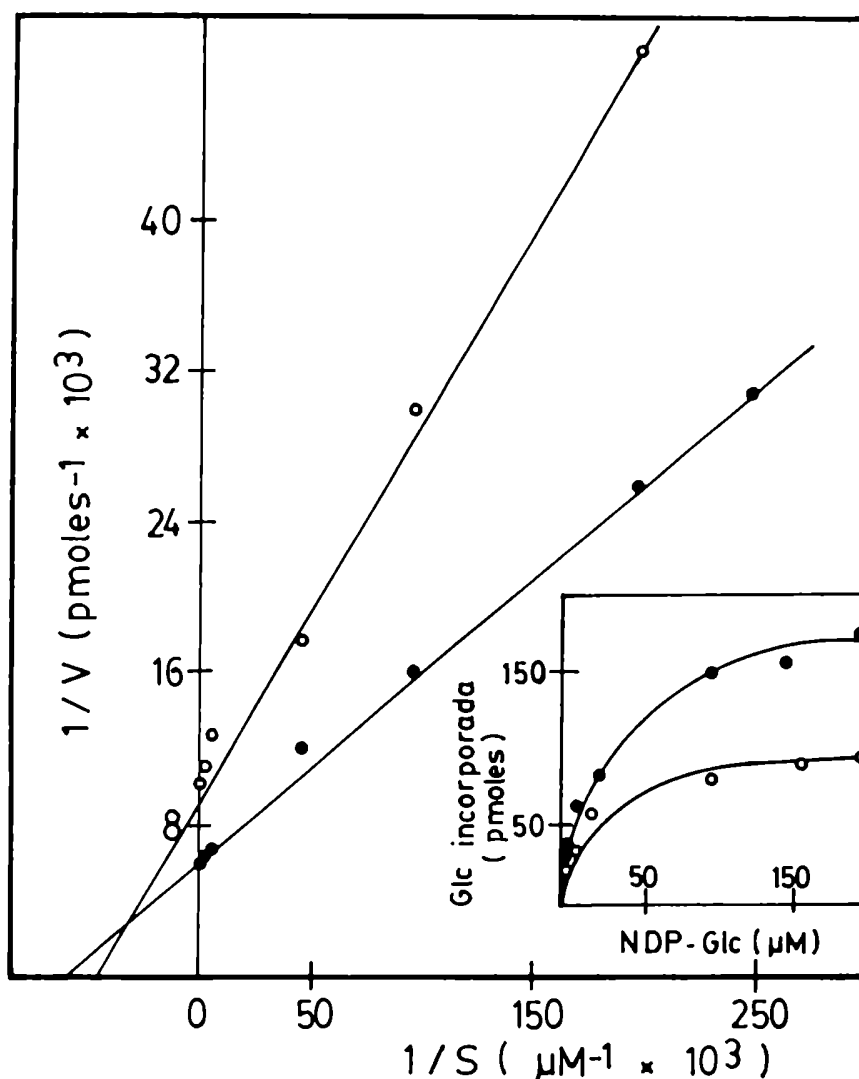
Las condiciones de ensayo, extracción y símbolos empleados en este experimento son los mismos que se indican para la Figura 9.

servó que, en buffer Tris-HCl, pH 7,5 y a temperatura ambiente, se pierde el 96% de las actividades después de 4h. Se comprobó también que ámbas enzimas son muy sensibles al congelado y descongelado aún en glicerol 20%, que parece proteger las enzimas contra la inactivación en frío (-20°C).

3. Actividades glucosil transferasa en función de la concentración de sustratos.

En la Figura 11 se representa la dependencia de la veloci

FIGURA 11. Gráficas de Lineweaver-Burk para actividades UDP-glucosa: glucosil transferasa y GDP-glucosa: glucosil transferasa.



Las diferentes concentraciones de sustratos se ajustaron agregando cantidades fijas de UDP-(^3H)-glucosa (●) ó GDP-(^{14}C)-glucosa (o) y concentraciones variables de los mismos compuestos no radiactivos. La velocidad se calculó como pmoles de glucosa $\times \text{min}^{-1}$ estimando la (^3H) y (^{14}C)-glucosa incorporada en A12 y A13 y calculando para cada concentración de sustrato los pmoles de glucosa correspondientes según la actividad específica de cada NDP-glucosa. Los métodos de incubación y extracción fueron los usados en condiciones standards.

dad de reacción para la formación de AI2 y AI3 con la concentración de UDP-glucosa y GDP-glucosa respectivamente. De los resultados se deduce que, tanto la reacción de síntesis de AI2 como la de AI3, siguen una cinética de tipo micaeliano. Se calculó una Km aparente de $1,7 \times 10^{-5}$ M y una Vmáx de 166 pmoles de glucosa/min incorporados en AI2. Para AI3 se obtuvo una Km aparente de $2,15 \times 10^{-5}$ M y una Vmáx de 114,3 pmoles de glucosa/min.

4. Efecto de incubaciones prolongadas sobre la síntesis de AI2.

Accidentalmente, en ensayos preliminares se había observado una disminución de la radiactividad incorporada en AI2, durante incubaciones prolongadas (más de 3 h). Ese hecho llevó a pensar en la presencia de glicosidasas en las membranas. Se procedió a incubar las mismas con el agregado de α y B-polisacáridos. Los resultados que se muestran en la Tabla V indican la presencia de B-glicosidasas. Las diferencias cuantitativas que se observan por el empleo de distintos métodos colorimétricos, sugieren que los compuestos solubilizados a partir de homopolisacáridos (celulosa y quitina) no fueron monosacáridos. La actividad degradativa podría atribuirse a B-endo-glucanasas²⁷⁴.

Con el propósito de anular el efecto de las glicosidasas se adicionaron a la mezcla de incubación varios compuestos como celobiosa, quitina y celulosa amorfas y almidón, en forma

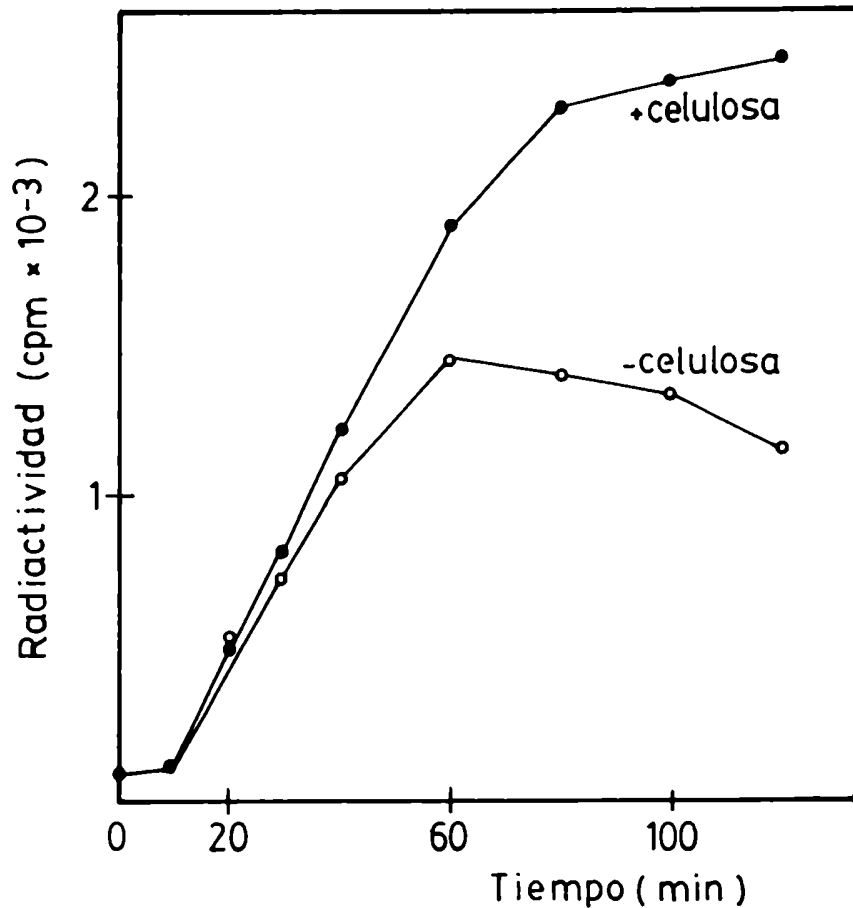
TABLA V. Detección de glicosidasas en las membranas.

Sustrato (210 mg)	Carbohidratos en la fracción soluble en etanol 70%	
	Azúcares:	
	reductores	totales
	(nmoles)	
Sin agregados	0,002	0,014
Celulosa	73,4	785,3
Almidón	-	-
Quitina	1,13	832,4
AI2	190,0	811,5

Celulosa y quitina amorfas y AI2 se obtubieron como se detalla en las secciones 7.1.5, 4.2.2 y 5 de Material y Métodos. Las incubaciones (1,5 h) se realizaron en condiciones standard con el agregado de los distintos polisacáridos en un volúmen de 100 ul. Las incubaciones concluyeron calentando los tubos 1 min a 100°C, se agregó etanol 70% final y se dejó en frío 30 min. Azúcares reductores y totales se midieron en el sobrenadante (centrifugación a 3000 xg, 10 min) por los métodos de Somogyi-Nelson y fenol-sulfúrico respectivamente.

separada. Con quitina y, especialmente con celulosa, la incorporación de radiactividad en AI2 no fue superior a la observada en 30 min y sin adiciones, pero se vio un efecto protector en tiempos largos (Figura 12). La celulosa amorfa no afec

FIGURA 12. Efecto de celulosa sobre la síntesis de AI2.



Las condiciones de incubación y extracción de AI2 son las descritas en las secciones 4.2.2. y 5 de Material y Métodos, excepto que las incubaciones se realizaron con el agregado de 20 ug de celulosa amorfa.

tó los valores iniciales de incorporación (1 a 20 min) sugi

riendo que no tiene efecto activador en la síntesis del producto, mientras que en incubaciones prolongadas (más de 60 min) protegió la síntesis de AI2 de la presencia de glicosidasas. En el Capítulo 3 se discutirá con detalle la participación de la celulosa amorfa como aceptor de glucosilos en la síntesis de AI2.

A partir de estos resultados se decidió agregar regularmente celulosa amorfa a las mezclas de incubación standard con los dos sustratos.

5. Especificidad de las glucosil transferasas.

Los resultados obtenidos en cuanto a requerimientos en cationes divalentes (Figuras 7 y 8) sugirieron que en membranas de Prototheca hay dos glucosil transferasas distintas. Para probar la especificidad de cada una de las enzimas por un determinado sustrato se realizaron incubaciones standards con sustratos radiactivos y el agregado de UDP ó GDP-glucosa y Ca^{+2} o Co^{+2} , en forma separada. Los resultados de las Tablas VI y VII muestran que, no hubo efecto de dilución isotópica con ninguno de los NDP-glucosa ensayados y que la incorporación de radiactividad en los productos fue muy baja cuando no se incluyó en la incubación el ión adecuado.

Estos resultados indicarían que el sistema de membranas contiene dos rutas paralelas aunque no se descarte que ambas vías tengan etapas comunes.

TABLA VI. Efecto de NDP-glucosa sobre la síntesis de AI2.

Sustrato radiactivo (30 uM) + NDP-glucosa (350 uM)	Ca ⁺² (5 mM)	³ H incorporado en AI2 (cpm)
UDP-(³ H)-Glc	no	174
UDP-(³ H)-Glc + GDP-Glc	no	162
UDP-(³ H)-Glc	si	2173
UDP-(³ H)-Glc + GDP-Glc	si	2156
UDP-(³ H)-Glc + ADP-Glc	si	2190
UDP-(³ H)-Glc + CDP-Glc	si	2241
UDP-(³ H)-Glc + UDP-Glc	si	489
GDP-(¹⁴ C)-Glc	si	250 (*)

Las condiciones de incubación (1 h) y extracción de productos se describen en las secciones 4.2.2 y 5 de Material y Métodos.

(*) Radiactividad incorporada en AI3.

TABLA VII. Efecto de NDP-glucosa sobre la síntesis de AI3.

Sustrato radiactivo (40 μ M) + NDP-Glc (350 μ M)	Co^{+2} (5 mM)	^{14}C incorporado en AI3 (cpm)
GDP-(^{14}C)-Glc	no	126
GDP-(^{14}C)-Glc + UDP-Glc	no	150
GDP-(^{14}C)-Glc	si	2859
GDP-(^{14}C)-Glc + UDP-Glc	si	2910
GDP-(^{14}C)-Glc + GDP-Glc	si	520
UDP-(^3H)-Glc	si	657 (*)

El experimento se realizó como se indica para la Tabla VI.

(*) Radiactividad incorporada en AI2.

6. Identificación de ^3H -AI2 y ^{14}C -AI3.

Polisacáridos insolubles en álcali caliente radiactivos se identificaron por diferentes métodos. Los resultados que se presentan en las Tablas VIII y IX corresponden a tratamientos con enzimas hidrolíticas. B-glucosidasa y celulasa hidro

TABLA VIII. Hidrólisis enzimática de AI2.

Tratamiento enzimático	^3H -AI2		Hidrólisis (%)
	Hidrolizado (cpm)	Resistente	
Control	ND	12500	0
B-amilasa	1725	10775	13,8
α -amilasa	1640	10879	13,1
B-glucosidasa	7200	5300	57,6
α -glucosidasa	480	12151	3,8
Celulasa	8258	5505	66,0
Pronasa	1320	11251	10,5

Muestras de ^3H -AI2 (12500 cpm) se trataron con diferentes glicosidasas y pronasa como se describe en la sección 6 de Material y Métodos. Las incubaciones concluyeron con el agregado de etanol 66% final. La radiactividad en el sobrenadante se consideró material hidrolizado.

lizaron un 57,6% y 66% de AI2 (Tabla VIII) y un 59,7% y 79,3% de AI3 (Tabla IX). Otras glicosidasas y pronasa también produjeron hidrólisis. Este comportamiento puede ser atribuido

TABLA IX. Hidrólisis enzimática de AI3.

Tratamiento enzimático	¹⁴ C-AI3		Hidrólisis (%)
	Hidrolizado (cpm)	Resistente	
Control	ND	9000	0
B-amilasa	621	8379	6,9
α-amilasa	708	8292	7,86
B-glucosidasa	5380	3620	59,7
α-glucosidasa	306	8694	3,4
Celulasa	7140	1860	79,3
Pronasa	895	8105	9,94

Muestras de ¹⁴C-AI3 (9000 cpm) se trataron en las condiciones descritas en la Tabla VIII.

a actividades inespecíficas. El patrón de sensibilidad enzimática de los productos fue consistente con aquel obtenido para celulosa amorfa cuando fue sometida a los mismos tratamientos (Tabla IV).

Hidrólisis ácidas seguidas por electroforesis en papel (Tablas X y XI, A) mostraron que AI2 y AI3 no contienen com

puestos cargados. Sólo fueron encontrados (^3H)-glucosa, (^3H)-celobiosa y (^3H)-laminaribiosa (Tabla X, A y B) para AI2 y, (^{14}C)-glucosa y (^{14}C)-celobiosa (Tabla XI, A y B) para AI3, tanto por cromatografía como por electroforesis en papel de hidrolizados ácidos o enzimáticos. La presencia de oligosacáridos radiactivos en el origen se interpretó como el resultado de tratamientos hidrolíticos incompletos.

^3H -AI2 y ^{14}C -AI3 metilados e hidrolizados a monosacáridos se analizaron mediante cromatografía en capa delgada. Los resultados en la Tabla X,C indican que AI2 contiene ligaduras glicosídicas entre los carbonos 1 y 4 mayoritariamente y 1,3 en menor proporción. Debe notarse que los mismos resultados se obtuvieron in vivo (Capítulo 1, 4.). Los monosacáridos derivados de la permetilación de AI3, seguida de hidrólisis ácida, fueron identificados como 2,3,4,6-tetra-Me-Glc y 2,3,6-tri-Me-Glc (Tabla XI,C). Se trataría de un glucano celulósico.

La formación de (^3H)-glucitol después de reducir ^3H -AI2 con NaBH_4 (Tabla X,D) podría indicar que las cadenas tienen su extremo reductor libre. La relación glucosa:glucitol indicó un largo de cadena promedio para AI2 de 37 residuos hexosa. El grado de polimerización estimado por este método concuerda con la elución de AI2 en el volumen muerto de una columna de Biogel P-6 (datos que no se muestran).

