

Tesis de Posgrado

Caracterización del mecanismo de glicosilación de proteínas en protozoarios

De la Canal, Laura

1987

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

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

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

Cita tipo APA:

De la Canal, Laura. (1987). Caracterización del mecanismo de glicosilación de proteínas en protozoarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2061_DelaCanal.pdf

Cita tipo Chicago:

De la Canal, Laura. "Caracterización del mecanismo de glicosilación de proteínas en protozoarios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2061_DelaCanal.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARACTERIZACION DEL MECANISMO DE GLICOSILACION DE PROTEINAS
EN PROTOZOARIOS

Laura de la Canal

Director de tesis: Armando J. Parodi

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación
Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA

- 1987 -

- 2061 -
y 2

A Gerardo,

porque respetaste mis inquietudes, me alentaste y soportaste sin quejas dos años de "abandono".

A papá, mamá y Lala.

A A.J.P.,

esta tesis es el fruto de la confianza que depositaste en mí.

AGRADECIMIENTOS

Entre las muchas personas que influyeron en mi formación y contribuyeron en la realización de esta tesis, deseo destacar mi agradecimiento:

A mi director de tesis, el Dr. Armando J. Parodi. Porque me dio total libertad de acción al mismo tiempo que siguió de cerca mi trabajo, por el apoyo que me brindó en todo momento, por su claridad de ideas y su generosidad para transmitir las, es sin duda a él a quien debo mi más profundo agradecimiento. Sin su colaboración incondicional la presentación de esta tesis no hubiera sido posible.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" que me permitieron trabajar en esta institución.

A mis profesores de la Universidad Nacional de Mar del Plata, J.I. Carreto, G. Daleo, R. Pont Lezica y H.G. Pontis, por haber despertado mi vocación científica y a G.L. Salerno, con quien hice mis primeros pasos en la investigación.

A Juan Carlos Engel, Patricia Doyle y Juan José Cazzulo, por la invaluable colaboración prestada para el desarrollo de varios experimentos y su excelente disposición para transmitir conocimientos.

A Daniel H. Mendelzon, Gerardo Z. Lederkremer, Claudia Oliva, Carlos Torres Moraes y Claudia Yagodnik, compañeros de laboratorio, que hicieron más amenas las largas jornadas de trabajo. A Daniel y Gerardo también les agradezco sus valiosos consejos técnicos.

A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Biológicas (Mar del Plata) y del IIB "Fundación Campomar", por la colaboración brindada y por tantos buenos momentos compartidos. Un recuerdo especial para mis amigos

Antonio Prisco, María Graciela Pucciarelli, Lorenzo Lamattina y Alejandra Raimondi. Para Alejandra, mi reconocimiento por la ayuda brindada para la corrección de este trabajo.

A Irene Cangiano y Norberto Malarini, por la eficiencia y dedicación puestas para el procesamiento del texto, la impresión y la realización de las figuras de esta tesis.

Las investigaciones que se presentan en esta tesis fueron realizadas con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y de UNDP/Banco Mundial/Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud.

This work was supported by the National Research Council (Argentina) and by the UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

INDICE

RESUMEN

ABREVIATURAS

CAPITULO I: INTRODUCCION

- I.1. Glicoproteínas
- I.2. O-glicosilación de proteínas
- I.3. N-glicosilación de proteínas
- I.4. Ciclo del dolicol
- I.5. Procesamiento de glicoproteínas tipo asparagina
- I.6. Glucosilación transitoria de glicoproteínas
- I.7. Funciones de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas
- I.8. Ubicación sistemática y biología de Euglena gracilis y tripanosomátidos
- I.9. Estudios sobre glicoproteínas en E. gracilis y tripanosomátidos
- I.10. N-glicosilación de proteínas en protozoarios de vida libre y parásitos

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

- II.1. Materiales
 - II.1.1. Material radioactivo
 - II.1.2. Standards radioactivos
 - II.1.3. Enzimas y otros reactivos
 - II.1.4. Protozoarios

II.2. Marcación de protozoarios y aislamiento de sustancias radioactivas

II.2.1. Marcación de L. enriettii

II.2.2. Marcación de E. gracilis

II.2.3. Marcación de T. cruzi

II.2.4. Aislamiento de Dol-P-monosacáridos sintetizados "in vivo"

II.2.5. Aislamiento de Dol-P-P-oligosacáridos sintetizados "in vivo"

II.2.6. Aislamiento de glicopéptidos

II.2.7. Aislamiento de oligosacáridos sensibles a endo-H de glicopéptidos

II.2.8. Aislamiento de oligosacáridos tipo complejo de glicopéptidos

II.3. Métodos

II.3.1. Hidrólisis ácida suave

II.3.2. Hidrólisis ácida total

II.3.3. Saponificación

II.3.4. Reducción de oligosacáridos con NaBH₄

II.3.5. Acetólisis

II.3.6. Cromatografía en papel

II.3.7. Electroforesis en papel

II.3.8. Determinación de proteínas

II.3.9. Determinación de radioactividad

II.3.10. Tratamiento con endo-H

II.3.11. Tratamiento con α -manosidasa

II.3.12. Tratamiento con proteasa

II.4. Preparaciones

II.4.1. Microsomas de tripanosomátidos

- II.4.2. Microsomas de hígado de rata
- II.4.3. Aceptores exógenos
- II.4.4. Microsomas de hígado solubilizados
- II.5. Incubaciones "in vitro"
- II.5.1. Síntesis de Dol-P-monosacáridos
- II.5.2. Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos
- II.5.3. Degradación de oligosacáridos

CAPITULO III: DERIVADOS DE DOLICOL EN Leishmania enriettii

Antecedentes y Objetivos

III. Resultados

III.1. Oligosacáridos unidos a Dol-P-P sintetizados "in vivo"

III.1.1. Tamaño

III.1.2. Sensibilidad a α -manosidasa

III.1.3. Sensibilidad a endo-H

III.1.4. Hidrólisis total

III.1.5. Acetólisis

III.2. Monosacáridos unidos a Dol-P sintetizados "in vivo"

Discusión

CAPITULO IV: MECANISMO DE GLICOSILACION DE PROTEINAS EN Euglena gracilis

Antecedentes y Objetivos

IV. Resultados

IV.1. Oligosacáridos unidos a Dol-P-P

IV.2. Oligosacáridos tipo alta manosa unidos a proteína

Discusión

CAPITULO V: SINTESIS "in vitro" DE DERIVADOS DE Do1-P EN TRIPANOSOMATIDOS

Antecedentes y Objetivos

V. Resultados

Discusión

CAPITULO VI: SINTESIS "in vitro" DE DERIVADOS DE Do1-P-P EN TRIPANOSOMATIDOS

Antecedentes y Objetivos

VI. Resultados

VI.1. Ensayo de Do1-P-Man:Do1-P-P-oligosacárido manosiltransferasas
de hígado de rata

VI.1.1. Diseño

VI.1.2. Caracterización de los aceptores exógenos

VI.1.3. Solubilización de manosiltransferasas Do1-P-Man dependientes

VI.2. Dadores de restos de manosa en tripanosomátidos

VI.3. Ensayo de Do1-P-Man:Do1-P-P-oligosacárido manosiltransferasas
en membranas de parásitos

VI.3.1. Síntesis de Do1-P-P-oligosacáridos

VI.3.2. Estructura de los oligosacáridos

Discusión

CAPITULO VII: GLICOSILACION Y PROCESAMIENTO DE GLICOPROTEINAS EN DIFERENTES

ESTADIOS DE T. cruzi

Antecedentes y Objetivos

VII. Resultados

VII.1. Oligosacáridos unidos a Dol-P-P

VII.1.1. Tamaño

VII.1.2. Estructura

VII.2. Oligosacáridos tipo alta manosa unidos a proteína

VII.2.1. Tamaño

VII.2.2. Estructura

VII.3. Oligosacáridos tipo complejo unidos a proteína

Discusión

REFERENCIAS

RESUMEN

La glicosilación de residuos de asparagina en las proteínas ocurre por el mismo mecanismo en todos los eucariotes estudiados, excepto en protozoarios de la familia Trypanosomatidae. Este consiste en la transferencia co-traducciona del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a partir del derivado de dolicol-P-P correspondiente.

En células de mamífero la biosíntesis de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$ se produce de manera secuencial y siguiendo un orden único, donde GDP-Man cede los primeros cinco restos de manosa, dolicol-P-Man los residuos de manosa restantes, y dolicol-P-Glc los tres residuos de glucosa.

En todos los tripanosomátidos estudiados se había demostrado la transferencia a proteínas "in vivo" de oligosacáridos carentes de residuos de glucosa. Además, en algunos de ellos el oligosacárido transferido resultó tener menos de nueve restos de manosa, pero en esos casos su estructura es la misma que la del oligosacárido del mismo tamaño intermediario en el ciclo del dolicol en mamíferos. Los derivados de dolicol-P-P que se acumulan y transfieren a proteínas son: $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en epimastigotes de Trypanosoma cruzi y en Trypanosoma conorhini, Trypanosoma dionisii, Leptomonas samueli, Herpetomonas samuelpeessoai y Herpetomonas muscarum; $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ en Leishmania mexicana, Leishmania adleri y Blastocrithidia culicis, y finalmente, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en Crithidia fasciculata, Crithidia hamosa y amastigotes de cultivo axénico de T. cruzi.

Aquí se han estudiado diversos aspectos del mecanismo de N-glicosilación de proteínas en tripanosomátidos con el objeto de determinar el origen de sus peculiaridades. Los principales resultados y conclusiones obtenidas se resumen a continuación.

1. La característica de transferir a proteínas oligosacáridos no glucosilados no es común a todos los protozoarios. Se demostró que el protozoario de vida libre Euglena gracilis transfiere $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ al igual que el resto de los eucariotes previamente estudiados.
2. Contrariamente a lo que se presuponía, miembros de un mismo género de tripanosomátidos pueden acumular derivados de Dol-P-P con oligosacáridos de diferente tamaño. Aquí se presentan evidencias de que células de Leishmania enriettii acumulan $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ mientras que previamente se había determinado la síntesis de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$ en otras dos especies de Leishmania.
3. Preparaciones de membrana de T. cruzi, L. enriettii, C. fasciculata y B. culicis sintetizan dolicol-P-Man pero no dolicol-P-Glc, que es el dador de restos glucosilo en el ensamblaje de lípido-oligosacáridos en otros eucariotes. Se concluye que la deficiencia primaria que conduce a estos tripanosomátidos a formar derivados de dolicol-P-P no glucosilados es la ausencia de actividad de UDP-Glc:dolicol-P-glucosiltransferasa, y por lo tanto su incapacidad de sintetizar dolicol-P-Glc.
4. Se diseñó un ensayo para la medición de actividades de manosiltransferasa dolicol-P-Man dependientes que consiste en la incubación de preparaciones de membrana con dolicol-P, $\text{GDP}(^{14}\text{C})\text{Man}$ y aceptores exógenos ($\text{Man}_5\text{-}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$). Luego por extracción de los derivados de dolicol-P-P sintetizados y análisis de los oligosacáridos radioactivos se puede determinar la presencia o ausencia de ciertas actividades de manosiltransferasa.

5. Utilizando el método que acaba de describirse se pudo determinar que B. culicis, que "in vivo" forma $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, "in vitro" es incapaz de transferir el séptimo, octavo y noveno residuo de manosa al lípido-oligosacárido preformado. L. enriettii y C. fasciculata que transfieren $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ "in vivo", no producen la adición del octavo y noveno resto de manosa "in vitro". Se concluye que: a) existen al menos tres actividades diferentes de dolicol-P-Man:dolicol-P-P-oligosacárido manosiltransferasa, y b) la síntesis de derivados de dolicol-P-P truncados en estos tripanosomátidos se debería a un bloqueo en la adición de determinados restos de manosa, originado por la falta de actividad de ciertas manosiltransferasas dolicol-P-Man dependientes.

6. Se determinó que en C. fasciculata los dadores de restos de manosa en el ensamblaje del dolicol-P-P-oligosacárido son los mismos que en células de mamífero: GDP-Man actúa como dador de los primeros cinco restos de manosa y dolicol-P-Man de los restantes.

7. Por primera vez se estudiaron los oligosacáridos unidos a dolicol-P-P y aquellos presentes en glicoproteínas de alta manosa en las formas tripomastigote (infectiva) y amastigotes intracelulares de T. cruzi. Se determinó que estos últimos transfieren a proteínas $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ mientras que la forma infectiva transfiere $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. En la Fig. 45 se presenta el mecanismo de N-glicosilación de proteínas propuesto para estas dos formas del parásito.

8. En cuanto a las formas epimastigote y amastigotes axénicos de T. cruzi se había determinado que células de clones CA-I transferían a proteínas $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ más $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, respectivamente. Aquí se presentan

evidencias de que las mismas formas de un clon no relacionado (M 80/88) acumulan como derivados de dolicol-P-P los mismos oligosacáridos que habían sido descriptos para clones CA-I.

9. De los puntos 7 y 8 se desprende que durante la diferenciación de T. cruzi se produce un cambio en el mecanismo de N-glicosilación que conduce a la transferencia a proteínas de oligosacáridos de diferente tamaño. T. cruzi es el primer eucariote donde se demuestra una modificación en el tamaño del oligosacárido transferido durante la diferenciación.

10. Se estudió el orden de remoción de los primeros restos de manosa durante el procesamiento de glicoproteínas en epimastigotes y tripomastigotes de T. cruzi. En ambas formas el procesamiento comienza con la remoción de los mismos residuos pero en los tripomastigotes se obtienen finalmente oligosacáridos más procesados.

11. En epimastigotes y tripomastigotes de T. cruzi se investigó la presencia de oligosacáridos tipo complejo en glicoproteínas. La detección de restos de galactosa en el material resistente a la enzima endo- β -N-acetilglucosaminidasa H y a la β -eliminación indica que existen oligosacáridos complejos en ambas formas del parásito.

Los resultados obtenidos aportan nuevos conocimientos acerca del mecanismo de N-glicosilación de proteínas en tripanosomátidos y permiten comprender varias de las peculiaridades que éste presenta. Al mismo tiempo se han formulado especulaciones evolutivas que permitirían explicar la síntesis de derivados de dolicol-P-P truncados en ciertos tripanosomátidos.

Algunos de los resultados que se presentan en esta tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

- "Glycosylation of proteins in the protozoan Euglena gracilis"

Laura de la Canal & Armando J. Parodi

Comparative Biochemistry and Physiology 81 B, 803-805 (1985)

- "Characterization of the mechanism of protein glycosylation and the structure of glycoconjugates in tissue culture trypomastigotes and intracellular amastigotes of Trypanosoma cruzi"

Patricia Doyle, Laura de la Canal, Juan C. Engel & Armando J. Parodi

Molecular and Biochemical Parasitology 21, 93-101 (1986)

- "Synthesis of dolichol derivatives in trypanosomatids. Characterization of enzymatic patterns"

Laura de la Canal & Armando J. Parodi

The Journal of Biological Chemistry 262, 11128-11133 (1987)

ABREVIATURAS

AMP	adenosina 5' monofosfato
Ara	arabinosa
Asn	asparagina
cpm	cuentas por minuto
DEAE-celulosa	dietilaminoetil-celulosa
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dol	dolicol
Dol-P	dolicol monofosfato
Dol-P-P	dolicol difosfato
endo-H	endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
Fam	familia
FCS	suero fetal bovino
Fuc	fucosa
G	glucosa
Gal	galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GDP	guanosina 5' difosfato
Glc	glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GlcNAc-P	N-acetilglucosamina-1-fosfato
GlcNH ₂	glucosamina
GMP	guanosina 5' monofosfato
Gn	N-acetilglucosamina
h	hora

Hyp	hidroxiprolina
Hyl	hidroxilisina
M	manosa
M 80	clon Miranda 80
M 88	clon Miranda 88
Man	manosa
Man-6-P	manosa-6-fosfato
MEM	medio mínimo de Eagle
MEM/piruvato	MEM sin glucosa conteniendo 5 mM piruvato de sodio
min	minuto
NeuAc	ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)
P	fosfato
PP	pirofosfato
PBS	buffer fosfato salino
RE	retículo endoplásmico
RER	retículo endoplásmico rugoso
SA	ácido siálico
Ser	serina
Solución A	0,25 M sacarosa, 5 mM Na-EDTA pH 7,2 y 5 mM β-mercapto-etanol
Thr	treonina
Tris	tris-(hidroximetil)aminometano
Tul 0	cepa Tulahuen 0
UMP	uridina 5' monofosfato
UDP	uridina 5' difosfato

1103

cloroformo/metanol/agua (1:1:0,3)

CAPITULO I

INTRODUCCION

I.1. Glicoproteínas

Las glicoproteínas pueden definirse como proteínas conjugadas conteniendo como grupo prostético uno o más heterosacáridos, con un número de restos sacarídicos relativamente pequeño, sin unidades repetitivas y covalentemente unidos a la proteína (1).

De acuerdo al tipo de unión que se establece entre el resto glicosídico y la proteína, las glicoproteínas se dividen en dos grandes grupos: O-glicosídicas y N-glicosídicas (2).

En cuanto a las glicoproteínas con enlaces O-glicosídicos, la unión péptido-azúcar se establece a través de un grupo hidroxilo en un aminoácido. Se han descrito varios aminoácidos y azúcares involucrados en este tipo de enlaces. El más habitual en células animales se constituye por la unión de un grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina en el péptido, con una N-acetilgalactosamina o xilosa. Las glicoproteínas que llevan este tipo de enlace se denominan genericamente mucinas (2).

Otro tipo de glicoproteínas con enlaces O-glicosídicos son los colágenos, donde la unión se forma entre un residuo de galactosa y el hidroxilo de una hidroxilisina en el polipéptido (Fig. 1) (3).

También existen glicoproteínas denominadas extensinas en las cuales el enlace O-glicosídico se establece entre un resto de arabinosa y uno de hidroxiprolina (3). Este tipo de unión es característico de compuestos presentes en la pared celular de vegetales (Fig. 1).

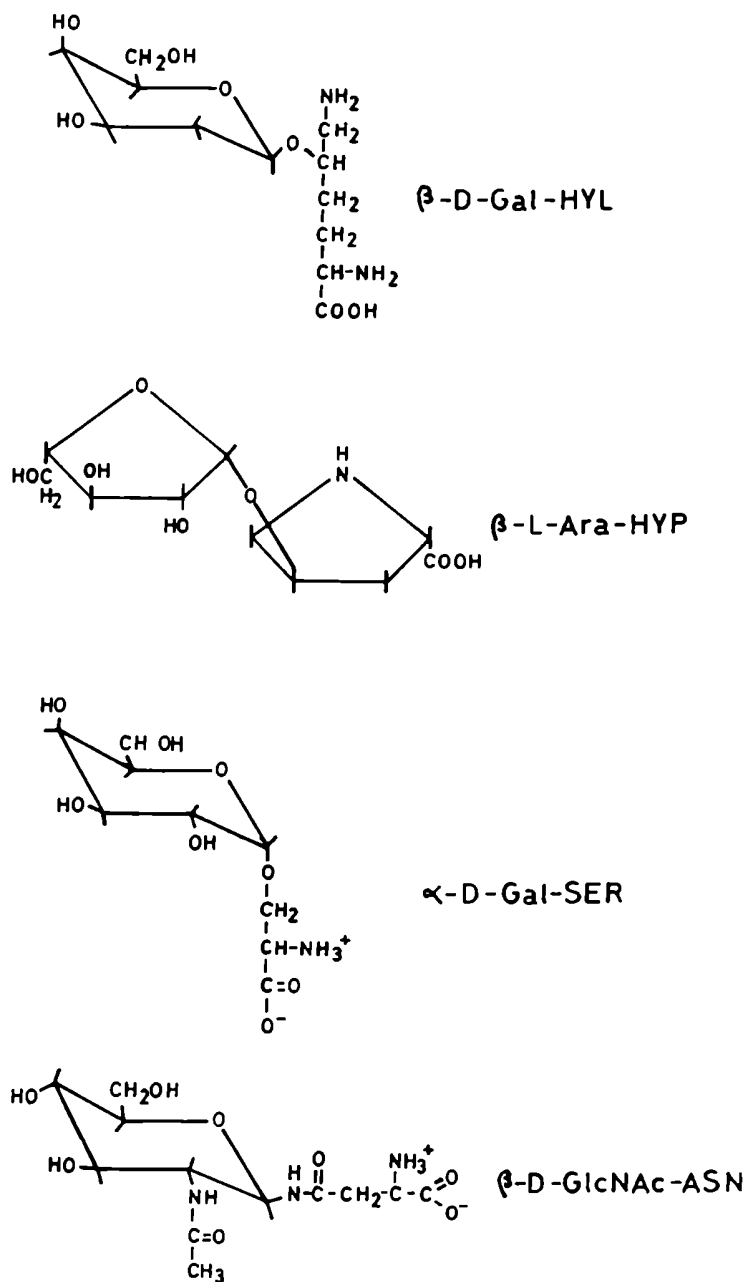


FIGURA 1: Enlaces aminoácido-azúcar presentes en glicoproteínas.

Por último, han sido descritas glicoproteínas de hongos y levaduras donde la unión se establece entre un resto de serina o treonina y uno de galactosa o manosa (Fig. 1) (3).

Las estructuras de los restos sacarídicos de las mucinas pueden ser muy variadas. El rasgo más generalizado entre ellas es la presencia del disacárido $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}$ unido a serina o treonina. Frecuentemente al resto de galactosa se le adiciona uno de ácido siálico por un enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ (2,4).

Por otra parte, el enlace del azúcar a la proteína característico de las glicoproteínas N-glicosídicas se establece entre una N-acetilglucosamina y el nitrógeno del grupo amido de una asparagina en la proteína. Estas glicoproteínas también se conocen con el nombre de "tipo asparagina" (Fig. 1).

Estructuralmente las glicoproteínas con uniones N-glicosídicas pueden clasificarse en tres subgrupos (Fig. 2), a saber: tipo alta manosa, tipo complejo y tipo híbrido.

Las glicoproteínas tipo alta manosa están constituidas exclusivamente por N-acetilglucosamina y manosa y presentan generalmente un núcleo interno de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (aunque pueden ser más pequeñas) con la estructura que se detalla en la Fig. 2. Los diferentes oligosacáridos de tipo alta manosa surgen de acuerdo al número y la localización de otros residuos de manosa que pueden aparecer en los extremos no reductores del núcleo central. Estos residuos siempre aparecen unidos por enlaces α -1,2.

En el caso de los oligosacáridos complejos el núcleo central es un pentasacárido: $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Esta estructura inicial se modifica por la presencia de "antenas" glicosídicas externas con distinto número y diferente

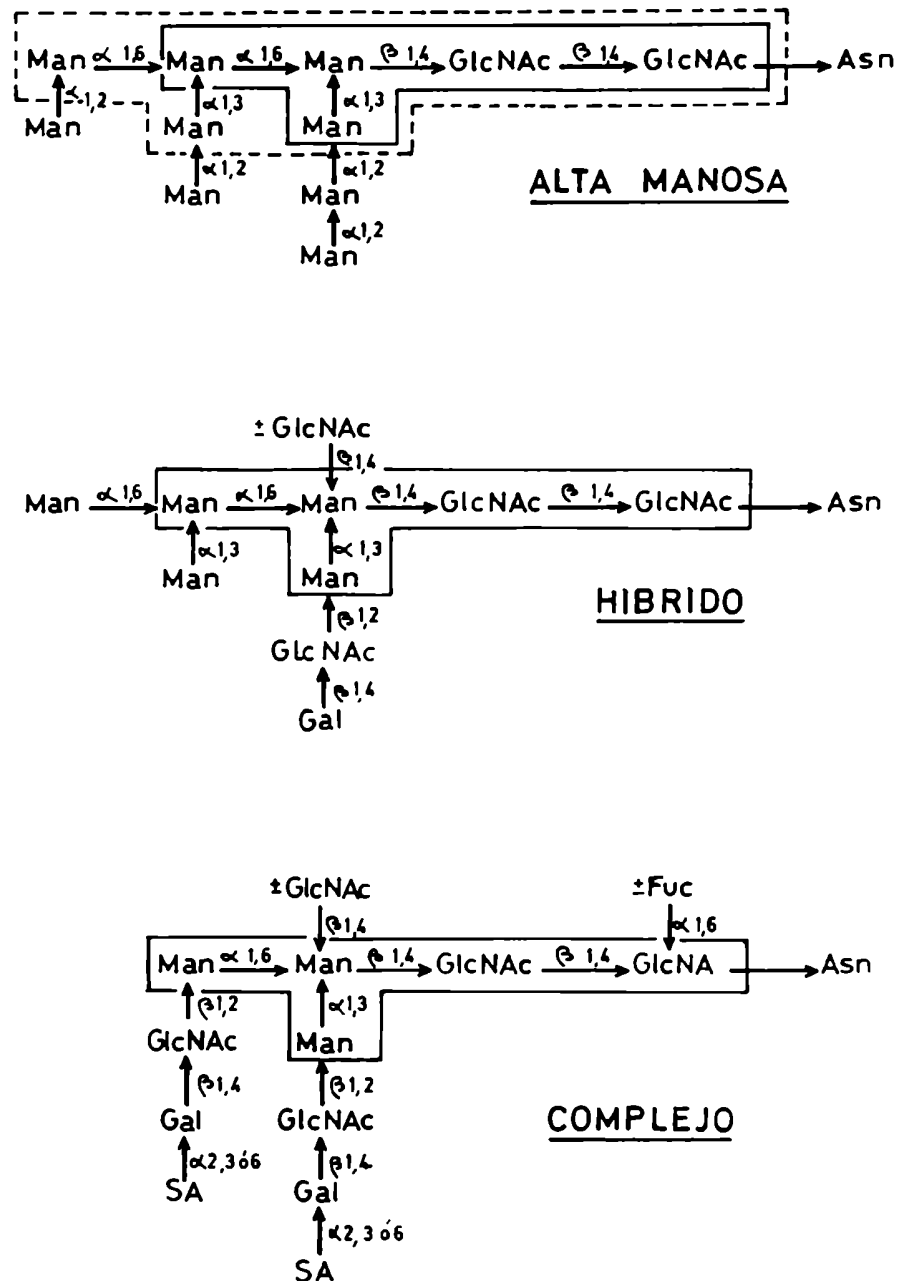


FIGURA 2: Estructura de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas.
 Las áreas recuadradas con línea continúa indican el núcleo de pentasacárido común a todas las estructuras N-glicosídicas y el área punteada corresponde al heptasacárido típico de las formas "alta manosa". Los residuos señalados con ± pueden estar ausentes.

composición de azúcares. La antena externa más frecuente en glicoproteínas complejas es del tipo $SA\alpha 2 \rightarrow 6 \text{ Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{ GlcNAc}$, pero se han informado muchas otras (2,5). Dos sustituyentes habituales en estas glicoproteínas son una fucosa unida por un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ con el residuo de N-acetilglucosamina más interno, y una N-acetilglucosamina unida en $\beta 1 \rightarrow 4$ al residuo de manosa más interno del núcleo (Fig. 2). A esta estructura básica pueden adicionarse antenas laterales unidas a residuos de α -manosa, u otros restos de azúcares que alargan las antenas externas. La mayoría de los oligosacáridos tipo complejo tienen dos, tres o cuatro antenas externas, pero también se han descrito con cinco (6).

Finalmente, las glicoproteínas con oligosacáridos tipo híbrido son aquellas que tienen rasgos estructurales tanto de glicoproteínas tipo alta manosa como complejas (ver Fig. 2).

Todos los oligosacáridos unidos a asparagina presentan la misma estructura central de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (recuadrada en la Fig. 2) porque todos ellos provienen de una ruta metabólica común y luego se procesan en forma independiente dando origen a variadas estructuras. Esa ruta biosintética común y el procesamiento de los oligosacáridos se describen en las siguientes secciones.

Por último, existe un tipo particular de proteínas glicosiladas; se trata de las manoproteínas de Saccharomyces cerevisiae que contienen restos sacarídicos unidos por dos tipos de enlaces: N-glicosídicos y O-glicosídicos. En la Fig. 3 se esquematiza la estructura de una manoproteína. Puede observarse que la porción sacarídica unida N-glicosídicamente está dividida en una cadena interna que contiene 9-11 restos de manosa y dos de N-acetilglucosamina, y una cadena externa formada por 100-150 manosas. La otra

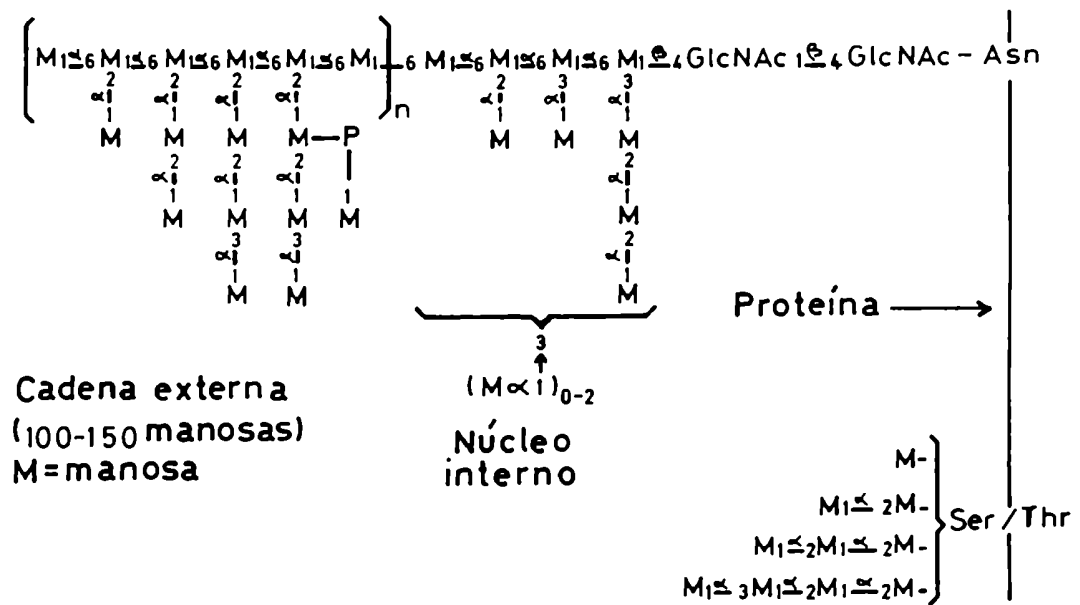


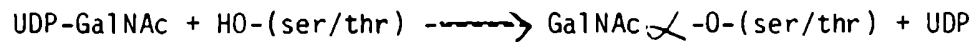
FIGURA 3: Estructura de manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*.

porción está compuesta de manosa, manobiosa, manotriosa y manotetrosa, unidas a restos de serina/treonina.

1.2. O-glicosilación de proteínas

La síntesis de oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a serina/treonina se produce por la adición secuencial de restos de monosacárido a partir de los nucleótido-azúcares correspondientes. Durante la secuencia de glicosilación el producto de una glicosiltransferasa es utilizado como sustrato por la glicosiltransferasa siguiente (3,7).