Aunque no se conozca la estructura precisa de AI2, los experimentos resumidos en las Tablas VIII y X indican que, sobre la base de su comportamiento químico y análisis enzimático,

TABLA X. Identificación de Al2 por diferentes métodos.

Tratamiento	Método de separación (solvente)	³ H-productos identificados	(%)
A- Hidrólisis ácida			
HCl fumante, 5 h, 4°C	EP(F)	monosacáridos neutros polímeros en origen	(30) (70)
H ₂ SO ₄ 30%, 8 h, 100°C	CP(B)	glucosa polímeros en origen	(96) (4)
HCl 2,5 N, 3 h, 100°C	EP(C)	glucosa celobiosa laminaribiosa polímeros en origen	(60) (18) (5) (17)
B- Hidrólisis enzimática, celu lasa, 4d, 35°C	CP(F)	glucosa celobiosa polímeros en origen	(48) (8) (44)
C- Permetilación e hidrólisis ácida	CCD(H)	2,3,4,6-tetra-Me-Glc 2,3,6-tri-Me-Glc 2,4,6-tri-Me-Glc	(23) (62) (14)
D- Reducción c/NaBH ₄ e hidrólisis ácida	EP(G)	glucosa glucitol polímeros en origen	(93) (2,5) (4,5)

³H-Al2 se obtuvo por incubación masiva (x 10). Hidrólisis y separación de productos fueron realizadas como se describe en la sección 7 de Material y Métodos.

TABLA XI. Identificación de Al_3 por diferentes métodos.

Tratamientos	Método de separación (solvente)	^{14}C -productos identificados	(%)
A- Hidrólisis ácida			
HCl fumante, 5 h, 4 $^{\circ}$ C	EP(F)	monosacáridos neutros	(52)
		polímeros en origen	(48)
H $_2$ SO $_4$ 35%, 8 h, 100 $^{\circ}$ C	CP(B)	glucosa	(67)
		celobiosa	(15)
		polímeros en origen	(18)
HCl 2,5 N, 3 h, 100 $^{\circ}$ C	EP(C)	glucosa	(63)
		celobiosa	(21)
		polímeros en origen	(16)
B- Hidrólisis enzimática, celulasa 4 d, 35 $^{\circ}$ C	CP(F)	glucosa	(57)
		celobiosa	(18)
		polímeros en origen	(25)
C- Permetilación e hidrólisis ácida	CCP(H)	2,3,4,6-tetra-Me-Glc	(32)
		2,3,6-tri-Me-Glc	(68)

^{14}C - Al_3 se obtuvo por incubación masiva (x 10). Hidrólisis y separación de productos fueron realizadas como se describe en la sección 7 de Material y Métodos.

sólo está presente un compuesto: un polímero neutro de glucosa. Su susceptibilidad a B-glucosidasas purificadas y ensayos de metilación muestran que AI2 es un B-(1,4)-glucano con algunas ligaduras B-(1,3). No es posible decir si las B-(1,3)-glucosas están unidas a la porción B-(1,4) en una misma cadena, o si se trata de moléculas independientes que coprecipitan en etanol. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por oxidación con periodato y metilación en estudios realizados in vivo (Tablas III y IV) donde la relación (1,4):(1,3) fue de 4:1. Es posible, sin embargo, dar algunas explicaciones para la presencia de B-(1,3)-glucanos hallados en AI2. En diferentes sistemas, la síntesis in vitro de B-(1,3)-glucanos (callosa) puede ser el resultado de una respuesta al daño cuando se obtienen preparaciones libres de células de tejidos en plantas superiores⁵³ u hongos²⁷⁵. Por el contrario una proporción baja de ligaduras B-(1,3) como la obtenida por estudios in vivo sostiene la idea de que UDP-glucosa: B-(1,3)-glucan sintetasa (EC 2.4.1.34) es un constituyente natural y activo en membranas de Prototheca tal como ocurre en fibras de algodón⁷² y el alga dinoflagelada Peridium westii²⁷⁶.

De los datos expuestos en las Tablas IX y XI se desprende de que ¹⁴C-AI3 es un B-(1,4)-glucano. Estos resultados coinciden con los que se obtuvieron anteriormente²⁴⁵ para este producto y que fue considerado un polisacárido de tipo celulósico.

Del análisis de los resultados que se presentan en este capítulo, surgen evidencias de que las membranas contienen por

lo menos tres glucan sintetetasas y no dos como se pensara al comienzo de este estudio. Dos de esas enzimas, GDP-glucosa: B-(1,4)-D-glucan sintetasa (EC 2.4.1.29) y UDP-glucosa: B-(1,4)-D-glucan sintetasa (EC 2.4.1.12), cuyos requerimientos salinos son netamente diferentes, sintetizan B-glucanos celulósicos. Por otra parte, en presencia de Ca^{+2} y UDP-glucosa, se activa una tercera enzima, UDP-glucosa: B-(1,3)-D-glucan sintetasa (EC 2.4.1.34). El producto resulta ser un B-glucano mixto. Considerando la baja proporción de ligaduras B-(1,3) verificadas in vitro (Tablas VIII y X) e in vivo (Tablas III y IV), se podría descartar entonces que, las condiciones elegidas para estudiar in vitro la síntesis de B-glucanos a partir de UDP-glucosa, sean desfavorables para la expresión de la UDP-glucosa: B-(1,3)-D-glucan sintetasa.

Se ha comprobado también que las actividades B-glucan sintetetasas no se interfieren en las condiciones de ensayo definidas como standards en la sección 4.2.2 de Material y Métodos. En consecuencia, se decidió a esta altura del trabajo proyectado, tomar como referencias los resultados que se obtuvieran con la vía metabólica que usa UDP-glucosa como sustrato, para lograr los objetivos pendientes.

7. Acción de inhibidores y activadores sobre la síntesis de AI2.

En el Capítulo 1 se demostró que, in vivo e in vitro, B-glucan sintetetasas están sometidas a períodos de activación

y quiescencia durante el ciclo biológico de Prototheca zopfii. Este hecho sugirió que la síntesis de B-glucanos estaría regulada por un mecanismo cíclico de activación-inactivación enzimático. Tomando como base los resultados que se resumen en la Figura 6 y las condiciones óptimas para la síntesis de AI2, se decidió ensayar el efecto de varios compuestos, inhibidores o activadores en el camino biosintético de polisacáridos, e iniciar el estudio de un posible mecanismo regulatorio. Dichos compuestos se agruparon en compuestos de diferente naturaleza (Tabla XII) y nucleótidos tri, di y monofosforilados (Tabla XIV). La efectividad de los compuestos ensayados fue evaluada en términos de inhibición y activación de la incorporación de radiactividad desde UDP-(³H)-glucosa en AI2 y se expresó como porcentaje del control.

EDTA se cita como causante de la disrupción de complejos particulados localizados en el plasmalema, donde probablemente ocurre el ensamblaje de fibras de celulosa¹¹⁷. Ensayado en concentración 1 mM no tuvo acción significativa, tal vez porque en el medio de incubación no hubo iones metálicos que inhibieran la reacción como se demostró precedentemente (Figura 7). Sin embargo, tuvo efectos inhibitorios in vivo que fue posible revertir por dilución (Capítulo 1).

Cumarina se indica como inhibidor de la síntesis de celulosa in vivo²⁷⁷. La síntesis de AI2 no se vio afectada pero, in vivo, se obtuvo 95% de inhibición en la síntesis de AI1¹¹⁸, postulándose que dicha inhibición fue a nivel de iniciación de

las cadenas. Sin embargo, no deben descartarse posibles efectos sobre la mitosis⁸⁹ o sobre la permeabilidad de los tejidos¹²⁶ in vivo.

Glicerol resultó ligeramente inhibitorio si bien hubo efecto positivo en la preservación de la actividad enzimática en frío (Capítulo 2). Inhibición en la formación de B-glucanos ha sido detectada en concentraciones de glicerol superiores al 20%¹¹⁴.

PEG-4000, reconocido promotor de la fusión de membranas²⁷⁸, mostró un marcado efecto activador y/o protector. Posteriormente se ensayaron varias concentraciones (Tabla XIII) obteniéndose la máxima incorporación con PEG 15%.

TABLA XIII. Acción de PEG-4000 sobre la síntesis de AI2.

PEG-4000 (%)	Radiactividad incorporada en ³ H-AI2 (cpm)
0	2010
5	2315
10	2651
15	2945
20	2886
25	2921

Las condiciones de incubación (45 min) y extracción se detallan en las secciones 4.2.2 y 5 de Material y Métodos. PEG-4000 se agregó en las concentraciones indicadas.

Triton X-100 y SDS inhibieron fuertemente la formación de AI₂, tal vez porque en su presencia las membranas perdieron integridad que llevó a la inactivación del complejo enzimático.

Proteínas como SAB y ovoalbúmina no tuvieron efecto protector. Tampoco se evidenció cambio por agregado de compuestos presentes en la fracción soluble del homogenato.

Calcofluor White, cuya función es la de desacoplante de polimerización y cristalización de fibras de celulosa, por formación de puentes de H entre grupos OH libres²⁷⁹, no tiene efecto en la formación de AI₂.

Los resultados de la Tabla XII, referidos a cumarina, EDTA y Calcofluor White indicaron que, in vitro, esos compuestos no ejercen sobre la síntesis de B-glucanos, el efecto que se les atribuye in vivo²⁸⁰. Cualquiera sea la causa, el sistema in vitro es parcialmente eficiente debido, en parte, al método de extracción de membranas empleado.

Con ATP 500 μ M la formación de AI₂ fue incrementada en un 40% (Tabla XIV). La activación enzimática observada podría estar relacionada con un proceso de fosforilación, de las propias sintetasas o de factores presentes en el medio de incubación, tal como se postulara para la síntesis de B-glucanos en Bacterias¹²¹ y hongos^{114,115,128}. No se descarta que el efecto se deba a la protección de UDP-glucosa contra enzimas degradativas, si bien la incubación de UDP-glucosa con membranas, sin ATP y CaCl₂, seguida por cromatografía en papel, resultó en un pico radiactivo en la posición de UDP-glucosa standard. Cuando se

TABLA XII. Efecto de distintos compuestos sobre la actividad
UDP-glucosa: glucan sintetasa.

Compuesto agregado	Incorporación de (³ H)Glc en AI2 (% del control)
EDTA 1 mM	99,35
Cumarina 150 uM	99,84
Glicerol 20% (v/v)	92,7
PEG-4000 20% (p/v)	144,2
Triton X-100	5,1
SDS 0,5% (p/v)	8,4
SAB 100 ug	102,3
Ovoalbúmina 100 ug	100
Sobrenadante (100000 xg) hervido, 100 ug	101,5
Sobrenadante (100000 xg) hervido y dializado, 100 ug	100,5
Calcofluor White 50 ug	105
Control	100 (4300 cpm)

Incubaciones(45 min) y extracciones se efectuaron en condiciones standard (secciones 4.2.2 y 5 de Material y Métodos).

TABLA XIV. Efecto de nucleótidos sobre la actividad UDP-glucosa: glucan sintetasa.

Nucleótido agregado	³ H)Glc incorporada en AI2	
	Nucleótido	
	10 μ M	500 μ M
	(% del control)	
ATP	109,26	139,44
GTP	100,85	105,48
UTP	100	100
CTP	100	100
ADP	100	99
GDP	100	100
UDP	98,3	88,25
CDP	100	100
UDP-d-Glc	100	99,8 (*)
GDP-d-Glc	100	100,2 (*)
AMP	100	99,5
GMP	100	100
UMP	100	97,4
CMP	100	100
Control	100 (5400 cpm)	

Las condiciones de incubación y extracción son las que se indican para la Tabla XII.

(*) concentración 150 μ M.

probó el efecto de ADP-glucosa 350 μ M (Tabla VI), éste no diluyó la marca radiactiva incorporada en A12, indicando que no fue sustrato alternativo. Este resultado sugirió además que, no hubo efecto protector de ATP contra enzimas degradativas. Debido a que la activación de la UDP-glucosa: glucan sintetasa se obtuvo a concentraciones de ATP un orden de magnitud mayor que la de UDP-glucosa, no se descartó que el ATP fuera hidrolizado por una ATPasa presente en el extracto crudo. Esta posibilidad no fue explorada.

Nucleótidos de uridina afectaron en distinto grado la actividad enzimática. Es probable que UDP, como producto de degradación de UDP-glucosa, se acumule y resulte inhibitorio, sobre todo en incubaciones largas. En menor medida este efecto se reflejó con UMP. Contrariamente, UDP-d-glucosa, análogo del sustrato y descrito como inhibidor del reciclamiento de lípidos glicosilados¹¹⁸, no tuvo efecto.

Los resultados preliminares sobre acción de los compuestos seleccionados como posibles modificadores de la síntesis de A12 (Tablas XII y XIV) no justificaron encarar un estudio de posibles mecanismos regulatorios de la UDP-glucosa: glucan sintetasa.

CAPITULO 3

EVIDENCIAS PARA LA FORMACION DE UN PRECURSOR DURANTE LA SINTESIS DE AI₂.

1. Productos de fraccionamiento.

En la sección 5 de Material y Métodos se describe el procedimiento seguido para aislar una fracción insoluble en TCA, denominada TCAI, y de otra insoluble en etanol 66% y en álcali (AI₂) en ese orden. La Tabla XV muestra la distribución de radiactividad incorporada en ambas fracciones después de 1 h de incubación. El 5% del total de la radiactividad fue precipitado con TCA 10% libre de lípidos. La fracción insoluble en etanol 66%, obtenida a partir del sobrenadante ácido, representa el 16,6% de la radiactividad total que, a su vez, es insoluble en álcali caliente en un 14%. En análisis preliminares se verifica que TCAI:

- 1- no pierde radiactividad por calentamiento a 100°C con el mismo ácido o por diálisis exhaustiva,
- 2- es soluble en álcali diluido (NaOH o NH₄OH 0,15 M a temperatura ambiente) y en ácido fórmico, y
- 3- absorbe a 280 nm y da reacción positiva con reactivos de fenol-sulfúrico, Lowry y Biuret.

Las propiedades señaladas por el método de fraccionamiento sugieren que TCAI contiene cadenas glicosídicas unidas covalentemente a un aceptor proteico.

TABLA XV. Distribución de (^3H)-glucosa en diferentes fracciones.

Fracción	(^3H)-glucosa incorporada	
	CPM	%
Insoluble en TCA 10% (TCAI)		
- 0°C, 30 min	8250	5,5
- 100°C, 10 min	6030	4,0
Insoluble en etanol 66%		
- 0°C, 1 h	24900	16,6
Insoluble en NaOH 0,2 M (AI2)		
- 100°C, 10 min	20890	13,9

Las membranas fueron incubadas con UDP-(^3H)-glucosa durante 1 h y aislados los productos como se describe en las secciones 4.2.2 y 5 de Material y Métodos, excepto que el primer precipitado en TCA fue resuspendido en TCA 10% y calentado por 10 min en una de las muestras.

2. Formación de TCAI y AI2 en el tiempo.

Cuando las membranas fueron incubadas con UDP-(^3H)-glucosa en condiciones standard por diferentes tiempos, se detectaron cantidades variables de TCAI y AI2. Las cinéticas de incorpo

ración se muestran en la Figura 13,A. La marcación de TCAI con
FIGURA 13. Formación de productos en el tiempo.