La síntesis se inicia con la transferencia de un resto de N-acetilgalactosamina al grupo hidroxilo de la serina o treonina, catalizado por la enzima UDP-GalNAc:polipéptido N-acetilgalactosaminil-transferasa (8), según la reacción siguiente:



A diferencia de lo que ocurre durante la N-glicosilación de proteínas, parece no existir ningún requerimiento en cuanto a la secuencia que rodea al resto de serina/treonina para permitir su glicosilación; pero si es importante la existencia de una estructura secundaria tal que favorezca el acceso de la transferasa al sitio de glicosilación (2).

La elongación continúa por adición secuencial de nuevos restos de monosacárido, a partir de nucleótido-azúcares dadores (4), hasta alcanzar la estructura final del oligosacárido.

Existen varios niveles de control que conducen a la síntesis de determinada estructura. En principio, cada célula determina por control genético

la expresión de la calidad y cantidad de cada glicosiltransferasa. Al respecto, es bien conocido que en los grupos sanguíneos A, B y O se determina genéticamente la síntesis de carbohidratos de diferentes estructuras en glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de los glóbulos rojos (4,7). En los tres grupos sanguíneos se sintetiza un oligosacárido común unido O-glicosídicamente a serina/treonina. En el grupo A, además, está codificada la síntesis de una α -N-acetilgalactosaminil-transferasa que cataliza la adición de un residuo de N-acetilgalactosamina al oligosacárido. Similarmente, en el grupo B se codifica una β -galactosiltransferasa que puede introducir un resto de galactosa, mientras que en los individuos del grupo O no se expresa ninguna de las dos enzimas, con lo que se mantiene intacta la estructura del oligosacárido original.

La proporción relativa de las glicosiltransferasas es otro factor importante en el control de la estructura final de los oligosacáridos. Se ha concluido que al llegar la biosíntesis del oligosacárido a un punto de ramificación, la cantidad relativa de cada glicosiltransferasa determinará la ruta de glicosilación que éste seguirá (2,9).

Muchos otros factores pueden influenciar la estructura final de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a proteínas. Los mismos no se tratarán aquí dado que en esta tesis se desarrollarán exclusivamente aspectos relacionados con glicoproteínas tipo asparagina.

Finalmente, de los temas que acaban de mencionarse se desea enfatizar el hecho que la O-glicosilación de proteínas se produce por transferencia directa y secuencial de restos de azúcares a partir de nucleótido-azúcares y no por transferencia en bloque de un oligosacárido preformado como ocurre en la N-glicosilación.

1.3. N-glicosilación de proteínas

En 1972 Parodi y col. (10) presentaron las primeras evidencias indicando que un oligosacárido glucosilado unido a lípido era transferido a proteínas endógenas de hígado de rata. Desde entonces, gran cantidad de información se ha acumulado confirmando el rol de un intermediario lipídico como precursor para la síntesis de glicoproteínas tipo asparagina. El lípido-oligosacárido precursor de la N-glicosilación de proteínas ha sido caracterizado tanto en su porción lipídica como en el residuo glucosilado, resultando ser $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$ (11-13). La biosíntesis de este compuesto será analizada en la siguiente sección.

Estudios "in vitro" realizados por el grupo de Robbins (14) constituyeron las primeras evidencias acerca de la eficiencia de transferencia a proteínas de distintos oligosacáridos, a partir de derivados de Dol-P-P. Ellos demostraron que derivados glucosilados se transferían 8-10 veces más rápido que compuestos equivalentes desprovistos de residuos de glucosa. Hoflack y col. (15) estudiando la síntesis de lípido-oligosacáridos a partir de precursores radioactivos en linfocitos de ratón permeabilizados observaron que los oligosacáridos no glucosilados unidos a lípido eran degradados de manera selectiva. Numerosos resultados obtenidos tanto "in vitro" (16,17) como "in vivo" (18-21) en varios sistemas, llevaron a generalizar que la presencia de tres residuos de glucosa en el oligosacárido transferido era una condición esencial para lograr una transferencia eficiente a proteínas. Sin embargo, el hecho que la transferencia de oligosacáridos glucosilados sea más eficiente no implica que otros oligosacáridos no puedan ser transferidos. Por

ejemplo, según un informe reciente de Romero & Herscovics (22) células F9 de teratocarcinoma murino transfieren una significativa cantidad de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ de Dol-P-P a proteínas, además del ya descrito $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

Como se verá más adelante, los tripanosomátidos constituyen una excepción dado que sólo transfieren a proteínas oligosacáridos no glucosilados. Otras excepciones son las mutantes de Saccharomyces cerevisiae obtenidas por el grupo de Robbins seleccionando por resistencia al suicidio provocado por (^3H)manosa (23,24). Todas ellas acumulan como derivados de Dol-P-P y transfieren a proteínas oligosacáridos no glucosilados. Estos oligosacáridos son: $\text{Man}_{1-2}\text{GlcNAc}_2$ en las mutantes alg 2-1, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ en alg 3-1 y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en alg 5-1 y alg 6-1.

En resumen, salvo escasas excepciones, "in vivo" la glicosilación de residuos de asparagina en las proteínas se produce esencialmente por la transferencia en bloque del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a partir de un intermediario lipídico.

Estudios de varios laboratorios permitieron establecer que la cadena interna unida a asparagina en las manoproteínas de S. cerevisiae también proviene de la transferencia de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (21,25).

En cuanto a la influencia del número de restos de manosa presentes en el oligosacárido en su transferencia a proteínas, las evidencias indican que tendrían poco o ningún efecto. Así, la línea celular mutante de linfoma de ratón Thy-1^- que sintetiza $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ unido a lípido, transfiere eficientemente este oligosacárido a proteínas (26,27). Algo similar se observa en células CHO (ovario de hamster chino) que sintetizan y transfieren a proteínas el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ en condiciones de ayuno de glucosa (28,29), mientras que normalmente transfieren $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. El mismo

efecto se observa en células tratadas con un desacoplante de la fosforilación oxidativa (30). Estudios "in vitro" también muestran la poca influencia de los restos de manosa. Spiro y col. (16) demostraron que la remoción con α -manosidasa de residuos de manosa periféricos del lípido-oligosacárido acumulado "in vivo" por células de tiroides, no tiene ningún efecto en su transferencia a proteínas por un sistema microsomal del mismo origen.

En general se acepta que en la N-glicosilación de proteínas el oligosacárido se transfiere a cadenas de proteína nacientes en el retículo endoplásmico. Sin embargo, existen evidencias experimentales que sugieren que la transferencia podría no ser en todos los casos cotraduccional sino también post-traduccional, pero siempre a proteínas recién sintetizadas (12).

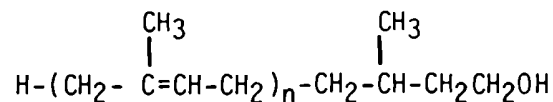
Con respecto a la estructura del péptido aceptor, se determinó que se produce la glicosilación de residuos de asparagina que se encuentran en la siguiente secuencia:

Asn - X - ser/thr

donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto probablemente prolina y ácido aspártico (31). Sin embargo, una asparagina en esa secuencia no es condición suficiente para determinar su glicosilación (32). Estudios de Bause & Legler (33) utilizando péptidos sintéticos llevaron a proponer que en el mecanismo de reacción de la glicosilación de proteínas es indispensable la formación de una unión tipo puente hidrógeno entre la cadena lateral del aminoácido hidroxilado y la amida de la asparagina. Actualmente se considera que para que se produzca la glicosilación el polipéptido debe tener una conformación tal que permita: a) la formación del puente de hidrógeno mencionado y, b) el acceso de la oligosacariltransferasa que cataliza la reacción (34).

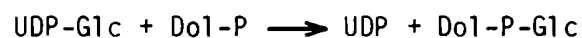
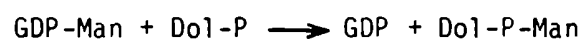
I.4. Ciclo del dolicol

El dolicol es un poliprenol α -saturado con un número variable de unidades de isopreno, entre 11 y 19 según la especie (35,36). La estructura del dolicol es la siguiente:



Tal como se mencionó en la sección anterior, la N-glicosilación de proteínas se produce por transferencia en bloque del oligosacárido preformado, a partir del lípido intermediario $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. La ruta biosintética que conduce a la formación de este compuesto se conoce con el nombre de "ciclo del dolicol" y aparece esquematizada en la Fig. 4.

La primera reacción de glicosilación consiste en la transferencia de un residuo de N-acetilglucosamina-fosfato del UDP-GlcNAc al Dol-P , con producción de GlcNAc-P-P-Dol (37). Esta reacción es inhibida por la tunicamicina (38), antibiótico utilizado como inhibidor específico de la N-glicosilación. A continuación se produce la adición de un resto de N-acetilglucosamina y cinco de manosa a partir de UDP-GlcNAc y GDP-Man , respectivamente. En cambio, los cuatro últimos residuos de manosa y los tres de glucosa no provienen de los nucleótido-azúcares correspondientes sino de los derivados de Dol-P que se sintetizan según las siguientes reacciones:



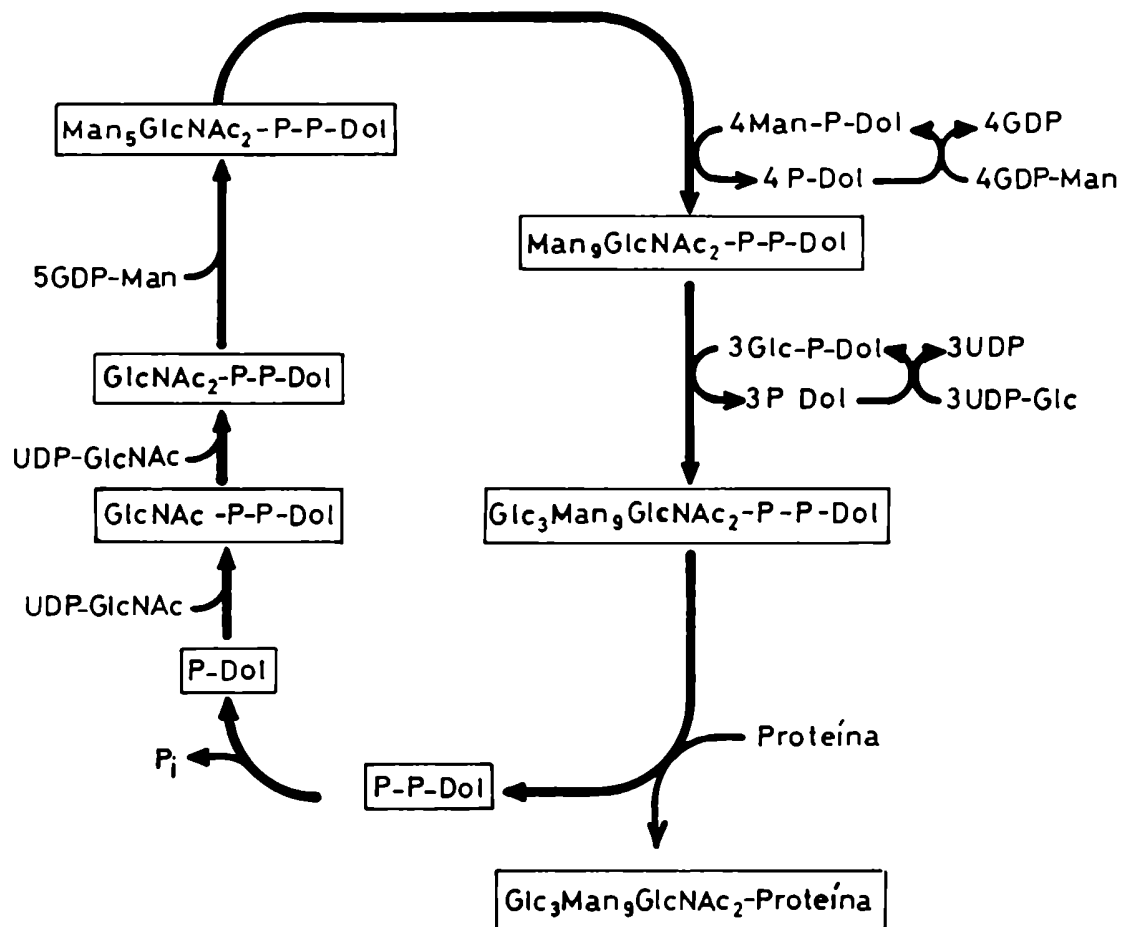


FIGURA 4: Ciclo del dolicol.

Finalmente, tal como aparece esquematizado en la Fig. 4, el $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ cede el oligosacárido a un residuo de asparagina en la proteína aceptora y el Dol-P-P liberado pierde un grupo fosfato con formación de Dol-P que reinicia el ciclo.

En la Fig. 5 se presenta la estructura de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ que fue elucidada por Li y col. en 1978 (18). En la misma también se representa en forma resumida el orden de adición de los restos de monosacárido, tema que se trata a continuación.

Kornfeld y colaboradores fueron quienes demostraron el origen de cada resto de manosa en la biosíntesis de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, trabajando con una línea celular mutante de linfoma de ratón (Thy-1^-). En primer lugar mostraron que estas células acumulaban "in vivo" principalmente $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ y que transferían a proteínas $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (27,39). A continuación demostraron que las células Thy-1^- eran incapaces de sintetizar Dol-P-Man tanto "in vivo" como "in vitro" (40). Finalmente presentaron evidencias de que preparaciones de membrana de estas células sintetizaban derivados de Dol-P-P de hasta cinco unidades de manosa cuando se suministraba $\text{GDP-(}^{14}\text{C)Man}$ como sustrato, mientras que a partir de $\text{Dol-P-(}^3\text{H)Man}$ (en presencia de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$) formaban derivados conteniendo entre 6 y 9 restos de manosa (41). Así quedó demostrado que en células de mamífero el dador de los primeros cinco restos de manosa en el ensamblaje de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ es el GDP-Man y que el Dol-P-Man cede los cuatro residuos restantes.

Por otra parte, la adición de los tres restos de glucosa al $\text{Dol-P-P-oligosacárido}$ a partir de Dol-P-Glc fue demostrada por Parodi en levaduras (42) y por el grupo de Leloir en hígado de rata (43).

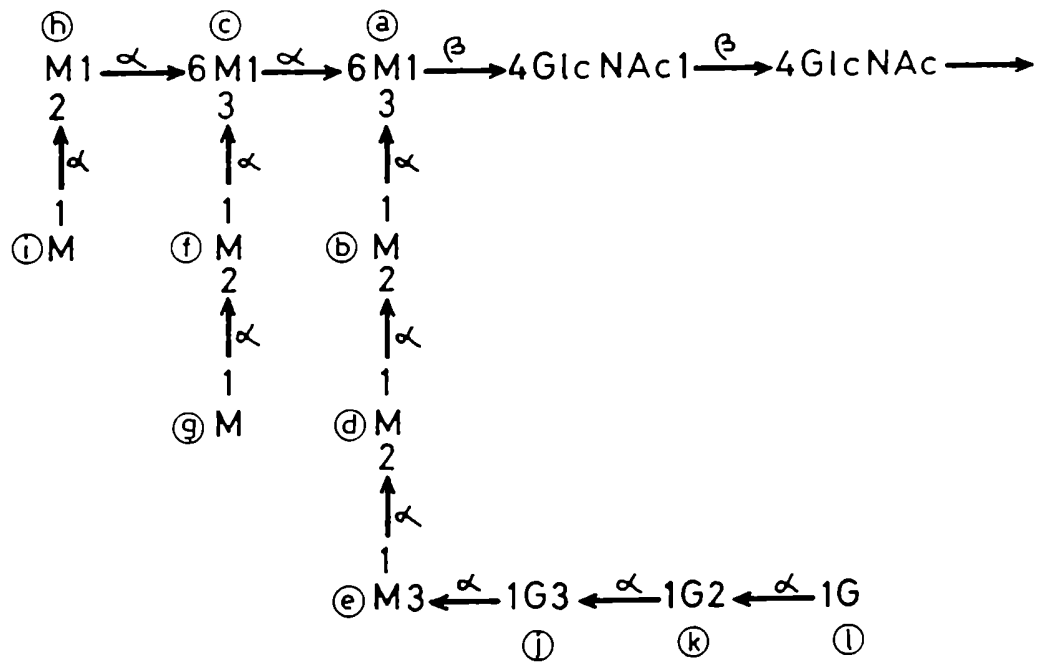


FIGURA 5: Estructura de Glc₃MangGlcNAc₂ unido a Dol-P-P.

Las letras indican, en orden alfabético, la secuencia de adición de los residuos de manosa y glucosa en el ensamblaje del oligosacárido en células de mamífero. Los tres residuos de glucosa están ausentes en tripanosomátidos (ver Fig. 14). G y M significan glucosa y manosa, respectivamente.

La secuencia de adición de residuos de manosa en el ensamblaje del derivado de Dol-P-P "in vivo" sigue un orden único (44) que aparece representado en la Fig. 6. El hecho que siga un orden único hace pensar en una alta especificidad de las glicosiltransferasas involucradas en el proceso. Sin embargo, hasta el momento son pocas las evidencias presentadas que permiten caracterizar actividades de manosiltransferasa individuales, y en todos los casos reportados se trata de actividades GDP-Man dependientes (45-49). "In vitro" en cambio, las evidencias experimentales sugieren una menor especificidad en cuanto al orden de adición de restos de manosa por las manosiltransferasas (41,50,51). Es así como en varios sistemas eucarióticos se observó que por incubación de fracciones de membrana con GDP-Man o Dol-P-Man radioactivos se obtienen Dol-P-P-oligosacáridos de variadas estructuras; este fenómeno se discutirá en el Capítulo VI.

A continuación se discutirán brevemente ciertos aspectos topológicos del ciclo del dolicol en el retículo endoplásmico (RE). Se ha establecido que la glicosilación de residuos de asparagina ocurre en el lumen del RE (5), pero aún no se comprende completamente la topología del ensamblaje del oligosacárido unido a Dol-P-P. Las observaciones más destacadas descriptas al respecto son las siguientes: a) no se detecta transporte de GDP-Man del citoplasma al lumen del retículo endoplásmico rugoso (52), b) la síntesis de Dol-P-Glc, Dol-P-Man y Dol-P-P-GlcNAc₂ en vesículas intactas con topología correcta es sensible a tratamiento de digestión con proteasas (53), c) varios investigadores, por diversas técnicas, mostraron que los intermediarios Man₃₋₅GlcNAc₂-P-P-Dol estarían del lado citoplasmático del retículo, mientras que todos los derivados de Dol-P-P entre Man₆GlcNAc₂ y Glc₃Man₉GlcNAc₂ se encontrarían en la faz luminal del mismo (54). En base a estas evidencias y a

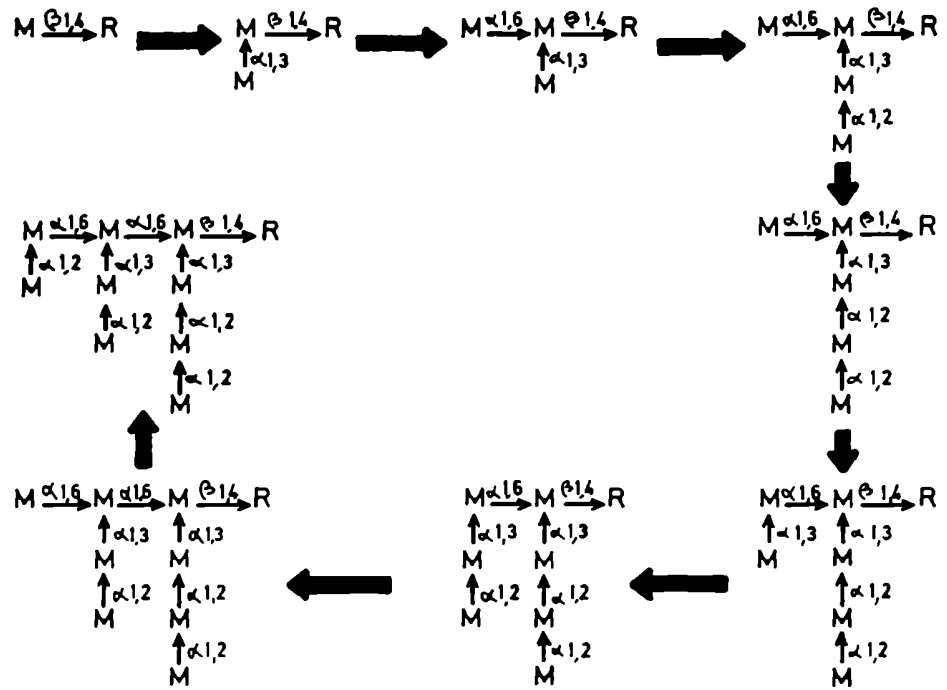


FIGURA 6: Orden de adición de restos de manosa en el ensamblaje de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.
 R: $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$; M: manosa.

muchas otras no mencionadas aquí, Hirschberg y Snider (54) han propuesto el modelo que aparece en la Fig. 7 acerca de la topología de la N-glicosilación en el retículo endoplásmico.

Resumidamente:

- la síntesis de Dol-P-P-GlcNAc₂ podría tener lugar tanto en la faz citoplasmática (Ia en Fig. 7) como en la luminal (Ib) de acuerdo a diferentes evidencias experimentales;
- la adición de los primeros cinco residuos de manosa (II) ocurriría en la faz citoplasmática del retículo, dado que el GDP-Man dador no pasaría al lumen del RE;
- el Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ sintetizado del lado citoplasmático haría un flip-flop en la membrana, exponiéndose entonces hacia el lumen del retículo;
- el Dol-P-Man sustrato para la entrada de los cuatro residuos de manosa restantes sería sintetizado en la faz citoplasmática y luego sufriría un flip-flop (III);
- el Dol-P-Man luminal cedería entonces cuatro restos de manosa al Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅, también en la faz luminal, produciendo Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉ (IV);
- el Dol-P-Glc, dador de restos glucosilo, podría sintetizarse tanto sobre la faz luminal como sobre la faz citoplasmática (V a y b), dado que el UDP-Glc es capaz de penetrar al lumen del RER;
- residuos glucosilo provenientes de Dol-P-Glc serían cedidos al Dol-P-P-oligosacárido probablemente sobre la cara luminal (VI) para formar Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃, que finalmente transferiría el oligosacárido a una proteína aceptora en el lumen (VII).

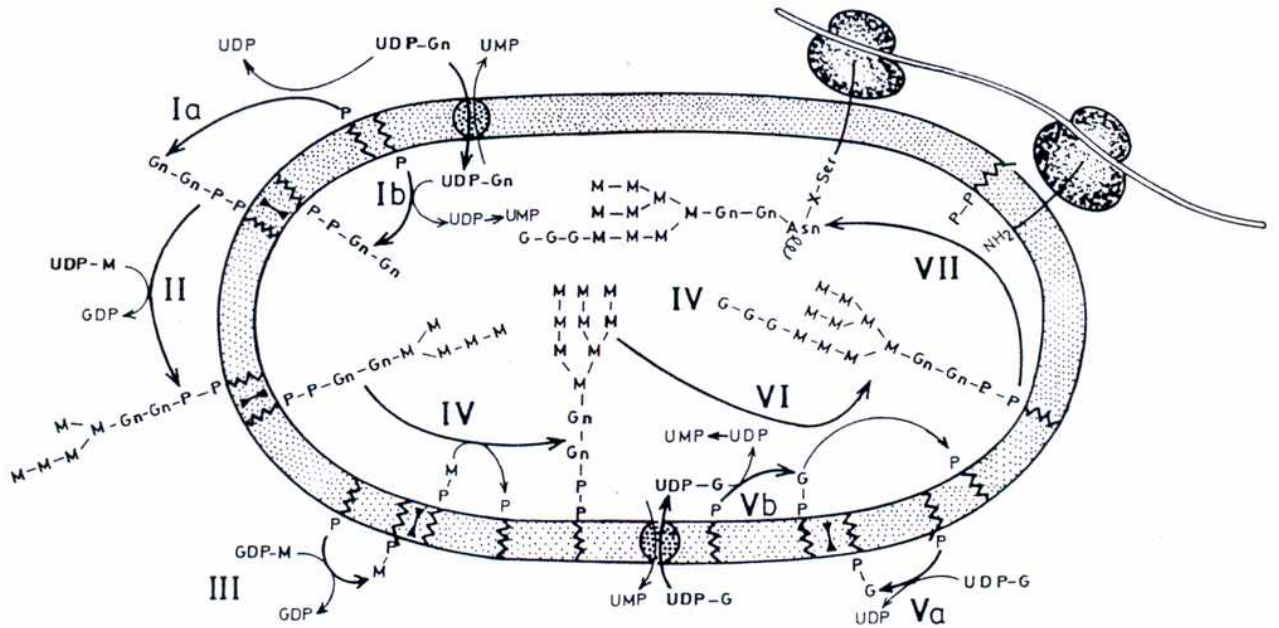





FIGURA 7: Topología de la N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso. Modelo de Hirschberg y Snider (54).

P : Dol-P; P-P : Dol-P-P; : translocasa; M: manosa; G: glucosa; Gn: N-acetilglucosamina.

Para concluir, el ciclo del dolicol tal como se ha detallado en esta sección es considerado universal entre los eucariotes, dado que ha sido descrito en una gran cantidad de organismos (13) sin diferencias significativas. Es más, se ha sugerido que el mecanismo de glicosilación de proteínas vía ciclo del dolicol debe haberse adquirido tempranamente en la evolución y que sería característico de toda célula eucariótica actual (55).

Varias o todas las reacciones del ciclo del dolicol han sido descritas en ciertos eucariotes inferiores: S. cerevisiae (11), los hongos Neurospora crassa (56), Aspergillus niger (57) y Mucor rouxii (58), el hongo mucilaginoso Dictyostelium discoideum (59), y en los protozoarios Tetrahymena pyriformis (60,61) y Volvox carteri (62).

Evidencias obtenidas en nuestro laboratorio acerca del mecanismo de glicosilación de proteínas en tripanosomátidos (ver sección I.10.) llevaron a especular que estos organismos podrían configurar una suerte de "mutantes naturales" de la N-glicosilación de proteínas (63) probablemente causada por una deficiencia en el ciclo del dolicol. En este trabajo de tesis se presentan evidencias que sustentarían este concepto, si bien esta no es la única hipótesis que permitiría explicar las peculiaridades observadas en el mecanismo de glicosilación de proteínas en los tripanosomátidos.

I.5. Procesamiento de glicoproteínas tipo asparagina

Una vez transferido el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a la proteína, éste sufre un rápido procesamiento que conduce a la aparición de los diferentes tipos de glicoproteínas en lo que al resto sacarídico se refiere (ver sección I.1.).

En la Fig. 8 se esquematizan las principales reacciones del procesamiento tal como se las ha estudiado en células de mamíferos; las mismas se resumen a continuación. El primer evento en el procesamiento (Fig. 8-2) consiste en la remoción de tres residuos de glucosa del oligosacárido, catalizada por dos α -glucosidasas del RER (64,65): la α -1,2 glucosidasa I remueve el residuo terminal y la α -1,3 glucosidasa II remueve los dos restos de glucosa internos. Comienza luego la remoción de restos de manosa unidos por enlaces α -1,2 (Fig. 8-3a). La primera α -1,2 manosidasa está localizada en el RER y escinde al menos un residuo de manosa. A continuación, los oligosacáridos de alta manosa pueden seguir procesándose por la acción de la α -1,2 manosidasa I del aparato de Golgi (66-68); por pérdida de hasta cuatro residuos de manosa se originan los diferentes oligosacáridos tipo alta manosa. Los oligosacáridos destinados a tener una estructura tipo compleja son demanosilados por la misma enzima hasta producir $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$; este oligosacárido no puede seguir su procesamiento a menos que se le adicione previamente un resto de N-acetilglucosamina catalizado por la N-acetilglucosaminiltransferasa I (69,70) (Fig. 8-4a). Recién entonces la manosidasa II del Golgi puede remover otros dos residuos de manosa con enlaces α -1,3 y α -1,6, dando como producto $\text{GlcNAc-Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 8-5). Posteriormente se produce la adición secuencial de restos de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico (Fig. 8-6 al 8-9) directamente a partir de los nucleótido-azúcares correspondientes. Después de la adición de un residuo de N-acetilglucosamina puede producirse la transferencia de un resto de fucosa al residuo más interno de N-acetilglucosamina (Fig. 8-7).

A diferencia de lo que ocurre durante la adición "in vivo" de restos de manosa al $\text{Dol-P-P-oligosacárido}$, la remoción de dichos restos en las gli-

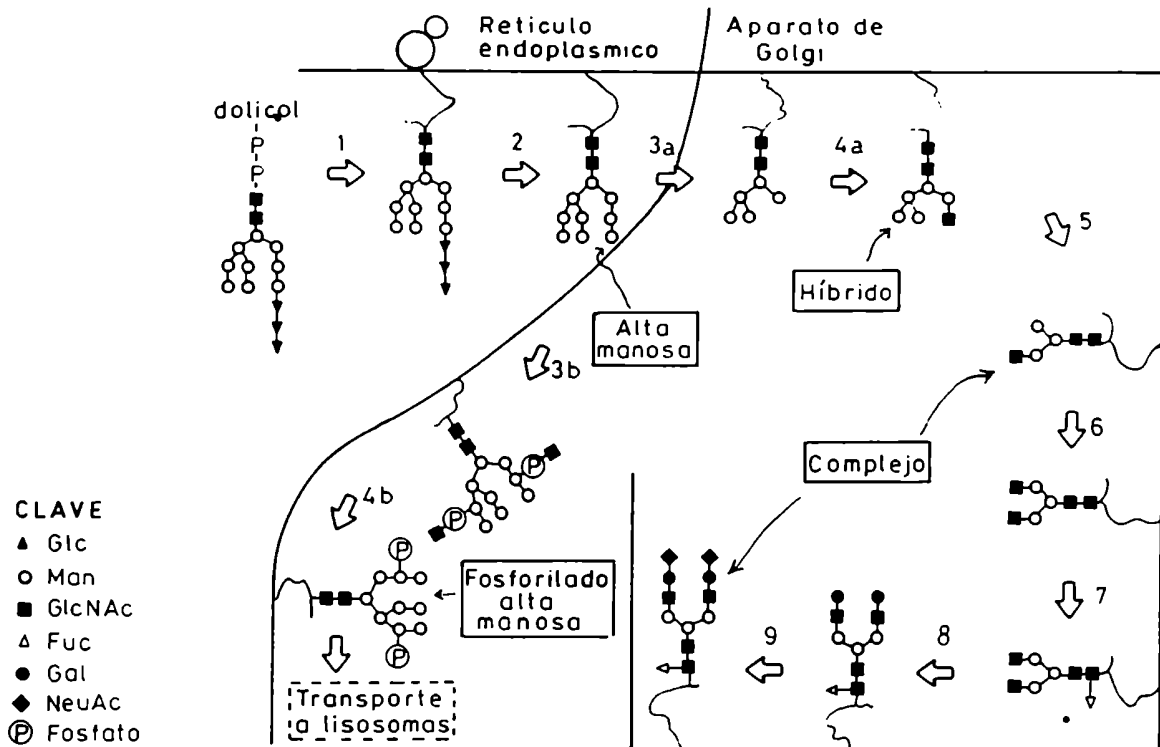


FIGURA 8: Procesamiento de glicoproteínas tipo asparagina.

coproteínas no sigue un orden preciso, si bien existe un orden más frecuente que se esquematiza en la Fig. 9. De tal manera, si se compara con la Fig. 6, se observa que la estructura de los productos del procesamiento con menos de nueve unidades de manosa puede ser distinta que la de los compuestos del mismo tamaño intermediarios en la síntesis de $\text{Glc}_3\text{MangGlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Este hecho permitirá interpretar varios resultados presentados en esta tesis.

Los factores que determinan el grado de procesamiento que sufrirá cada glicoproteína o cada sitio de glicosilación no se conocen con certeza, pero existen ciertos indicios. En principio, un factor determinante es la localización subcelular de la proteína en cuestión. De tal manera, las glicoproteínas que no salen del RER evidentemente no serán procesadas por enzimas del aparato de Golgi (71). El procesamiento de oligosacáridos de proteínas que pasan al aparato de Golgi estaría sometido a varios controles, siendo dos los más conocidos: a) la localización específica de las enzimas procesadoras y, b) la estructura de la cadena polipeptídica. Estos dos niveles de control se detallan a continuación.

a) Localización de las enzimas: la localización específica de las enzimas procesadoras provee un mecanismo de control en el espacio y en el tiempo. En 1983 Griffith y col. basados en las evidencias experimentales obtenidas acerca del transporte intracelular de proteínas virales, sugirieron que el complejo de Golgi podía dividirse en tres compartimentos funcionales (72,73). Se asumió que estos tres compartimentos, denominados cis (en contacto con el RER), medio y trans (el más distal), presentaban diferentes baterías enzimáticas. Las primeras evidencias al respecto indicaban un movimiento vectorial (de cis a trans) de las glicoproteínas de membrana del virus Semliki Forest y la construcción de estructuras tipo complejo en las cisternas trans

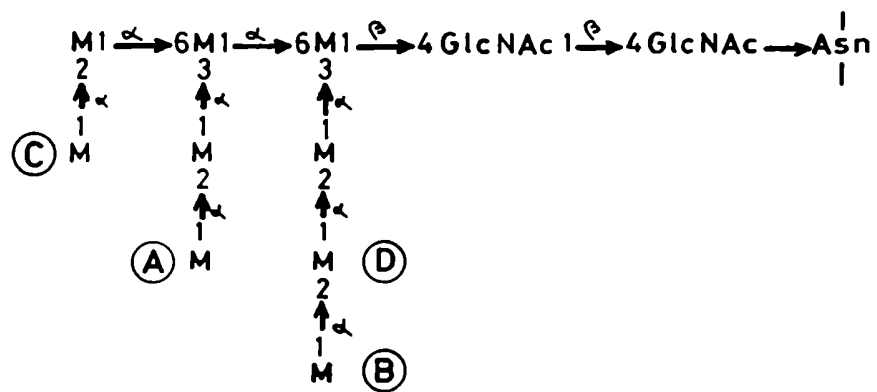


FIGURA 9: Orden de remoción de restos de manosa del oligosacárido $MangGlcNAc_2$ unido a proteína. Las letras indican, en orden alfabético, la secuencia más frecuente de remoción de restos de manosa en células de mamífero. Con menor frecuencia el orden puede ser: B, C, D y A.

del aparato de Golgi (74). Los tres compartimentos ya han sido detectados por técnicas citoquímicas. Otros grupos determinaron que las enzimas procesadoras tienen una distribución precisa en las cisternas del Golgi, que concuerda con la secuencia de procesamiento. Así, por varios métodos se ha demostrado que la galactosiltransferasa está localizada en las cisternas trans del Golgi en células humanas (75) y la N-acetilglucosaminiltransferasa I en las cisternas del Golgi medio (76). Se ha definido la localización subcelular de muchas otras enzimas involucradas en el procesamiento y en todos los casos coincide con la ubicación esperada de acuerdo a su función (5).

b) Estructura de la cadena polipeptídica: se observó que la incorporación de análogos de leucina e isoleucina en la cadena liviana de una inmunoglobulina sintetizada por células MOPC-46B evita el procesamiento normal de la misma (77). Este resultado indica que la estructura de la proteína influencia el procesamiento que sufrirá el oligosacárido. Evidencias en el mismo sentido fueron obtenidas mediante el empleo de la enzima endo-H, utilizada habitualmente en el estudio de glicoproteínas por su capacidad de romper la unión β -1,4 entre dos restos de N-acetilglucosamina en glicoproteínas de alta manosa. Virus Sindbis, que normalmente poseen dos glicoproteínas, cada una de las cuales posee dos oligosacáridos, uno de tipo alta manosa y el otro de tipo complejo, fueron crecidos en una mutante celular incapaz de formar oligosacáridos complejos (ausencia de N-acetilglucosaminiltransferasa I). De esta manera los dos oligosacáridos en ambas glicoproteínas virales resultaron ser de tipo alta manosa, esto es, totalmente atacables por endo-H en glicopéptidos obtenidos por proteólisis de las glicoproteínas. Sin embargo, al hacer actuar la enzima endo-H sobre los viriones intactos, sólo aquellos oligosacáridos que en células de tipo salvaje son procesados hasta tipo complejo

resultaron ser atacados por la glicosidasa. Esto indica que dichos oligosacáridos estaban más expuestos que los que permanecen normalmente como alta manosa. Se asume, por lo tanto, que los oligosacáridos más expuestos a las enzimas procesadoras son los que terminan su transformación como oligosacáridos complejos (78).

Como se mencionó anteriormente, sólo existen indicios acerca del mecanismo de control del procesamiento, por lo que aún no se encuentra explicación a varios fenómenos observados. Por ejemplo, Strous y Lodish estudiaron la biosíntesis de transferrina (glicoproteína de secreción con oligosacáridos tipo complejo) en hepatocitos y la de glicoproteínas de la membrana del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Esos estudios mostraron que en presencia del ionóforo monensina que afecta la función del Golgi la transferrina se secreta con oligosacáridos de alta manosa y las glicoproteínas del VSV tienen una estructura de tipo complejo (79). Estos y otros resultados indican que habría más de una ruta intracelular para la biosíntesis de glicoproteínas con oligosacáridos tipo complejo.

Una vez procesadas las glicoproteínas dejan el aparato de Golgi para dirigirse a sus destinos finales. Así, las glicoproteínas de membrana plasmática y las de secreción son transportadas a la superficie celular a través del sistema de endomembranas. En cambio las glicoproteínas destinadas a ser enzimas lisosomales siguen una ruta que las caracteriza. Esta comienza probablemente en el cis Golgi donde se produce la fosforilación de residuos de manosa catalizada por dos enzimas: la N-acetilglucosaminilfosfotransferasa y la N-acetilglucosamina-1-fosfodiesterasa-N-acetilglucosaminidasa (80,81). La primera enzima cataliza la transferencia de un resto de N-acetilglucosamina-fosfato de UDP-GlcNAc a un resto de manosa en oligosacáridos de alta manosa (Fig. 8-3 b) y la segunda remueve la N-acetilglucosamina para exponer la manosa fosforilada (Fig. 8-4 b). Los restos de N-acetilglucosamina-fosfato pueden ser transferidos a cinco restos de manosa diferentes y un mismo oligosacárido puede tener más de una manosa-6-fosfato.

Los residuos manosilfosfato en oligosacáridos de alta manosa actúan como señal de reconocimiento específico de las enzimas lisosomales y determinan su transporte a los lisosomas (80). Existen receptores en la membrana del aparato de Golgi que reconocen la señal de Man-6-P. Estos se unen a las glicoproteínas que llevan la señal y las vesículas que contienen los complejos formados se fusionan con la membrana lisosomal. A continuación se disocian los complejos receptor-enzima lisosomal y estas últimas son liberadas en el lumen del lisosoma (82).

No se conocen con precisión los factores que determinan que uno o más restos de manosa en una determinada glicoproteína sean convertidos en señales de manosa-fosfato. Los resultados actuales sugieren que la N-acetilglucosaminilfosfotransferasa reconocería una secuencia de aminoácidos específica en la

proteína que sería común a todas las enzimas lisosomales y que estaría ausente en el resto de las glicoproteínas (83,84).

La ruta de procesamiento que siguen las manoproteínas de S. cerevisiae es diferente a las expuestas. El oligosacárido transferido es deglucosilado por la acción de las α -glucosidasas I y II y luego una α -1,2 manosidasa del RE remueve un resto de manosa (Fig. 10). El oligosacárido $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ así formado es elongado en el aparato de Golgi, donde una serie de manosiltransferasas introducen residuos de manosa directamente a partir de GDP-Man para completar la cadena interna y sintetizar la externa (42,25).

I.6. Glucosilación transitoria de glicoproteínas

Otras reacciones de procesamiento de glicoproteínas fueron descritas por Parodi y col. inicialmente en Trypanosoma cruzi (85-86) y luego observadas en hígado de rata y semillas de Phaseolus vulgaris (87), tiroides de ternera (88) y varios tripanosomátidos cuyos casos particulares se presentan más adelante. Estas reacciones de procesamiento consisten en la glucosilación transitoria de oligosacáridos de alta manosa, actuando como dador de restos glucosilo el UDP-Glc (87). Los productos glucosilados que se detectan habitualmente al incubar células de mamífero con (^{14}C)glucosa por períodos muy cortos son: $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y en ciertos casos $\text{Glc}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. En principio se pensó que estos compuestos podían provenir de la demanosilación de oligosacáridos glucosilados unidos a proteína. Sin embargo, las evidencias experimentales indican que las formas glucosiladas aparecerían por glucosilación de los oligosacáridos demanosilados formados por procesamiento (87). Estas formas se consideran transitorias dado

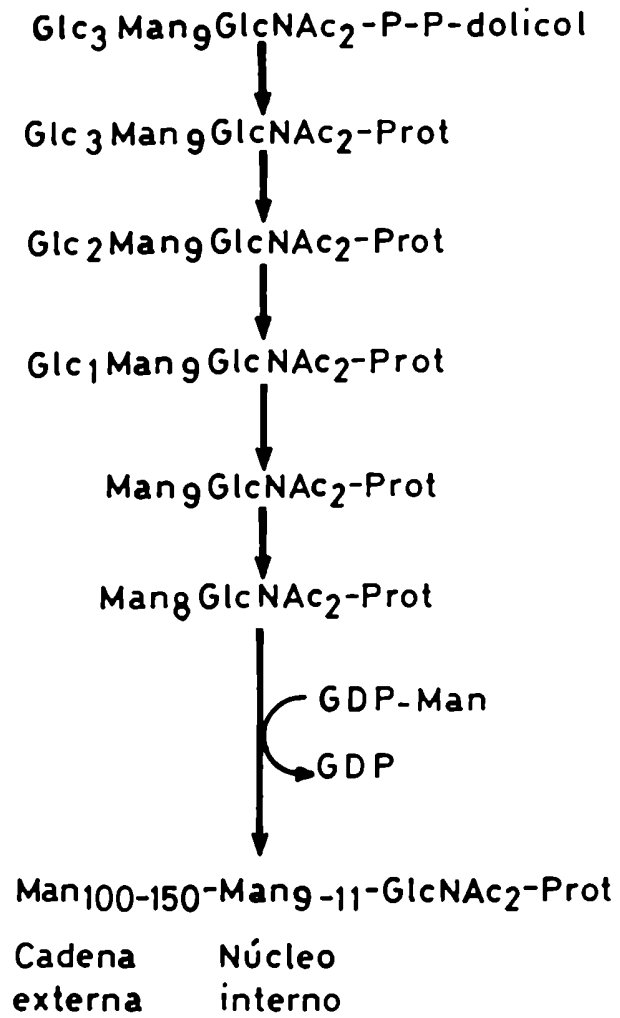


FIGURA 10: Glicosilación de residuos de asparagina y procesamiento en manoproteínas de S. cerevisiae.

que sólo se observan a tiempos cortos de marcación con (^{14}C)glucosa y desaparecen al realizar un "chase".

En la Fig. 11 se presenta un esquema del mecanismo de glucosilación transitoria de oligosacáridos de alta manosa en glicoproteínas de mamíferos (88).

La glucosilación transitoria de glicoproteínas tendría lugar en el retículo endoplásmico liso y rugoso (87). Esta localización es la misma que la descrita para las glucosidasas y una α -1,2 manosidasa que intervienen en el procesamiento (64-66). En base a estos hechos Parodi especuló que la función de la glucosilación transitoria podría ser proteger a los oligosacáridos unidos a proteína de una excesiva degradación en el retículo endoplásmico (87). Hasta el momento no han surgido nuevas evidencias que permitan verificar o descartar esta hipótesis.

I.7. Funciones de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas

En los últimos años se ha acumulado una cantidad tal de información sobre las funciones que desempeña la porción sacarídica de las glicoproteínas que hace imposible su tratamiento en extenso. Es por eso que aquí se ha optado por presentar algunos pocos ejemplos bien conocidos que proveen una noción general del tema. Para mayor detalle se refiere al lector a las revisiones publicadas (2,89,90).

Se pueden atribuir dos propiedades principales a los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas, que son las que determinan una inmensa variedad de funciones. Estas dos propiedades que se discutirán a continuación son: a) la capacidad de actuar como señal de reconocimiento y, b) la de influenciar las propiedades físico-químicas de las proteínas.

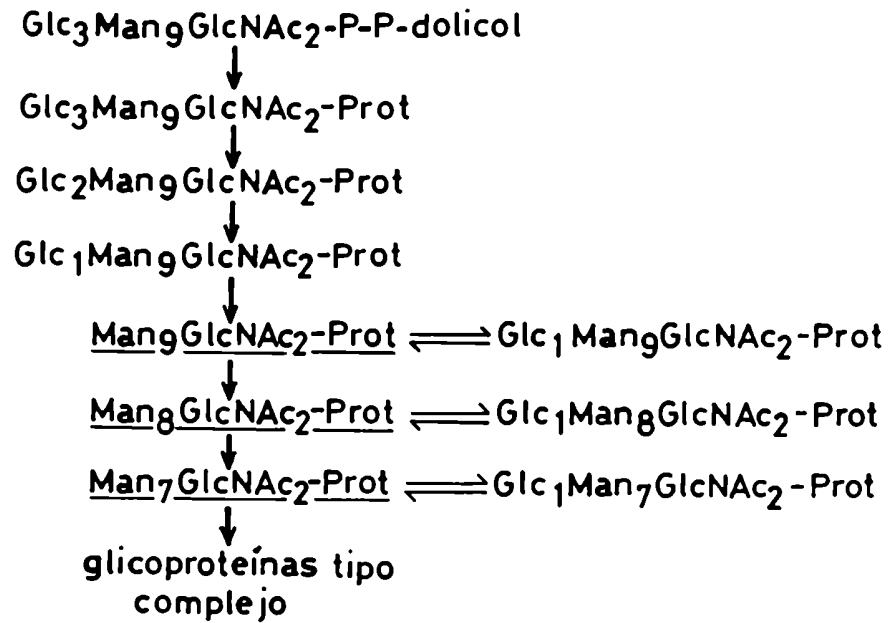


FIGURA 11: Glucosilación transitoria de glicoproteínas de alta manosa en células de mamífero. Los oligosacáridos subrayados son los que se encuentran en glicoproteínas maduras.

a) Señal de reconocimiento: en muchos casos se ha demostrado que un azúcar o una secuencia sacarídica que actúa como marcador biológico interactúa con proteínas que reconocen esa señal, desencadenando una respuesta específica (2). Por ejemplo, proteínas del plasma que llevan un residuo de galactosa terminal (expuesto) son reconocidas por un receptor de hepatocitos de mamífero, específico para galactosa, y son sacadas de la circulación. Otro ejemplo bien conocido es el que involucra el reconocimiento de un residuo de manosa-6-fosfato en las enzimas lisosomales por parte de receptores del aparato de Golgi que determina que sean conducidas hacia los lisosomas (ver sección 1.5.).

Finalmente también se asigna a los oligosacáridos una función en el reconocimiento célula-célula. Así, la diferenciación de Dictyostelium discoideum involucra una asociación de células que es mediada por la interacción entre proteínas tipo lectina en una célula y un resto de oligosacárido en otra célula.

b) Influencia sobre propiedades físico-químicas: la incorporación de un resto de oligosacárido en una proteína provoca cambios en su carga, tamaño e hidrofobicidad; estos cambios a su vez suelen modificar ciertas propiedades de las proteínas, fundamentalmente su estructura terciaria, solubilidad y viscosidad. A continuación se citan algunos ejemplos en relación a este tema:

- Se considera que los restos de ácido siálico con sus grupos carboxilo disociados son los responsables de la alta viscosidad de varias mucinas de saliva y de mucus cervical e intestinal (2).
- Anticuerpos monoclonales preparados contra proteínas deglicosiladas de la cubierta del virus Semliki Forest no reconocen a las mismas proteínas gli-

cosiladas, sugiriendo que se produjo un cambio conformacional por glicosilación de la proteína (89).

- El carbohidrato protegería a las glicoproteínas contra la proteólisis; la invertasa, fibronectina y deoxirribonucleasa son más sensibles a proteasas cuando no están glicosiladas (90). Sin embargo, en estos tres casos la presencia del oligosacárido parece no ser indispensable para desempeñar su actividad biológica (89).
- La actividad de las glicoproteínas anticongelantes de peces antárticos depende de la integridad de unidades de disacárido que forman puentes de hidrógeno con moléculas de agua, evitando así el crecimiento de los cristales de hielo (2).
- La invertasa de levadura es más sensible a la desnaturalización por pH o calor cuando no está glicosilada (89).

De este apretado resumen acerca de las propiedades de los oligosacáridos presentes en glicoproteínas se desprende la diversidad de funciones que pueden desempeñar.

1.8. Ubicación sistemática y biología de *Euglena gracilis* y tripanosomátidos

Los organismos que han sido objeto de estudio en el presente trabajo, *Euglena gracilis* y varios tripanosomátidos, pertenecen al Subreino Protozoa. En primer lugar se presenta la ubicación sistemática de estos protozoarios (91).

Phylum SARCOMASTIGOPHORA

Subphylum MASTIGOPHORA

Clase 1 Phytomastigophorea

Orden 3 Euglenida

Suborden 2 Euglenina

Géneros: Euglena y otros

Clase 2 Zoomastigophorea

Orden 2 Kinetoplastida

Suborden 2 Trypanosomatina

Fam Trypanosomatidae

Géneros: Trypanosoma, Herpetomonas, Leptomonas, Criethidia, Leishmania, Blastocrithidia y otros.

Euglena ha sido un enigma para muchos biólogos dado que presenta características animales y vegetales. A pesar de las controversias taxonómicas generadas, la clasificación que acaba de citarse es universalmente aceptada. Euglena es un protista de vida libre que cubre infinidad de nichos ecológicos y habitats, que van de medios anaeróbicos a aguas tropicales, ácidas o alcalinas. Las características más destacadas del género Euglena (92) son: a) la presencia de cloroplastos, de diferentes formas y número, cuando crece en un medio luminoso y, b) dos flagelos, uno muy móvil que emerge de la invaginación celular, y otro no emergente (Fig. 12 a).

Los organismos de la Fam. Trypanosomatidae, a los que nos referiremos como tripanosomátidos, son todos parásitos, si bien algunas formas pueden ser cultivadas axenicamente. Se caracterizan por la presencia de un único flagelo que puede estar libre o unido al cuerpo celular formando una membrana ondulante; poseen una estructura celular, el kinetoplasto, que caracteriza al Orden al cual pertenecen (91). El kinetoplasto es una región especializada de

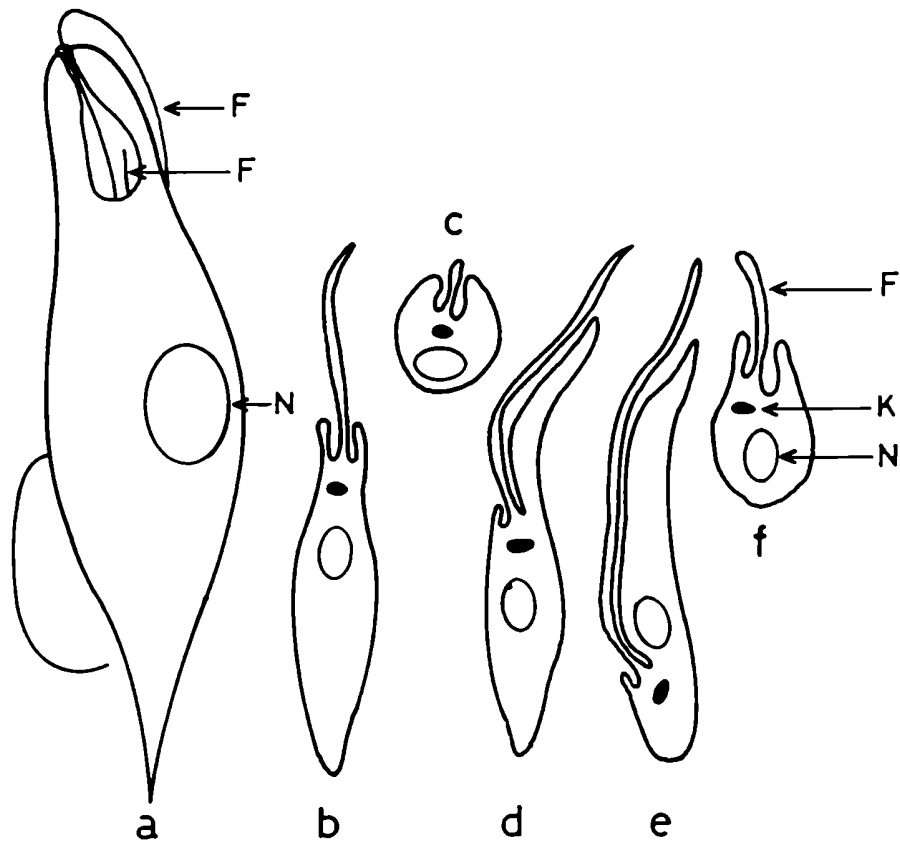


FIGURA 12: Diferentes morfologías y estadios de desarrollo en Euglena gracilis y tripanosomátidos.

a: forma libre de E. gracilis

b: promastigote de tripanosomátidos (ej.: forma infectiva de L. enriettii)

c: amastigote de tripanosomátidos (ej.: forma intracelular de T. cruzi y L. enriettii)

d: epimastigote de tripanosomátidos (ej.: B. culicis y formas de cultivo de T. cruzi)

e: tripomastigote de tripanosomátidos (ej.: forma infectiva de T. cruzi)

f: coanmastigote de tripanosomátidos (ej.: C. fasciculata)

F= flagelo; N= núcleo; K= kinetoplasto.

la única mitocondria que presentan los Kinetoplastida. Este se ubica en la base del flagelo y se caracteriza por su alto contenido de DNA (alrededor del 20% del DNA total, variando según la especie) (93).

Dado que uno de los temas que nos ocupa aquí es el mecanismo de glicosilación de proteínas en tripanosomátidos, sería interesante conocer las características funcionales del sistema de endomembranas de estos organismos. Sin embargo, los datos bibliográficos sólo apuntan a aspectos morfológicos, donde se destaca la presencia de una cisterna de retículo endoplásmico muy prominente y en estrecho contacto con el aparato de Golgi que se localiza en la parte anterior del cuerpo, entre el núcleo y el kinetoplasto (94).

A continuación se presentan someramente algunos rasgos de los tripanosomátidos estudiados en esta tesis. Trypanosoma y Leishmania son parásitos típicos de vertebrados, pero además cumplen parte de su ciclo de vida en ciertos artrópodos. A estos parásitos se los llama digenéticos por alternar entre dos hospedadores: un artrópodo vector y un vertebrado (95). Crithidia y Blastocrithidia, en cambio, son parásitos exclusivamente de invertebrados, principalmente insectos. Dado que desarrollan todo su ciclo en un único hospedador se los denomina tripanosomátidos monogenéticos. A estos organismos también se los reúne bajo el nombre de "triplanosomátidos de hospedadores inferiores" o "triplanosomátidos inferiores" (95).

Los parásitos monogenéticos se transmiten de un artrópodo a otro por ingestión de la materia fecal de un hospedador infectado. Una vez producida la infección los parásitos se alojan normalmente en el lumen del intestino del hospedador. Los insectos hospedadores más habituales de los tripanosomátidos inferiores estudiados en esta tesis son: los mosquitos Anopheles sp y Culex sp para Crithidia fasciculata, y Culex pipens y Aedes vexans para

Blastocrithidia culicis.

En lo que se refiere a Trypanosoma y Leishmania, los ciclos de vida y transmisión son más complejos por el hecho de ser digenéticos. Los vectores de Trypanosoma cruzi son la vinchuca (Triatoma infestans) y otros Triatominae (96); los de Leishmania enriettii son tábanos, principalmente Lutzomejia monticola (97). El hospedador vertebrado más habitual descrito para L. enriettii es el conejillo de las Indias, y se sabe que es incapaz de producir infección en el hombre (97). En cuanto a T. cruzi el panorama es más complicado dado que tiene un amplio rango de hospedadores. Desde el punto de vista socio-económico el principal hospedador es el hombre, dado que su infección produce la enfermedad de Chagas. Antes de describir el ciclo de vida de T. cruzi se describirán brevemente las distintas formas del parásito que se encuentran en la naturaleza.

Los cambios morfológicos que se operan durante el ciclo de vida de los tripanosomátidos involucran una variación en la posición del complejo flagelo-kinetoplasto con respecto al núcleo y al extremo anterior del parásito (98). En la Fig. 12b-f se han esquematizado las diferentes formas de T. cruzi y las correspondientes al resto de los tripanosomátidos estudiados en esta tesis. Puede verse que los amastigotes de T. cruzi, que según su nombre carecerían de flagelo, en realidad poseen un flagelo corto que no podía ser detectado por microscopía óptica. Debido a la presencia de ese flagelo varios autores prefieren llamar esferomastigote a la forma amastigote.

Es importante destacar que las diversas morfologías detectadas en T. cruzi son un reflejo de cambios más importantes en su comportamiento. Así, mientras los tripomastigotes son infectivos e incapaces de dividirse, los amastigotes intracelulares son formas replicativas y no infectivas. La forma

epimastigote que se encuentra en el intestino del invertebrado vector también es capaz de dividirse.

En cultivo axénico pueden obtenerse formas epimastigote, tripomastigote y amastigote. Sin embargo, y especialmente en el caso de los amastigotes que naturalmente son intracelulares, el hecho de tener la misma morfología no implica necesariamente que su metabolismo sea idéntico al de los parásitos encontrados en ciclos naturales. En el capítulo VII se presentan evidencias que concuerdan con esta aseveración.

En la Fig. 13 se presenta el ciclo de vida de T. cruzi en la vinchuca y en el hombre (94,96). El ciclo puede resumirse en las siguientes etapas:

- I : La vinchuca puede infectarse al chupar sangre de un hombre enfermo que lleva tripomastigotes. En el estómago del invertebrado los tripomastigotes se transforman en epimastigotes;
- II : luego, por sucesivas divisiones celulares en el intestino de la vinchuca, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados en las heces;
- III: cuando la vinchuca pica al hombre en el mismo momento defeca y deja las heces contaminadas con tripomastigotes. Estos entran en la circulación, penetran en las células hospedadoras y se transforman en amastigotes;
- IV : los amastigotes intracelulares se dividen y se diferencian a tripomastigotes que, luego de lisis la célula hospedadora, nuevamente entran al torrente sanguíneo (IVa). Los tripomastigotes sanguíneos pueden colonizar nuevas células donde se transforman en amastigotes (IVb);
- I : el ciclo se reinicia cuando los tripomastigotes reinfectan al vector.

Finalmente, se han descripto diferencias significativas en ciertos parámetros biológicos en células de T. cruzi clonadas de diversas cepas. Las

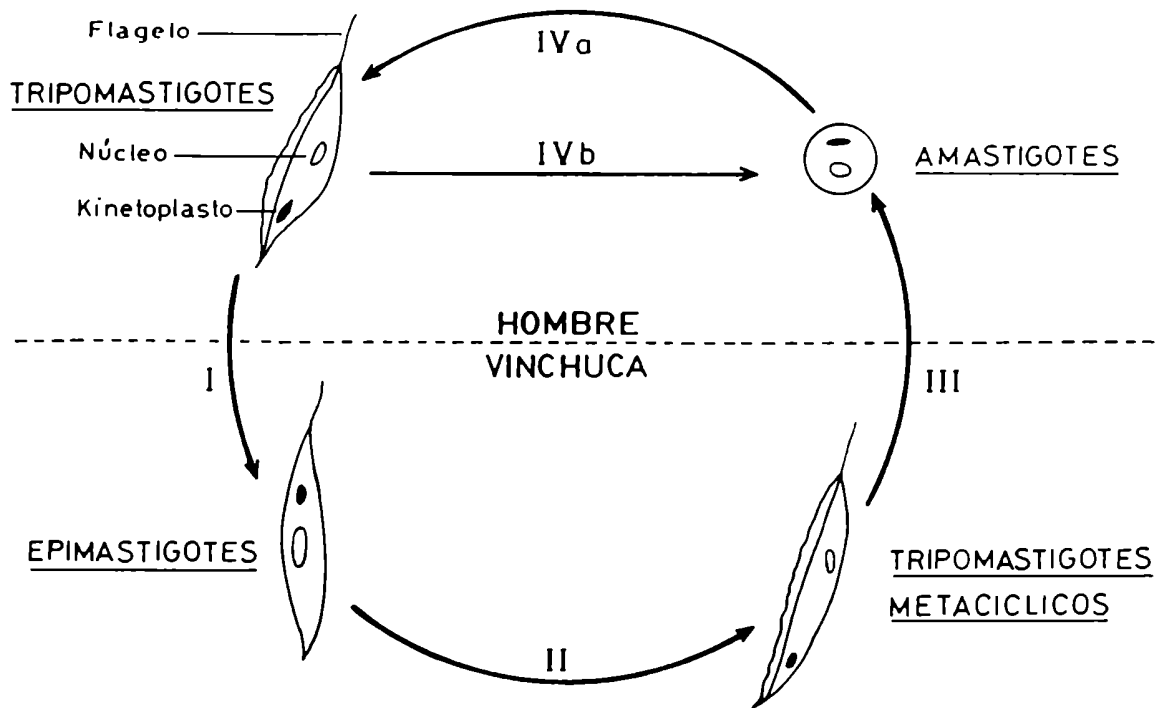


FIGURA 13: Ciclo de vida doméstico de T. cruzi.

principales diferencias se observan en: contenido de DNA por célula, infectividad "in vivo" e "in vitro", composición antigénica y velocidad de crecimiento (99). Por esa razón en los ensayos realizados con T. cruzi que se presentan en esta tesis se cita el clon utilizado, dado que no se puede asegurar que otro clon tenga el mismo comportamiento.

I.9. Estudios sobre glicoproteínas en E. gracilis y tripanosomátidos

La literatura es muy escasa en lo referente al estudio de glicoproteínas de E. gracilis. En cambio, el papel de las glicoproteínas en la diferenciación y capacidad de penetración en células hospedadoras ha sido muy estudiado en tripanosomátidos.

Se han presentado evidencias de que las glicoproteínas tipo asparagina estarían involucradas en el proceso de adhesión y penetración de T. cruzi en células de mamífero y se considera que son los principales antígenos de superficie. Trabajos de Piras y col. (100) mostraron que la incubación de tripomastigotes con tunicamicina, en concentraciones que inhiben levemente la incorporación de manosa a glicoproteínas, es capaz de aumentar dos veces la adhesión de los parásitos a fibroblastos de ratón al tiempo que disminuye notablemente la penetración de los parásitos a las células. También se ha mostrado que la incubación de tripomastigotes y amastigotes con α -manosidasa provoca un aumento en la adhesión de los parásitos a células en cultivo (101).