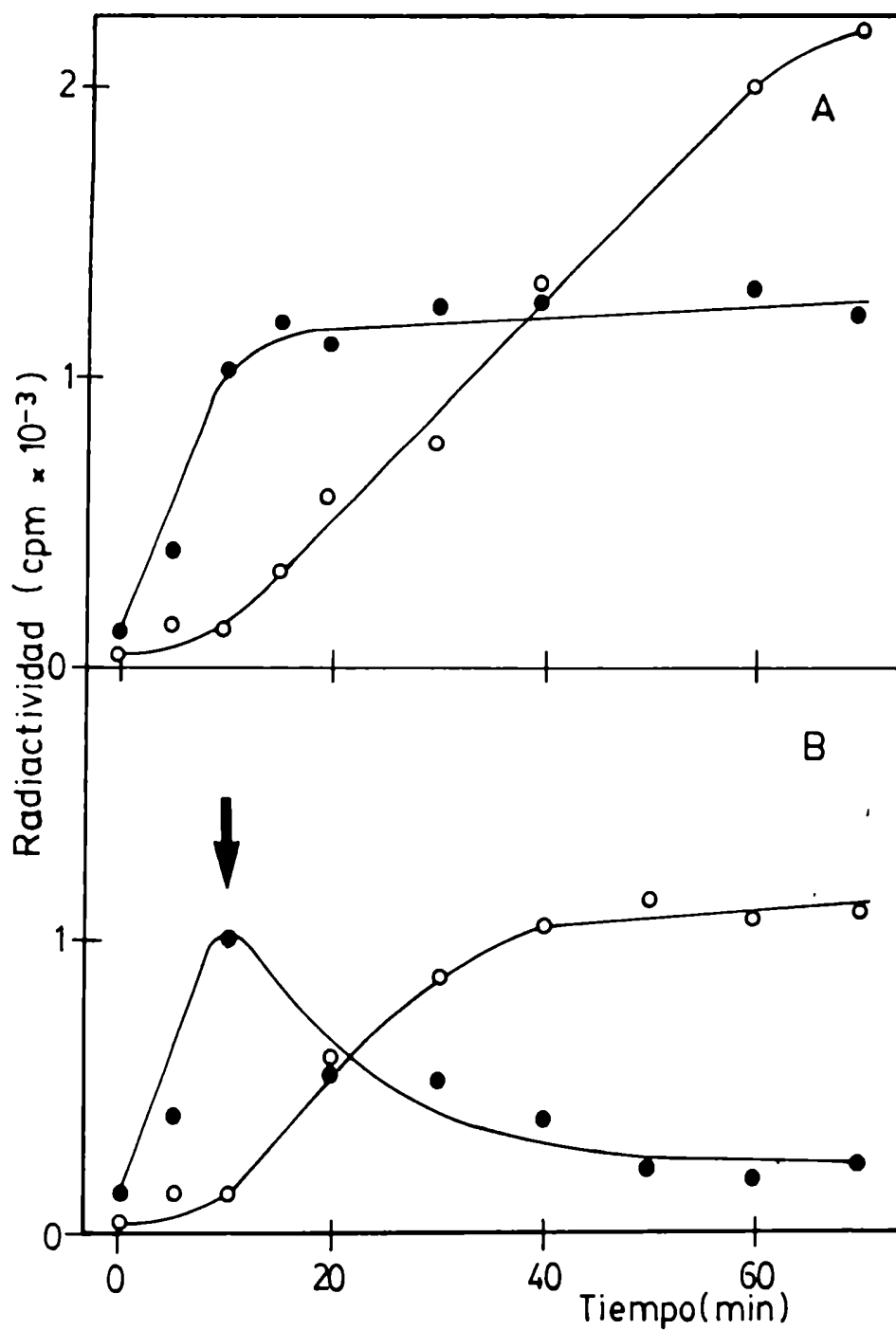


FIGURA 13.

Incubación y extracción se realizaron en condiciones standard (secciones 4.2.2 y 5 de Material y Métodos). A: TCAI (●) y AI2 (○) se extrajeron y midieron en los tiempos indicados; B: después de incubar 10 min, se agregó UDP-glucosa 5 mM a la mezcla de incubación.

(³H)-glucosa ocurre en los primeros 10 min alcanzando un "plateau" después de 15 min. En AI2, la incorporación sucede a velocidad constante después de un corto período "lag". La rápida síntesis de TCAI y el "lag" inicial en la formación de AI2 sugieren una relación precursor-producto.

Con el objeto de obtener evidencias adicionales sobre el posible rol de TCAI como precursor de AI2, se realizó un clásico experimento de pulso y "chase". El extracto crudo fue incubado con UDP-(³H)-glucosa 10 min y en ese momento se agregó UDP-glucosa 4 mM final. La distribución de radiactividad en los productos se muestra en la Figura 13, B indica que el ³H de TCAI es transferido a AI2. La incorporación de (³H)-glucosa en AI2 alcanza un máximo después de 40 min, mientras que en TCAI la radiactividad se incorpora linealmente durante 15 min y luego desciende a un valor mínimo de incorporación de marca que se mantiene a partir de los 50 min. Esta distribución de radiactividad indica que TCAI es un posible precursor de AI2.

3. TCAI y celodextrinas como precursores en la síntesis de AI2.

Cooper & Manley¹¹⁷ y Franz²²⁸ han sugerido que, tanto celo

dextrinas como glucoproteínas solubles, pueden funcionar como precursores en la síntesis de B-glucanos de pared celular. Se probó entonces la capacidad de ^3H -TCAI y ^3H -celodextrinas como sustratos en incubaciones standards con UDP-glucosa observándose (Tabla XVI) que, la radiactividad de esos compuestos no se transfiere a AI2 bajo ninguna condición. Una posible explicación es que el tratamiento con TCA y/o solventes orgánicos destruyera la integridad de la membrana²⁸¹ y en consecuencia la habilidad de transferir radiactividad desde TCAI a polisacáridos.

Esos resultados indicaron que, para probar el rol intermedio de TCAI había que aislar el mismo en condiciones no desnaturalizantes. Para ello se diseñó un experimento en dos etapas. La primera consistió en una incubación standard con UDP-(^3H)-glucosa de 10 min. La reacción se terminó por dilución con Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y se centrifugó a alta velocidad obteniéndose el pellet y sobrenadante correspondientes. El pellet (fracción membranosa) se lavó para sacar el sustrato radiactivo. Con el mismo propósito se filtró el sobrenadante (fracción soluble) por columnas de Sephadex G-25 y se recuperó la muestra eluída en el Vo. En tubo separado se verificó que la cantidad de ^3H -AI2 formada en 10 min era irrelevante. En la segunda etapa las fracciones membranosa y soluble tritiadas se incubaron, con y sin UDP-glucosa, en presencia de PEG-4000 y membranas frescas como fuente de enzimas. Los resultados del experimento se exponen en la Tabla XVII. Es evidente que

TABLA XVI. TCAI y celodextrinas como sustratos en la síntesis de AI2.

Sustratos del segundo experimento	TCAI	³ H)-glucosa incorporada en	
		Etanol 66%	
		soluble	insoluble
		(cpm)	
- ³ H-TCAI con lípidos (A)	3834	79	-
³ H-TCAI con lípidos + UDP-Glc	3706	86	-
- ³ H-TCAI libre de líp.(B)	3410	115	-
³ H-TCAI libre de lípidos + UDP-Glc	3295	171	105
- ³ H-celodextrinas (C)	-	3210	-
³ H-celodextrinas + UDP-Glc	-	3190	-

Primer experimento: ³H-TCAI ([±] lípidos) y ³H-AI2 se obtuvieron a partir de incubaciones standards de 10 y 60 min respectivamente. (A): TCAI sin tratar con solventes orgánicos se neutralizó y dializó extensivamente. (B): TCAI libre de lípidos (sección 5 de Material y Métodos). (C): ³H-AI2 se hidrolizó con HCl 2,5N, 100°C, 3h, neutralizó y filtró por columnas de Biogel P-6, recuperándose el Ve con Kav= 0,5 (³H-celodextrinas).

Segundo experimento: se incuban (1,5h) los compuestos obtenidos en el 1er experimento con 300 ug de proteínas, PEG-4000 20%, CaCl₂ 5 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, con y sin UDP-glucosa 5 mM en un volumen de 100 ul. TCAI se extrajo como en (B). Las fracciones soluble e insoluble en etanol 66% se aislaron del sobrenadante ácido neutralizado.

TABLA XVII. Transferencia de radiactividad de TCAI a AI2.

Sustratos	(^3H) -glucosa incorporada		
	Primera incubación	Fracción soluble	Fracción membranosa
		(cpm)	
UDP- (^3H) -glucosa	2210	2982	
Segunda incubación	TCAI	AI2	Transferencia a AI2
	(cpm)		(%)
^3H -fracción soluble + UDP-Glc	1930	51	2,57
^3H -fracción soluble	2142	36	1,65
^3H -fracción membranosa + UDP-Glc	2235	1030	31,5
^3H -fracción membranosa	2603	103	3,8

Primero las membranas se incubaron en presencia de UDP- (^3H) -glucosa en condiciones estándar (10 min). La reacción fue diluída y centrifugada a 100000 xg, 1h. El pellet fue lavado por resuspensión en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y centrifugado nuevamente. El sobrenadante fue cromatografiado sobre columnas de Sephadex G-25 y recuperado en Vo. La segunda incubación fue hecha con ^3H -membranas y ^3H -fracción soluble como sustratos, durante 1 h, a 30°C en un volúmen final de 60 ul y conteniendo PEG-4000 20%, CaCl_2 5 mM, 300 ug de membranas frescas y UDP-glucosa 5 mM o no.

sólo la fracción membranosa puede transferir radiactividad (31%) a AI2 y que esa incorporación depende del UDP-glucosa agregado a la mezcla. También, experimentos paralelos pusieron en relieve que PEG es esencial para la reacción porque su omisión resultó en una transferencia escasa de ^3H a AI2. Este hecho, junto con los resultados que se muestran en la Tabla XIII agregan una evidencia más de que el PEG promueve la fusión de membranas y la interacción entre proteínas²⁸².

Si bien la función intermediaria de TCAI es claramente demostrada, queda sin una explicación satisfactoria el que, aún en las condiciones usadas (Tabla XVII), se obtuvieran valores discretos de transferencia. Algunas aclaraciones partieron de los resultados provistos por el siguiente experimento. Células sincronizadas de Prototheca se marcaron in vivo con (^3H)-glucosa y se obtuvieron las membranas en la forma habitual. Esas ^3H -membranas se incubaron con UDP-(^{14}C)-glucosa y se extrajeron TCAI y AI2 al cabo de 1 h. La distribución de doble marca se aprecia en la Tabla XVIII. Se calcula que sólo el 26% del ^3H incorporado in vivo en ^3H -TCAI se transfiere a AI2 in vitro. En cambio, la incorporación de (^{14}C)-glucosa en AI2 no se ve afectada por manipulación de membranas significando que la integridad de las mismas es importante y que su extracción altera la capacidad de transferir ^3H desde TCAI a AI2. De los resultados presentados en las Tablas XVII y XVIII se deduce que la radiactividad en TCAI es parcialmente transferida, tanto in vitro como in vivo, a AI2 (31 y 26% respectivamente). Dos

TABLA XVIII. Transferencia de TCAI marcada in vivo.

Sustratos	Radiactividad incorporada en			
	TCAI		AI2	
	³ H (dpm)	¹⁴ C	³ H (dpm)	¹⁴ C
Membranas marcadas <u>in vivo</u>	1692	-	81	-
Membranas marcadas <u>in vivo</u> + UDP-(¹⁴ C)-Glc	1318	1115	450	1620

Células sincronizadas fueron incubadas durante 10 min con (³H)-glucosa y lavadas extensivamente con glucosa y agua. Con esas células se prepararon membranas como se describe en la sección 3 de Material y Métodos. Se realizaron incubaciones standards con las membranas tritiadas como fuente de enzimas y UDP-(¹⁴C)-glucosa 30 μ M. Los productos se aislaron como se indica en la sección 5 de Material y Métodos y se contó la radiactividad para ambos isótopos.

razones pueden aducirse para esta transferencia relativamente pobre: a) que la radiactividad en las membranas está asociada con distintas especies moleculares y sólo una es la involucrada con la síntesis de AI2 y b) que una parte de las membranas se destruye por manipulación y pierde consecuentemente su capacidad de transferencia.

4. Localización del precursor de AI2.

Se incubaron membranas en condiciones standards con UDP-(^3H)-glucosa por 10 min. Se aisló la fracción membranosa como se indicó precedentemente y se la digirió con celulasa o tripsina en presencia o ausencia de detergente. Mediante una segunda incubación con el sustrato frío se pudo medir la capacidad de las membranas tratadas para transferir (^3H)-glucosa a AI2. Los resultados en la Tabla XIX,A indican que un 25% de la radiactividad en TCAI resistió la tripsinización y un 40% la acción de celulasa. En presencia de Triton X-100, 95 y 88% de la marca fue hidrolizada por ámbas enzimas. Este comportamiento sugiere que parte de la (^3H)-glucosa en las membranas es protegida de la acción hidrolítica si, por ejemplo, está ubicada en la parte interna de una vesícula.

Respecto a la capacidad de transferir (^3H)-glucosa desde las membranas pretratadas a AI2 (Tabla XIX,B) se ve que membranas digeridas con celulasa transfieren un 60% de la marca remanente, en cambio las membranas tripsinizadas transfirieron sólo el 34% de la marca. Estos resultados indican que el intermediario de AI2 está dentro de una vesícula y que las sintetasas son destruídas por la tripsina. Además, el intermediario parece ubicado en el interior de una vesícula a cubierto de la acción enzimática.

Parece claro que la síntesis de AI2 depende de la presencia de una proteína glicosilada pegada a las membranas o internali

TABLA XIX. Efecto de tripsina y celulasa sobre la fracción membranosa.

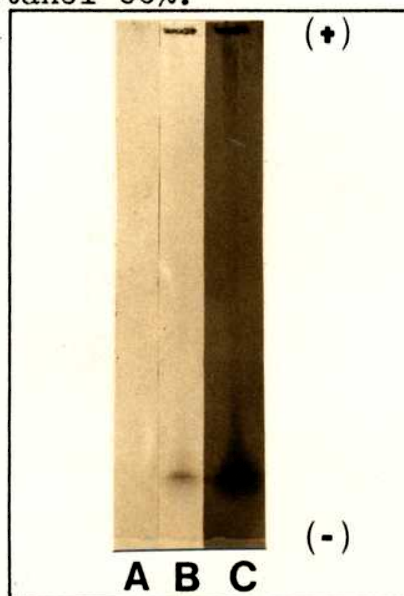
Tratamiento de la fracción membranosa	Radiactividad incorporada en			
	TCAI		AI2	
A)	(cpm)	(%)	(cpm)	(%)
Sin tratamientos	4550	100	ND	-
Tripsina	1150	25,3	ND	-
Tripsina + Triton X-100	240	5,3	ND	-
Celulasa	1801	39,6	ND	-
Celulasa + Triton X-100	550	12,0	ND	-
B) Sustratos	(cpm)	(%)	(cpm)	(%)
Membranas sin tratar + UDP-Glc	3050	69,3	1355	30,7
Membranas tratadas con tripsina + UDP-Glc	694	66,0	358	34,0
Membranas tratadas con celulasa + UDP-Glc	516	41,5	729	58,5

Las membranas fueron incubadas en condiciones standards (10 min) con UDP-(³H)-glucosa como sustrato. ³H-fracción membranosa fue aislada como se indicó para la Tabla XVII. (A) Alícuotas (4500 cpm) se incubaron con 12 ug de tripsina o 10 mg de celulasa en presencia o no de Triton X-100 0,1%. TCAI y AI2 se extrajeron como se describe en la sección 5 de Material y Métodos. (B) Para medir la capacidad de transferencia de las membranas tratadas con enzimas, éstas fueron precipitadas por centrifugación a alta velocidad, lavadas y reincubadas en presencia de UDP-glucosa 5 mM, PEG-4000 20%, 300 ug de membranas frescas por 1 h.

zada en una vesícula y de UDP-glucosa como dador de glucosilos. Una situación análoga fue planteada para la síntesis de α -glucanos (glucógeno y almidón). Los estudios pioneros de Krisman sobre la formación de glucógeno en hígado de rata, mostraron la existencia de una glucoproteína con funciones precursoras²⁰⁴. A resultados parecidos se llegó con extractos crudos de papa, demostrándose la presencia de una glucoproteína en la etapa sintética inicial del almidón²¹⁷.

Es importante aclarar a esta altura que la fracción insoluble en etanol 66% y, por consiguiente, AI2 están libres de proteínas. El experimento que así lo indica consistió en cromatografiar, en gel de poliacrilamida y sin SDS, la fracción insoluble en etanol 66%, completa y predigerida con celulasa. En la Figura 14 se ve que los polímeros predigeridos y completos no entran en el gel indicando que no contienen carga. Estos

FIGURA 14. Electroforesis en gel nativo de la fracción insoluble en etanol 66%.



zada en una vesícula y de UDP-glucosa como dador de glucosilos. Una situación análoga fue planteada para la síntesis de α -glucanos (glucógeno y almidón). Los estudios pioneros de Krisman sobre la formación de glucógeno en hígado de rata, mostraron la existencia de una glucoproteína con funciones precursoras²⁰⁴. A resultados parecidos se llegó con extractos crudos de papa, demostrándose la presencia de una glucoproteína en la etapa sintética inicial del almidón²¹⁷.

Es importante aclarar a esta altura que la fracción insoluble en etanol 66% y, por consiguiente, AI2 están libres de proteínas. El experimento que así lo indica consistió en cromatografiar, en gel de poliacrilamida y sin SDS, la fracción insoluble en etanol 66%, completa y predigerida con celulasa. En la Figura 14 se ve que los polímeros predigeridos y completos no entran en el gel indicando que no contienen carga. Estos

FIGURA 14. Electroforesis en gel nativo de la fracción insoluble en etanol 66%.

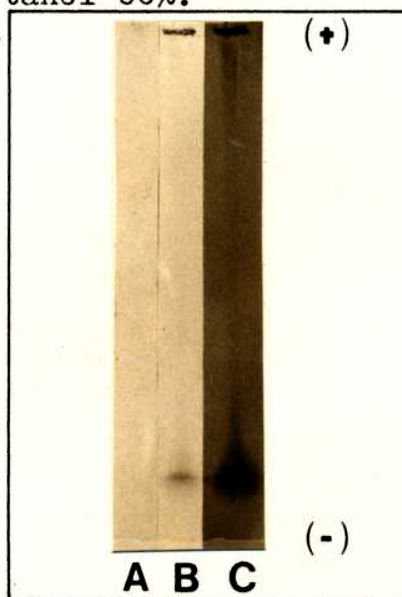


FIGURA 14.

Muestras y gel se prepararon como se describe en las secciones 5 y 7.2.4 de Material y Métodos. Fracciones insolubles en etanol 66% (180 ug) se sembraron predigeridas con celulasa y teñidas con Coomassie Blue (calle A) y con Schiff/ác periódico (calle B). La fracción sin tratamientos y teñida con Schiff/ác. periódico se sembró en la calle C.

resultados y aquellos en que se obtuvo (^3H)-glucitol por reducción de $^3\text{H-AI2}$ con NaBH_4 (Tabla X,D) sugieren que las cadenas polisacáridicas tienen glucosas en sus extremos reductores que no estarían unidas a otras moléculas cargadas y/o de distinta naturaleza.

Si, como se desprende de los resultados, AI2 es de naturaleza exclusivamente polisacáridica (Tabla X,D y Figura 14) y TCAL es su precursor (Figura 13 y Tabla XVII) es posible que, en un momento durante el alargamiento de oligosacáridos anclados a proteínas de la membrana, éstos se liberen de la porción peptídica. Del evento podrían encargarse las β -glicosidasas de la membrana (Tabla V y Figura 12). Una situación parecida se ha descrito para la síntesis de almidón²¹⁷.

CAPITULO 4

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN INTER MEDIARIO GLUCOPROTEICO.

1. Preparación de ^{14}C - ^3H -TCAI.

En el Capítulo 3 se obtuvieron evidencias parciales de que TCAI contiene un polipéptido ligado covalentemente a un polímero de (^3H)-glucosa. En busca de evidencias concluyentes sobre la formación de una proteína glicosilada precursora de AI2 se realizó el siguiente experimento. Células en la tercera hora del ciclo celular se marcaron durante 15 min con (^{14}C)-prolina, se lavaron extensivamente y obtuvieron ^{14}C -membranas. En el paso siguiente se incubaron las ^{14}C -membranas con UDP-(^3H)-glucosa para obtener TCAI doblemente marcado. Los resultados en la Tabla XX, Experimento A, muestran la incorporación de radiactividad en TCAI después de 10 min de incubación. La cantidad de (^{14}C)-prolina y (^3H)-glucosa coprecipitada con TCA 10% es considerable, mientras que la de (^{14}C)-prolina en AI2 es ínfima. Este último resultado representa una evidencia más de la naturaleza exclusivamente polisacárida de AI2.

En un segundo experimento, la mezcla de incubación se centrifugó a alta velocidad y se agregó, en el sobrenadante y precipitado resuspendido, TCA en concentración final 10%, aislándose TCAI. La Tabla XX, Experimento B, muestra la relación

$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ para las dos fracciones. La fracción precipitada por centrifugación contiene 5 veces más glucosa que la soluble y, en ella debe reconocerse a la denominada fracción membranosa (Tabla XVII) que actuó como intermediario de AI2.

TABLA XX. Distribución de radiactividad en diferentes productos.

Fracción	Radiactividad incorporada $^{14}\text{C}/^3\text{H}$		
	$(^3\text{H})\text{-Glc}$	$(^{14}\text{C})\text{-Pro}$	
(cpm)			
Experimento A			
TCAI	25540	10312	0,4
AI2	3941	170	0,04
Experimento B			
TCAI			
Sobrenadante	16019	2055	0,13
Precipitado	10108	7089	0,7

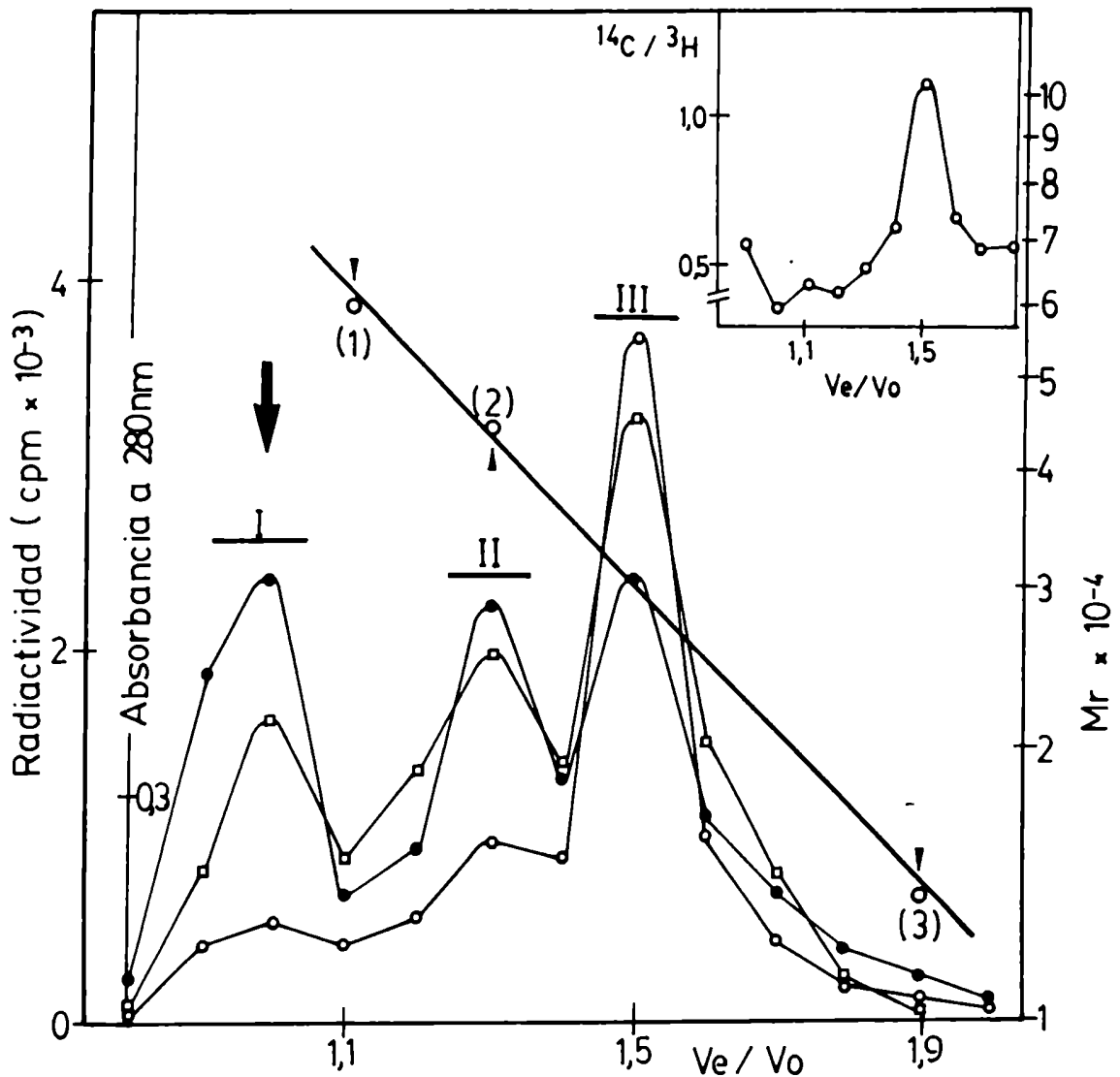
Las incubaciones se realizaron en condiciones standards (10 min) empleándose ^{14}C -membranas y UDP- (^3H) -glucosa. Experimento A: TCAI y AI2 fueron extraídos directamente de la mezcla de incubación (sección 5 de Material y Métodos). Experimento B: la incubación fue terminada por dilución (30 veces) con buffer, centrifugada a 100000 xg durante 1 h. TCAI fue obtenida a partir del sobrenadante y precipitado.

2. Purificación de GP.

^{14}C - ^3H -TCAI fue solubilizada en buffer fosfato de Na con ME , SDS y urea, calentada a 50°C por 30 min y cromatografiada en una columna de Sephadex G-75. De la columna eluyeron tres picos (Figura 15). El pico I eluyó con el V_0 y los restantes se incluyeron en la columna. Muestras de los tres picos fueron tratadas con celulasa y B-glucosidasa, resultando que sólo el pico III fue digerido por las enzimas además de tener un alto contenido en glucosa (Figura 15, inserto). El Mr del pico III se estimó en 28-30 kDa y el contenido de carbohidratos y proteínas fue, según los métodos de Lowry y fenol-sulfúrico, de 15 y 85% respectivamente.

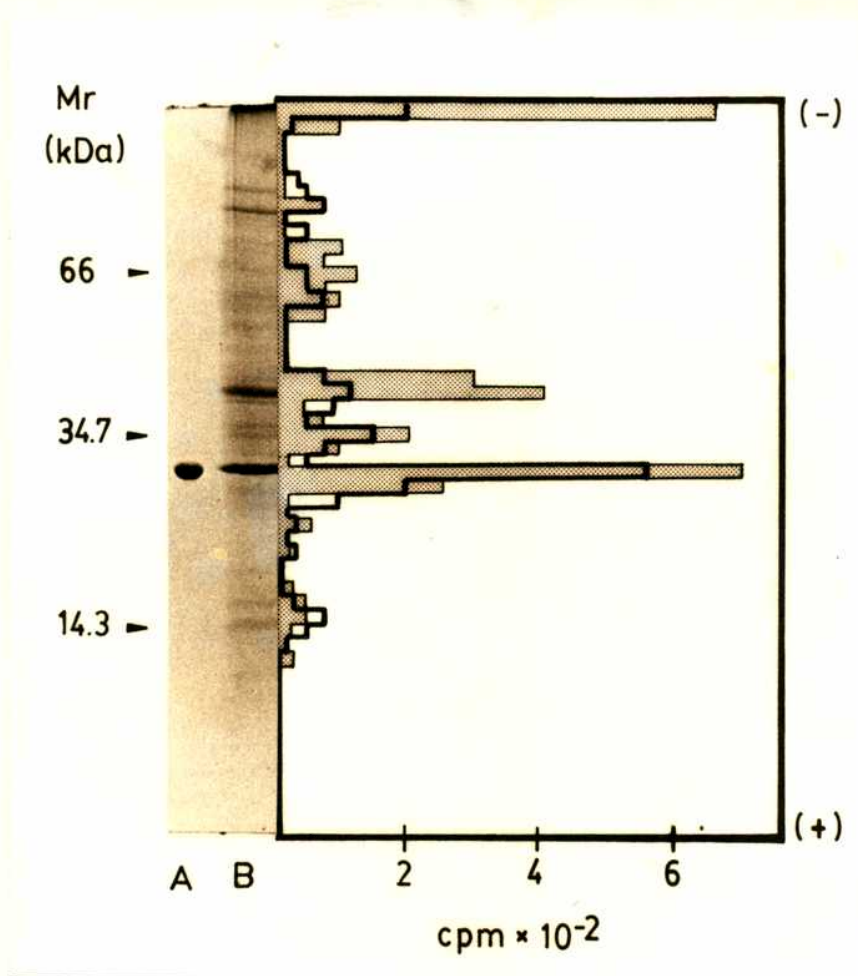
El pico III, denominado GP, se corrió en electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, dando una sola banda con Mr de 29 kDa (Figura 16, calle A), valor que coincide con el calculado por filtración en gel. En la Figura 16, calle B se muestran las proteínas contenidas en TCAI, donde GP es bien visible. Esta fracción fue incluida en el gel sólo después de haberla cromatografiado por filtración en gel y tratado con buffer conteniendo ME , SDS y urea, 10 min a 100°C , antes de la correida electroforética. El histograma de la Figura 16 da idea de la distribución de ^3H y ^{14}C en TCAI. Este gráfico, equivalente al de la Figura 15, inserto, muestra un alto contenido de los dos isótopos para GP. Dadas las condiciones experimentales, altamente disociantes (Figuras 15 y 16), puede

FIGURA 15. Filtración en gel Sephadex G-75 de TCAI.



TCAI doblemente marcada fue obtenida por incubación (10 min) y extracción standards (secciones 4.2.2 y 5 de Material y Métodos). Muestras (7000 cpm/mg proteína) fueron tratadas en condiciones desnaturalizantes antes de ser cromatografiadas sobre columnas de Sephadex G-75. Los picos I, II y III se recuperaron, dializaron y liofilizaron. (●): absorbancia a 280 nm; (□): ^{14}C y (○): ^3H . Las flechas indican el V_e de proteínas standards: (1) pepsina, (2) ovoalbúmina y (3) citocromo C. En el ángulo superior derecho se representa la relación $^{14}\text{C}/^3\text{H}$.

FIGURA 16. PAGE/SDS de TCAI y GP.

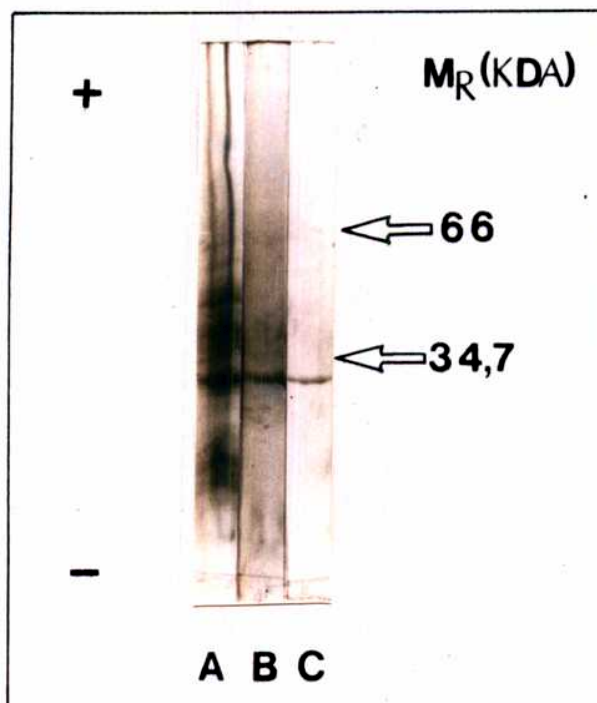


Tratamiento de las muestras y corrida electroforética se describen en la sección 7.2.4 de Material y Métodos. Calle A: GP (30 µg de proteína), calle B: TCAI (360 µg de proteína). Las muestras se tiñeron con Coomassie Blue. En el histograma se representa la distribución de ¹⁴C (■) y ³H (▨) en TCAI. La columna de la izquierda corresponde a Mr de proteínas standards.

afirmarse que prolina y glucosa son parte de la misma molécula y que el Mr promedio de GP es de 29 kDa. Notablemente, el Mr de GP de Prototheca es similar a aquel calculado para la glucoproteína precursora de almidón en papa²¹⁶ aunque esta similitud puede ser casual.