Dada la importancia socio-económica de la enfermedad de Chagas, muchos grupos de investigación intentan identificar glicoproteínas antigénicas específicas de la forma infectiva de T. cruzi (tripomastigote) con la idea de

obtener vacunas y anticuerpos monoclonales. La principal estrategia utilizada ha sido la caracterización mediante el uso de lectinas y electroforesis en geles de poliacrilamida. Existen en la literatura gran cantidad de publicaciones al respecto, pero su interpretación se hace difícil debido a la diversidad de cepas utilizadas y a la falta de resolución de los métodos empleados (94). Las primeras evidencias más claras acerca de la existencia de glicoproteínas con propiedades antigénicas específicas de diferentes estadios de T. cruzi fueron dadas por los grupos de Cohn (102) y Colli (103). La incorporación de electroforesis bidimensionales aportó nuevos datos sobre el tema y actualmente se considera que una glicoproteína de superficie aislada de tripomastigotes, de 85 KD (proteína Tc-85), sería específica de ese estadio y sería necesaria para una eficiente internalización de los parásitos en las células de mamífero (104). Esta glicoproteína se une a Concanavalina A y a la aglutinina de germen de trigo, y esta última unión no es afectada por tratamiento de las glicoproteínas con neuraminidasa (103). Estos resultados indican que el residuo responsable de la unión a la lectina sería N-acetilglucosamina y no un ácido siálico. También se mostró que la N-acetilglucosamina inhibe la internalización de ciertos clones de tripomastigotes en varias células en cultivo. Todas estas observaciones han llevado a especular que la proteína Tc-85 estaría involucrada en la interacción hospedador-parásito vía un receptor de N-acetilglucosamina presente en la superficie del hospedador (103). Recientemente se han clonado fragmentos de DNA genómico que codifican para una glicoproteína de la superficie de tripomastigotes de 85 KD, y es muy probable que se trate de la misma que estudia el grupo de Colli (105).

Por otra parte, Sher y Snary (106) han presentado evidencias según las

cuales un anticuerpo monoclonal específico para una glicoproteína de superficie de epimastigotes (y ausente en tripomastigotes) de peso molecular 72.000 es capaz de inhibir la transformación de epimastigotes a tripomastigotes "in vitro"; se ha postulado que esta molécula sería un receptor que controla la diferenciación del parásito (107).

I.10. N-glicosilación de proteínas en protozoarios de vida libre y parásitos

Hasta la década del 80 muy poco se conocía acerca del mecanismo de glicosilación de proteínas en protozoarios. Keenan (60,61) había descrito que preparaciones libres de células de Tetrahymena pyriformis incubadas con UDP-Glc catalizaban la síntesis de un glicolípido con propiedades idénticas a los derivados de Dol-P descritos en eucariotes superiores, que servía como dador de glucosa para la síntesis de otras sustancias glucosiladas tentativamente identificadas como un lípido-oligosacárido y glicoproteínas. Más tarde Müller (62) trabajando con extractos libres de células de Volvox carteri presentó resultados que indicarían que el oligosacárido de composición $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sería el transferido durante el proceso de N-glicosilación de proteínas en ese protozoario.

Simultáneamente Parodi y col. comenzaron a estudiar el mecanismo de glicosilación de proteínas tipo asparagina en protozoarios parásitos. En un primer trabajo (108) demostraron que C. fasciculata "in vivo" sintetizaba $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ como único derivado de Dol-P-P. Se demostró también que el oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ era transferido a proteínas. Estos resultados sugirieron por primera vez que la N-glicosilación de proteínas en un protozoario parásito no involucraba la transferencia de oligosacáridos glucosilados. La

Ausente del oligosacarido
 en: C.fasciculata, C.harmosa y T.cruzi (amastigotes axénicos)

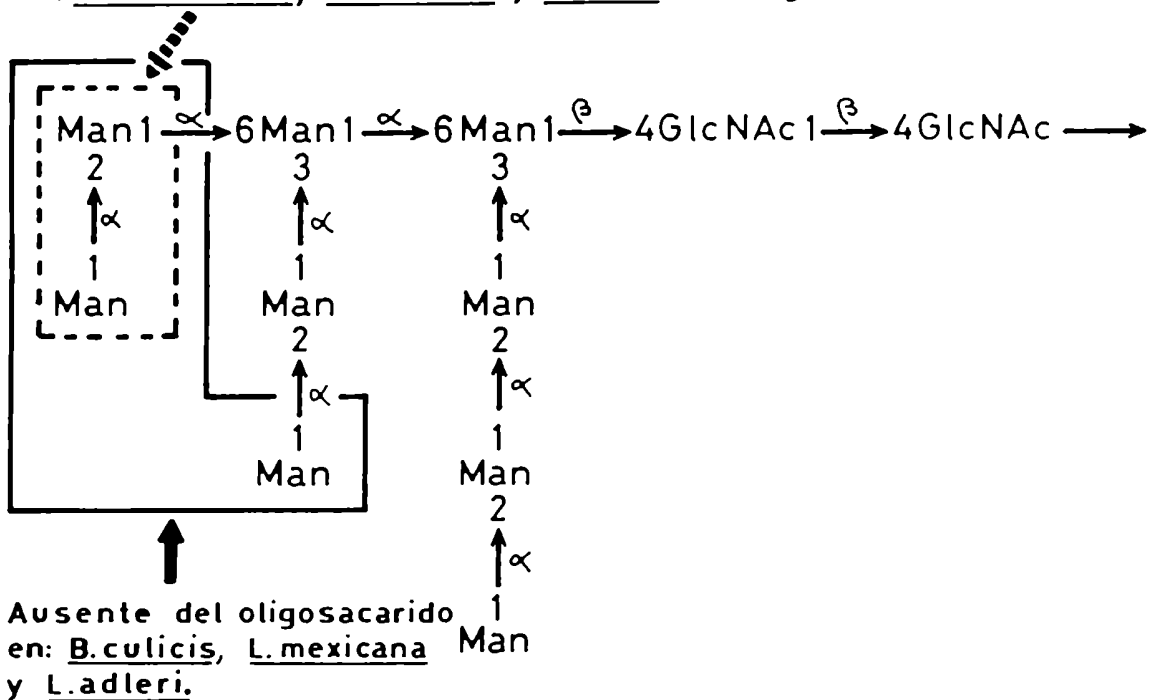


FIGURA 14: Estructuras de los oligosacáridos unidos a Dol-P-P de varios tripanosomátidos. La estructura completa de MangGlcNAc₂ corresponde a los compuestos encontrados en T. cruzi (epimastigotes de cultivo axénico), T. dionisii, T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpessoai y L. samueli. Los recuadros indican residuos de manosa ausentes en otros tripanosomátidos.

estructura del oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que sintetiza "in vivo" C. fasciculata como derivado de Dol-P-P ya ha sido determinada (108,109) (Fig. 14) resultando ser la misma que la del intermediario en la síntesis de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ en células de mamífero (ver Fig. 6).

En sucesivos trabajos se caracterizaron los oligosacáridos unidos a Dol-P-P y transferidos a proteínas en otros tripanosomátidos, resultando ser: $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ para epimastigotes de T. cruzi (85,86,110) y para Trypanosoma conorhini, Trypanosoma dionisii, Leptomonas samueli, Herpetomonas samuelpeossoi y Herpetomonas muscarum (111,112), $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ para Leishmania mexicana (113), Blastocrithidia culicis y Leishmania adleri (111,112), y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ para Crithidia hamosa (114). Las estructuras de estos oligosacáridos aparecen representadas en la Fig. 14. Puede observarse que en todos los tripanosomátidos que sintetizan derivados de Dol-P-P con menos de nueve residuos de manosa, la estructura del oligosacárido que acumulan es la misma que la del compuesto equivalente intermediario en la formación de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ en mamíferos (ver Fig. 6). Además, se destaca el hecho que todos los oligosacáridos transferidos a proteínas están desprovistos de residuos de glucosa. Estas peculiaridades observadas en el mecanismo de glicosilación de proteínas en tripanosomátidos serán objeto de estudio en la presente tesis.

Otras observaciones con respecto al mecanismo de glicosilación de proteínas en tripanosomátidos se señalan a continuación:

- Mientras que en epimastigotes de T. cruzi había sido demostrada la transferencia a proteínas de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (85,86) recientemente se determinó que la forma amastigote de cultivo axénico de clones CA-I sintetiza 4 a 5 veces más de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unidos a Dol-P-P y que transfiere a

proteínas ambos oligosacáridos (115). Durante la diferenciación "in vitro" de amastigotes axénicos a epimastigotes pudo confirmarse la existencia de este cambio en el mecanismo de N-glicosilación de proteínas al pasar de una forma a la otra. La estructura de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ transferido en amastigotes axénicos es la misma que la del oligosacárido sintetizado por C. fasciculata y que la del compuesto del mismo tamaño intermediario en el ciclo del dolicol en mamíferos (ver Fig. 14).

- Se ha detectado una nueva reacción en el procesamiento de glicoproteínas tipo asparagina. Consiste en la incorporación de residuos de galactosa en configuración furanósica, en extremos no reductores de oligosacáridos sensibles a endo-H. Estos restos de galactofuranosa han sido descritos en C. fasciculata y Crithidia harmosa (114), y en L. samueli y H. samuelpeessoai (112).
- La glucosilación transitoria de oligosacáridos de alta manosa descrita en la sección I.6. ha sido observada en T. cruzi (85,86,115), L. mexicana (113), en T. dionisii, T. conorhini, L. samueli, H. samuelpeessoai, B. culicis y L. adleri (112) y en C. fasciculata y C. harmosa (114). En la Fig. 15 se presenta un resumen acerca del mecanismo de glicosilación y procesamiento de glicoproteínas en los tripanosomátidos en los que se conoce.
- El tamaño de la porción lipídica de los Dol-P-monosacáridos sintetizados "in vivo" fue determinada para dos tripanosomátidos. En T. cruzi (110) fue estimada en 13 unidades de isopreno y en C. fasciculata (35) en 11 unidades.

Mayores detalles sobre el mecanismo de glicosilación de proteínas en tripanosomátidos serán presentados en la sección Antecedentes y Objetivos de cada capítulo de esta tesis.

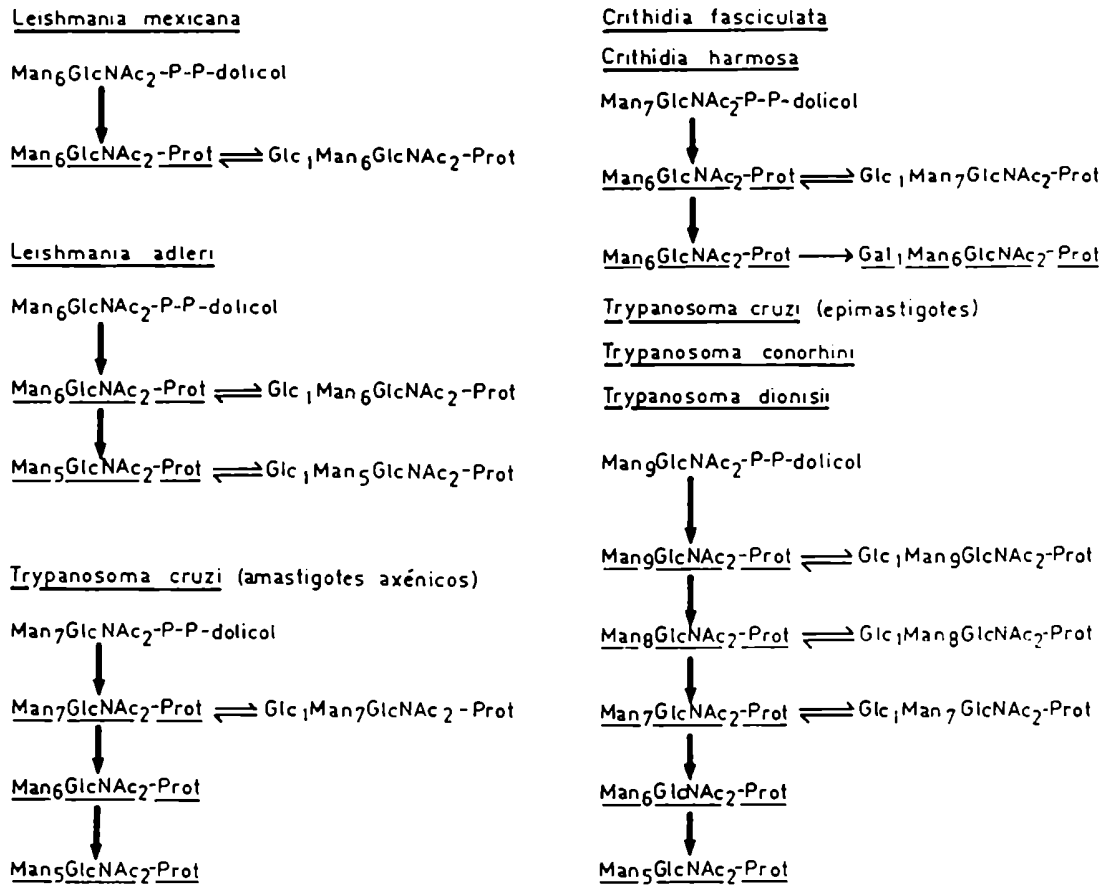


FIGURA 15: Mecanismo de N-glicosilación de proteínas y procesamiento de los oligosacáridos en tripanosomátidos.

Los oligosacáridos subrayados son los que se detectan en las glicoproteínas maduras. En epimastigotes de T. cruzi sólo se transfiere $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ mientras que en amastigotes obtenidos de medio axénico se transfieren $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (mecanismo de epimastigotes) y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

II.1. Materiales

II.1.1. Material radioactivo

La marcación de células de E. gracilis se realizó con (U-¹⁴C)glucosa (284.5 Ci/mol) de New England Nuclear. En las marcaciones de L. enriettii y T. cruzi se utilizó (U-¹⁴C)glucosa (325 Ci/mol) adquirida a American Radiolabeled Chemicals.

GDP-(¹⁴C)Man (216.5 Ci/mol) y UDP-(¹⁴C)Glc (285 Ci/mol) fueron preparados en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por S. Raffo y M. Bravo, según la técnica de Wright y Robbins (116) con algunas modificaciones.

II.1.2. Standards radioactivos

Man₇GlcNAc₂ y Man₉GlcNAc₂ se obtuvieron como derivados de Dol-P-P sintetizados "in vivo" por amastigotes de cultivo axénico de T. cruzi en presencia de (U-¹⁴C)glucosa (115).

Man₅₋₉GlcNAc se prepararon por incubación de cortes de oviducto de gallina con (U-¹⁴C)glucosa y tratamiento con endo-H de los glicopéptidos formados, previa incubación de las proteínas totales con proteasa (21).

Man₂, Man₃ y Man₄ radioactivos se obtuvieron por acetólisis del manano de S. cerevisiae (117) y Man₄GlcNAc por acetólisis de (¹⁴C)Man₉GlcNAc

obtenido de oviducto de gallina.

Dol-P-(¹⁴C)Man fue preparado por incubación de microsomas de hígado de rata con Dol-P y GDP-(¹⁴C)Man bajo las condiciones indicadas en la sección II.5.1. El Dol-P-Man sintetizado se purificó por cromatografía de intercambio iónico de la manera descrita en II.2.4.

Glc₁₋₃ManGlcNAc₂ se obtuvieron como derivados de Dol-P-P de cortes de oviducto de gallina incubados con (U-¹⁴C)glucosa (21).

II.1.3. Enzimas y otros reactivos

Se utilizaron las siguientes enzimas:

- proteasa tipo XIV de Streptomyces griseus, de Sigma;
- endo-β-N-acetilglucosaminidasa H (endo-H) de S. griseus, de Sigma;
- α-manosidasa de "jack bean" tipo III, de Sigma.

Dol-P fue adquirido a Sigma.

II.1.4. Protozoarios

E. gracilis var bacillaris fue cultivada a 28°C y en oscuridad en dos medios que diferían en la fuente de carbono. El medio A contenía 0,3% glucosa y el B 1% etanol. Ambos medios contenían además: 1% triptona (Difco), 0,4% extracto de levadura (Difco) y 10 µg/ml de vitamina B 12.

C. fasciculata y B. culicis fueron cultivadas en el medio descrito por Bacchi y col. (118) a 28°C.

L. enriettii (forma promastigote) y T. cruzi (formas epimastigote y amastigotes axénicos) se cultivaron a 25 y 28°C respectivamente, ambos en un

medio conteniendo: 33 g/l de infusión cerebro-corazón (Difco), 3 g/l de trip-tosa (Difco), 4 g/l de Na_2HPO_4 , 0,4 g/l de KCl, 0,02 g/l de hemina (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (FCS) inactivado (GEN S.A.), todo ajustado a pH 7.2-7.4.

Los tripomastigotes y amastigotes intracelulares de T. cruzi se obtuvieron a partir de células en cultivo infectadas. Como hospedadoras se utilizaron células BESM (músculo liso de embrión bovino) que fueron cultivadas en monocapa en botellas plásticas de 175 cm², con medio RPMI-1640 suplementado con 5% FCS (119), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Según se quisieran obtener tripomastigotes o amastigotes intracelulares, las células fueron infectadas a una multiplicidad de 10^6 ó $1,5 \times 10^7$ parásitos/botella, respectivamente. Al infectar a una alta multiplicidad las células hospedadoras se lisan antes de que los amastigotes se transformen intracelularmente en tripomastigotes, y liberan al medio los amastigotes intracelulares. Sin embargo, habitualmente las preparaciones de amastigotes intracelulares llevan un 10-20% de contaminación con tripomastigotes.

Los amastigotes axénicos se obtuvieron por pasaje a medio fresco de una pequeña cantidad de epimastigotes de fase estacionaria. Bajo estas condiciones parte de los epimastigotes adoptan la morfología de amastigotes (120). Los amastigotes pueden separarse de los epimastigotes debido a que los primeros forman agregados y sedimentan mientras que los epimastigotes, por ser flagelados, se distribuyen en todo el medio, lo que permite eliminarlos por sucesivos cambios de medio de cultivo. El cultivo de amastigotes se mantiene por repique a medio fresco de células en fase exponencial de crecimiento. Si el cultivo alcanza la fase estacionaria se diferencia a epimastigotes.

Los clones de T. cruzi utilizados en los distintos ensayos fueron: CA-I/72, Miranda 80 y Miranda 88. De acuerdo al análisis de restricción de minicírculos las células Miranda 80 y 88 son indistinguibles, pero diferentes de las células CA-I/72 (121).

II.2. Marcación de protozoarios y aislamiento de sustancias radioactivas

II.2.1. Marcación de Leishmania enriettii

0,4 g de parásitos se cosecharon en fase de crecimiento exponencial por centrifugación a 1.500 x g durante 10 min a 4°C. Se lavaron dos veces con 50 ml de PBS y una vez con 50 ml de medio mínimo de Eagle (MEM) (122) sin glucosa pero con el agregado de 5 mM piruvato de sodio (MEM/piruvato). Luego los parásitos fueron resuspendidos en 0,8 ml de MEM/piruvato conteniendo 150 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa, todo previamente templado a 25°C. La incubación a esa temperatura duró 15 min y se detuvo por el agregado de 5 ml de cloroformo/metanol (3:2) de manera de obtener una partición de Folch (cloroformo/metanol/agua 3:2:1). De la interfase formada se aislaron los Dol-P-P-oligosacáridos y de la fase inferior los Dol-P-monosacáridos.

II.2.2. Marcación de Euglena gracilis

En el caso de las células cultivadas en medio A, 22 g (peso húmedo) de células cosechadas en fase de crecimiento exponencial se lavaron tres veces con 1,5 volúmenes (Vol/peso húmedo) de MEM/piruvato. La marcación se realizó resuspendiendo las células lavadas en un volumen de MEM/piruvato conteniendo 500 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa. A los 15 y 25 min de incubación a 28°C se

tomaron alícuotas de 20 ml y se sometieron a sendas particiones de Folch. Para las células crecidas en medio B las condiciones empleadas fueron las mismas excepto que se partió de 2,5 g de material y las alícuotas se tomaron (de un volumen total de 5 ml) como sigue: la primera (de 4 ml) se tomó a los 20 min de incubación; al ml restante se le agregaron 9 ml de medio B y se incubó durante 130 min más. Ambas alícuotas se llevaron a la proporción final de cloroformo/metanol/agua (3:2:1) para detener la incubación.

II.2.3. Marcación de Trypanosoma cruzi

Para la marcación de epimastigotes y amastigotes axénicos de T. cruzi los organismos se cosecharon en fase de crecimiento exponencial, se lavaron tres veces con MEM/piruvato, se resuspendieron en dos volúmenes de MEM/piruvato + 100-300 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa y se incubaron a 37°C por diferentes tiempos.

Para la obtención de tripomastigotes y amastigotes intracelulares se infectaron células musculares en cultivo a diferente multiplicidad (los detalles se presentaron en la sección II.1.4.). Producida la lisis de las células infectadas, el sobrenadante que llevaba los parásitos fue centrifugado a 350 g por 5 min. El sobrenadante se pasó a dos botellas plásticas de 175 cm² y se incubó tres horas a 37°C para producir la adhesión de las células musculares que contaminaban el sobrenadante. El medio sobrenadante se filtró luego a través de un filtro Spectra/mesh de 10 μ m de abertura de poro. Este procedimiento aseguró que la muestra obtenida no estuviera contaminada con células hospedadoras. De aquí en más el procedimiento de marcación no difirió del realizado para los otros protozoarios. Brevemente, los parásitos

purificados de células de mamífero se lavaron tres veces con MEM/piruvato y se resuspendieron en dos volúmenes de MEM/piruvato conteniendo 100-300 μ Ci de (U- 14 C)glucosa. El medio de marcación de tripomastigotes fue adicionado con 1% de seroalbúmina bovina para evitar la lisis de los parásitos. Finalmente se realizaron las incubaciones a 37°C por diferentes tiempos.

En los casos de incubaciones tipo "pulso-chase", el pulso duró 60 min con la marca radioactiva y luego se diluyó 10 veces con medio de crecimiento en el caso de los epimastigotes y medio RPMI-1640 con 5% FCS para los tripomastigotes, y se dejó incubar 60 min más.

Para el estudio de los Dol-P-P-oligosacáridos y de los oligosacáridos de alta manosa unidos a proteína, terminadas las incubaciones se recibieron alícuotas en 25 ml de cloroformo/metanol (3:2), se agregaron 8 mg de proteína microsomal de rata como carrier y agua, hasta completar 5 ml. De la interfase formada se extrajeron los derivados de Dol-P-P y los glicopéptidos.

Para aislar oligosacáridos tipo complejo de glicoproteínas las marcaciones se detuvieron agregando 4 volúmenes de metanol.

II.2.4. Aislamiento de Dol-P-monosacáridos sintetizados "in vivo"

La fase inferior de la partición de Folch obtenida luego de incubar las células con (14 C)glucosa se secó a temperatura ambiente y se saponificó (ver II.3.3.). Después de saponificar, la fase inferior resultante se secó, se disolvió en 0,8 ml de cloroformo/metanol (2:1) y se sembró en una columna (pipeta Pasteur) de DEAE-celulosa (forma acetato) equilibrada con el mismo solvente. La columna se lavó con 8 ml de cloroformo/metanol (2:1) y luego se eluyó con 4 ml del mismo solvente conteniendo 10 mM formiato de amonio y 12

ml de cloroformo/metanol (2:1) con 30 mM formiato de amonio. Las fracciones colectadas fueron de 0,8 ml y se reunieron aquellas eluidas con 30 mM de sal que presentaron radioactividad. Estas fracciones se secaron primero con corriente de aire y luego en desecador al vacío y finalmente fueron sometidas a hidrólisis ácida suave para su análisis.

II.2.5. Aislamiento de Dol-P-P-oligosacáridos sintetizados "in vivo"

En el caso de L. enriettii la interfase de la primera partición de Folch se sometió a una nueva partición en cloroformo/metanol/agua (3:2:1). La interfase obtenida se lavó cuatro veces con 5 ml de agua y luego se extrajo con 2 ml de metanol y seis veces con 1,5 ml de cloroformo/metanol/agua (1:1:0,3); este último solvente de ahora en más será llamado 1103. El precipitado delipidado no se descartó porque contenía las glicoproteínas. Se reunieron el extracto metanólico y el de 1103 y se evaporaron a sequedad con corriente de aire a temperatura ambiente. El material seco se resuspendió en 0,8 ml de solvente 1103 y se sembró en una columna de DEAE-celulosa (forma acetato) de 0,5 x 5 cm equilibrada con el mismo solvente. Se recogieron fracciones de 1 ml provenientes de: 10 ml de lavado con 1103, 5 ml de 1103 conteniendo 10 mM formiato de amonio, 10 ml de 1103 conteniendo 30 mM de la misma sal y 10 ml de 1103 conteniendo 60 mM formiato de amonio. Se reunió el material radioactivo que eluyó como un pico bien definido con 30 mM de sal. Este fue secado con corriente de aire e hidrolizado para liberar los oligosacáridos.

Para el material obtenido de células de E. gracilis se procedió prácticamente de la misma manera que con el proveniente de L. enriettii, siendo

la única diferencia que los volúmenes de las soluciones de lavado y extracción del pellet proteico se aumentaron seis veces debido a que se partió de una mayor cantidad de material. Una vez obtenido el extracto 1103 se trabajó con los volúmenes indicados para L. enriettii.

En el caso de T. cruzi las interfases se lavaron una vez con 30 ml de cloroformo/metanol/agua (3:2:1), otra vez con 30 ml de agua y finalmente tres veces con 5 ml de agua. La extracción y purificación de Dol-P-P-oligosacáridos se realizó como se indicó para L. enriettii.

II.2.6. Aislamiento de glicopéptidos

Para la obtención de glicopéptidos se trabajó con el precipitado remanente luego de la extracción de Dol-P-P-oligosacáridos con solvente 1103. Este material delipidado se lavó una vez con 5 ml de metanol y tres veces con 5 ml de agua. El precipitado proteico lavado se sometió a digestión con proteasa bajo las condiciones explicadas en la sección II.3.12. Los productos de proteólisis se separaron por filtración en una columna de BioGel P-6 (120 x 1,25 cm) equilibrada con buffer acetato de piridina 0,1 M pH 5,0. Se sembraron aproximadamente 2 ml de muestra (después de reducir su volumen por evaporación) y se recogieron fracciones de 2 ml. Se reunieron las fracciones radioactivas cuyos volúmenes de elución coincidieron con aquellos de los glicopéptidos conteniendo entre 4 y 14 restos de monosacárido utilizados como standard. Ese material se secó con corriente de aire, se sembró en papel y se sometió a electroforesis en 5% ácido fórmico. Las sustancias neutras se descartaron y se continuó trabajando con el material radioactivo que migró hacia el cátodo. La movilidad electroforética de esas sustancias proviene de

La carga positiva que adquieren los aminoácidos en medio ácido. Este material cargado se eluyó y se secó, constituyendo la llamada fracción de glicopéptidos purificados.

II.2.7. Aislamiento de oligosacáridos sensibles a endo-H de glicopéptidos

Estos se obtuvieron por tratamiento con endo-H de los glicopéptidos purificados (ver II.3.10.) y una segunda electroforesis en ácido fórmico 5%. Los oligosacáridos sensibles a endo-H, por acción de esta enzima son separados de un residuo de N-acetilglucosamina unido a su vez a un péptido, con lo que pierden su carga positiva en medio ácido. Por lo tanto, los oligosacáridos liberados por endo-H no migran en una electroforesis en ácido fórmico 5%. Se eluyeron entonces los compuestos correspondientes al pico neutro, se secaron y se procedió a su identificación.

La fracción de oligosacáridos endo-H resistentes está constituida por el material que después de tratamiento con la enzima sigue migrando hacia el cátodo.

II.2.8. Aislamiento de oligosacáridos tipo complejo de glicopéptidos

La incubación de los parásitos con (^{14}C)glucosa se detuvo agregando 4 volúmenes de metanol. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de agua y se reprecipitó con 4 ml de metanol tres veces más. Finalmente se agregó 1 ml de 0,02 N HCl y se hidrolizaron los residuos de ácido siálico por calentamiento a 100°C durante 150 min (123). Cumplido este tiempo las muestras se enfriaron, se neutralizaron con NaOH y se precipitaron con 4 volúmenes de metanol. Este precipitado fue digerido primero con proteasa y

luego con endo-H. El material resistente a esta última enzima fue aislado por electroforesis en ácido fórmico 5% como se detalló en la sección anterior. Luego fue sometido a β -eliminación en 0,5 ml de 0,075 N NaOH, 1 M NaBH₄, durante 16 horas a 45°C (124). A continuación se agregaron 3 ml de ácido acético 1 M y se desaló la muestra en una columna de BioGel P-6 (97 x 1 cm) equilibrada con 0,1 M buffer acetato de piridina pH 5,0. Finalmente, los oligosacáridos liberados por β -eliminación se separaron de los glicopéptidos resistentes al tratamiento por electroforesis en ácido fórmico 5%. El material cargado positivamente en ese sistema de electroforesis está constituido por glicopéptidos con oligosacáridos tipo complejo. Para analizarlos se los sometió a hidrólisis ácida total y los productos se purificaron por electroforesis en ácido fórmico 5%. Por este procedimiento se recuperan los azúcares liberados como material neutro y se pierden los aminoácidos y los restos de glucosamina.

II.3. Métodos

II.3.1. Hidrólisis ácida suave

Este método es normalmente empleado para romper el enlace entre Dol-P o Dol-P-P y mono u oligosacáridos. Las muestras fueron secadas y resuspendidas en 1 ml de HCl 0,02 N. La hidrólisis se realizó durante 15 min a 100°C. Una vez enfriadas las muestras se agregaron 5 ml de cloroformo/metanol (3:2) y se centrifugaron. Las fases superiores conteniendo los mono u oligosacáridos liberados de Dol-P o Dol-P-P respectivamente, se secaron a 60°C y se cromatografiaron en papel.

II.3.2. Hidrólisis ácida total

Los oligosacáridos se disolvieron en 1 ml de HCl 1 N y se hidrolizaron durante 4 h a 100°C. Para cambiar los iones cloruro de la muestra por iones acetato se agregaron 1 ml de agua y aproximadamente 1 g de un intercambiador de aniones (Dowex AG-X-1 forma acetato). El material no pegado a la resina más el volumen de dos lavados con 1 ml de agua se reunieron y secaron.

II.3.3. Saponificación

La fase inferior seca se resuspendió en 2,5 ml de cloroformo/metanol (4:1) conteniendo 0,2 N NaOH. Se incubó 10 min a 37°C y luego se llevó a la proporción final (3:2:1) de cloroformo/metanol/agua, por agregado de 0,8 ml de metanol y 0,66 ml de agua. La fase inferior así formada se lavó tres veces con cloroformo/metanol/agua (1:16:16), y finalmente se llevó a sequedad.