Por una razón no conocida, al cabo de 10 min de incubación proteínicas, glicosiladas o no, se desprendieron de la membrana y fueron recuperadas como fracción soluble (Capítulo 3). Dicha fracción como se desprende de los resultados expuestos en la Tabla XVII, no contiene al menos en forma activa, al precursor de AI2. De estas observaciones surgió el interés por saber si GP es una molécula exclusiva de la fracción membranosa o existe una forma soluble. Se procedió entonces a separar esas fracciones por centrifugación (100000 xg, 1 h) a partir del volúmen de una incubación standard de 10 min. Las dos fracciones, membranosa y soluble, se cromatografiaron en columnas de Sephadex G-75, recuperándose los mismos V_e en que eluyó GP (pico III). En la Figura 17 se muestran los resultados de una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la fracción soluble completa (Figura 17, calle A) y del pico III de las fracciones soluble y membranosa (Figura 17, calles B y C). Se puso en evidencia que existe una especie molecular soluble con las mismas propiedades electroforéticas de GP intermediaria, aunque no fue posible definir si el evento de su liberación es un accidente experimental u ocurre también in vivo.

FIGURA 17. PAGE/SDS de GP de las fracciones soluble y membrana
nosa.



Fracciones soluble y membranosa se obtuvieron como se describe en la Tabla XVII y se cromatografiaron sobre columnas de Sephadex G-75. Se recuperaron las muestras que eluyeron con el Ve de GP (Figura 15, pico III). El gel se preparó como se indica en la sección 7.2.4. de Material y Métodos y se tiñó con Coomassie Blue. Calle A: fracción soluble completa (360 ug de proteína); calle B: GP de la fracción soluble (60 ug de proteína); calle C: GP de la fracción membranosa (35 ug de proteína). En la columna a la derecha se indican las Mr de proteínas standards.

3. Naturaleza de la unión aminoácido-azúcar de GP.

Con el propósito de conocer el tipo de unión péptido-carbohidrato en GP, muestras de ésta doblemente marcadas se de

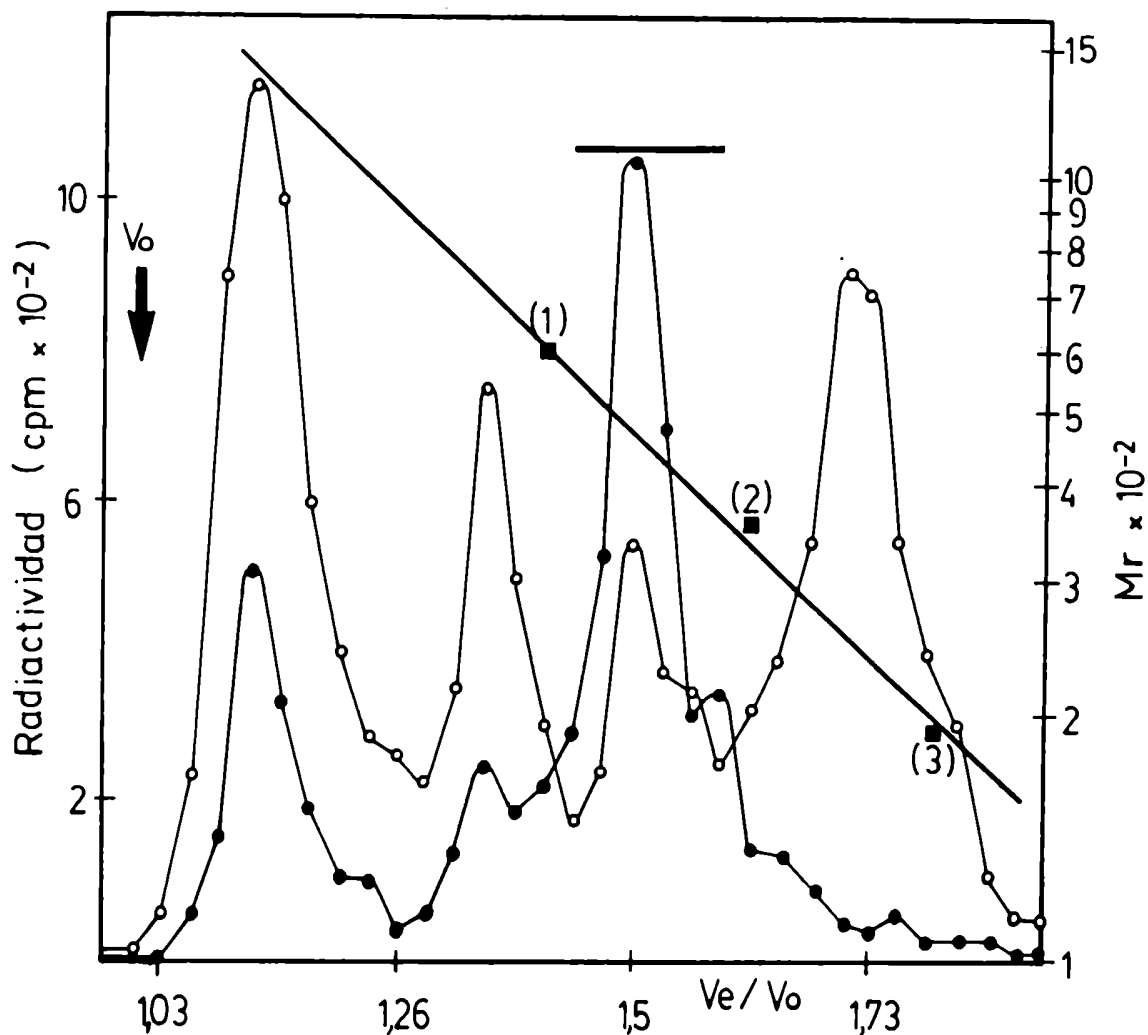
gradaron con álcali en las condiciones señaladas en la sección 7.1.1 de Material y Métodos. Después de cada tratamiento, las muestras se neutralizaron y cromatografiaron en columnas de Sephadex G-25. GP es resistente a B-eliminación y a tratamientos alcalinos más fuertes (NaOH 1 M, 5 h, 100°C y Ba(OH)₂ 0,2 M, 6 h, 120°C) indicando que no hay en la muestra ligaduras O-glicósídicas a serina o treonina ni ligaduras N-glicósídicas a asparagina²⁸³. Después del tratamiento con Ba(OH)₂, 85% de la marca radiactiva fue recuperada en el Ve de la columna, sugiriendo que GP contiene ligaduras O-glicósídicas a hidroxiprolina o hidroxilisina y que los enlaces peptídicos son destruidos por el tratamiento liberándose un ¹⁴C-aminoácil-³H-oligosacárido²⁸⁴⁻²⁸⁶.

Para identificar el aminoácido y el azúcar involucrados en la ligadura O-glicósídica, se efectuaron varios tratamientos tendientes a reducir el tamaño de GP por ámbos extremos, peptídico y glicósídico. Los cambios producidos se siguieron por cromatografía en columnas de Biogel P-6 y P-2 calibradas. GP doblemente marcada (1 x 10⁴ cpm de ¹⁴C, ¹⁴C/³H= 1,12) fue sometida a los siguientes tratamientos. Entre paréntesis se indican las características de la muestra recuperada de cada cromatografía:

- degradación con Ba(OH)₂ (Mr de 2 kDa y ¹⁴C/³H= 0,132)
- digestión con celulasa (Mr de 900 Da y ¹⁴C/³H= 0,254) e
- hidrólisis ácida suave con TFA 0,1 N, H₂SO₄ 0,1 N ó ácido oxálico 30 mM, pH 3,0.

En la Figura 18 se muestra el perfil de elución de los produc

FIGURA 18. Filtración en gel de productos formados por hidrólisis ácida suave de aminoácil-azúcares.

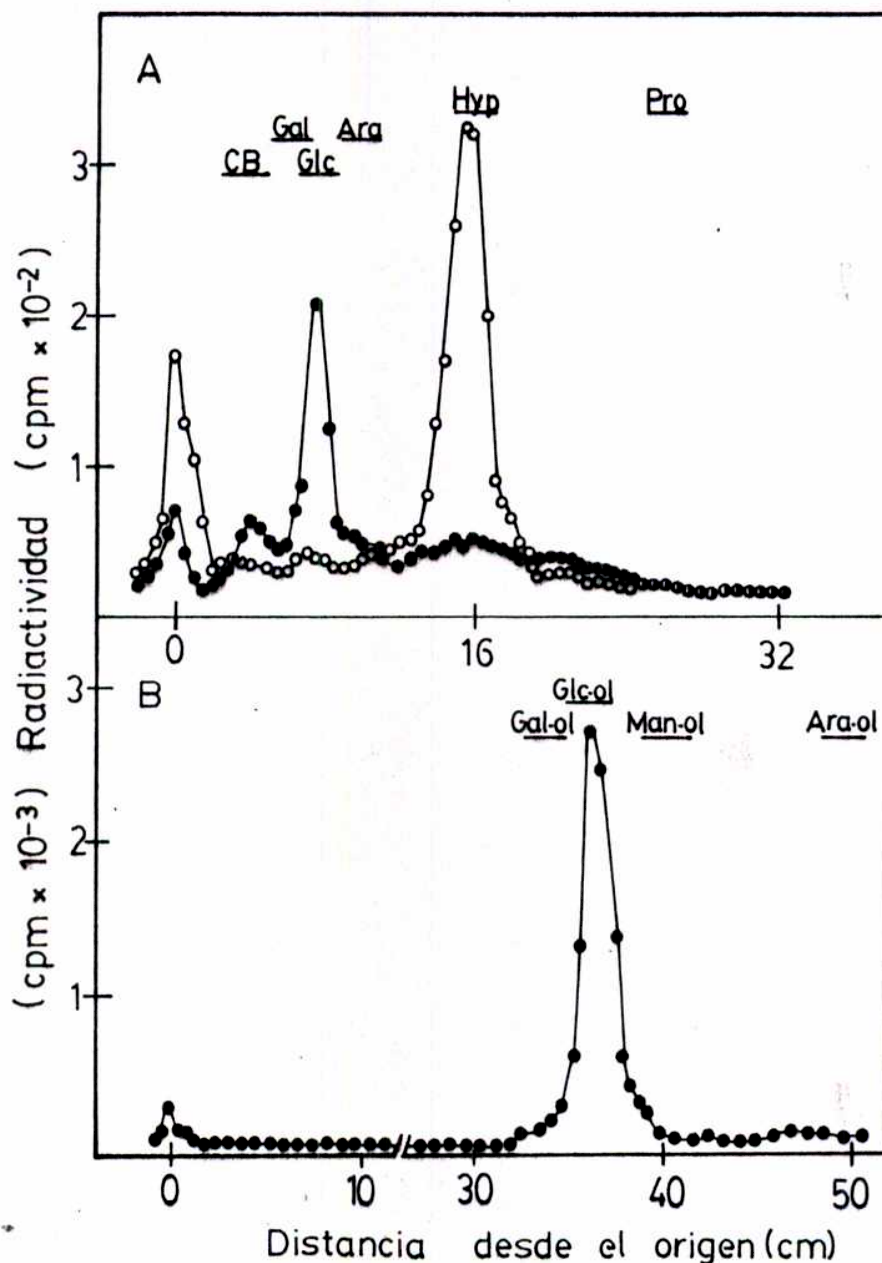


¹⁴C-aminoácil-³H-azúcares obtenidos por degradación con Ba(OH)₂ seguida de digestión con celulasa se cromatografiaron sobre columnas de Biogel P-2. La barra abarca los volúmenes seleccionados para el siguiente tratamiento. Los símbolos señalan: (o) ³H, (●) ¹⁴C, (■) volúmenes de elución de PEG-600(1), (³H)-sacarosa (2) y (³H)-glucosa (3). Los tratamientos seguidos se describen en las secciones 7.1.1. y 7.2.1.2. de Material y Métodos.

tos obtenidos con el último tratamiento. Las características de la muestra seleccionada (Mr de 460 Da, $^{14}\text{C}/^3\text{H} = 1,7$) sugieren que, probablemente, contiene un ^{14}C -aminoácido unido a una o dos hexosas. Posteriormente, la muestra se hidrolizó completamente con TFA 2,5 N. Una mitad del hidrolizado se cromatografió sobre papel con solvente D. La otra mitad se redujo con NaB^3H_4 examinándose los productos radiactivos por cromatografía en papel con solvente E. Los resultados en la Figura 19,A indican que (^{14}C)-prolina se transformó en (^{14}C)-hidroxiprolina ($R_f = 0,3$) y, se identifica además un segundo pico tritiado que corre como el standard de glucosa aunque debe aclararse que el solvente usado no fue el adecuado para la separación de azúcares. La Figura 19,B muestra los productos radiactivos después de la reducción con NaB^3H_4 . La marca de tritio coincide con el standard de glucitol ($R_{\text{glc}} = 1,23$) y no se detectó ^{14}C .

De los resultados analizados en esta parte del Capítulo 4 es importante resaltar que la ligadura glicopeptídica es resistente a la degradación alcalina y a la hidrólisis ácida suave, liberándose oligosacáridos con distinto grado de glicosilación y unidos O-glicosídicamente a un aminoácido. Los resultados de la Figura 19 son concluyentes respecto a la identificación de la unión aminoacil-azúcar de GP. Ligaduras del tipo hidroxiprolina-arabinosa/galactosa se han demostrado en glicopéptidos de diferentes paredes vegetales¹⁰. La unión glucosil-hidroxiprolina se describe aquí por primera vez para Prototheca zopfii, aunque ésta ya fuera sugerida para glicoproteínas de pared celu

FIGURA 19. Identificación de ^{14}C -aminoácido y ^3H -azúcar en la ligadura péptido-carbohidrato.



(A): cromatografía en papel con solvente D de productos obtenidos por hidrólisis ácida suave de polímeros digeridos con celulasa. (B): cromatografía en papel con solvente E de los mismos productos señalados en A pero previamente reducidos con NaB^3H_4 . (●) indica ^3H y (○) ^{14}C .

lar en plantas superiores^{244,287}. Por otra parte, se sabe que entre los aminoácidos que se encuentran en baja proporción en algas se cuentan principalmente prolina e hidroxiprolina²⁸⁸⁻²⁹⁰. Estos aminoácidos fueron identificados en varias especies del grupo Chlorophyta^{285,291-293}. Este hecho indicaría que existe una correlación entre la distribución de hidroxiprolina glicosilada y su posición filogenética²⁹³.

Experimentalmente, se encontró que la resistencia de la unión hidroxiprolina-glucosa a ser clivada por ácidos fue comparable con la de hidroxiprolina-galactosa²⁹³ y la de hidroxilisina-galactosa²⁴³. Los tratamientos ácidos tuvieron un efecto de "peeling" sobre el oligosacárido, eliminando azúcares desde el extremo no reductor²⁹⁴.

El tipo de ligadura glicopeptídica en el precursor de AI2 contrasta con las ligaduras descritas para otros precursores de homopolisacáridos. Por ejemplo, el glucógeno está covalentemente ligado a una proteína vía tirosina^{295,296}, en paramilón de Euglena gracilis se sugiere una unión pirofosfato¹⁹³ y el intermediario de almidón en papa presenta una unión O-glicosídica entre serina/treonina y glucosa²⁹⁷. Estas ligaduras comparten la propiedad de ser lábiles a tratamientos alcalinos y/o ácidos. Por el contrario, la unión hidroxiprolina-glucosa de GP es estable en álcali y/o ácidos diluïdos como ocurre con uniones del tipo O-glicosídicas presentes en colágeno²⁹⁸ y en glicoproteínas de la pared celular de Chlamydomonas²⁹⁹ y Acer pseudoplatanus^{244,300}.