II.3.4. Reducción de oligosacáridos con NaBH₄

Las muestras secas se resuspendieron en 1 ml de NaBH₄ 0,1 M y se incubaron 16 h a temperatura ambiente. Se agregaron 1,5 ml de ácido acético, se secó la muestra y se desaló con una resina catiónica (Dowex 50, forma H⁺). El material desalado se llevó a sequedad, se resuspendió en 1 ml de metanol y se secó nuevamente para eliminar el ácido bórico. Este procedimiento se repitió tres veces más.

II.3.5. Acetólisis

Basicamente el procedimiento empleado fue el descrito por Kocourek y Ballou (125). La acetilación de las muestras se llevó a cabo en 1 ml de piridina/anhídrido acético (1:1) durante 3 h a 100°C. A continuación las muestras se secaron y se lavaron dos veces con 1 ml de metanol anhidro evaporando a sequedad cada vez.

La acetólisis se realizó en 1 ml de anhídrido acético/ácido acético/ácido sulfúrico (10:10:1) a 30°C durante 16 h. Cumplido este tiempo se agregaron 2 ml de piridina y se evaporó a 60°C con corriente de aire. Luego se agregaron 2,5 ml de cloroformo y 2,5 ml de agua. Se secó la fase clorofórmica y la fase acuosa se extrajo nuevamente con 2,5 ml de cloroformo. La segunda fase clorofórmica obtenida se reunió con el material seco de la primera, se lavó con 2 ml de agua y se secó.

Finalmente se realizó la de-O-acetilación de los productos de acetólisis. Se agregaron 0,9 ml de metanol y 0,1 ml de metóxido de sodio 1 M a cada muestra. Este último reactivo se preparó disolviendo sodio metálico en metanol. Después de 20 min de reacción a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de agua y se desaló por agregado de resina Dowex 50 (forma H⁺). La solución desalada se secó y se identificaron los productos de acetólisis por cromatografía en papel.

II.3.6. Cromatografía en papel

El papel utilizado fue SS 2043a (Schleicher & Schüell). Los solventes empleados para desarrollar las cromatografías se detallan a continuación:

A, 1-butanol/piridina/agua (6:4:3)

B, 1-butanol/piridina/agua (10:3:3)

C, 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4)

D, 1-butanol/piridina/agua (4:3:4)

E, 1 M ácido acético /1 M acetato de amonio pH 7,4 /etanol (26:4:75)

II.3.7. Electroforesis en papel

Se usó papel SS 2043a (Schleicher & Schüell). Las condiciones en que se realizaron las electroforesis y los buffers utilizados fueron:

Acetato de piridina 1 M, pH 6,5: 25 V/cm, 30 min

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

Acido fórmico 5%: 30 V/cm, 120 min

II.3.8. Determinación de proteínas

Se realizó por el método de Lowry (126). Como standard se utilizó seroalbúmina bovina.

II.3.9. Determinación de radioactividad

Para la determinación de radioactividad en cromatogramas y electroferogramas se cortó cada tira en papelitos de 1 cm (eventualmente de 0,5 cm); cada papelito fue colocado en un vial descartable conteniendo mezcla de centelleo (0,5% 2,5-difeniloxazol, 0,025% 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil) benceno en tolueno).

En el caso de las muestras radioactivas acuosas la radioactividad se midió con tres volúmenes de la mezcla de centelleo descrita por Bray (127).

Las muestras contenidas en solventes orgánicos fueron evaporadas con corriente de aire y luego se agregaron 2 ml de mezcla de Bray.

En todos los casos la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido.

II.3.10. Tratamiento con endo-H

Las muestras secas se resuspendieron en 180 μ l de buffer trietilamina-acetato 50 mM pH 5,5 , se agregaron 0,01 unidades de endo-H y se incubaron a 37°C entre 12 y 24 horas (128). Terminada la incubación se evaporaron las muestras a sequedad con corriente de aire.

II.3.11. Tratamiento con α -manosidasa

100 μ l de suspensión enzimática (8 unidades) se dializaron durante 3 horas contra 250 ml de buffer citrato de sodio 50 mM pH 4,5 conteniendo 0,1 mM acetato de zinc. La suspensión dializada se agregó al tubo que llevaba la

muestra seca y se incubó a 37°C durante 16 horas. La incubación se detuvo por agregado de 1 ml de agua y calentamiento a 100°C, 5 min. Se centrifugó, el sobrenadante límpido se llevó a sequedad, y se sembró en papel para ser desalado por electroforesis en acetato de piridina. El material neutro luego de la electroforesis se eluyó, se secó y se identificó por cromatografía en papel.

II.3.12. Tratamiento con proteasa

El precipitado de proteína se resuspendió en 5 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 conteniendo CaCl₂ 2 mM. Se agregó una punta de espátula de proteasa y se incubó entre 37 y 50°C, durante 4 ó 2 días respectivamente, bajo atmósfera de tolueno. Cada día se agregó otra punta de espátula de la enzima. Terminada la incubación, se redujo el volumen por evaporación con corriente de aire a 60°C; se centrifugó y se sembró en una columna de filtración en gel para la separación de los productos (ver "Aislamiento de glicopéptidos", sección II.2.6.).

II.4. Preparaciones

II.4.1. Microsomas de tripanosomátidos

Células de los diferentes tripanosomátidos se cosecharon durante la fase de crecimiento exponencial temprana por centrifugación a 1.000 x g durante 10 min. Se lavaron dos veces con solución A (0,25 M sacarosa, 5 mM Na-EDTA pH 7,2 y 5 mM 2-mercaptoetanol), se mezclaron con dos veces su peso húmedo en perlas de vidrio, y se rompieron en mortero hasta que al microscopio

pio prácticamente no se vieron células vivas (aproximadamente 2 min). Se dejaron decantar las perlas de vidrio y a continuación el homogenato obtenido se diluyó con solución A y se centrifugó 5 min a 1.000 x g. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 17.300 x g durante 15 min. Este sobrenadante se ultracentrifugó 60 min a 100.000 x g, de donde se obtuvo un precipitado microsomal que fue resuspendido en homogenizador Potter vidrio-teflón a una concentración de proteína de 30-60 mg/ml con un mínimo volumen de solución A.

Para realizar la síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos se emplearon microsomas recién preparados dado que por congelamiento perdían la actividad enzimática.

II.4.2. Microsomas de hígado de rata

34 g de hígado de ratas que fueron ayunadas durante 48 h se homogeneizaron con solución A en un disruptor tipo "Omnimixer". El homogenato se centrifugó a 18.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se ultracentrifugó 60 min a 100.000 x g y el precipitado microsomal se resuspendió en solución A con la ayuda de un homogenizador Potter, a una concentración de proteína de aproximadamente 100 mg/ml.

II.4.3. Aceptores exógenos

100 g de hígado de vaca se homogeneizaron en Omnimixer con 200 ml de metanol y 300 ml de cloroformo. La interfase obtenida por centrifugación a baja velocidad se lavó tres veces con 500 ml de cloroformo/metanol/MgCl₂ 4 mM (1:16:16) y una vez con 500 ml de cloroformo/metanol/agua (1:16:16). Luego

se extrajeron los Dol-P-P-oligosacáridos con 200 ml de solvente 1103; este procedimiento se repitió dos veces más. El extracto 1103 obtenido se filtró a través de papel Whatman N°1 y todo el volumen se sembró en una columna de DEAE-celulosa (forma acetato) de 32 x 1,2 cm, equilibrada con solvente 1103. La columna se lavó con 150 ml de 1103 y se eluyó primero con 120 ml de 1103 conteniendo 15 mM formiato de amonio, y luego con 150 ml de 1103 con 100 mM de la misma sal. El material eluido con 100 mM de formiato de amonio se llevó a la proporción final 3:2:1 de cloroformo/metanol/agua para eliminar la sal. La fase inferior así formada se lavó con cloroformo/metanol/agua (1:16:16), se secó y se resuspendió en 6 ml de solvente 1103. Los aceptores exógenos se conservaron a -20°C hasta su utilización.

II.4.4. Microsomas de hígado solubilizados

1 ml de microsomas de hígado de rata (aproximadamente 100 mg de proteína) se resuspendieron, en frío, con 5 ml de buffer TNP40 (0,1 M Tris-acetato pH 7,0, 5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoetanol, 20% glicerol y 0,12% Nonidet P-40). Se agitó un minuto en Vortex y se centrifugó 60 min a 100.000 x g. El sobrenadante de ultracentrifugación se usó como fuente de enzima.

II.5. Incubaciones "in vitro"

II.5.1. Síntesis de Dol-P-monosacáridos

Las mezclas de reacción contenían, en un volumen total de 50 μ l, 0,6% Tritón X-100, 50 mM buffer Tris-maleato pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 12 mM 5'AMP, 0,4-0,9 mg de proteína de membrana, diferentes concentraciones de Dol-P de

hígado y $9 \mu\text{M}$ UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ ó $10 \mu\text{M}$ GDP- $(^{14}\text{C})\text{Man}$. En todos los casos se agregó primero el Dol-P, que fue secado al vacío y luego resuspendido en el detergente. A continuación se agregaron el resto de los reactivos. Las incubaciones duraron 5 min y se realizaron a 28°C , excepto para L. enriettii e hígado de rata que los ensayos tuvieron lugar a 25 y 37°C , respectivamente. Para detener las reacciones se agregaron $0,5$ ml de metanol, $0,75$ ml de cloroformo y $0,2$ ml de agua. Las fases inferiores se lavaron tres veces con $0,5$ ml de cloroformo/metanol/agua (1:16:16) y finalmente se determinó la radioactividad en cada una.

Para estudiar los nucleótido-azúcares presentes al final de la incubación se tomaron $100 \mu\text{l}$ de la fase superior de la partición de Folch con la que se detuvo el ensayo, se sembró esa alícuota en papel y se cromatografió en solvente E.

II.5.2. Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos

$10 \mu\text{g}$ de Dol-P y $30 \mu\text{l}$ de aceptores exógenos (provenientes de $0,5$ g de hígado de vaca) fueron secados al vacío y solubilizados con $5 \mu\text{l}$ de deoxicolato de sodio 5%. A continuación se agregaron el resto de los reactivos en las concentraciones finales que se indican: 40 mM buffer Tris-maleato pH 7,6, 8 mM MgCl_2 , $55 \mu\text{M}$ GDP- $(^{14}\text{C})\text{Man}$ y las preparaciones frescas de membrana (3 mg de proteína en el caso de hígado de rata, $0,72$ mg para L. enriettii, $1,5$ mg para C. fasciculata, $0,8$ mg para B. culicis y $0,68$ mg para T. cruzi), en un volumen final de $60 \mu\text{l}$. Cuando se indica en el texto, los sustratos Dol-P y GDP- $(^{14}\text{C})\text{Man}$ fueron reemplazados por Dol-P- $(^{14}\text{C})\text{Man}$ (60.000 cpm) sintetizado por microsomas de hígado de rata como se describió en la sección anterior y

purificado por cromatografía en DEAE-celulosa (ver II.2.4.).

Las incubaciones se realizaron a 28°C en los casos de C. fasciculata, B. culicis y T. cruzi, a 25°C para L. enriettii y a 37°C para microsomas de hígado de rata. A los 15-20 min de incubación las reacciones se detuvieron por agregado de 0,5 ml de metanol, 0,2 ml de una suspensión acuosa de microsomas de hígado (30 mg proteína/ml) como carrier y 0,75 ml de cloroformo. Después de centrifugar, las interfases y las fases inferiores obtenidas se procesaron por separado.

Interfases: se lavaron dos veces con cloroformo/metanol/agua (1:16:16). Los derivados de Dol-P-P que contenían más de 6-7 unidades de monosacárido fueron extraídos cuatro veces con 0,5 ml de solvente 1103. Los extractos 1103 se purificaron luego por pasaje a través de microcolumnas (pipetas Pasteur) de DEAE-celulosa (forma acetato) equilibradas con solvente 1103. Después de sembrar la muestra, cada columna fue lavada con 9 ml de solvente 1103, luego con 4 ml del mismo solvente con el agregado de 10 mM de formiato de amonio, y finalmente se eluyeron los Dol-P-P-oligosacáridos con 8 ml de solvente 1103 conteniendo 30 mM formiato de amonio.

Fases inferiores: se secaron y saponificaron bajo las condiciones descriptas en la sección II.3.3. Las fases inferiores limpias conteniendo los derivados de Dol-P y los derivados de Dol-P-P de menos de 6-7 restos de monosacárido, se reunieron con los derivados de Dol-P-P de mayor tamaño sólo cuando el texto lo indica.

La determinación de actividad de manosiltransferasa con enzima solubilizada se realizó en presencia de: 20 μ l de aceptores exógenos (contenidos originalmente en 0,32 g de hígado de vaca), Dol-P-(¹⁴C)Man sintetizado por microsomas de hígado de rata (20.000 cpm), 60 μ l de buffer TNP40 (ver sección

II.4.4.), 5 mM MgCl₂, 0,25% Nonidet P-40 y 40 μl de preparación microsomal solubilizada. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 30 min y se detuvieron agregando 0,5 ml de metanol, 0,75 ml de cloroformo y 0,2 ml de suspensión de microsomas de hígado como carrier. A continuación se procedió de la misma manera que cuando se utilizaron microsomas como fuente de enzima.

II.5.3. Degradación de oligosacáridos

Se incubó MangGlcNAc (18.000 cpm) sintetizado "in vivo" por cortes de oviducto de gallina con los siguientes reactivos: 40 mM buffer Tris-maleato pH 7,6, 8 mM MgCl₂, 0,4% deoxicolato de sodio y 1,5 mg de preparación microsomal de C. fasciculata, en un volumen final de 60 μl. Después de 6 horas de incubación a 28°C se agregaron 0,75 ml de cloroformo, 0,5 ml de metanol y 0,2 ml de agua. La fase superior formada por centrifugación se secó, se resuspendió en 1 ml de 0,1 M buffer acetato de piridina pH 5 y se sembró en una columna de BioGel P-6 equilibrada con el mismo buffer. Se reunieron las fracciones donde eluyen oligosacáridos entre 4 y 14 restos sacarídicos, se secaron y se sometieron a cromatografía en papel con solvente C.

CAPITULO III

DERIVADOS DE DOLICOL EN Leishmania enriettii

Antecedentes y Objetivos

En la sección I.10. se han mencionado los oligosacáridos que se acumulan como derivados de Dol-P-P y se transfieren a proteínas en diferentes tripanosomátidos. Cabe recordar que en todos los casos estos oligosacáridos están desprovistos de residuos de glucosa.

Se ha demostrado que el oligosacárido de mayor tamaño que se sintetiza unido a Dol-P-P y que se transfiere a proteínas es el mismo para todas las especies estudiadas de los géneros Trypanosoma y Herpetomonas: Man₇GlcNAc₂ (85,110-112). Además, las dos especies del género Crithidia analizadas acumulan Man₇GlcNAc₂ (108,114) y las dos especies de Leishmania (L. adleri y L. mexicana) transfieren a proteínas Man₆GlcNAc₂ (111,113). Esta observación llevó a generalizar que, aparentemente, el tamaño del oligosacárido que se acumula como derivado de Dol-P-P sería el mismo para todos los miembros de un género de tripanosomátidos (111). En la búsqueda de otro tripanosomátido que acumulara Man₆GlcNAc₂, y teniendo en cuenta la generalización mencionada, se inició el estudio de los derivados de Dol-P-P en L. enriettii. Como se mostrará a continuación, L. enriettii acumula "in vivo" Man₇GlcNAc₂-P-P-Dol, con lo que se niega la generalización según la cual todos los tripanosomátidos pertenecientes a un mismo género acumularían y transferirían a proteínas oligosacáridos del mismo tamaño.

Por otra parte, trabajos previos del grupo de Parodi han demostrado la incapacidad de T. cruzi (110), C. fasciculata (114), T. dionisii y L. samueli

(111) de sintetizar Dol-P-(^{14}C)Glc "in vivo" a partir de (^{14}C)glucosa, pero bajo las mismas condiciones se detectó la formación de Dol-P-(^{14}C)Man. En cambio en los casos de L. adleri y H. muscarum (111) se observó síntesis "in vivo" de Dol-P-Man y Dol-P-Glc. Estos resultados sugirieron que la ausencia de derivados de Dol-P-P glucosilados en los tripanosomátidos sería causada en algunos casos por la incapacidad de sintetizar Dol-P-Glc y en los otros debido a un defecto en la transferencia del resto glucosilo del Dol-P-Glc al oligosacárido preformado. Como primer intento para caracterizar la deficiencia presente en L. enriettii aquí se analizan los Dol-P-monosacáridos sintetizados "in vivo".

III. Resultados

III.1. Oligosacáridos unidos a Dol-P-P sintetizados "in vivo"

Células de L. enriettii se incubaron durante 15 minutos en presencia de (U- ^{14}C)glucosa. Cumplido ese tiempo, los parásitos fueron sometidos a una partición en cloroformo/metanol/agua (3:2:1) y de la interfase formada se extrajeron los Dol-P-P-oligosacáridos. Luego éstos fueron purificados por cromatografía de intercambio aniónico y finalmente los oligosacáridos se liberaron de la porción lipídica por hidrólisis ácida suave.

III.1.1. Tamaño

Los oligosacáridos liberados de Dol-P-P se sometieron a cromatografía en papel en solvente C con el objeto de determinar su tamaño. En la Fig. 16 aparece el resultado obtenido. El único compuesto que se detectó

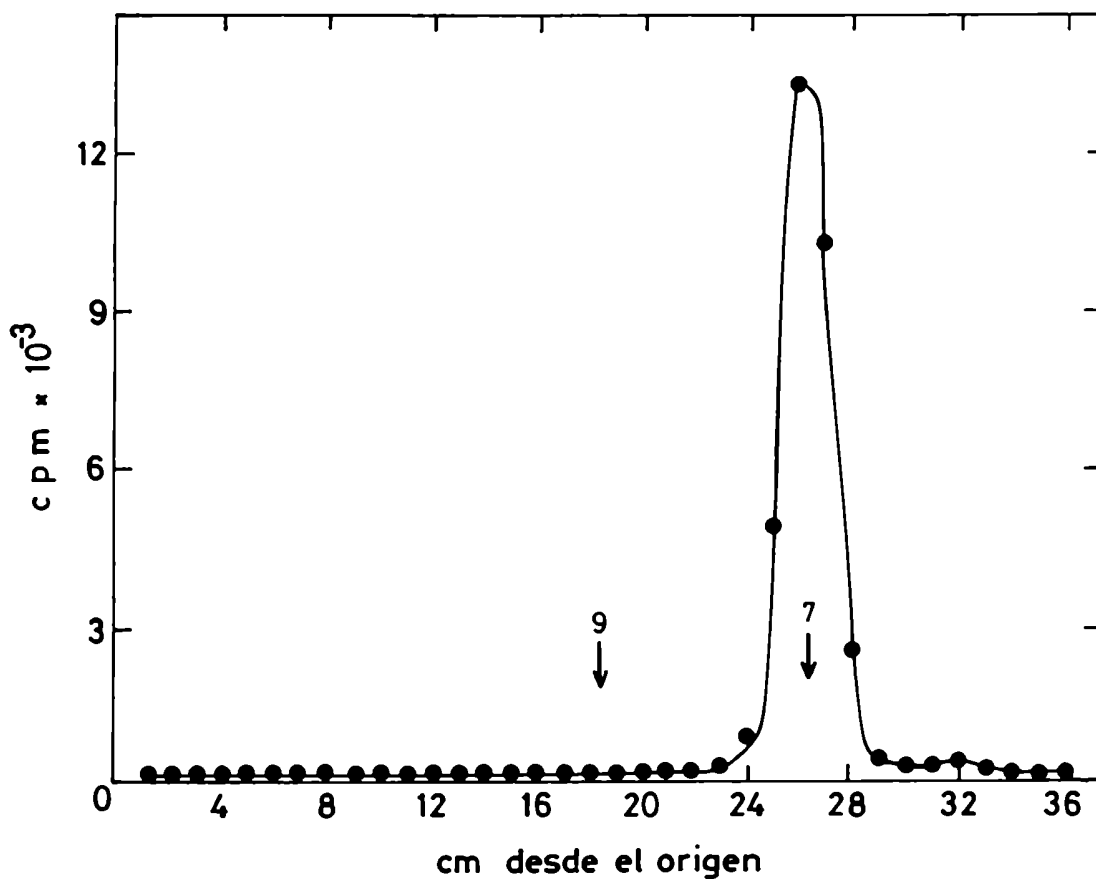


FIGURA 16: Oligosacáridos unidos a Dol-P-P en L. enriettii.

Los Dol-P-P-oligosacáridos sintetizados "in vivo" en presencia de (U-¹⁴C)glucosa se purificaron según el método descrito en la sección II.2.5. Los oligosacáridos liberados de Dol-P-P por hidrólisis ácida suave se sometieron a cromatografía en papel (solvente C).

Standards: 9, Man₉GlcNAc₂; 7, Man₇GlcNAc₂.

comigra con un standard de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$.

III.1.2. Sensibilidad a α -manosidasa

El compuesto que comigró con un standard de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en la Fig. 16 fue eluido del papel y una alícuota se trató con α -manosidasa. Los productos de hidrólisis enzimática se desalaron y se cromatografiaron en papel (solvente D) para su identificación. En la Fig. 17 A se muestra el perfil obtenido. Se observa un único pico con la misma migración que un standard de manosa. Además, entre los standards de Man_3 y Man_2 se detectan uno o más compuestos que no se definen en un pico neto y que llevan poca marca radioactiva. Este tipo de comportamiento suele observarse cuando se trata con α -manosidasa una muestra que lleva en el extremo reductor dos residuos de N-acetilglucosamina. La poca definición del pico se debería a la mala migración del producto de degradación ManGlcNAc_2 . Si el compuesto tratado hubiera estado glucosilado se debería haber encontrado un pico migrando como $\text{GlcMan}_4\text{GlcNAc}_2$, o sea menos que el standard de Man_4 .

III.1.3. Sensibilidad a endo-H

Una técnica utilizada con frecuencia para la caracterización de oligosacáridos de alta manosa consiste en el tratamiento de los mismos con la enzima endo-N-acetilglucosaminidasa H (endo-H). Esta enzima hidroliza en forma específica la unión entre dos residuos de N-acetilglucosamina con enlace β -1,4 en oligosacáridos de alta manosa (128).

Una alícuota del supuesto $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ de la Fig. 16 fue tratada con endo-H. Los productos de hidrólisis se separaron por cromatografía en papel

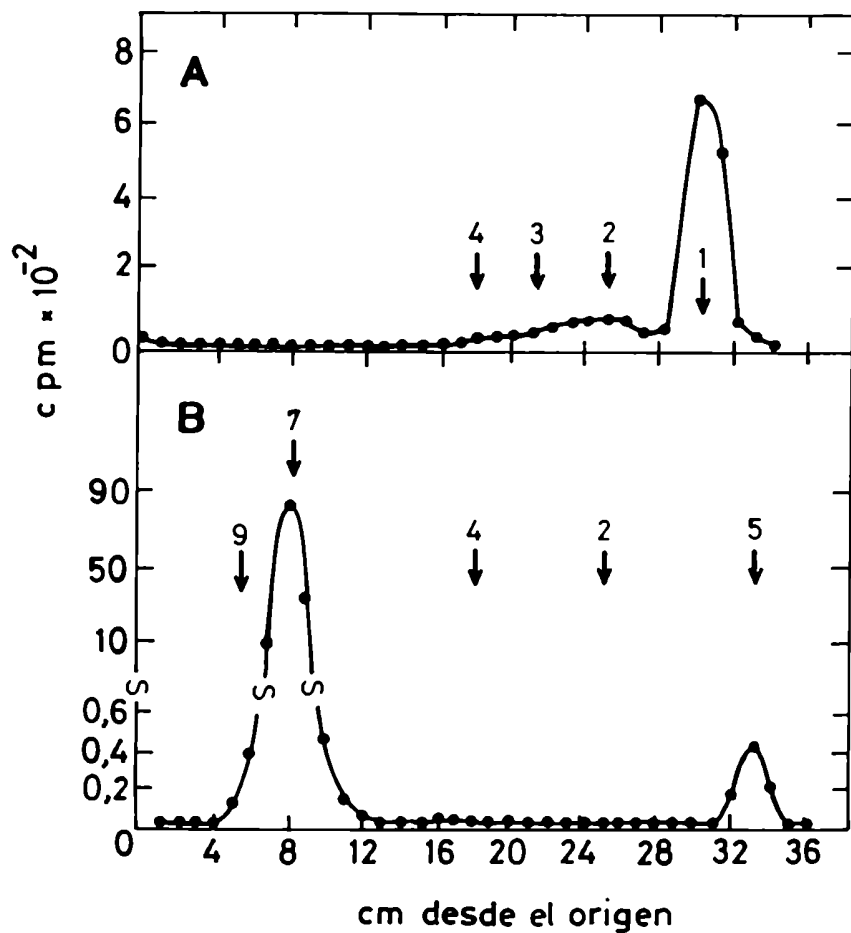


FIGURA 17: Caracterización del oligosacárido unido a Dol-P-P. Tratamientos enzimáticos.

El oligosacárido que migró como $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en la Fig. 16 fue tratado con las enzimas α -manosidasa (panel A) y endo-H (panel B). Los productos se analizaron por cromatografía en papel en solvente D.

Standards: 9, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$; 7, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$; 5, N-acetilglucosamina; 4, Man_4 ; 3, Man_3 ; 2, Man_2 ; 1, manosa.

desarrollada en solvente D.

En la Fig. 17 B puede observarse que con este tratamiento se produjo la liberación de N-acetilglucosamina al tiempo que se conserva un compuesto que sigue comigrando con el standard de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (pico I).

III.1.4. Hidrólisis total

Parte del material que migró como $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ después del tratamiento con endo-H (pico I, Fig. 17 B) fue sometido a hidrólisis ácida total. Los productos se identificaron por cromatografía en papel (solvente A) según se muestra en la Fig. 18 A. Se observa un solo pico de radioactividad que migra como un standard interno de manosa, pero no se detecta glucosamina radioactiva. Si se considera que en la Fig. 17 B se detectó aproximadamente 200 veces más de radioactividad en el oligosacárido liberado por endo-H que en el resto reductor de N-acetilglucosamina, resulta razonable que en la Fig. 18 A no se observe un pico de glucosamina radioactiva dado que sólo una pequeña alícuota del oligosacárido fue sometida a hidrólisis total. Por otra parte, ya en C. fasciculata se había informado la ausencia de marca radioactiva en glucosamina después de realizar la hidrólisis del oligosacárido proveniente de Dol-P-P (108). En ese caso aparentemente los restos de N-acetilglucosamina no aparecían marcados incluso después de 1 h de incubación de las células con (^{14}C)glucosa (108).

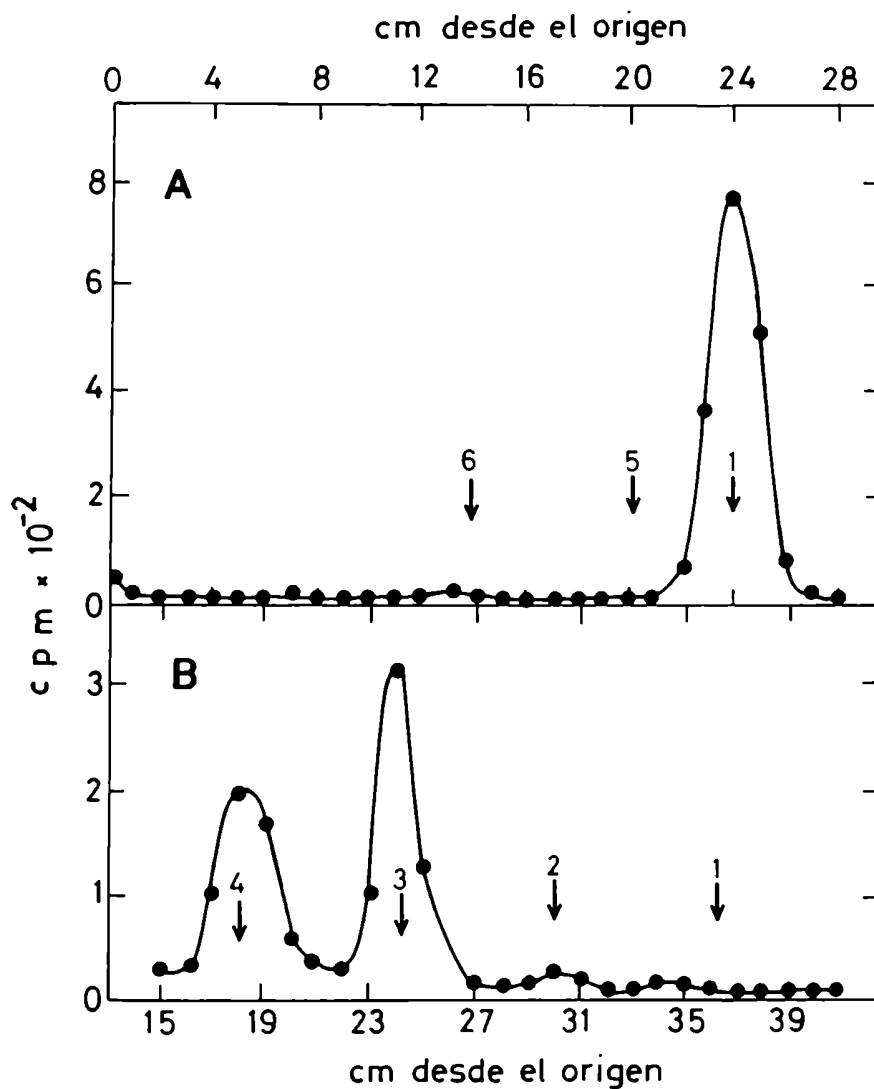


FIGURA 18: Caracterización del oligosacárido unido a Dol-P-P. Tratamientos químicos.

Parte del material del pico I en la Fig. 17 B se sometió a hidrólisis ácida total y los productos se cromatografiaron en papel con solvente A (panel A). Otra alícuota del compuesto del pico I se sometió a acetólisis y los fragmentos obtenidos se corrieron en cromatografía en papel con solvente D (panel B). Las fracciones que no se muestran carecen de radioactividad.

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

III.1.5. Acetólisis

Se denomina acetólisis al tratamiento químico que produce la escisión preferencial de enlaces α -1,6 entre residuos de manosa (125). El análisis de los fragmentos producidos permite dilucidar parcialmente la estructura de oligosacáridos de alta manosa. Con ese fin se sometió a acetólisis una alícuota del material que corresponde al pico I de la Fig. 17 B. Los productos de acetólisis separados por cromatografía en papel se presentan en la Fig. 18 B. Estos migran como Man_3 y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Si se consulta la Fig. 14 podrá observarse que estos serían los fragmentos esperados si el oligosacárido que se estudia tuviera la misma estructura que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unido a lípido de C. fasciculata, C. hamosa y amastigotes axénicos de T. cruzi.

III.2. Monosacáridos unidos a Dol-P sintetizados "in vivo"

Células de L. enriettii fueron incubadas durante 15 min con (^{14}C)glucosa. Luego se realizó una partición de Folch y de la fase inferior se purificaron los Dol-P-monosacáridos radioactivos. Los monosacáridos fueron obtenidos por hidrólisis ácida suave de los derivados de Dol-P y luego identificados por cromatografía en papel. En la Fig. 19 se presentan los resultados; se observa un pico que migró como manosa, indicando que el único derivado de Dol-P sintetizado fue Dol-P-Man.