4. Identificación del ^3H -oligosacárido de GP.

4.1. Grado de polimerización.

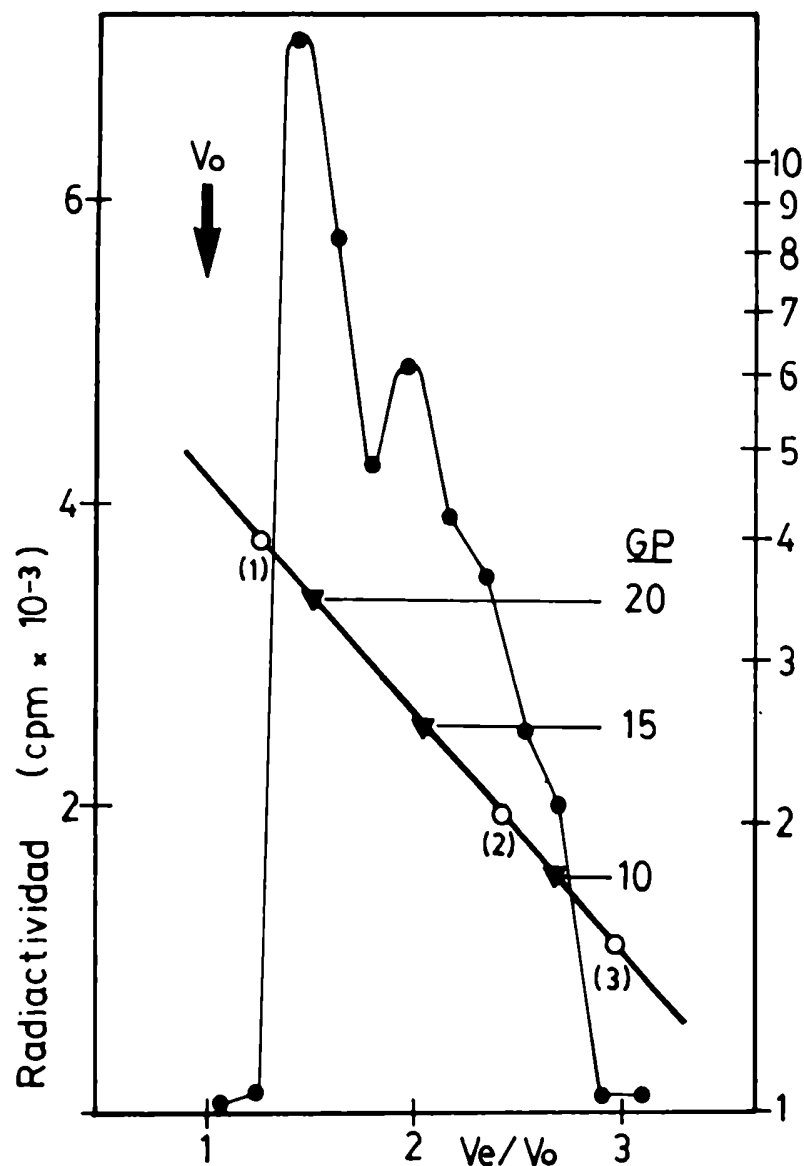
Para estimar Mr del oligosacárido liberado por el tratamiento con $\text{Ba}(\text{OH})_2$, el aminoacil- ^3H -oligosacárido fue cromatografiado en columnas de Biogel P-6 calibrada. La radiactividad eluyó de la columna como un pico ancho con un Mr de 3,5 a 1,5 kDa (figura 20). Los oligosacáridos más largos y más abundantes tuvieron un grado de polimerización de 20 hexosas y el más corto con un promedio de 10 hexosas. El contenido de azúcares totales, determinado por fenol-sulfúrico y glucosa como standard, fue del 95%. Considerando los Mr calculados por filtración en gel, Sephadex G-75 (Figura 15) y Biogel P-6 (Figura 20), se estimó que el oligosacárido representa un 10% de la masa molecular de GP. Consecuentemente, GP contendría una cadena oligosacárida por molécula.

4.2. Posición y configuración anomérica de las ligaduras glicosídicas.

GP fue sometida a la acción de diferentes enzimas hidrolíticas (sección 6 de Material y Métodos). Los resultados en la Tabla XXI muestran que un 74% y un 53% de la radiactividad es hidrolizada por celulasa y B-glucosidasa respectivamente. Por otro lado, la digestión proteolítica hidrolizó un 90% de GP.

Los azúcares liberados por celulasa e hidrólisis ácida

FIGURA 20. Tamaño de los ^3H -oligosacáridos obtenidos por degradación con $\text{Ba}(\text{OH})_2$.



^3H -GP fue tratada con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,2 M y cromatografiada sobre Biogel P-6 como se describió en las secciones 7.1.1 y 7.2.1.2 de Material y Métodos. Los símbolos indican: (●) radiactividad, (o) Mr, (▼) grado de polimerización tomando como unidad la glucosa y polímeros marcadores: (1) PEG-4000, (2) PEG-1500 y (3) (^3H)-sacarosa.

TABLA XXI. Hidrólisis enzimática de GP.

Tratamiento enzimático	³ H-GP		Hidrólisis (%)
	Hidrolizada	Resistente	
	(cpm)		
Control	4510	ND	0
B-amilasa	3450	1060	23,5
α-amilasa	3588	914	20,3
B-glucosidasa	2128	2400	53,0
α-glucosidasa	4145	390	8,6
Celulasa	1180	3360	74,0
Pronasa	450	4055	90,0

Muestras de ³H-GP (4500 cpm = 100%) fueron tratadas con pronasa y glicosidasas purificadas. Al final de las incubaciones con glicosidasas las muestras fueron cromatografiadas en columnas de Sephadex G-25 y la radiactividad en el Vo se consideró como material no hidrolizado. Para el tratamiento con pronasa, la radiactividad remanente en el sobrenadante de TCA 10% se consideró como producto de hidrólisis.

se identificaron por cromatografía en papel. La Tabla XXII, A y B muestra que (³H)-glucosa y (³H)-celobiosa fueron los principales productos. Los aminoácil-³H-oligosacáridos liberados por degradación con Ba(OH)₂ saturado fueron permetilados, hidrolizados con ácido y los monosacáridos metilados cromatografiados en capa delgada. La Tabla XXII,C muestra la distri

TABLA XXII. Análisis de aminoacil-oligosacáridos por diferentes métodos.

Tratamientos	Método de separación (solvente)	³ H-productos identificados	(%)
A- Hidrólisis ácida			
H ₂ SO ₄ 35%, 8h a 100°C	CP(B)	glucosa	(82)
		polímeros en origen	(18)
HCl 2,5 N, 3 h a 100°C	EP(C)	glucosa	(75)
		celobiosa	(15)
		polímeros en origen	(10)
B- Hidrólisis enzimática c/celulasa, 4 d a 35°C			
	CP(F)	glucosa	(60)
		celobiosa	(12)
		polímeros en origen	(22)
C- Permetilación e hidrólisis ácida			
	CCD(H)	2,3,4,6-tetra-Me-Glc	(9,5)
		2,3,6-tri-Me-Glc	(81)
		2,4,6-tri-Me-Glc	(9,5)

Aminoacil-³H-oligosacáridos se obtuvieron por degradación con Ba(OH)₂ de GP y cromatografía en Biogel P-6. Detalles de las hidrólisis y separación de productos se describen en la sección 7 de Material y Métodos.

bución de ^3H en los productos: 2,3,4,6-tetra-Me-Glc, 2,3,6-tri-Me-Glc y 2,4,6-tri-Me-Glc. La presencia de glucosa en GP con ligaduras B(1,4) y B(1,3) en proporción 9:1 concuerdan con el patrón identificador de A11 (Tabla III) y A12 (Tabla X).

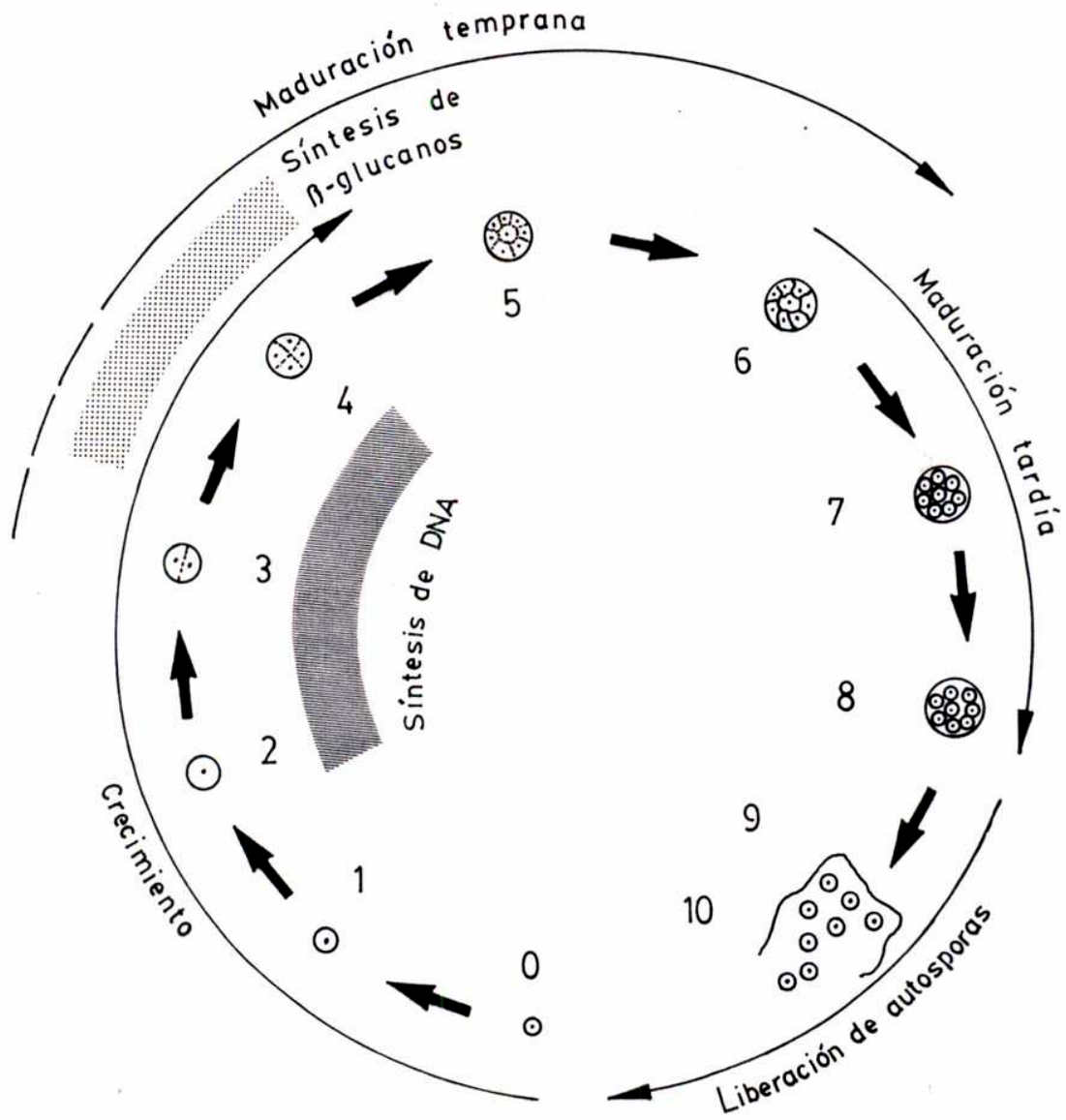
IV. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

En esta tesis se demuestra la formación de un compuesto de naturaleza glucoproteica con funcionesceptoras para la iniciación y subsiguiente alargamiento de B-glucanos en Prototheca zopfii. Se comenzó sincronizando el alga con EDTA 1,5-2 mM, un inhibidor reversible del crecimiento, seguido por diluciones periódicas del medio basal. La sincronización del cultivo se demostró por determinación del número de células y el contenido de DNA. El ciclo celular tiene una duración de 10-12 h y se producen un promedio de 8 autosporas por generación. Se determinó la incorporación de (^{14}C)-glucosa a un polisacárido insoluble en álcali caliente (AI1) identificado como un B-(1,4)B-(1,3)-glucano principalmente entre la 3ra y 4ta hora del ciclo. Cuando se estudiaron in vitro las actividades de diferentes enzimas vinculadas a la formación de polisacáridos de pared celular, se verificó que la síntesis de glicolípidos, glicoproteínas y polisacáridos insolubles en álcali fue máxima en el período señalado. En la Figura 21 se esquematiza el ciclo biológico de Prototheca zopfii.

Membranas obtenidas de cultivos en la 3ra h del ciclo catalizaron la síntesis de polisacáridos a partir de UDP-(^3H)-glucosa y GDP-(^{14}C)-glucosa como dadores de glucosilos. Se midieron para ámbos sustratos parámetros cinéticos y requerimiento de metales divalentes de las glucosil transferasas. También se estudió el efecto de dilución isotópica que producen

FIGURA 21. Ciclo biológico de Prototheca zopfii.



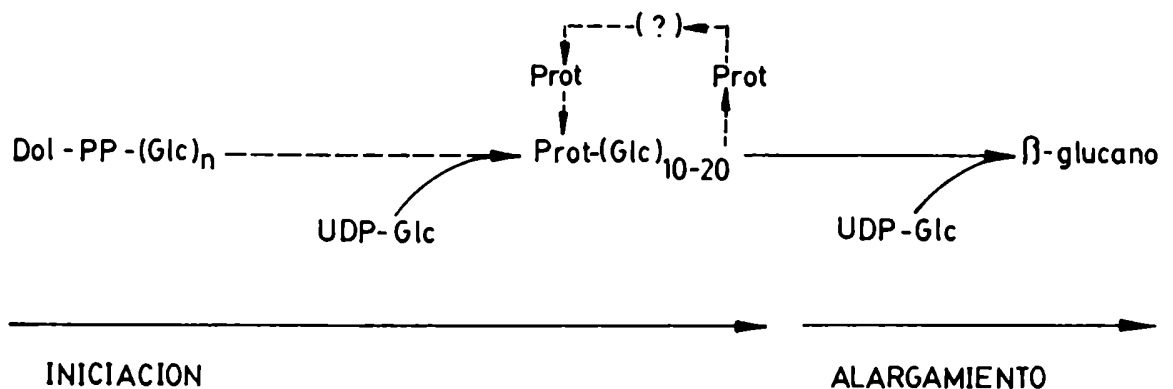
los nucleótidos azúcares entre sí. Se concluyó que hay dos vías metabólicas que sintetizan un B(1,4)B(1,3)-glucanos (AI2) a partir de UDP-glucosa y un B(1,4)-glucano (AI3) a partir de GDP-glucosa. Estos sistemas no se interfirieron entre sí pero no se descartó que tengan etapas comunes. La formación del B-glucano mixto se incrementó por el agregado de ATP 500 μ M o PEG-4000 15% a la mezcla de incubación, pero con estas adiciones no se logró restablecer las velocidades de síntesis del polímero obtenidas in vivo.

En condiciones standards de incubación, membranas de Prototheca incorporaron glucosa de UDP-(3 H)-glucosa en una fracción insoluble en TCA 10% (TCA1) y en AI2. Cinéticas de incorporación en el tiempo y experimentos de "pulso y chase" indicaron que TCA1 es precursor de AI2. El aislamiento de fracciones membranosas o solubles tritiadas mostró que sólo la fracción membranosa fue capaz de transferir radiactividad a AI2. Membranas glucosiladas radiactivas tratadas con tripsina o celulasa fueron afectadas parcialmente en su capacidad de transferir glucosilos, indicando que el precursor está internalizado en vesículas.

A partir de TCA1 doblemente marcada con (14 C)-prolina y (3 H)-glucosa, se aisló y caracterizó una glucoproteína (GP). Esta tiene un Mr de 29 kDa y un contenido de carbohidratos del 10%. La cadena oligosacáridica está unida a la porción peptídica por una ligadura O-glicosídica entre hidroxiprolina y glucosa. El oligosacárido tiene un grado de polimerización entre

10 y 20 hexosas. El único monosacárido encontrado en la porción glicosídica de GP es glucosa, que está unida por enlaces B(1,4) y B(1,3) en las proporciones indicadas para AI2 y AI1. En la Figura 22 se muestra un modelo en el que se resumen las reacciones encontradas y que se propone como vía metabólica que lleva a la síntesis de B-glucanos en Prototheca.

FIGURA 22. Modelo propuesto para la síntesis de B-glucanos en Prototheca zopfii.



Las líneas cortadas indican las reacciones que probablemente ocurren pero que no fueron demostradas experimentalmente.

LILIANA A. P.

R. PONT LEZICA

V. CITAS BIBLIOGRAFICAS

V. CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. Delmer, D.P. (1977) Rec. Adv. in Phytochem. Vol II (Loewus, F.A. & Runeckles, V.C. eds.) pp45-77, Plenum, New York.
2. Gardner, K.H. & Blackwell, J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 343, 232.
3. Gardner, K.H. & Blackwell, J. (1974) Biopolymers 13, 1975.
4. Brown, R.M., Willison, J.H.M. & Richardson, C.L. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4565.
5. Mühlethaler, K. (1967) Annu. Rev. Plant Physiol. 18, 1.
6. Robinson, D.G. & Preston, R.D. (1972) Biochim. Biophys. Acta 273, 336.
7. Katö, K. (1981) in Encyclopedia of Plant Physiol. Vol. 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp29-42, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
8. Lamport, D.T.A. & Catt, J.W. (1981) in Encyclopedia of Plant Physiol. Vol. 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp133-165, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
9. Mc Neil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. & Albersheim, P. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53, 625.
10. Lamport, D.T.A. (1980) The Biochemistry of Plants Vol. III (Preiss, J. ed.) pp505-541, Academic Press Inc.

11. Chrispeels, M.J. (1976) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27, 19.
12. Preston, R.D. (1974) *The Physical Biology of Plant Cell Wall*, Chapman & Hall, London.
13. Percival, E. & Mc Dowell, R.H. (1967) *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press, London, New York.
14. Aronson, J.M. (1972) in *The Fungi Vol. I* (Ainsworth, G.C. & Sussman, A.S. eds.) pp49-67, Academic Press, New York.
15. Sturgeon, R.S. (1974) in *Plant Carbohydrate Biochemistry* (Fridam, J.B. ed.) pp219-233, London Academic.
16. Farcas, V. (1979) *Microbiological Reviews* 49, 117.
17. Cabib, E., Roberts, R. & Bowers, B. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 763.
18. Wessels, J.G.H. & Sietsma, J.H. (1981) in *Encyclopedia of Plant Physiology 13B* (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp 352-384, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
19. Burke, D., Kaufman, F., Mc Neil, M. & Albersheim, P. (1973) *Plant Physiol.* 54, 109.
20. Wilder, B.M. & Albersheim, P. (1973) *Plant Physiol.* 51, 889.
21. Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D. & Albersheim, P. (1973) *Plant Physiol.* 51, 188.
22. Shafizadeh, F. & Mc Ginnis, G.D. (1971) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 26, 297.

23. Stephen, A.M. (1981) in *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 8 (Bell, E.A. & Charlwood, B.V. eds.) pp555-584, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
24. Willison, J.H.M. & Klein, A.S. (1982) in *Cellulose and other polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp61-68, Plenum Press, New York, London.
25. Frei, E. & Preston, R.D. (1961) *Nature* 192, 939.
26. Loos, E. & Meindl, D. (1982) *Planta* 156, 270.
27. Takeda, H. & Hirokawa, T. (1978) *Plant Cell Physiol.* 19, 591.
28. Marx Figini, M. & Matus, M. (1976) *Anales Asoc. Quim. Argentina* 64, 225.
29. Mackie, W. & Sellen, D.B. (1969) *Polymer* 10, 621.
30. Herth, W. & Schnepf, E. (1982) in *Cellulose and other polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp185-206, Plenum Press, New York, London.
31. Sietsma, J.H., Child, J.J., Nesbitt, L.R. & Haskins, R.H. (1975) *J. Gen. Microb.* 86, 29.
32. Ruiz Herrera, J. (1981) *Ciencia* 32, 89.
33. Colvin, J.R., Sowden, L.C. & Leppard, G.G. (1977) *Can. J. Microbiol.* 23, 790.
34. Hestrin, S. & Schramm, M. (1954) *Biochem. J.* 58, 345.
35. Hestrin, S. (1962) in *The Bacteria* vol. III (Gunsalus, I.C. & Stanier, R.Y. eds.) pp373-388, Academic Press, New York.

36. Wardrop, A.B. (1970) *Protoplasma* 70, 73.
37. Klein, A.S., Montezinos, D. & Delmer, D.P. (1981) *Planta* 152, 105.
38. Carpita, N.C. & Delmer, D.P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 308.
39. Swissa, M., Aloni, Y., Weinhouse, H. & Benziman, M. (1980) *J. Bacteriol.* 143, 1142.
40. Bowles, D.J. & Northcote, D.H. (1972) *Biochem. J.* 130, 1133.
41. Pillonel, C., Buchala, A.J. & Meier, H. (1980) *Planta* 149, 306.
42. Franz, G. & Heiniger, U. (1981) in *Encyclopedia of Plant Physiology* 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp47-67, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
43. Girard, V., Capellano, A. & Fevre, M. (1984) *J. Gen. Microbiol.* 130, 2367.
44. Takeuchi, Y. & Komamine, A. (1981) *Plant Cell Physiol.* 22, 1585.
45. Blaschek, W., Haas, D., Koenler, H. & Franz, G. (1981) in *Cell Walls '81* (Robinson, D.G. & Quader, H. eds.) pp109-127, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
46. Prat, R. & Roland, J.C. (1971) *Compt. Rend. Acad. Sci. Ser. D.* 273, 165.
47. Boffey, S. & Northcote, D.H. (1975) *Biochem. J.* 150, 433.
48. Wilkinson, M. & Northcote, D.H. (1980) *J. Cell Sci.* 42, 401.

49. Shore, G., Raymond, Y. & MacLachlan, G.A. (1975) *Plant Physiology* 56, 34.
50. Raymond, Y., Fincher, G.B. & MacLachlan, G.A. (1978) *Plant Physiol.* 61, 938.
51. Anderson, R.L. & Ray, P.M. (1978) *Plant Physiol.* 61, 723.
52. Glaser, L. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 627.
53. Van der Woude, W.J., Lembi, C.A., Morre, D.J., Kindinger, J.I. & Ordin, L. (1974) 54, 333.
54. Callaghan, T. & Benziman, M. (1984) *Nature* 311, 165.
55. Liu, T.J. & Hassid, W.Z. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1922.
56. Henry, R.J. & Stone, B.A. (1982) *Biochem. J.* 203, 629.
57. Brett, C.T. (1981) *Tech. Carbohydr. Metab.* B307, pp1-11, North Holland Scientific Publishers Ltd.
58. Blackwell, J. (1982) in *Cellulose and other natural polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp403-428, Plenum Press, New York, London.
59. Chanzy, H., Chumpitazi, B. & Peguy, A. (1982) *Carbohydr. Polymers* 2, 35.
60. Brett, C.T. (1981) *J. Exper. Bot.* 32, 1067.
61. Romanovicz, P.K. & Brown, R.M. (1976) *Appl. Polym. Symp.* 28, 587.
62. Mueller, S.C. & Brown, R.M. (1982) *Planta* 154, 501.

63. Hughes, R. & Stret, H.E. (1974) *Ann. Bot.* 38, 555.
64. Dennis, D.T. & Preston, R.D. (1961) *Nature* 191, 667.
65. Nortncote, D.H. (1969) *Essays Biochem.* 5, 86.
66. Roberts, K. (1984) *Nature* 311, 105.
67. Robinson, D.G. & Quader, H. (1982) *J. Theor. Biol.* 92, 483.
68. Delmer, D.P. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 105.
69. Blaschek, W., Hass, D., Koehler, H., Semler, U. & Franz, G. (1983) *Pflanzenphysiol. Bd.* 111, 357.
70. Aloni, Y. & Benziman, M. (1982) in *Cellulose and other polymers systems* (Brown, R.M. ed.) pp341-359, Plenum Press, New York, London.
71. Ray, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 431.
72. Delmer, D.P., Heiniger, U. & Kulow, C. (1977) *Plant Physiol.* 59, 713.
73. Darvill, A., Mc Neil, M., Albersheim, P. & Delmer, D.P. (1980) in *The Biochemistry of Plants Vol. I* (Tolbert, N.E. ed.) pp91-162, Academic Press, New York.
74. Presto, R.D. (1979) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30, 55.
75. Meier, H., Buchs, L., Buchala, A.J. & Homewood, T. (1981) *Nature* 289, 821.
76. Cooper, K.M. (1982) in *Cellulose and other polymer systems*

- (Brown, R.M. ed.) pp167-184, Plenum Press, New York, London.
77. Haigler, C.H. & Benziman, M. (1982) in Cellulose and other polymer systems (Brown, R.M. ed.) pp273-297, Plenum Press, New York, London.
 78. Quader, H. (1984) Plant Physiol. 75, 534.
 79. Benziman, M., Brown, C.H., Haigler, C.H., White, A.R. & Cooper, K.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6678.
 80. Wood, P.J., Fulcner, R.G. & Stone, B.A. (1983) J. Cereal Sci. 1, 95.
 81. Herth, W. (1980) J. Cell Biol. 87, 442.
 82. Mueller, S.C. & Brown, M.R. (1982) Planta 154, 489.
 83. Robinson, D.G. (1981) in Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp317-329, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 84. Mueller, S.C. & Brown, R.M. (1982) Planta 154, 501.
 85. Max Figini, M. (1982) in Cellulose and other polymer systems (Brown, R.M. ed.) pp243-271, Plenum Press, New York, London.
 86. Ruiz Herrera, J. (1982) in Cellulose and other polymer systems (Brown, R.M. ed.) pp207-223, Plenum Press, New York, London.
 87. Montgomery, G.W.G., Adams, D.J. & Gorday, G.W. (1984) J. of Gen. Microbiol. 130, 291.

88. Heath, I.B. (1974) *J. Theor. Biol.* 48, 445.
89. Hepler, P.K. & Palevitz, B.A. (1974) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25, 309.
90. Robinson, D.C. & Quader, H. (1982) in *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development* (Lloyd, C. ed.) pp109-126, Academic Press, London.
91. Doohan, M.E. & Palevitz, B.A. (1980) *Planta* 149, 389.
92. Seagull, R.W. & Heath, I.B. (1980) *Protoplasma* 103, 205.
93. Romanovicz, D.K. (1982) in *Cellulose and other polymer systems* (Loewus, F. ed.) pp127-147, Academic Press, New York, London.
94. Brown, R.M., Herth, W., Franke, W.W. & Romanovicz, D.K. (1973) in *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides* (Loewus, F. ed.) pp207-257, Academic Press, New York, London.
95. Brown, R.M., Franke, W.W., Kleining, H. & Sitte, P. (1973) *Science* 166, 894.
96. Zaar, K. (1977) *Cytobiologie* 16, 1.
97. Lloyd, C. (1980) *Nature* 284, 596.
98. Brown, R.M. & Montezinos, D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 194, 143.
99. Herth, W. (1983) *Planta* 159, 347.

100. Willison, J.H.M. & Brown, R.M. (1978) *J. Cell Biol.* 77, 103.
101. Kiermayer, O. & Sleytr, U.B. (1979) *Protoplasma* 101, 133.
102. Hearth, I.B. (1974) *J. Theor. Biol.* 48, 4545.
103. Sietsma, J.H. & Wessels, J.G.H. (1981) *J. Gen. Microbiology* 125, 209.
104. Mueller, S.C. & Brown, R.M. (1980) *J. Cell Biol.* 84, 315.
105. Willison, J.H.M. & Grout, B.W.W. (1978) *Planta* 140, 57.
106. Hopp, H.E., Romero, P.A., Daleo, G.R. & Pont Lezica, R. (1979) in *Adv. Biochem. and Physiol. of Plant Lipids* (Appelquist, L.A. & Lilgenberg, C. eds.) pp313-318, Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam.
107. Wright, K. & Northcote, D.H. (1976) *Protoplasma* 88, 225.
108. Giddings, T.H., Brower, D.L. & Staenelin, L.A. (1980) *J. Cell Biol.* 84, 327.
109. Leppard, G.G. & Colvin, J.R. (1978) *J. Microsc.* 113, 181.
110. Colvin, J.R. (1981) in *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp9-24, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
111. Colvin, J.R. (1980) *Planta* 149, 97.
112. Quader, H., Wagenbreth, I. & Robinson, D.G. (1978) *Cytobiol.* 18, 39.

113. Quader, H. (1981) in Cell Walls '81 (Robinson, D.G. & Quader, H. eds.) pp198-205, Stuttgart, WissVerlagsgesellschaft.
114. Shematek, E.M., Braatz, J.A. & Cabib, E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 888.
115. Shematek, E.M. & Cabib, E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 895.
116. Fevre, M. (1983) Planta 159, 130.
117. Cooper, D. & Manley, R.S.J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 381, 78.
118. Datema, R., Schwarz, R.T., Rivas, L.A. & Pont Lezica, R. (1983) Plant Physiol. 71, 76.
119. Cerenius, L. & Söderhäll, K. (1984) Plant Physiol. 60, 247.
120. Notario, V., Kawai, H. & Cabib, E. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1902.
121. Aloni, Y., Delmer, D.P. & Benziman, M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6448.
122. Henry, R.J. & Stone, B.A. (1982) Plant Physiol. 69, 632.
123. Chao, H. & MacLachlan, G. (1978) Plant Physiol. 61, 943.
124. Orlean, P.A.B. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 397.
125. Hopp, H.E., Romero, F.A. & Pont Lezica, R. (1978) FEBS Lett. 86, 259.
126. Montezinos, D. & Delmer, D.P. (1980) Planta 148, 303.

127. Fevre, M. & Rougier, M. (1981) in Cell Walls '81 (Robinson, D.G. & Quader, H. eds.) pp143-152, Wiss Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
 128. Kauss, H. & Jeblick, W. (1985) FEBS Lett. 185, 226.
 129. Peaud-Lenoël, C. & Axelos, M. (1970) FEBS Lett. 8, 224.
 130. Smith, M.M. & Stone, B.A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 313, 72.
 131. Ray, P.M. (1985) Plant Physiol. 78, 466.
 132. Ray, P.M. (1973) Plant Physiol. 51, 609.
 133. Ray, P.M. (1977) Plant Physiol. 59, 594.
 134. Shore, G. & Maclachlan, G.A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 329, 271.
 135. Beasley, C.A. & Ting, I.P. (1974) American J. Bot. 61, 188.
 136. Meyer, Y. & Herth, W. (1982) in Cellulose and other natural polymer systems (Brown, R.M. ed.) pp149-165, Plenum Press, New York, London.
 137. Dalessandro, G. & Mastropasqua, L. (1982) Z. Pflanzenphysiol. 107, 467.
 138. Ryan, C.A., Bishop, P. & Pearce, G. (1981) Plant Physiol 68, 616.
 139. Haass, D., Blaschek, W., Koehler, N. & Franz, G. (1981) in Cell Walls '81 (Robinson, D.G. & Quader, H. eds.) pp119-127, Wiss Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
-

140. Kreibich, G., Debey, P. & Sabatini, D.D. (1973) *J. Cell Biol.* 58, 436.
141. Racker, E. (1979) *Methods in Enzymol.* 55, 699.
142. Carpita, N.C. (1982) in *Cellulose and other polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp225-242, Plenum Press, New York, London.
143. Mueller, S.C. & MacLachlan, G.A. (1980) *Plant Physiol suppl.* 65, 106.
144. Stroobant, P., Dame, J.B. & Scarborough, G.A. (1980) *Fed. Proc.* 39, 2437.
145. Kauss, H., Köhle, H. & Jeblick, W. (1983) *FEBS Lett.* 158, 84.
146. Gerritson, W.J., de Kruijff, B., Verkleij, A.J., de Gier, J. & van Deenen, L.L.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 598, 554.
147. Helsper, J.P.F.G., Veerkamp, J.H. & Sassen, M.M.A. (1977) *Planta* 133, 303.
148. Pierce, M.J. & Raschke, R. (1980) *Planta* 148, 174.
149. Zimmerman, U. (1978) *Plant Physiol.* 29, 121.
150. Carpita, N.C. & Delmer, D.P. (1980) *Plant Physiol.* 66, 911.
151. Ephritikhine, G., Lamant, A. & Heller, R. (1980) *Plant Sci. Letters* 19, 55.
152. Klingenberg, M. (1981) *Nature* 290, 449.
153. Kimelberg, H.K. (1977) *Cell Surface Reviews* 3, 205.

154. Quader, H. & Robinson, D.G. (1979) *Eur. J. Cell Biol.* 20, 51.
155. Lüttge, U. & Higinbotham, N. (1979) *Transport in Plants*, New York, Spring Verlag.
156. Delmer, D.P., Benziman, M. & Padam, E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5282.
157. Fèvre, M. (1979) *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 95, 129.
158. Tsai, C.M. & Hassid, W.Z. (1971) *Plant Physiol.* 47, 740.
159. San Blas, G. & San Blas, F. (1982) *J. of Bacteriol.* 152, 563.
160. Gregoriadis, G. (1985) *Trends in Biotechnology* 3, 235.
161. van Rooijen, N. & van Nieuwmegen, R. (1983) *Methods in Enzymol.* 93, 83.
162. Maclachlan, G.A. (1977) in *Plant Growth Regulation* (Pilet, P.E. ed.) pp13-20, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
163. Colombo, R., Bonetti, A., Cerana, R. & Lado, P. (1981) *Plant Sci. Lett.* 21, 305.
164. Datko, A.H. & Maclachlan, G.A. (1970) *Can. J. Bot.* 48, 1165.
165. Rollit, J. & Maclachlan, G.A. (1974) 13, 367.
166. Verma, D.P.S., Kumar, V. & Maclachlan, G.A. (1982) in *Cellulose and other natural polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp459-488, Plenum Press, New York, London.
167. Robyt, J.F. (1979) *Trends Biochem. Sci.* 4, 47.