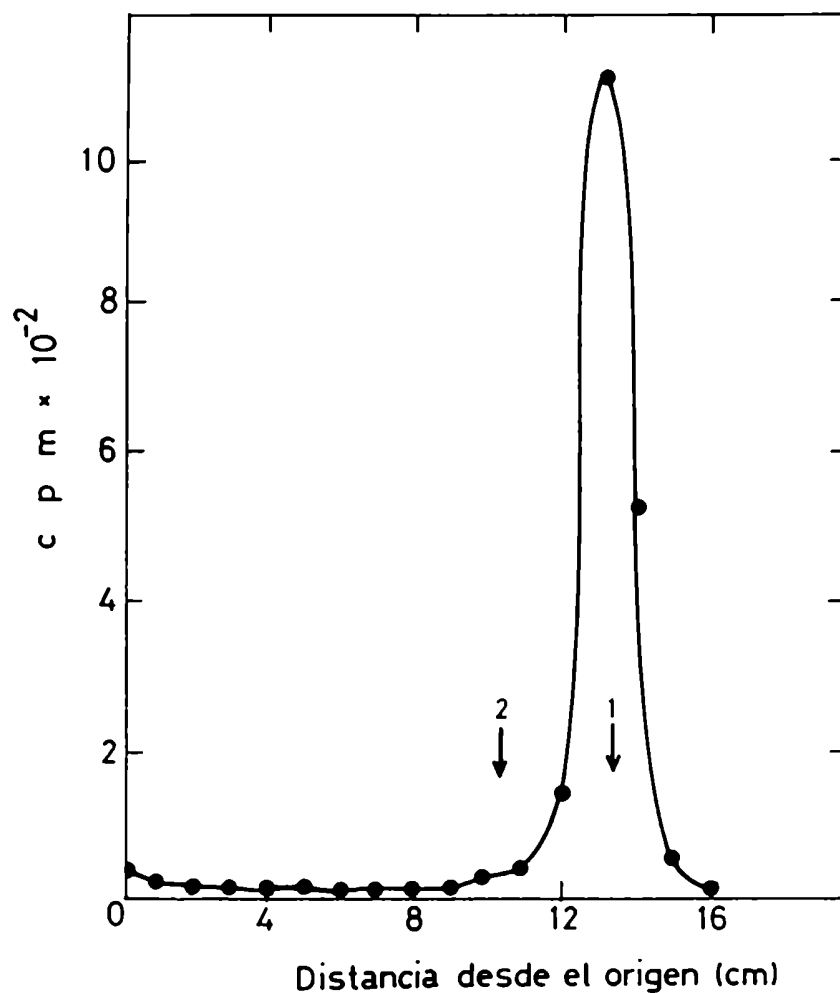


FIGURA 19: Monosacáridos unidos a Dol-P en L. enriettii.

Los Dol-P-monosacáridos sintetizados "in vivo" en presencia de ($U-^{14}C$)glucosa se aislaron como se describe en Materiales y Métodos. Los monosacáridos liberados de Dol-P por hidrólisis ácida suave se cromatografiaron en papel con solvente B.

Standards: 1, manosa; 2, glucosa.

Discusión

Los resultados presentados permiten caracterizar al único derivado de Dol-P-P acumulado "in vivo" por L. enriettii como Man₇GlcNAc₂. De tal manera, L. enriettii compartiría con los demás tripanosomátidos analizados hasta el momento la característica de sintetizar derivados de Dol-P-P no glucosilados.

No ha sido el objetivo de este trabajo la caracterización detallada de la estructura del oligosacárido unido a lípido. Sin embargo, los datos que aporta la acetólisis sugieren que la estructura del oligosacárido Man₇GlcNAc₂ de L. enriettii sería la misma que la del oligosacárido presente en C. fasciculata (109), C. harmosa (114) y amastigotes de cultivo axénico de T. cruzi (115) (ver Fig. 14) y que la del intermediario en la formación de Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol en mamíferos (44) (ver Fig. 6).

De tal manera, las evidencias presentadas contradicen la sugerencia dada anteriormente (111) según la cual los tripanosomátidos pertenecientes a un mismo género acumularían como derivado de Dol-P-P un oligosacárido del mismo tamaño. Recuerde el lector que en L. adleri (111) y L. mexicana (113) se había demostrado la síntesis de Man₆GlcNAc₂ como derivado de mayor tamaño.

Por otra parte, se muestra la incapacidad de L. enriettii para sintetizar Dol-P-Glc "in vivo". Este resultado podría explicar la ausencia de derivados glucosilados de Dol-P-P; sin embargo, como se verá más adelante, se requieren estudios "in vitro" para corroborar esta posible explicación. Esos estudios se presentan en el capítulo V de esta tesis.

CAPITULO IV

MECANISMO DE GLICOSILACION DE PROTEINAS EN *Euglena gracilis*

Antecedentes y Objetivos

Ya se ha comentado que la incapacidad de sintetizar derivados de Dol-P-P glucosilados es una característica universal de los tripanosomátidos previamente estudiados y a los que ahora se suma *L. enriettii*. Además, junto con las mutantes de levadura aisladas por el grupo de Robbins (23,24) constituyen los únicos organismos que transfieren a proteínas solamente oligosacáridos no glucosilados.

Tratando de encontrar una explicación a este comportamiento surgen en principio dos preguntas: la incapacidad de sintetizar $\text{Glc}_3\text{MangGlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$,

- será común a todos los protozoarios por ser organismos que están en los eslabones más bajos del árbol evolutivo de los eucariotes?, o
- existirá sólo en los tripanosomátidos, quizás como adaptación al parasitismo?

Se han mencionado en la Introducción los resultados presentados por Keenan en *Tetrahymena pyriformis* (60) y Müller en *Volvox carteri* (62) que hacían sospechar la existencia de derivados de Dol-P-P glucosilados y su transferencia a proteínas; pero en ningún caso se realizaron ensayos "in vivo" que permitieran caracterizar el oligosacárido transferido a proteínas en protozoarios diferentes de los tripanosomátidos.

Intentando responder las preguntas planteadas se decidió entonces estu-

diar el mecanismo de glicosilación de proteínas en E. gracilis, protozoario de vida libre que pertenece a una Clase diferente a la de los tripanosomátidos (ver sección 1.8.).

IV. Resultados

IV.1. Oligosacáridos unidos a Dol-P-P

Células de E. gracilis que habían crecido en medio A se incubaron durante 15 y 25 min. con (U-¹⁴C)glucosa. Se aislaron los derivados de Dol-P-P y los oligosacáridos liberados por tratamiento ácido suave se identificaron por cromatografía en papel desarrollada en solvente C. La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos. Tanto con 15 como con 25 minutos de incubación (paneles A y B respectivamente), el principal compuesto que se detecta migra como un standard de Glc₃MangGlcNAc₂ (pico I).

A continuación se reunieron las sustancias que migraron en el pico I en los paneles A y B de la Fig. 20 y se sometieron a hidrólisis total. Como se ve en la Fig. 21, por cromatografía en papel se detectan dos productos principales que migran como manosa y glucosa, y uno menor que comigra con un standard de glucosamina. Un cuarto pico con escasa migración podría corresponder al disacárido $\text{GlcNH}_2\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNH}_2$ (producto de desacetilación en medio ácido de GlcNAc₂) que es muy resistente a la hidrólisis.

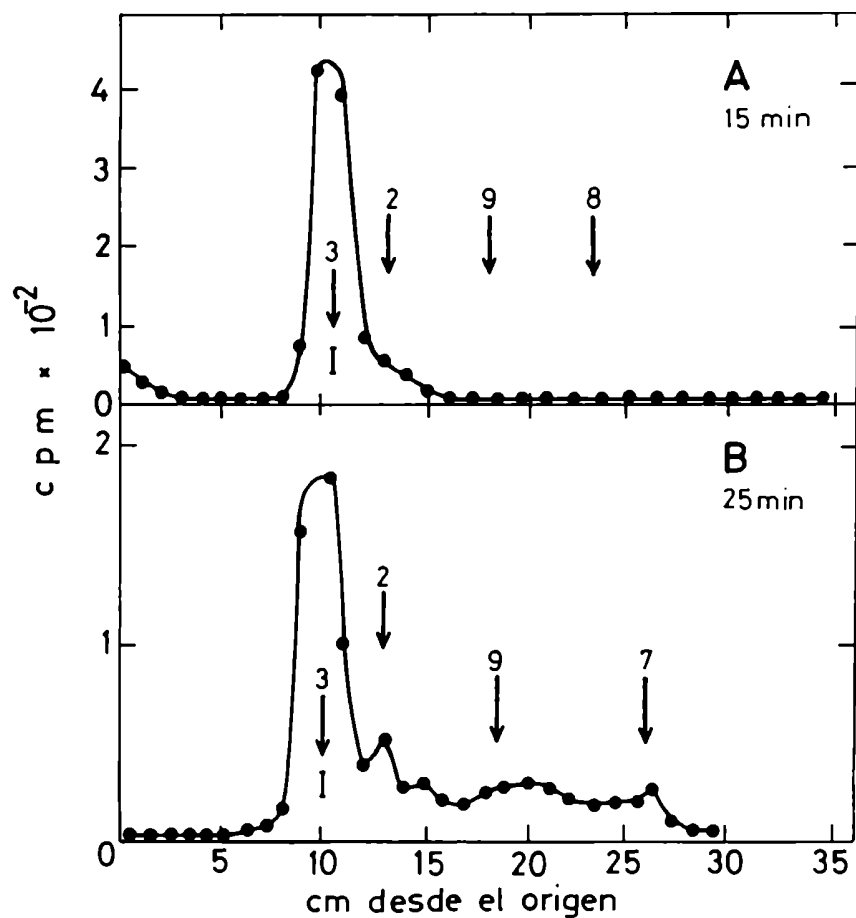


FIGURA 20: Oligosacáridos unidos a Dol-P-P en *E. gracilis*.

Los Dol-P-P oligosacáridos se aislaron de células cultivadas en medio A e incubadas con (U-¹⁴C)glucosa por los tiempos indicados en cada panel. Los oligosacáridos se separaron del Dol-P-P por hidrólisis ácida suave y se corrieron en cromatografía en papel con solvente C.

Standards: 3, Glc₃MangGlcNAc₂; 2, Glc₂MangGlcNAc₂; 9, MangGlcNAc; 8, MangGlcNAc; 7, Man₇GlcNAc.

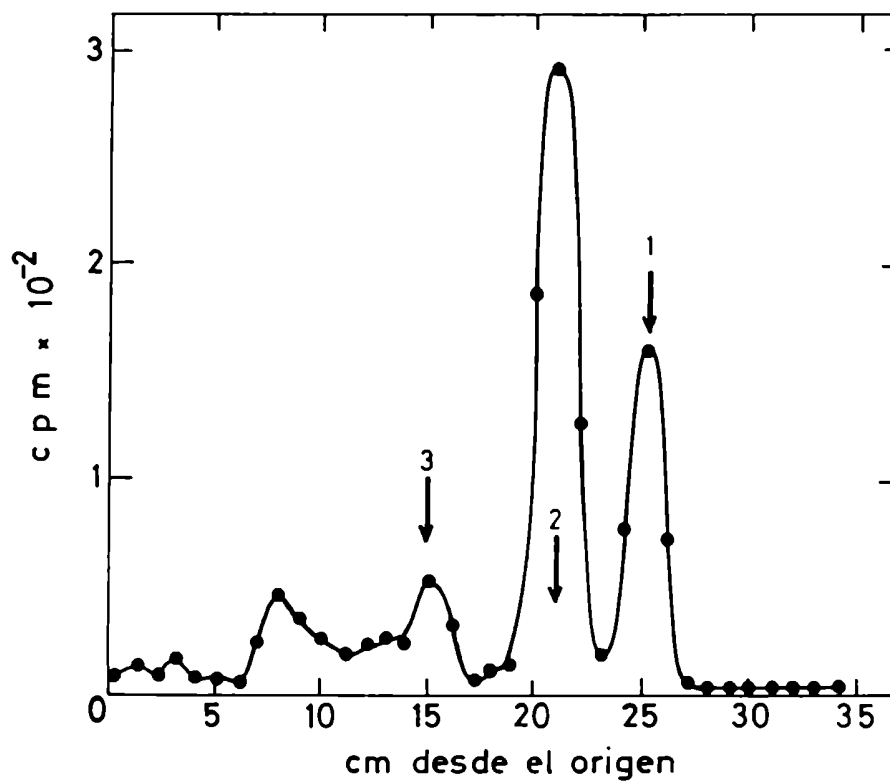


FIGURA 21: Composición de azúcares del oligosacárido unido a Dol-P-P. Las sustancias que migraron como el "pico I" en la Fig. 20 A y B se eluyeron, se reunieron y fueron sometidas a hidrólisis ácida total. Los productos se cromatografiaron en papel con solvente A. Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, glucosamina.

IV.2. Oligosacáridos tipo "alta manosa" unidos a proteína

Se realizaron incubaciones de células de E. gracilis crecidas en medio A o B con (U-¹⁴C)glucosa. A distintos tiempos se tomaron alícuotas las cuales fueron sometidas a una partición de Folch, degradación de proteínas y purificación de los glicopéptidos. La descripción de este procedimiento se detalló en el capítulo II. Los glicopéptidos aislados fueron tratados con la enzima endo-H y así se obtuvieron los oligosacáridos sensibles a endo-H (de "alta manosa"). Para caracterizar los oligosacáridos de glicoproteínas maduras se procedió incubando las células durante 20 min con (U-¹⁴C)glucosa; cumplido ese tiempo se diluyó 10 veces con medio B y se incubó por otros 130 min más (corresponde al panel D de la Fig. 22).

La Fig. 22 muestra los perfiles de oligosacáridos sensibles a endo-H obtenidos por cromatografía en papel con solvente C. Varios puntos merecen comentarse:

- A tiempos de incubación semejantes no se detectan diferencias significativas en el perfil de oligosacáridos provenientes de células cultivadas en medio A o B, donde las fuentes de carbono fueron glucosa y etanol, respectivamente (compárense los paneles B y C de la Fig. 22).
- El oligosacárido de mayor tamaño que se observa a los 15, 20 y 25 min de incubación migra como $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (paneles A - C) y no se detecta en glicoproteínas maduras (panel D).
- En las glicoproteínas maduras parecen predominar las formas menos procesadas de los oligosacáridos de alta manosa, fundamentalmente $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (panel D).

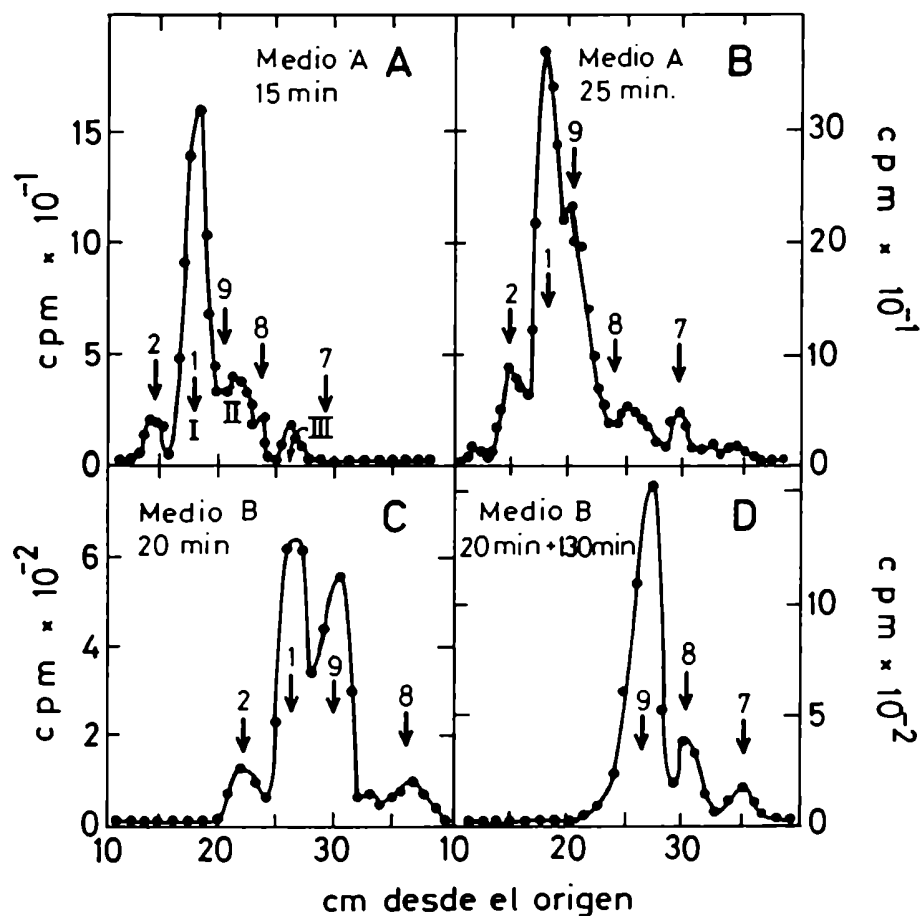


FIGURA 22: Oligosacáridos sensibles a endo-H en glicoproteínas de E. gracilis.

En cada panel aparece el medio en que fueron cultivadas las células y el tiempo de incubación con (U- ^{14}C)glucosa. D: las células fueron incubadas durante 20 min con la marca radioactiva; luego se diluyó 10 veces con medio B y se incubó 130 min más. En todos los casos se aislaron los glicopéptidos y de ellos se purificaron los oligosacáridos sensibles a endo-H. Estos se corrieron en cromatografía en papel con solvente C.

Standards: 2, $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$; 1, $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$; 9, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$; 8, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$; 7, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$.

- En los paneles A, B y C se observa un compuesto que comigra con un standard de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (pico I). Además, en la muestra obtenida a los 15 min de incubación se ven dos picos de radioactividad que migran: uno entre $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (pico II), y el otro entre $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (pico III). En varios sistemas (85,88) compuestos con migraciones semejantes que aparecen sólo a tiempos cortos de marcación, han sido caracterizados como $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (el pico II) y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (el pico III).

Discusión

El estudio del mecanismo de glicosilación de proteínas en E. gracilis ha sido enfocado desde dos puntos de vista: a) del derivado de Dol-P-P acumulado, y b) de los oligosacáridos unidos a proteínas de alta manosa.

Aquí se muestra la acumulación "in vivo" en E. gracilis de un oligosacárido mayoritario unido a Dol-P-P. De acuerdo a su migración en papel y su composición en monosacáridos, este oligosacárido sería $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

En cuanto a los oligosacáridos sensibles a endo-H unidos a proteína, la detección de $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ indica que un oligosacárido glucosilado ha sido transferido a proteínas. Se asume que se trata de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ por el criterio que se explica a continuación. No se esperaba detectar $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína debido a que su vida media, una vez transferido, se calcula inferior a dos minutos en otros sistemas bien conocidos (células de mamífero) (129). En cambio $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, producto de procesamiento de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, se detecta habitualmente por tener una vida media más larga. De tal manera, la presencia de $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína sería una evidencia indirecta de la transferencia de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a partir

del lípido intermediario.

En resumen, la acumulación de $\text{Glc}_3\text{MangGlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ y la detección de $\text{Glc}_2\text{MangGlcNAc}_2$ unido a proteína, nos permiten asumir que $\text{Glc}_3\text{MangGlcNAc}_2$ es el oligosacárido que se transfiere a proteínas en *E. gracilis*.

Por otra parte, la aparición de $\text{Glc}_1\text{MangGlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína, a tiempos cortos de marcación, indicaría la existencia de glucosilación transitoria de glicoproteínas en *E. gracilis*. En eucariotes superiores se ha demostrado que esos dos oligosacáridos se originan por la glucosilación de MangGlcNAc_2 y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína, respectivamente. La glucosilación transitoria ya ha sido demostrada también en tripanosomátidos (ver sección I.10.). En cuanto al oligosacárido $\text{Glc}_1\text{MangGlcNAc}_2$ detectado en proteínas, no podemos discriminar si ha sido originado por deglucosilación de $\text{Glc}_2\text{MangGlcNAc}_2$, por glucosilación de MangGlcNAc_2 o por ambos mecanismos.

En base a las evidencias aquí presentadas y a los conocimientos previos sobre eucariotes superiores, en la Fig. 23 se presenta el modelo propuesto para la N-glicosilación de proteínas en *E. gracilis*.

Respondiendo entonces a una de las preguntas planteadas en los objetivos, ahora sabemos que la característica de transferir a proteínas oligosacáridos sin residuos de glucosa observada en tripanosomátidos, no es común a todos los protozoarios. *E. gracilis*, un protozoario de vida libre, transfiere a proteínas $\text{Glc}_3\text{MangGlcNAc}_2$ al igual que el resto de los eucariotes.

Para los neófitos en la bioquímica y sistemática de protozoarios, es interesante destacar que se han observado varias similitudes desde el punto de vista de la bioquímica descriptiva entre euglénidos y tripanosomátidos (por ej.: presencia de citocromos tipo c y enzimas del ciclo del glioxilato

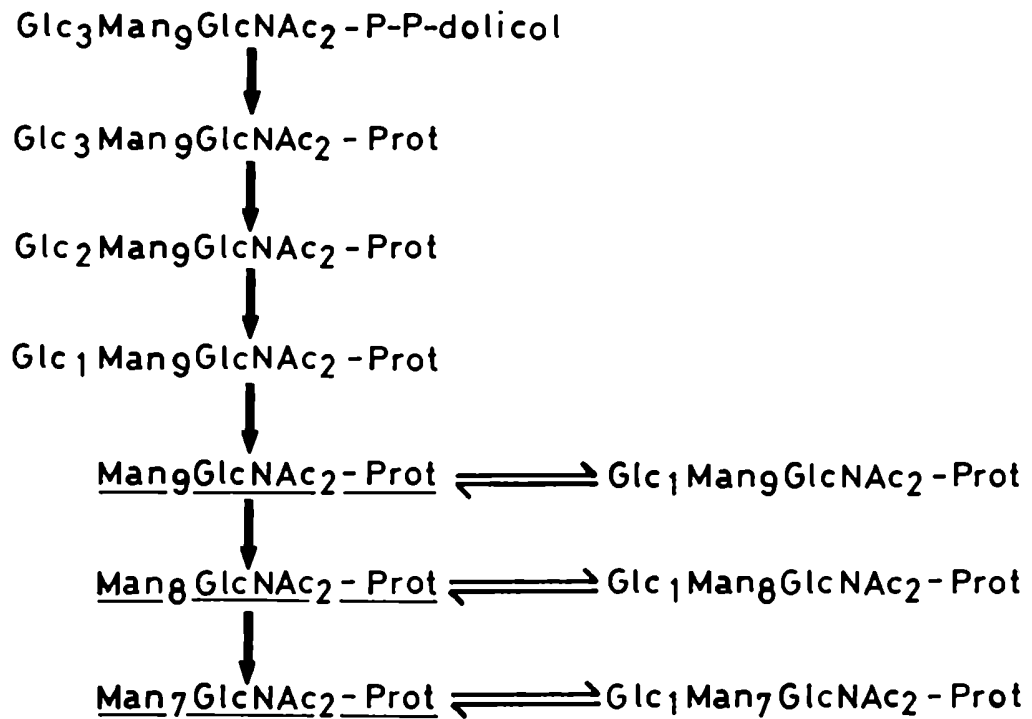


FIGURA 23: Mecanismo de N-glicosilación de proteínas propuesto para E. gracilis.

Sobre la derecha de la figura aparecen las formas provenientes de glucosilación transitoria. Los compuestos subrayados son los que se encuentran en las glicoproteínas maduras.

(130)), dos grupos que dentro de los protozoarios están bastante distanciados.

Por otra parte, se recuerda al lector que preparaciones de membrana del protozario fotosintético Volvox carteri producían la formación de $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ como derivado de Dol-P-P de mayor tamaño (62), y que con extractos libres de células de Tetrahymena pyriformis se observaba síntesis de un compuesto glucosilado unido a lípido (no caracterizado) y su posible transferencia a proteínas (60). Todas estas evidencias, tomadas en conjunto, permiten reafirmar a los tripanosomátidos como excepciones entre los eucariotes (incluso entre los protozoarios) en cuanto a la transferencia a proteínas de oligosacáridos no glucosilados. Sin embargo, todavía no se sabe si la incapacidad de sintetizar Dol-P-P-oligosacáridos glucosilados en los tripanosomátidos está relacionada con su especialización al parasitismo. Para intentar resolver esta cuestión sería interesante conocer el mecanismo de glicosilación de proteínas en algún miembro del Suborden Bodonina. Los Bodoninos son protozoarios que pertenecen al mismo orden que los tripanosomátidos (O. Kinetoplastida) pero que presentan formas de vida libre. Lamentablemente, este estudio no se pudo realizar por la imposibilidad de obtener los organismos.

CAPITULO V

SINTESIS "in vitro" DE DERIVADOS DE DOL-P EN TRIPANOSOMATIDOS

Antecedentes y Objetivos

En este capítulo se intentará explicar la ausencia de derivados de Dol-P-P glucosilados en los tripanosomátidos.

Existen evidencias de que la falta de glucosa en el medio de cultivo de algunas células de mamífero provoca la acumulación y transferencia a proteínas de oligosacáridos de menor tamaño que los que las mismas acumulan en un medio rico (28,29). Habitualmente el medio utilizado en la marcación de tripanosomátidos no contiene glucosa (medio MEM/piruvato) y se pensó que esa podía ser la causa de la detección de derivados de Dol-P-P no glucosilados. Sin embargo, se ha informado que la marcación de C. fasciculata o de T. cruzi en presencia ya sea de 5,5 mM glucosa o de 5 mM piruvato de sodio produce la síntesis del mismo derivado: $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en el primer protozoario (114) y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en el segundo (110). Por otra parte, también se mostró que inhibiendo la síntesis de proteínas de manera de acumular Dol-P-P-oligosacáridos por falta de polipéptidos aceptores, también se acumula $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ en C. fasciculata (111). Se descarta así la posibilidad de que se sintetizen derivados glucosilados y que no sean detectados debido a su inmediata transferencia a proteínas.

Un último punto a considerar se refiere a la capacidad de sintetizar Dol-P-Glc. Se ha reportado que en T. cruzi (110), C. fasciculata (114), T. dionisii y L. samueli (111), y L. enriettii (esta tesis) no se detecta la síntesis de Dol-P-Glc después de incubar los protozoarios con (U- ^{14}C)glucosa.

Estas observaciones podrían explicar la ausencia de derivados de Dol-P-P glucosilados en estos tripanosomátidos, dado que el Dol-P-Glc actúa como dador de restos glucosilo (ver sección I.4.). Sin embargo, el hecho que no se observe síntesis de Dol-P-Glc "in vivo", no indica necesariamente la ausencia de la actividad enzimática que lo sintetiza; por ejemplo, algún trastorno en el transporte de los sustratos o su rápida utilización "in vivo" podrían conducir a la incapacidad de sintetizar o de detectar Dol-P-Glc. Trabajando "in vitro" podría identificarse la naturaleza de este defecto.

Para tratar de explicar el origen de la ausencia de oligosacáridos glucosilados unidos a Dol-P-P en tripanosomátidos se realizaron ensayos de síntesis de Dol-P-Glc utilizando preparaciones de membrana. Estos ensayos fueron efectuados tanto con tripanosomátidos monogénéticos (C. fasciculata y B. culicis) como digénéticos (L. enriettii y T. cruzi) con el objeto de cubrir un panorama relativamente amplio.

V. Resultados

Preparaciones de membrana de C. fasciculata, L. enriettii, B. culicis y T. cruzi se incubaron durante cinco minutos con diferentes concentraciones de Dol-P de hígado y GDP-(¹⁴C)Man o UDP-(¹⁴C)Glc y en presencia de 12 mM 5'AMP como inhibidor de pirofosfatasa de nucleótido-azúcares. Las incubaciones se detuvieron realizando una partición de Folch y se determinó la radioactividad presente en cada fase inferior, después de haber sido lavadas como se indicó en II.5.1. La Fig. 24 A-D muestra que en los cuatro protozoarios la presencia de Dol-P estimuló la síntesis de un compuesto liposoluble utilizando GDP-(¹⁴C)Man como sustrato. En cambio, no se detectó la formación de un pro-

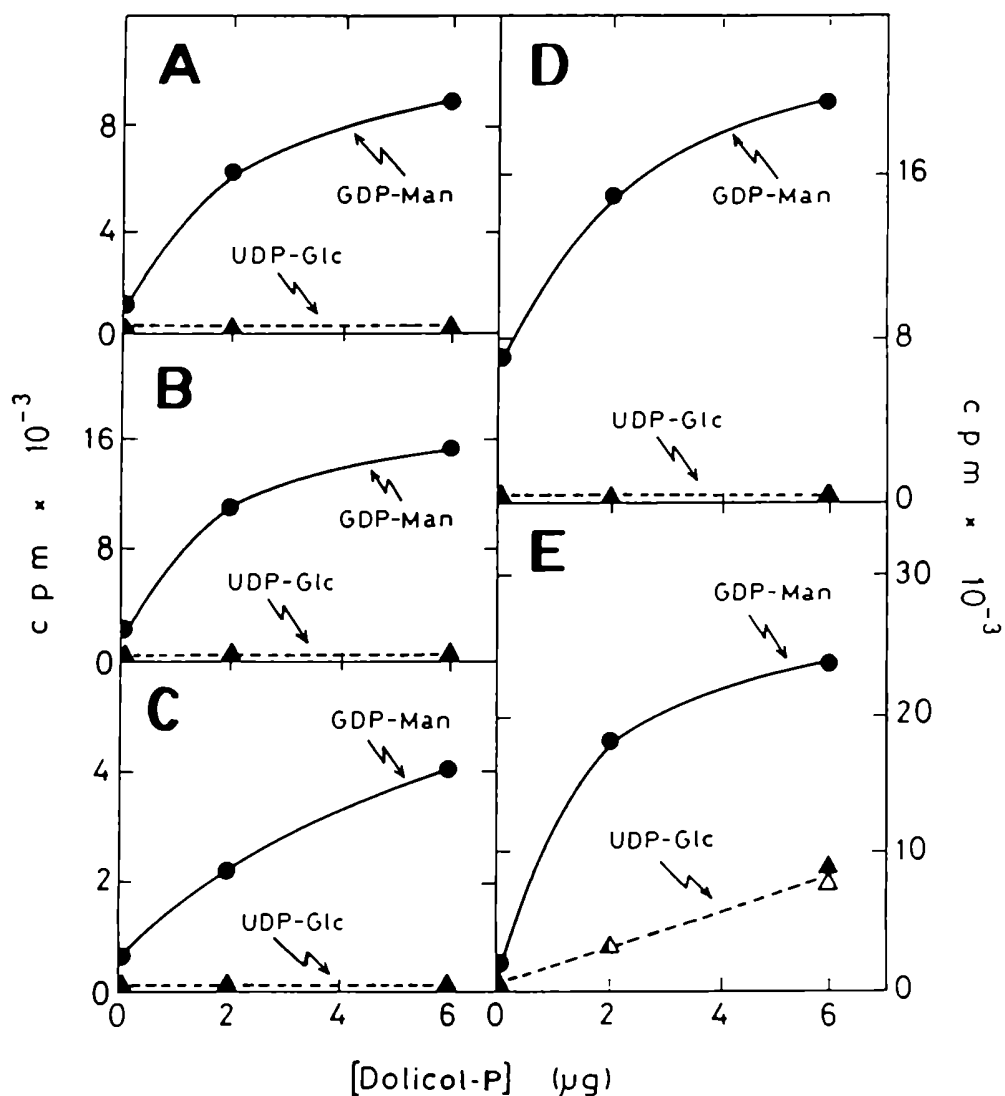


FIGURA 24: Síntesis de Dol-P-monosacáridos "in vitro".