168. Helting, T. & Roden, L. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2799.
169. Ryman, B.E. & Whelan, W.J. (1971) *Adv. Enzymol.* 34, 285.
170. Cooper, D. & Manley, R.S.J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 381, 109.
171. Potter, J.L. & Weiman, R.A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 428, 240.
172. Kemp, J. & Loughman, B.C. (1974) *Biochem. J.* 142, 153.
173. Lüderitz, C., Westphal, O., Staub, A.M. & Nikaido, H. (1971) in *Microbial Toxins* (Weinbaun, G., Kadis, S. & Ajl, S.J. eds.) Vol. IV, pp145-233, Academic Press, New York, London.
174. Osborn, M.J. (1969) *Annu. Rev. Biochem.* 38, 501.
175. García, R.C., Recondo, E. & Dankert, M.A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 45, 93.
176. Khan, A.W. & Colvin, J.R. (1961) *Science* 133, 2014.
177. Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 559, 1.
178. Elbein, A.D. (1981) in *Encyclopedia of Plant Physiology* 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp166-193, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
179. Brett, C.T. & Northcote, D.H. (1975) *Biochem. J.* 148, 107.
180. Helsper, J.F.F.G. (1979) *Planta* 144, 443.
181. Hopp, H.E., Romero, P.A., Daleo, G.R. & Font Lezica, R. (1978)

- Eur. J. Biochem. 84, 561.
182. Green, J.R. & Northcote, D.H. (1979) Biochem. J. 178, 661.
183. Babizinski, P., Haselbeck, A. & Tanner, W. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 509.
184. Schutzbach, S., Springfield, J.D. & Jensen, J.W. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4170.
185. James, D.W. & Elbein, A.D. (1980) Plant Physiol. 65, 460.
186. Schwarz, R.J. & Datema, R. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 65.
187. Chapman, A., Fujimoto, K. & Kornfeld, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4441.
188. Smith, W.K., Nakajima, T. & Ballou, C.E. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3426.
189. Ballou, C.E. (1980) in Fungal Polysaccharides (Sandford, P.A. & Matsuda, K. eds.) ACS Symposium Series N^o 126.
190. Whelan, W.J. (1976) Trends Biochem. Sci. 1, 13.
191. Rothman, J.E. & Lodish, H.F. (1977) Nature 269, 775.
192. Sentandreu, R., Larriba, G. & Elorza, M.V. (1981) in: Encyclopedia of Plant Physiol. 13B (Loewus, F.A. & Tanner, W. eds.) pp487-512, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
193. Deri Tomos, A. & Northcote, D.H. (1978) Biochem. J. 174, 283.
194. Robyt, J.F. & Martin, P.J. (1983) Carbohydr. Res. 113, 301.

195. Robyt, J.F., Klimbe, B.K. & Walseth, T.F. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165, 643.
196. Gahan, L.C. & Conrad, H.E. (1968) Biochemistry 7, 3979.
197. Barengo, R., Flawiá, M. & Krisman, C.R. (1975) FEBS Lett. 53, 275.
198. Barengo, R. & Krisman, C.R. (1978) Biochim. Biophys. Acta 540, 190.
199. Kawaguchi, K., Fox, J., Holmes, E., Boyer, C. & Preiss, J. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 190, 385.
200. Gunja-Smith, Z., Patil, N.B. & Smith, E.E. (1977) J. Bacteriol. 130, 818.
201. Takahara, H. & Matsuda, K. (1977) J. Biochem. 81, 1587.
202. Fontana, J.D. & Krisman, C.R. (1978) Biochim. Biophys. Acta 540, 183.
203. Hunt, S. (1970) Glycogen in Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates, pp171-175, Academic Press, New York.
204. Krisman, C.R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1206.
205. Krisman, C.R. & Barengo, R. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 117.
206. Butler, N.A., Lee, E.Y.C. & Whelan, W.J. (1977) Carbohydr. Res. 55, 73.
207. Krisman, C.R. (1973) Annu. N. Y. Acad. Sci. 210, 81.
208. Berthillier, G., Azzar, C. & Got, R. (1975) European J.

- Biochem. 51, 275.
209. Chee, N.P. & Geddes, R. (1977) FEBS Lett. 73, 164.
210. Aon, M.A. & Curtino, J.A. (1984) Eur. J. Biochem. 140, 557.
211. Blumenfeld, M.L., Whelan, W.J. & Krisman, C.R. (1983) Eur. J. Biochem. 135, 175.
212. Tandecarz, J.S. & Cardini, C.E. (1978) Biochim. Biophys. Acta 543, 423.
213. Lavintman, N. & Cardini, C.E. (1972) in Biochemistry of the Glycosidic Linkage (Piras, R. & Pontis, H.G. eds.) pp503-507, Academic Press, New York.
214. Tandecarz, J.S. & Cardini, C.E. (1979) Plant Sci. Lett. 15, 151.
215. Tandecarz, J.S., Sivak, M.N. & Cardini, C.E. (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 82, 157.
216. Lavintman, N., Tandecarz, J.S., Carceller, M., Mendiara, S. & Cardini, C.E. (1974) Eur. J. Biochem. 50, 145.
217. Tandecarz, J.S., Lavintman, N. & Cardini, C.E. (1975) Biochim. Biophys. Acta 399, 345.
218. Tandecarz, J.S., Szalai, E.N. & Cardini, C.E. (1982) Anales Asoc. Quím. Argent. 70, 395.
219. Pisigan, R.A. & Rosario, E.J. (1976) Phytochem. 15, 71.
220. Lehle, L. (1981) in Encyclopedia of Plant Physiol., Vol. 13B (Loewus, R.A. & Tanner, W. eds.) pp459-483, Springer-Verlag,

Berlin, Heidelberg, New York.

221. Blakwell, J. & Wein, M.A. (1980) *J. Mol. Biol.* 137, 49.
222. Lipke, H. & Geoghegan, T. (1971) *Biochem. J.* 125, 703.
223. Rudall, K.M. (1963) *Adv. Insect Physiol.* 1, 257.
224. Neville, A.C. (1975) in *Biology of the Arthropod Cuticle* Vol. 415 (Farner, D.S. ed.), Springer-Verlag, Berlin.
225. Kjosbakken, J. & Colvin, R.J. (1975) *Canadian J. Microb.* 21, 111.
226. Herten, W., Franke, W.W., Stadler, J., Bittiger, H., Keilich, G. & Brown, R. (1972) *Planta* 105, 79.
227. Balint, S., Farkas, V. & Bauer, S. (1976) *FEBS Lett.* 64, 44.
228. Korn, E.D. & Northcote, D.H. (1960) *Biochem. J.* 75, 12.
229. Kolarová, N., Masler, L. & Sikl, D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 328, 221.
230. Franz, G. (1976) *Applied Polymer Symposium* 28, 611.
231. Updegraff, D.M. (1969) *Analytical Biochem.* 32, 420.
232. Northcote, D.H. (1958) *Biol. Rev.* 33, 53.
233. Mans, R.J. & Novelli, G.D. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 48.
234. Hurst, P.L., Nielsen, J., Sullivan, P.A. & Shepherd, M.G. (1977) *Biochem. J.* 165, 33.

235. Umezurike, G.M. (1979) *Biochem. J.* 177, 9.
236. Siegel, S., Brady, A.M. & Awad, W.M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4155.
237. Dawson, R.M., Elliot, D.C., Elliot, W.H. & Jones, K.M. (1969) *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press, Oxford, U.K.
238. Takasaki, S., Mizuochi, T. & Kobata, A. (1982) *Meth. Enzymol.* 83, 263.
239. Goldstein, I.S., Hay, G.W., Lewis, D.A. & Smith, F. (1965) *Methods in Carbohydr. Chem.* 5, 361.
240. Hakomori, S. (1964) *J. Biochem.* 55, 205.
241. Sanford, P.A. & Conrad, H.E. (1966) *Biochemistry* 5, 1508.
242. Owens, R.J. & Northcote, D.H. (1981) *Biochem. J.* 195, 661.
243. Arima, T. & Spiro, R.G. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1836.
244. Pope, D.G. (1977) *Plant Physiol.* 59, 894.
245. Hopp, E.H. (1977) *Tesis Doctoral*, Universidad de Bs. As.
246. Hough, L. & Jones, K.J.N. (1962) *Meth. Carb. Chem.* 1, 21.
247. Brett, C.T. (1978) *Plant Physiol.* 62, 377.
248. Olson, A.C. (1964) *Plant Physiol.* 31, 543.
249. Markham, R. & Smith, J.D. (1952) *Biochem. J.* 52, 552.

250. Bourne, E.J., Hutson, D.H. & Weigel, H. (1961) *J. Chem. Soc.* 35.
251. Trevelyan, W.E., Proctor, D.P. & Harrison, J.S. (1950) *Nature* 166, 444.
252. Williams, R.J. & Kirby, H. (1948) *Science* 107, 481.
253. Perham, R.N. (1978) *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry B* 110, 1-39, North-Holland. Scientific Publishers Ltd.
254. Chapman, A., Li, E. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10243.
255. Alperin, D.H., Carminatti, H., Idoyaga-Vargas, V.P. & Couso, R.O. (1983) *J. Chromatogr.* 242, 193.
256. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., Van der Hock, P. & Van Alphen, L. (1975) *FEBS Lett.* 58, 254.
257. Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F.H. (1971) *Biochemistry* 10, 2606.
258. Fleck, A. & Munro, H.N. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 55, 571.
259. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
260. Gordall, A.C., Bardawill, C.J. & David, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751.
261. Somogyi, M. (1952) *J. Biol. Chem.* 195, 19.
262. Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.* 153, 375.

- 263^a Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350.
- 264^a Kobayashi, Y. & Maudsley, D.V. (1969) *Meth. Bioch. Anal.* 17, 55.
- 263^b Tamiya, H. (1966) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17, 1.
- 264^b Lorenzen, H. (1970) in *Photobiology of microorganisms* (Halldal, P. ed.) pp187-212, Wiley Interscience, London.
265. Cameron, I.L. & Jeter, J.R. (1970) *J. Protozool.* 17, 429.
266. Sando, N. (1963) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9, 233.
267. Montezinos, D. & Brown, R.M. (1978) *Cytobios* 23, 119.
268. Iwamura, T. (1962) in *Physiology and Biochemistry of Algae* (Lewin, R.A. ed.) pp231-238, Academic Press, New York, London.
269. Takeda, H. & Hirokawa, T. (1982) *Plant Cell Physiol.* 23, 1033.
270. Takeda, H. & Hirokawa, T. (1979) *Plant Cell Physiol.* 20, 989.
271. Lloyd, D. & Turner, G. (1968) *J. Gen. Microbiol.* 50, 421.
272. Conte, M.V. & Scott Fore, R. (1973) *Arch. Mikrobiol.* 92, 227.
273. Amino, S., Yoshihisa, T. & Komamine, A. (1985) *Physiol. Plant.* 65, 67.
274. Verma, D.P.S., Kumar, V. & MacLachlan, G.A. (1982) in *Cellulose and other polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp459-488, Plenum Press, New York, London.
275. Fevre, M. & Rougier, M. (1981) *Planta* 151, 232.

276. Nevo, Z. & Sharon, N. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 173, 161.
 277. Hara, M., Umetsu, N., Miyamoto, C. & Tamari, K. (1973) *Plant Cell Physiol.* 14, 11.
 278. Lee, J.C. & Lee, L.L.Y. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 625.
 279. Haigler, C., Brown, R.M. & Benziman, M. (1980) *Science* 210, 903.
 280. Pillonel, Ch. & Meier, H. (1985) *Planta* 165, 76.
 281. Maclachlan, G.A. (1982) in *Cellulose and other polymer systems* (Brown, R.M. ed.) pp327-339, Plenum, New York, London.
 282. Halper, L.A. & Srere, P.A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 529.
 283. Sharon, N. & Lis, H. (1981) *Chemical & Engineering News* 59, 21.
 284. Vercellotti, J.R. & Just, E.K. (1967) *Carbohydr. Res.* 5, 102.
 285. Lang, W.C. (1982) *Plant Physiol.* 69, 678.
 286. Lamport, D.T.A. (1967) *Nature* 216, 1322.
 287. Mani, U.V., Akiyama, Y., Mohrlök, S. & Lamport, D.T.A. (1979) *Plant Physiol. Suppl.* 63, 31, Abstr. 167.
 288. Punnett, T. & Derrenbacker, E.C. (1966) *J. Gen. Microbiol.* 44, 105.
 289. Gotelli, I.B. & Cleland, R. (1968) *Amer. J. Bot.* 55, 907.
 290. Steward, F.C., Mott, R.L., Israel, H.W. & Ludford, P.M. (1970) *Nature* 225, 760.
-

291. Miller, D.H., Mellman, J.S., Lamport, D.T.A. & Miller, M. (1974) *J. Cell Biol.* 63, 420.
292. Iriki, Y. & Miwi, T. (1960) *Nature* 185, 178.
293. Lamport, D.T.A. & Miller, D.H. (1971) *Plant Physiol.* 48, 454.
294. Spiro, R.G. (1972) *Meth. Enzymol.* 28, 3.
295. Rodriguez, I.R. & Whelan, W.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 829.
296. Aon, M.A. & Curtino, J.A. (1985) *Biochem. J.* 229, 269.
297. Moreno, S., Cardini, C.E. & Tandecarz, J.S. (1986) *Eur. J. Biochem.* 157, 539.
298. Butler, W.F. & Cunningham, W.J. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3882.
299. Miller, D.H., Lamport, D.T.A. & Miller, M. (1972) *Science* 176, 918.
300. Clarke, A.E., Anderson, R.L. & Stone, B.A. (1979) *Phytochem.* 18, 521.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

VI. ABREVIATURAS

Para la mención, en forma abreviada, de los compuestos químicos más comunes se usan aquellas siglas recomendadas por IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature.

- AI1: polisacáridos insolubles en álcali caliente obtenidos in vivo.
- AI2: fracción insoluble en etanol 66% y en NaOH 0,2 M caliente obtenida a partir de UDP-glucosa.
- AI3: fracción insoluble en etanol 66% y en NaOH 0,2 M caliente obtenida a partir de GDP-glucosa.
- Ara-ol: arabinitol.
- CB: celobiosa.
- CCD: cromatografía en capa delgada.
- CP: cromatografía en papel.
- EP: electroforesis en papel.
- Gal-ol: galactitol.
- Glc-ol: glucitol.
- GP: glucoproteína eluída como pico III en columnas de Sephadex G-75.
- Man-ol: manitol.
- Me: metil.
- ME: 2-mercaptoetanol.
- NDP: nucleótido difosfato.
- PCA: ácido perclórico.
- PEG: polietilen glicol
- SAB: seroalbúmina bovina.
- TCA: ácido tricloroacético
- TCAI: fracción insoluble en TCA 10%.
- TFA: ácido trifluoroacético.

VII. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Pont Lezica, director de esta tesis, por haberme guiado en mi iniciación en la investigación bioquímica, por su constante apoyo, conocimientos y sentido crítico brindados desde mi ingreso en su laboratorio. A él mi más profundo y sincero agradecimiento.

Al Dr. Gustavo Daleo, por sus valiosos consejos y lectura crítica de esta tesis.

A Claudia Casalongué y Cecilia Scheggia, inmejorables compañeras de laboratorio, por los gratos momentos compartidos durante estos años.

Al Dr. Horacio Pontis, director del IIB, por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto.

Al Dr. Juan Accorinti, consejero de estudios, por su orientación en mi plan de materias en la Carrera del Doctorado.

A los restantes miembros del IIB, por su apoyo y sugerencias.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, por su apoyo económico, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A mi esposo, por brindarme su comprensión y apoyo incondicional durante todos estos años.