Se incubaron preparaciones de membrana de *C. fasciculata* (A), *L. enriettii* (B), *B. culicis* (C), epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tul 0 (D) y de hígado de rata (E) y de hígado de rata (E), con concentraciones crecientes de Dol-P de hígado y GDP-(¹⁴C)Man (●-●) o UDP-(¹⁴C)Glc (▲-▲). E: ▲-▲ y △-△ indican incubaciones realizadas con 0,6 mg de proteína microsomal de rata o con la misma cantidad de esa preparación más microsomas de *C. fasciculata*, respectivamente. Se midió la radioactividad presente en la fase orgánica según se describió en II.5.1.

ducto de esas características a partir de UDP-(¹⁴C)Glc.

El compuesto liposoluble sintetizado por microsomas de L. enriettii a partir de GDP-(¹⁴C)Man y Dol-P fue caracterizado como sigue: a) por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo/metanol (2:1) eluyó con un gradiente de formiato de amonio en la misma posición en la que lo hizo un standard de Dol-P-Man sintetizado por microsomas de hígado de rata. En la Fig. 25 A se muestra el perfil de elución de esta columna. b) La hidrólisis ácida suave del compuesto purificado por DEAE-celulosa de la Fig. 25 A reveló por cromatografía en papel la presencia de manosa como único azúcar radioactivo (Fig. 25 B). La caracterización de los compuestos liposolubles producidos a partir de GDP-Man y Dol-P por T. cruzi, C. fasciculata y B. culicis dio resultados semejantes a los presentados para L. enriettii.

La incapacidad de sintetizar Dol-P-Glc a partir de Dol-P y UDP-(¹⁴C)Glc observada en la Fig. 24 podría deberse a la falta de sustrato radioactivo debido a una inmediata degradación del mismo al iniciarse el ensayo. Si este fuera el caso, alícuotas de la fase superior producida en la partición de Folch con la que se detuvieron los ensayos, cromatografiadas en un solvente adecuado, deberían mostrar la ausencia de UDP-(¹⁴C)Glc. Sin embargo, la cromatografía en papel desarrollada en solvente E de alícuotas de las fases superiores muestra que, terminado el ensayo, entre 50 y 90% de la radioactividad inicial se recupera como UDP-Glc en los cuatro tripanosomátidos. Los resultados se presentan en la Fig. 26. De aquí se concluye que la falta de síntesis de Dol-P-Glc no es debida a la degradación del sustrato durante los ensayos.

Por otra parte, cuando se realizaron ensayos con microsomas de hígado de rata bajo las mismas condiciones que se utilizaron para los tripanosomátidos,

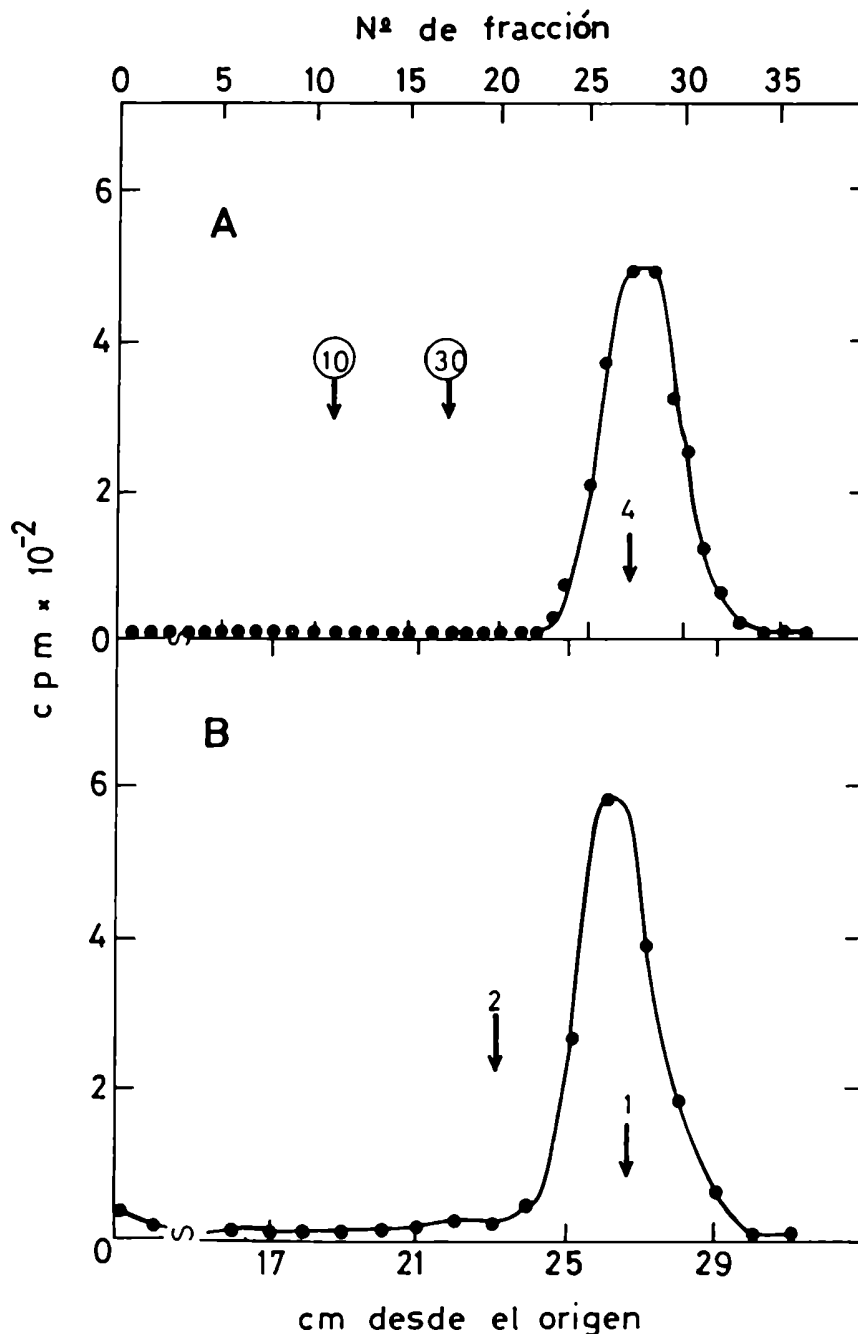


FIGURA 25: Caracterización de Dol-P derivados sintetizados "in vitro".

El material liposoluble de la Fig. 24 B sintetizado por membranas de L. enriettii fue caracterizado por: A, cromatografía en columna de DEAE-celulosa (forma acetato) equilibrada con cloroformo/metanol (2:1), y eluida con 10 (10) y 30 (30) mM de formiato de amonio en el mismo solvente, en las fracciones que indican las flechas (ver sección II.2.4.); B, el compuesto purificado por DEAE-celulosa fue sometido a hidrólisis ácida suave y los productos acuosolubles se corrieron en cromatografía en papel con solvente A.

Standards: H, Dol-P-Man sintetizado por microsomas de hígado de rata; 1, manosa; 2, glucosa.

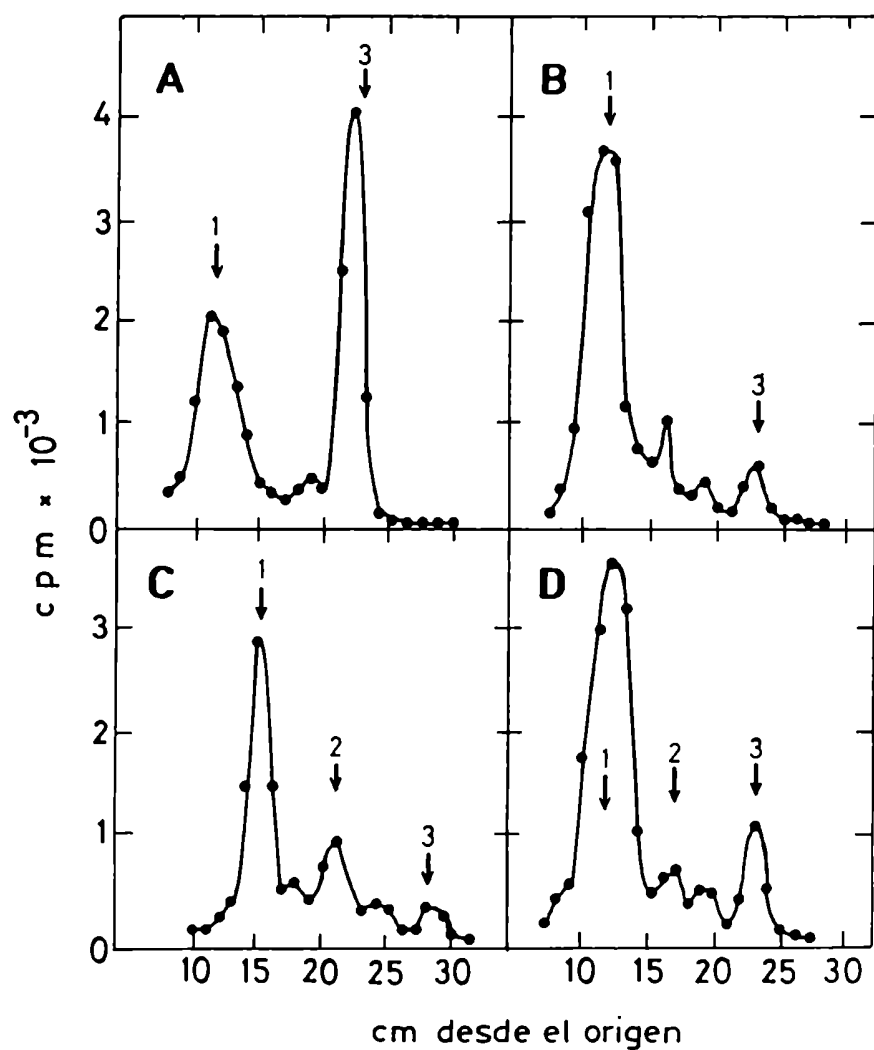


FIGURA 26: Síntesis de Dol-P-Glc "in vitro". Control de degradación.

Terminadas las incubaciones de síntesis de Dol-P-Glc de la Fig. 24, 100 μ l de la fase superior formada durante la partición de Folch, se sembraron en papel y se cromatografiaron con solvente E. Las membranas usadas en cada ensayo fueron: C. fasciculata (panel A), L. enriettii (B), B. culicis (C) y T. cruzi (Tul O) (D). No se muestran las fracciones que no llevaban radioactividad. Standards: 1, UDP-Glc; 2, Glc-6-P; 3, glucosa.

se observó síntesis de Dol-P-Glc y Dol-P-Man radioactivos (Fig. 24 E). En otro experimento se mezclaron microsomas de hígado de rata y de C. fasciculata (0,6 mg de proteína de cada uno) y se incubaron con UDP-(¹⁴C)Glc. El resultado obtenido fue el mismo que cuando se incubaron sólo microsomas de hígado, indicando que la preparación de C. fasciculata no contiene ningún factor que inhiba la síntesis de Dol-P-Glc o que lo degrade (Fig. 24 E).

Discusión

Los resultados presentados muestran que preparaciones de membrana de C. fasciculata, L. enriettii, B. culicis y T. cruzi son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc, en condiciones bajo las cuales sintetizan un compuesto liposoluble caracterizado como Dol-P-Man. Se concluye entonces que estos tripanosomátidos carecerían de la actividad de transferasa involucrada en la formación de Dol-P-Glc. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por incubación de células con (U-¹⁴C)glucosa, pero aquí se verifica por primera vez la existencia de una deficiencia enzimática. Las observaciones hechas "in vivo" no permitían concluir al respecto, dado que podrían ser múltiples las razones por las cuales no se detectara Dol-P-Glc "in vivo". Por ejemplo, se ha descrito una línea celular de mamífero que presenta una severa reducción en la galactosilación de proteínas, al tiempo que sintetiza cantidades normales del nucleótido-azúcar dador (UDP-Gal) y presenta actividad normal de galactosil-transferasa "in vitro" (131-132). Deutscher y Hirschberg (133) demostraron que esta línea celular es incapaz de translocar el UDP-Gal desde su sitio de síntesis, el citoplasma, al lumen del aparato de Golgi (donde ocurre la galactosilación), con lo que se explica el fenotipo observado "in

vivo". Algo semejante fue observado en una línea celular mutante que carece de residuos de ácido siálico en sus glicoproteínas. En este caso está afectado el transporte de CMP-ácido siálico a través de la membrana del aparato de Golgi, y la actividad de sialil-transferasa es normal (134).

La ausencia de actividad de UDP-Glc:Dol-P glucosiltransferasa descrita en este capítulo, permitiría explicar la formación y transferencia a proteínas de derivados de Dol-P-P carentes de residuos de glucosa en los tripanosomátidos estudiados. Se recuerda al lector que, al menos en células de mamíferos (43) y en levadura (42), el dador de restos glucosilo en el ensamblaje de $\text{Glc}_3\text{MangGlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ es el Dol-P-Glc. En este sentido los tripanosomátidos serían semejantes a las mutantes de Saccharomyces cerevisiae alg 5-1 descritas por Runge y col. (23). Estas levaduras son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc y por esa razón transfieren a proteínas un oligosacárido no glucosilado: MangGlcNAc_2 . También se determinó que microsomas de las mutantes alg 5-1 son capaces de transferir Dol-P-Glc (exógeno) a Dol-P-P-oligosacáridos, mientras que las mutantes alg 6-1 pueden sintetizar Dol-P-Glc pero son incapaces de transferir restos glucosilo al lípido-oligosacárido. En el caso de los tripanosomátidos aquí estudiados no se verificó su capacidad de transferir glucosilos de Dol-P-Glc a Dol-P-P-oligosacáridos. Por lo tanto, la incapacidad de sintetizar Dol-P-Glc es una deficiencia primaria y no se puede descartar que también tengan afectado el mecanismo de transferencia de glucosilos a partir de Dol-P-Glc.

Se comentó en el capítulo III que en L. adleri y H. muscarum (111) se había observado la síntesis "in vivo" de Dol-P-Man y Dol-P-Glc. Estos tripanosomátidos no han sido estudiados en el presente trabajo pero previamente se especuló que la síntesis de derivados de Dol-P-P no glucosilados se debería a

la incapacidad de transferir restos glucosilo de Dol-P-Glc al oligosacárido preformado. Si este fuera el caso, ambos tripanosomátidos tendrían la misma deficiencia que las mutantes de levadura alg 6-1 descritas más arriba. Hasta el momento no han sido aportadas pruebas experimentales que avalen esta especulación.

Por otra parte en T. cruzi (85-86), C. fasciculata (114) y B. culicis (112) se ha detectado la glucosilación transitoria de oligosacáridos de alta manosa en glicoproteínas. Dado que estos tripanosomátidos son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc se asume que el dador de restos glucosilo en la reacción mencionada sería el UDP-Glc, tal como fuera determinado previamente para microsomas de hígado de rata (87).

Por el momento, esta es toda la información que podemos aportar acerca del origen de la incapacidad de sintetizar Dol-P-Glc y la consiguiente transferencia a proteínas de oligosacáridos no glucosilados en estos tripanosomátidos. Cabe preguntarse si la falta de actividad de UDP-Glc:Dol-P glucosiltransferasa se debe, entre otras posibilidades, a algún fenómeno de regulación transcripcional, traduccional o post-traduccional, a una mutación (estructural o regulatoria), o sencillamente a que los tripanosomátidos nunca han llevado en su genoma la codificación para esa enzima. Cualquiera fuera el caso surge otra pregunta: ¿existirá alguna ventaja adaptativa en el hecho de transferir oligosacáridos no glucosilados? Por la información que se posee en otros sistemas, parece poco probable que este sea el caso, dado que las evidencias indican que la transferencia de oligosacáridos glucosilados es mucho más eficiente ("in vitro" hasta 25 veces en S. cerevisiae (17)) que la de sus homólogos no glucosilados; si bien es cierto que este comportamiento se observa en organismos que naturalmente transfieren a proteínas

Glc₃Man₉GlcNAc₂, que no es lo que ocurre en los tripanosomátidos.

SINTESIS "in vitro" DE DERIVADOS DE DOL-P-P EN TRIPANOSOMATIDOS
Actividades de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasa

Antecedentes y Objetivos

Observaciones previas indicaban que los tripanosomátidos presentan dos rasgos diferentes al resto de los eucariotes en cuanto a su mecanismo de N-glicosilación, a saber: 1) todas las especies estudiadas transfieren a proteínas oligosacáridos no glucosilados, y 2) algunas especies sintetizan como derivado de Dol-P-P y transfieren a proteínas oligosacáridos con menos de nueve restos de manosa. Los resultados presentados en el capítulo V de esta tesis permiten explicar el primer comportamiento: los tripanosomátidos investigados carecen de actividad de UDP-Glc:Dol-P glucosiltransferasa, lo que los hace incapaces de sintetizar derivados de Dol-P-P glucosilados. Queda aún por explicar el segundo comportamiento; este es el tema que se desarrolla en el presente capítulo.

Se recuerda al lector que entre los tripanosomátidos que "in vivo" acumulan derivados de Dol-P-P con menos de nueve restos de manosa, también existe diversidad. Así, mientras C. fasciculata, C. hamosa y L. enriettii acumulan $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, L. mexicana, L. adleri y B. culicis acumulan $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Además, los derivados de Dol-P-P que sintetizan "in vivo" estas especies tienen la misma estructura que los intermediarios en la síntesis de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ en células de mamífero (comparar Figs. 6 y 14). Estas observaciones hicieron pensar que estos dos grupos de tripanosomátidos carecerían de diferentes actividades de manosiltransferasa involucradas en la síntesis de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$; los tripanosomátidos que

transfieren $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ carecerían de una potencial "manosiltransferasa 8" que catalizaría la adición del octavo residuo de manosa, y aquellos que transfieren $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ no tendrían actividad de "manosiltransferasa 7". Sin embargo, esto no es más que una especulación, dado que hasta el momento no han sido presentadas evidencias que indiquen la existencia de actividades de manosiltransferasa-Dol-P-Man-dependientes distintas en ningún sistema.

Para corroborar la hipótesis planteada fue necesario diseñar un ensayo que permitiera medir actividades de manosiltransferasa individuales en preparaciones de membrana de los diferentes tripanosomátidos. En primer lugar aquí se presenta el diseño del ensayo realizado con microsomas de hígado de rata y a continuación los resultados obtenidos en tripanosomátidos.

VI. Resultados

VI.1. Ensayo de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasas de hígado de rata

VI.1.1. Diseño

Los detalles metodológicos del ensayo diseñado se presentaron en la sección "Incubaciones in vitro" de Materiales y Métodos (II.5.2.). Resumidamente, se incubaron microsomas de hígado de rata con Dol-P, GDP-(^{14}C)Man y aceptores exógenos no radioactivos. Estos últimos consisten en una mezcla de derivados de Dol-P-P de hígado de vaca que contiene todos los precursores entre $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (la verificación se detalla en la sección siguiente). Después de 15 min de incubación se puri-

ficaron los derivados de Dol-P-P contenidos en un extracto 1103 y los oligosacáridos liberados de Dol-P-P por hidrólisis ácida suave se identificaron por cromatografía en papel con solvente C. Como se observa en la Fig. 27 A, en ausencia de aceptores exógenos no se detecta la síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos radioactivos. La adición de aceptores exógenos al ensayo permite la síntesis de varios derivados de Dol-P-P que migran entre los standards de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$, indicando que los microsomas de hígado de rata contienen manosiltransferasas funcionales capaces de utilizar como sustrato aceptores de hígado de vaca. Tal como se esperaba, un compuesto que migró como $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ fue el derivado de mayor tamaño formado en el ensayo. El pico que se observa detrás de éste probablemente corresponda a un derivado glucosilado de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ sintetizado a partir de Dol-P-Glc endógeno.

VI.1.2. Caracterización de los aceptores exógenos

Para utilizar el ensayo diseñado en la medición de actividades individuales de manosiltransferasa era indispensable confirmar que los aceptores exógenos contuvieran todos los precursores requeridos con las estructuras correctas entre $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

Es posible conocer el tamaño de los aceptores exógenos suministrados en el extracto lipídico analizando la distribución de la radioactividad en cada resto de manosa de los productos radioactivos sintetizados por microsomas de hígado (Fig. 27 A). Así, por ejemplo, la ausencia de radioactividad en los residuos a-e (Fig. 5) del oligosacárido $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ sintetizado "in vitro" indicaría la presencia de aceptores de igual o mayor tamaño que

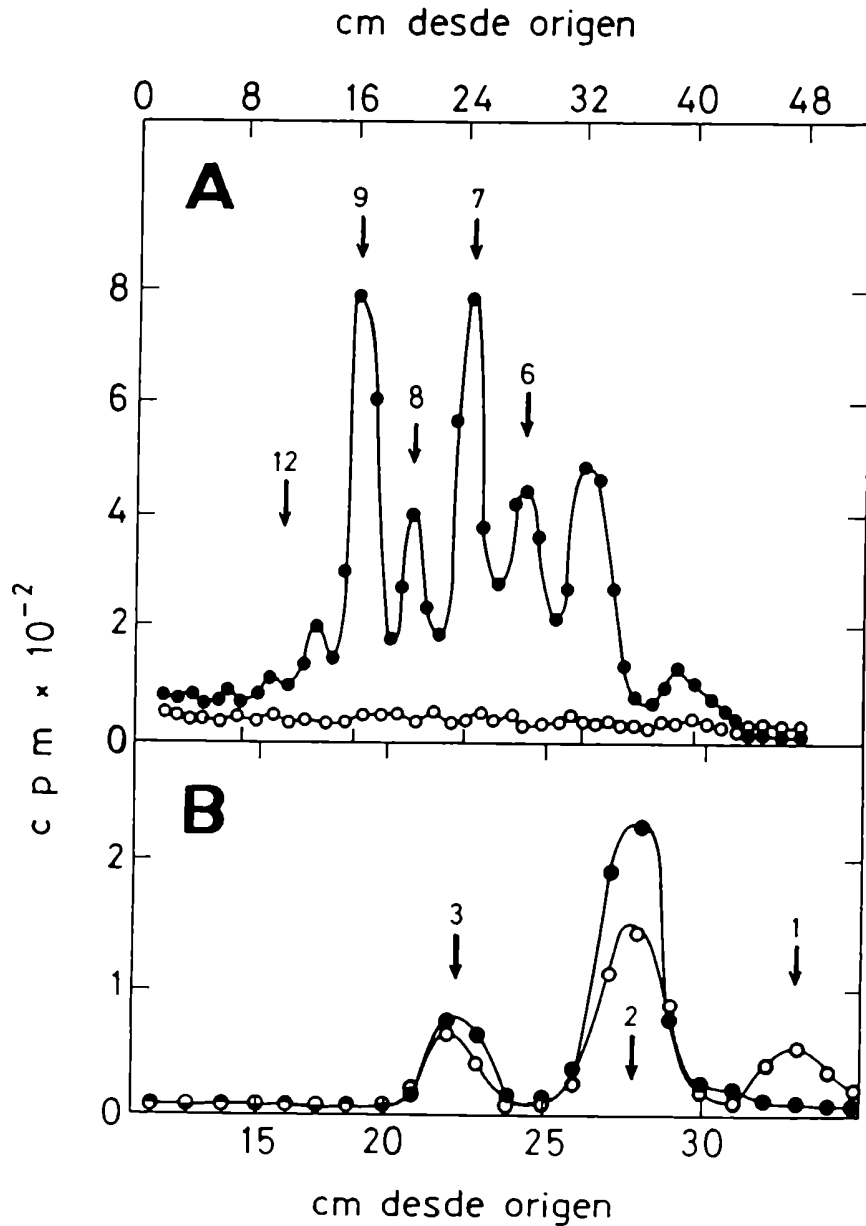


FIGURA 27: Oligosacáridos unidos a Dol-P-P sintetizados por microsomas de hígado.

A: se incubaron microsomas de hígado de rata con Dol-P y GDP-(¹⁴C)Man en presencia (●—●) o ausencia (o—o) de aceptores exógenos. Se extrajeron los Dol-P-P-oligosacáridos, se sometieron a hidrólisis ácida suave y los oligosacáridos liberados se corrieron en cromatografía en papel con solvente C. B: los compuestos que migraron como los standards 9 (●—●) y 6 (o—o) en el panel A, se eluyeron y sometieron a acetólisis. Los productos se analizaron por cromatografía en papel con solvente D. Las fracciones que no se muestran no presentaron radioactividad. Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 6, Man₆GlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; 8, Man₈GlcNAc; 9, Man₉GlcNAc; 12, Glc₃Man₉GlcNAc₂.

Man₅GlcNAc₂. Por otra parte, si se detectara igual cantidad de radioactividad en los residuos h e i de MangGlcNAc₂ indicaría que entre los aceptores no hay MangGlcNAc₂. Por el contrario, si hay más radioactividad en i que en h se confirmaría la existencia de MangGlcNAc₂-P-P-Dol en el extracto lipídico. De la distribución de radioactividad en los distintos residuos de MangGlcNAc₂ se pueden fácilmente obtener otras conclusiones análogas respecto de la presencia de Man₅₋₈GlcNAc₂-P-P-Dol en el extracto.

Como control del método se analizó la estructura de MangGlcNAc, uniformemente marcado en los restos de manosa, proveniente de glicopéptidos de T. cruzi marcados durante 120 min con (¹⁴C)glucosa. La acetólisis de este oligosacárido rindió Man₂, Man₃ y Man₄GlcNAc. La relación de radioactividad manobiosa/manotriosa fue de 0,67 que es prácticamente el valor teórico. En Man₄GlcNAc la radioactividad fue algo menor que lo esperado, probablemente por pérdida selectiva del material que contiene la N-acetilglucosamina durante la acetólisis de la muestra. De tal manera, se confirma que las proporciones relativas de radioactividad en los residuos de manosa c, f, g, h e i (Fig. 5) pueden ser utilizadas para determinar la existencia de ciertos aceptores exógenos. En cuanto a los residuos a, b, d y e, como su recuperación no es cuantitativa, sólo se considerará la ausencia o presencia de radioactividad en ellos.

Se procedió entonces a realizar el análisis estructural de los oligosacáridos sintetizados por microsomas de hígado de rata como derivados de Dol-P-P. El compuesto que migró en la Fig. 27 A como MangGlcNAc se sometió a acetólisis seguida de cromatografía en papel desarrollada en solvente D. En la Fig. 27 B puede observarse que este tratamiento produjo manobiosa (80% de la marca radioactiva) y manotriosa (20% restante), pero no se detectó

radioactividad en $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$. Para determinar el tipo de enlace presente en cada fragmento de acetólisis, éstos fueron sometidos a reducción con NaBH_4 y electroforesis en buffer molibdato de sodio 0.1 M pH 5,0. Bajo estas condiciones los fragmentos que contienen restos de manitol con enlaces α -1,2 cercanos al extremo reductor migran hacia el ánodo, mientras que aquellos con enlaces α -1,3 no migran (135). Después del tratamiento descrito el disacárido migró hacia el ánodo y el trisacárido no migró, indicando la presencia de un enlace (1 \rightarrow 2) en la manobiosa y uno (1 \rightarrow 3) proximal al extremo reductor del trisacárido.

Por lo tanto, de acuerdo al tamaño y a los enlaces presentes en los fragmentos de acetólisis, se concluye que la estructura de $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ unido a lípido sintetizado por microsomas de hígado, es la misma que la que se encuentra "in vivo" en células de mamífero (ver Fig. 6).

A continuación se sugiere al lector remitirse a la Fig. 28 para la mejor comprensión de los resultados que van a presentarse. Para determinar el porcentaje de radioactividad presente en cada residuo de manosa en $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ sintetizado por microsomas de hígado se realizó la hidrólisis total de los fragmentos de acetólisis reducidos con NaBH_4 . Luego, por electroforesis en 0,1 M molibdato de sodio pH 5,0 se separaron los restos de manitol que migran hacia el ánodo, de los de manosa que permanecen en el origen. Por análisis del fragmento de manobiosa se determinó que el 54% de la radioactividad total de $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ se encontraba en el residuo i de la Fig. 28 y que el h llevaba un 26% de la marca. Un estudio semejante del fragmento de manotriosa reveló que el residuo c no tenía marca radioactiva y que f y g juntos (sin poder discriminarlo) contenían el 20% de la radioactividad restante. El hecho que el residuo i haya presentado más radioactividad que el

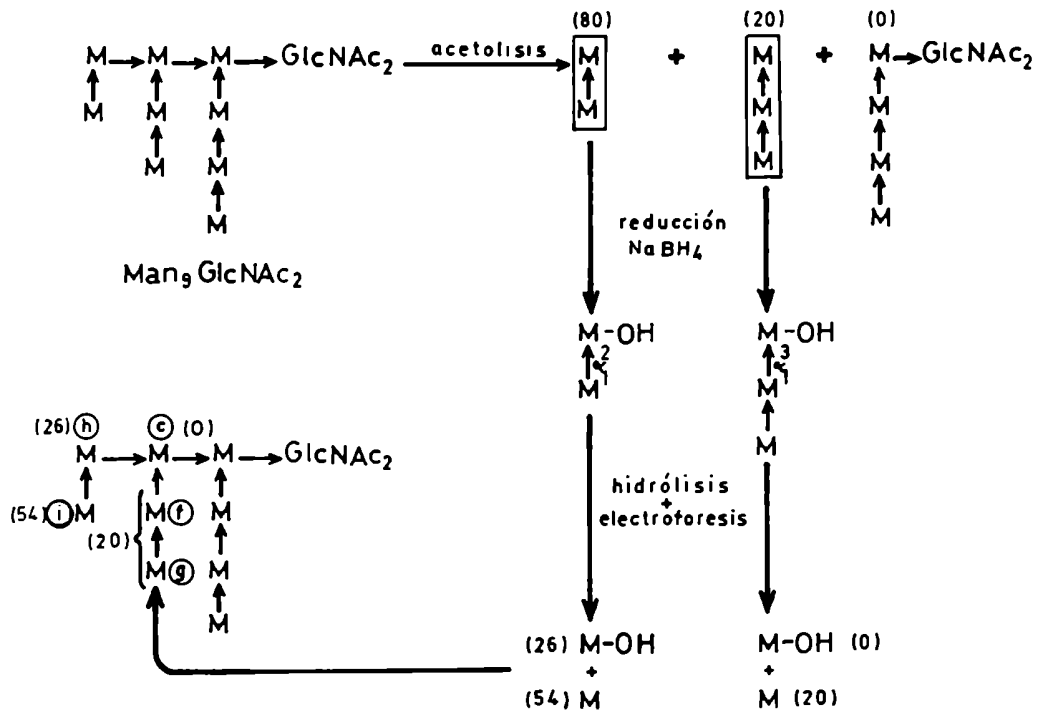


FIGURA 28: Secuencia de tratamientos para el análisis de los aceptores exógenos. Dedución de la existencia de $\text{Man}_5\text{-}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Entre paréntesis aparecen los porcentajes de radioactividad total determinados en cada fragmento o resto sacarídico (M = manosa; M-OH = manitol).

h indica que los aceptores exógenos contienen $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Por razonamientos semejantes se concluye que también hay en los aceptores $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-}$, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-}$ y probablemente $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

Por otra parte, la acetólisis de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ o $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ de la Fig. 27 A rinde fragmentos diferentes a los esperados si existieran con una única estructura, idéntica a la de los intermediarios del ciclo del dolicol en mamíferos. Por ejemplo, en el caso de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ los fragmentos de acetólisis esperados eran Man_2 y tal vez $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ si éste estuviese marcado; sin embargo, como se observa en la Fig. 27 B, no se encontró $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ y junto con un pico principal de Man_2 aparecen dos menores de Man_3 y manosa radioactivos. Parte del material que migró como Man_2 quedó en el origen de una electroforesis en molibdato de sodio después de haber sido reducido, de donde se deduce que existía una unión (1 \rightarrow 3). Concluyendo, parte del $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ unido a lípido sintetizado por microsomas de hígado tiene la misma estructura que el compuesto del mismo tamaño que se sintetiza "in vivo", pero además existirían isómeros con estructuras diferentes. Lo mismo sucedería con $\text{Man}_7\text{-gGlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ sintetizados "in vitro". Rearick y col. (41) encontraron un comportamiento semejante cuando incubaban preparaciones de membrana de células Thy-1⁻ (linfoma murino) con Dol-P-Man y GDP-Man. Ellos observaron que los derivados de Dol-P-P de mayor tamaño sintetizados "in vitro" ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) tenían la estructura que se encuentra "in vivo", mientras que los derivados de menor tamaño se presentaban como una mezcla de isómeros. Resultados en el mismo sentido fueron presentados para preparaciones de membrana de tejido mamario bovino (51,136) y de S. cerevisiae (50). En ambos casos se detectó la síntesis de un solo isómero de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ unido a Dol-P-P, idéntico al sintetizado "in vivo",

mientras que $\text{Man}_{6-8}\text{GlcNAc}_2$ se presentaban al menos como dos isómeros. En el sistema de tejido mamario también se demostró que $\text{Man}_{1-2}\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ eran monoisoméricos (136) y que $\text{Man}_{4-5}\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ se formaban con varias estructuras diferentes (137). La interpretación que se dio a estos resultados (41,51) fue que en un sistema libre de células las manosiltransferasas actuarían con menor especificidad que "in vivo" en cuanto al orden de adición de los restos de manosa, dando origen a "intermediarios erróneos" que se acumularían por ser malos sustratos para la transferasa siguiente. Es importante destacar que en todos los casos los isómeros sintetizados eran parte del compuesto mayor ($\text{Man}_n\text{GlcNAc}_2$) confirmando que la falta de especificidad residía únicamente en el orden de adición de los monosacáridos. De acuerdo a esta interpretación se desea destacar que si el compuesto de mayor tamaño que se detecta "in vitro" es el producto final, éste debería tener la misma estructura que el oligosacárido equivalente sintetizado "in vivo".

Por otra parte interesaba saber si en la preparación de microsomas de hígado había una alta actividad de α -manosidasa que pudiera dar origen a los oligosacáridos de estructuras diferentes a las que se encuentran "in vivo". Para despejar esta incógnita se realizó un ensayo semejante al diseñado para la medición de manosiltransferasas, donde se reemplazó el $\text{GDP-(}^{14}\text{C)}\text{Man}$ por una concentración equivalente de GDP-Man no radioactivo y se adicionó $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ radioactivo sintetizado por células de C. fasciculata. Después de 20 minutos de incubación se extrajeron los derivados de Dol-P-P y se analizaron por cromatografía en papel. En la Fig. 29 se presenta el derivado radioactivo que se recupera después de realizar la incubación descrita (panel A) y el $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ liberado por hidrólisis ácida del sustrato utilizado en el ensayo (panel B). Puede observarse que después de la incubación el

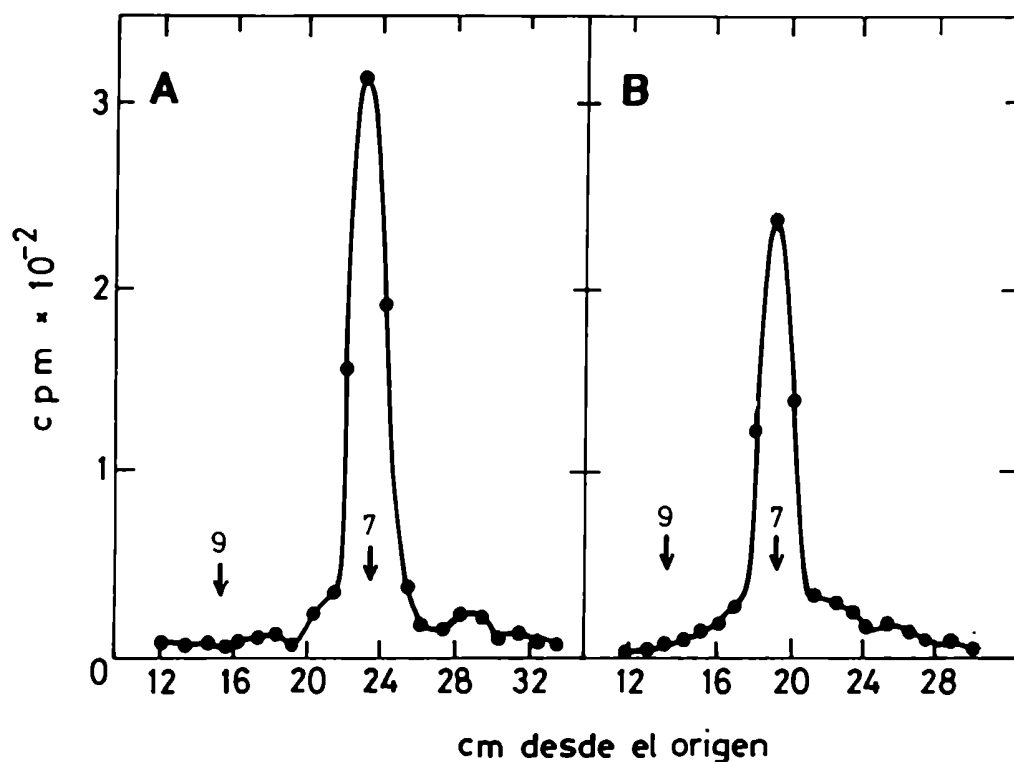


FIGURA 29: Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos por microsomas de hígado. Control de degradación.

A: se incubaron microsomas de hígado de rata con Dol-P, GDP-Man, aceptores exógenos y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ radioactivo (10.000 cpm) sintetizado "in vivo" por *C. fasciculata*. A los 20 min de incubación se extrajeron los Dol-P-P-oligosacáridos, se sometieron a hidrólisis ácida suave y se cromatografiaron en papel con solvente C las sustancias hidrofílicas. B: una alícuota del sustrato radioactivo del ensayo anterior ($\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$) fue hidrolizada en medio ácido suave y los oligosacáridos liberados se corrieron en cromatografía en papel con solvente C. Las fracciones 0-12 no contenían radioactividad.

Standards: 9, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$; 7, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$.

perfil del cromatograma no cambia, indicando que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ no fue degradado a oligosacáridos menores. Este ensayo tiene sólo valor indicativo ya que se desconocen las actividades específicas del $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ de C. fasciculata y de los Dol-P-P-oligosacáridos que se forman en el ensayo con microsomas de hígado.

VI.1.3. Solubilización de manosiltransferasas Dol-P-Man dependientes

Se probaron diversas formas de solubilización de enzimas microsomales de hígado de rata con el objeto de intentar posteriormente la purificación de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasas. La condición de solubilización que permitió recuperar actividades de manosiltransferasa fue la siguiente: buffer Tris-acetato 83 mM pH 7,0, 0,1% Nonidet P-40, 16,6% glicerol, 4,2 mM β -mercaptoetanol y 4,2 mM EDTA-Na. Con el material solubilizado se realizaron ensayos de actividad en presencia de aceptores exógenos y Dol-P-(^{14}C)Man como sustratos. Terminada la incubación se extrajeron los derivados de Dol-P-P, se hidrolizaron en medio ácido suave y los compuestos hidrofílicos se cromatografiaron en papel. Los detalles de solubilización y medición de actividad de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasas se han presentado en el capítulo II. La Fig. 30 muestra que siguiendo esta metodología se observó síntesis de derivados que migran como $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Lamentablemente, las manosiltransferasas solubilizadas perdían rápidamente la actividad, lo que impidió su purificación. Se probaron diferentes concentraciones de Nonidet P-40 y deoxicolato de sodio, presencia de NaCl 0,1 M, agregado de fosfatidilcolina o extractos lipídicos de microsomas de hígado, pero bajo ninguna condición se logró estabilizar la actividad

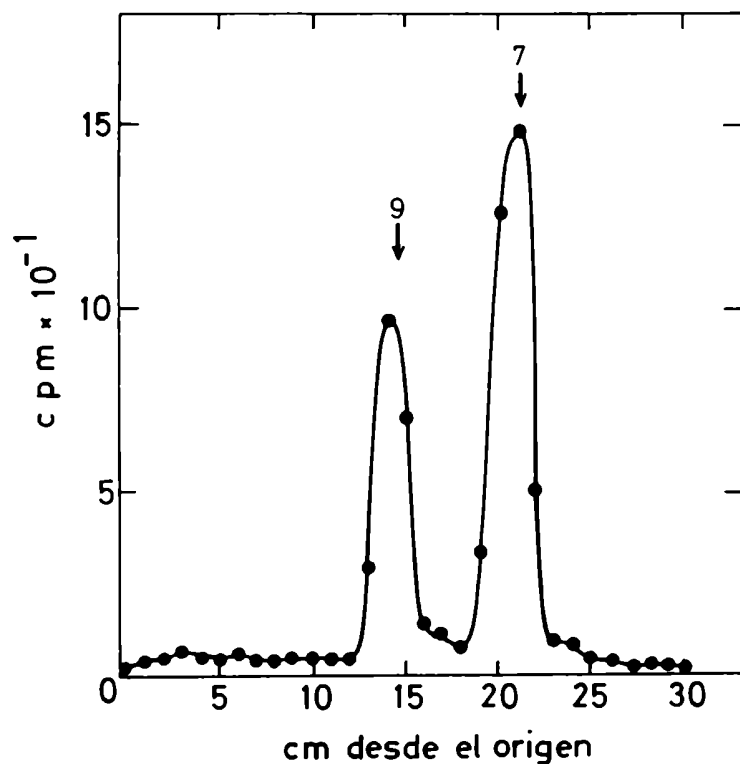


FIGURA 30: Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos por microsomas solubilizados de hígado de rata.

Un extracto solubilizado de microsomas (ver II.4.4.) se incubó con Dol-P-(¹⁴C)Man y aceptores exógenos bajo las condiciones detalladas en Materiales y Métodos. Terminada la incubación se extrajeron los derivados de Dol-P-P y los oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave se cromatografiaron en papel con solvente C.

Standards: 9, Man₉GlcNAc₂; 7, Man₇GlcNAc₂.

después de solubilizada.

VI.2. Dadores de restos de manosa en tripanosomátidos

Se recordará que en células de mamífero se ha determinado que los primeros cinco residuos de manosa utilizados en la síntesis de derivados de Dol-P-P provienen del GDP-Man, y los cuatro residuos restantes provienen de un lípido-azúcar dador: el Dol-P-Man. Aquí se estudiaron los dadores de residuos de manosa en C. fasciculata, dado que se había observado que este tripanosomátido tenía un bajo contenido de Dol-P endógeno (véase Fig. 24 A) lo que facilitaría la interpretación de los resultados. Los ensayos consistieron en la incubación de membranas de C. fasciculata con GDP-(¹⁴C)Man en presencia o ausencia de aceptores exógenos y Dol-P. Terminada la incubación se realizó una partición de Folch, se extrajeron los oligo y monosacáridos unidos a Dol-P-P y Dol-P, y los productos acuosolubles liberados por hidrólisis ácida suave se analizaron por cromatografía en papel. En la Fig. 31 se presentan los resultados obtenidos. Puede observarse que en presencia de Dol-P y GDP-(¹⁴C)Man la preparación de membrana de C. fasciculata formó casi exclusivamente Dol-P-(¹⁴C)Man (panel A). La adición de aceptores exógenos al ensayo, en ausencia de Dol-P de hígado de rata, condujo a la formación de Dol-P-P-oligosacáridos de hasta cinco residuos de manosa, al tiempo que se redujo notablemente la cantidad de Dol-P-(¹⁴C)Man sintetizado (Fig. 31 B). Finalmente, cuando la mezcla de ensayo contuvo Dol-P, GDP-(¹⁴C)Man y aceptores exógenos se observó la formación de Dol-P-P-oligosacáridos de hasta siete residuos de manosa (Fig. 31 C).

Los datos presentados sugieren que los dadores de restos de manosa en C.

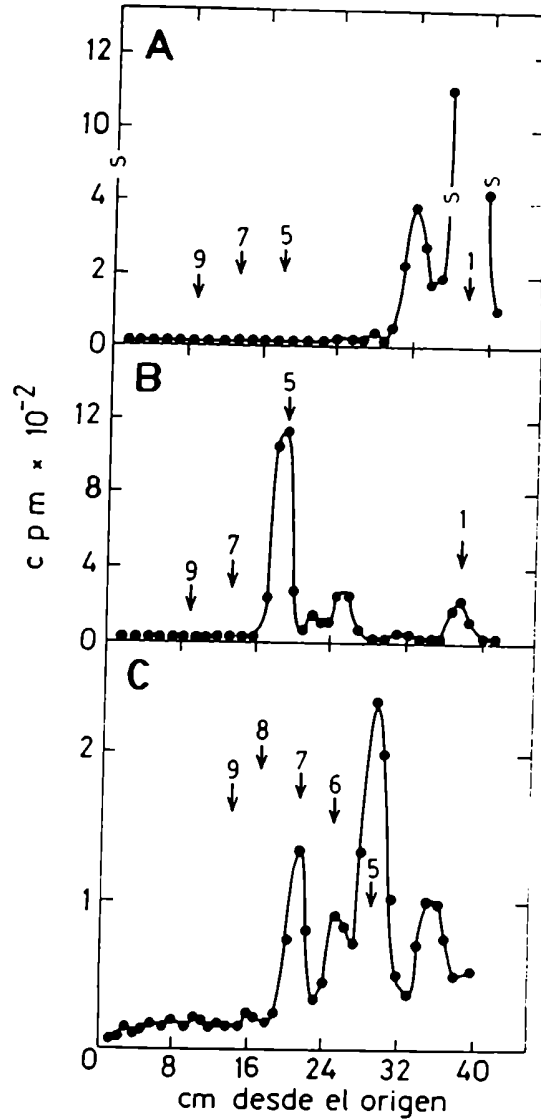


FIGURA 31: Dadores de restos de manosa en tripanosomátidos.

Membranas de C. fasciculata fueron incubadas con GDP-(¹⁴C)Man en presencia de Dol-P (panel A), o en ausencia de Dol-P y con el agregado de aceptores exógenos (B), o en presencia de Dol-P y los aceptores (C). Se extrajeron los derivados de Dol-P y Dol-P-P a partir de la fase inferior y la interfase de cada ensayo y se reunieron. Los mono y oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave se cromatografiaron en papel con solvente C.

Standards: 1, manosa; 5, Man₅GlcNAc; 6, Man₆GlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; 8, Man₈GlcNAc; 9, Man₉GlcNAc.

fasciculata serían los mismos que los determinados para células de linfoma de ratón: GDP-Man dador de los primeros cinco restos y Dol-P-Man de los siguientes.

VI.3. Ensayo de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasas en membranas de parásitos

VI.3.1. Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos

Para la determinación de actividades de manosiltransferasa en preparaciones de membrana de tripanosomátidos, se realizaron ensayos en presencia de GDP-(¹⁴C)Man, Dol-P y aceptores exógenos, según el diseño presentado en la sección 1.1. de este capítulo. Los oligosacáridos derivados de Dol-P-P sintetizados "in vitro" se identificaron por cromatografía en papel; los resultados se muestran en la Fig. 32. En ningún caso se observó síntesis de derivados de Dol-P-P cuando el ensayo no contenía aceptores exógenos. Los oligosacáridos de mayor tamaño sintetizados en presencia de aceptores por las diferentes preparaciones de membrana fueron: Man₇GlcNAc₂ para L. enriettii (panel B), Man₆GlcNAc₂ para B. culicis (panel C) y Man₉GlcNAc₂ para T. cruzi (panel D). Además, como se describió en la Fig. 31 C, microsomas de C. fasciculata sintetizaron oligosacáridos de hasta siete unidades de manosa (se repite en Fig. 32 A).

En otro tipo de ensayo se incubaron membranas de L. enriettii con aceptores exógenos y Dol-P-(¹⁴C)Man de hígado de rata. En la Fig. 33 puede observarse que bajo estas condiciones también fue Man₇GlcNAc₂ el derivado de Dol-P-P de mayor tamaño sintetizado por microsomas de L. enriettii.

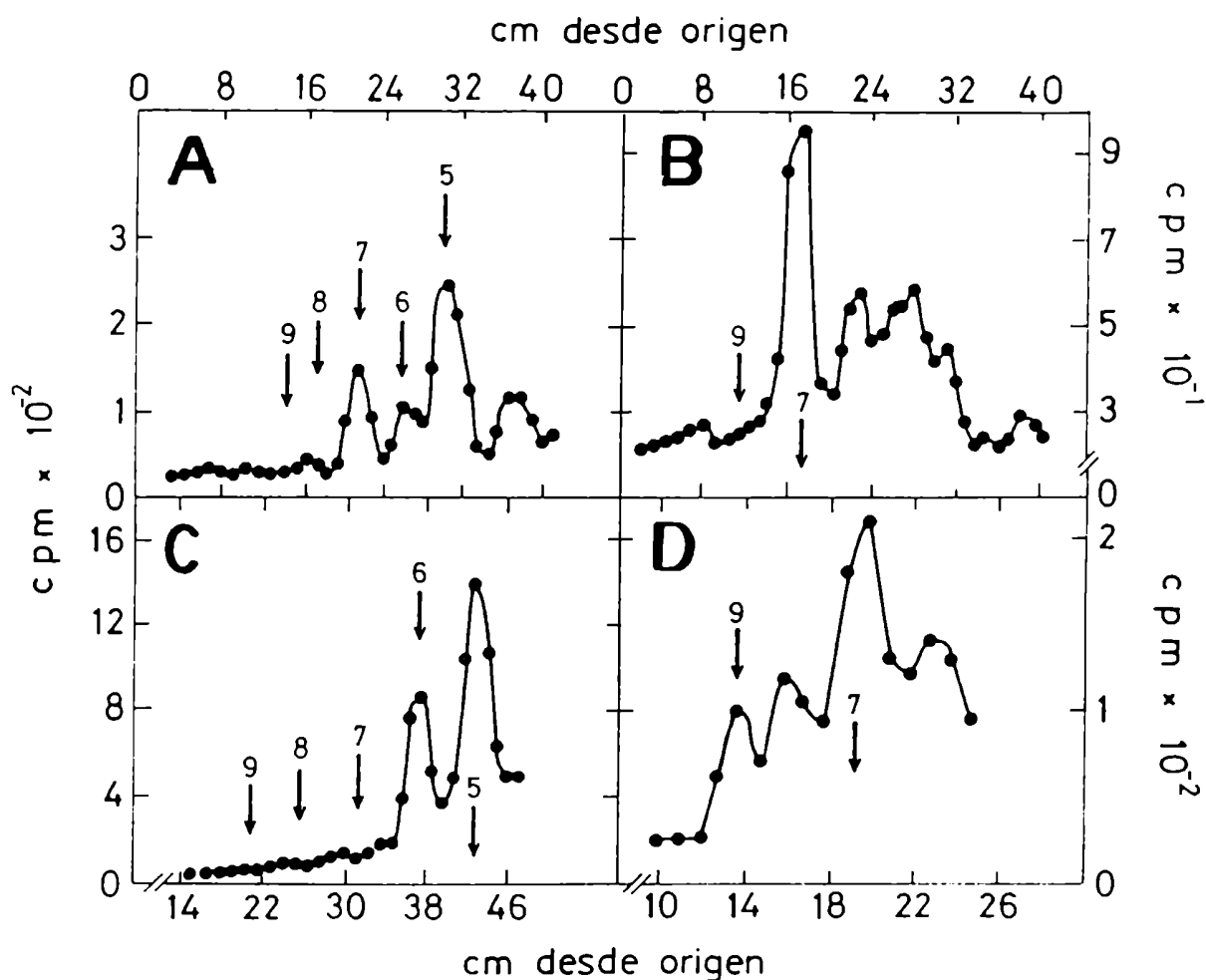


FIGURA 32: Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos por membranas de tripanosomátidos.

Se incubaron preparaciones de membrana de *L. enriettii* (panel B), *B. culicis* (C) y de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tul 0 (D) con GDP-(^{14}C)Man, Dol-P y aceptores exógenos. En el panel A se repite la Fig. 31 C, donde se utilizaron membranas de *C. fasciculata*. Los derivados de Dol-P-P sintetizados se extrajeron con solvente 1103, se purificaron y los oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave se corrieron en cromatografía en papel con solvente C. Las fracciones que no se presentan no llevaban radioactividad.

Standards: 9, Man₉GlcNAc; 8, Man₈GlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; 6, Man₆GlcNAc; 5, Man₅GlcNAc.

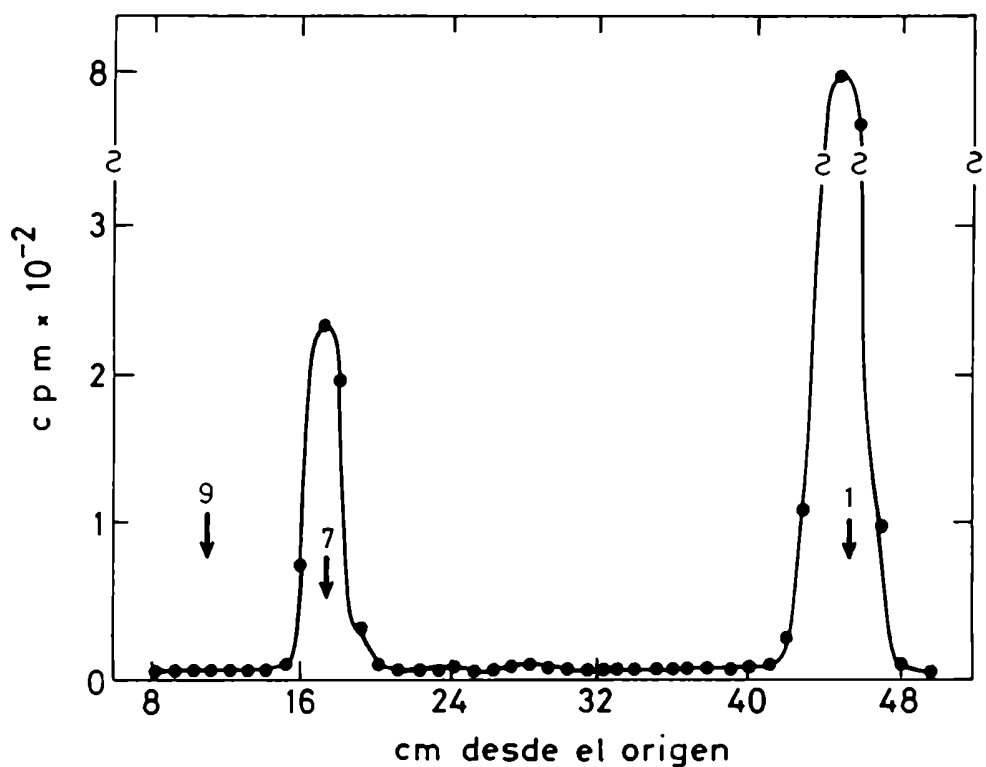


FIGURA 33: Síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos a partir de Dol-P-Man radioactivo.

Microsomas de *L. enriettii* fueron incubados con aceptores exógenos y Dol-P-(¹⁴C)Man preparado con microsomas de hígado de rata. Se extrajeron los derivados de Dol-P y Dol-P-P y los azúcares obtenidos por hidrólisis ácida suave se cromatografiaron en papel con solvente C. Para detalles y standards ver Fig. 31.

En resumen, el oligosacárido de mayor tamaño sintetizado "in vitro" por cada tripanosomátido tiene el mismo número de residuos de manosa que el que cada especie transfiere a proteínas "in vivo". Merece destacarse el hecho que las preparaciones de membrana de C. fasciculata, B. culicis y L. enriettii no fueron capaces de sintetizar oligosacáridos mayores que el que sintetizan "in vivo", a pesar de que los aceptores exógenos poseen los sustratos adecuados.

VI.3.2. Estructura de los oligosacáridos

De acuerdo a la hipótesis presentada en la sección 1.2., si la ambigüedad en el orden de adición de restos de manosa en sistemas libres de células también ocurriese en tripanosomátidos, entonces sólo los oligosacáridos que son productos finales en el ciclo del dolicol tendrían que tener la misma estructura que los encontrados "in vivo". Por esa razón se decidió realizar el análisis estructural de los derivados de Dol-P-P de mayor tamaño sintetizados por cada preparación de membrana. De tal manera, si obtuviéramos estructuras diferentes a las de los compuestos sintetizados por células intactas, asumiríamos que estamos frente a productos de degradación de oligosacáridos mayores o de compuestos intermediarios con estructuras "erróneas". Por el contrario, si las estructuras fueran similares concluiríamos que se trata de productos finales del ciclo del dolicol.

Se sometieron a acetólisis los oligosacáridos de mayor tamaño sintetizados por membranas de cada especie y los productos del tratamiento se cromatografiaron en papel con solvente D. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 34. Puede observarse que la acetólisis de

Man₇GlcNAc₂ sintetizado ya sea por C. fasciculata (Fig. 32 A) o L. enriettii (Fig. 32 B) produjo manotriosa como único fragmento radioactivo (Figs. 34 A y B). Man₆GlcNAc₂ producido por membranas de B. culicis (Fig. 32 C) rindió manobiosa (Fig. 34 C) y Man₉GlcNAc₂ de T. cruzi (Fig. 32 D) produjo 16% de manotriosa y 84% de manobiosa (Fig. 34 D). En ningún caso se encontró radioactividad en Man₄GlcNAc₂, indicando que los Dol-P-P-oligosacáridos radioactivos han sido sintetizados sobre los aceptores suministrados. Además, los diferentes porcentajes de radioactividad observados en cada fragmento de acetólisis de Man₉GlcNAc₂ de T. cruzi confirman que Man₅₋₈GlcNAc₂ unidos a Dol-P-P no radioactivos han sido utilizados como sustrato.

Los resultados presentados indican que la estructura del oligosacárido de mayor tamaño sintetizado "in vitro" por cada especie es la misma que la del derivado de Dol-P-P que cada una sintetiza "in vivo". Por lo tanto, de acuerdo a las razones argumentadas más arriba, se sugiere que Man₇GlcNAc₂ y Man₆GlcNAc₂ son los derivados de mayor tamaño formados por membranas de C. fasciculata y L. enriettii, y por B. culicis, respectivamente. Se descartaría entonces la posibilidad de que los compuestos detectados "in vitro" se hayan originado por degradación de otros mayores, ya que en ese caso se encontrarían mezclas de isómeros y no una única estructura igual a la que sintetizan las células intactas.

Para reforzar la idea de que los oligosacáridos detectados "in vitro" no provenían de la degradación de otros mayores, se incubó una preparación de membranas de C. fasciculata con el oligosacárido Man₉GlcNAc radioactivo; las condiciones de ensayo han sido descriptas en Materiales y Métodos (II.5.3.). Después de 20 min ó 6 h de incubación se purificaron los oligosacáridos presentes en la fase superior de una partición de Folch. El material purificado

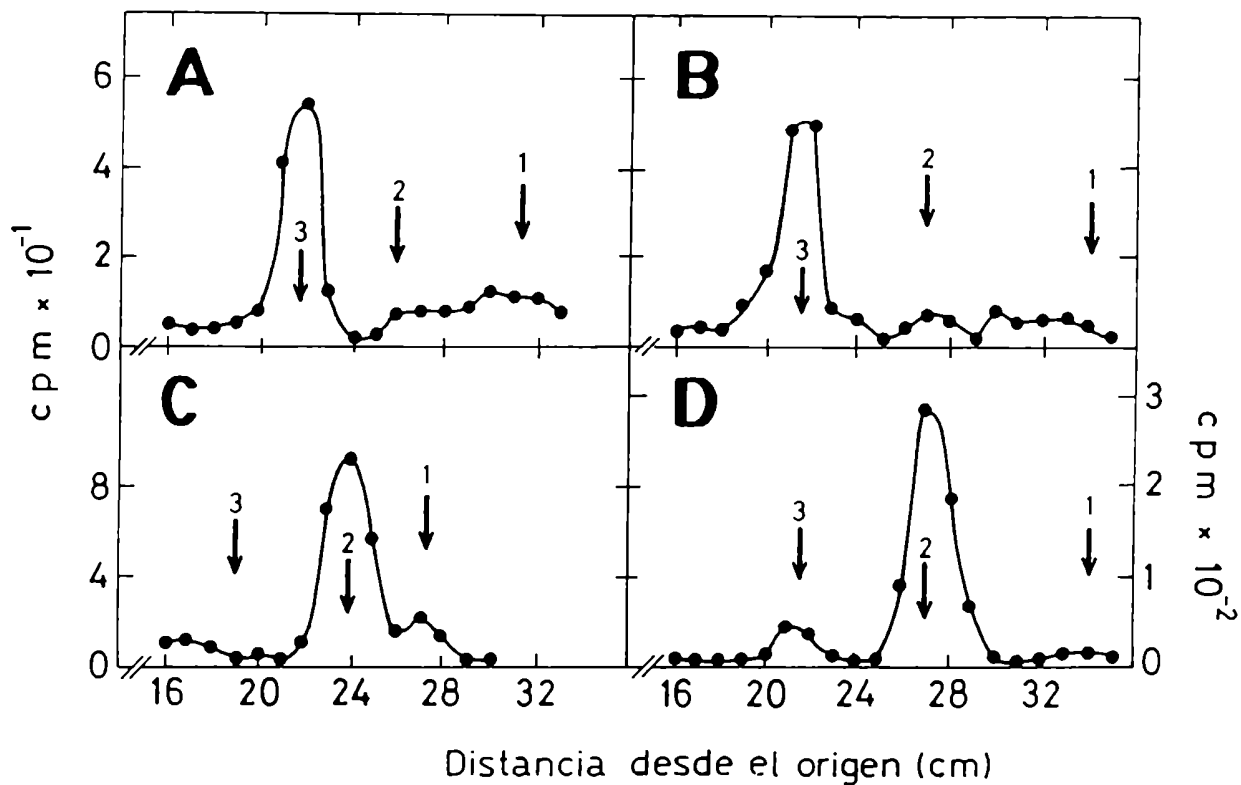


FIGURA 34: Acetólisis de oligosacáridos sintetizados por membranas de parásitos.

Se sometieron a acetólisis y posterior cromatografía en papel con solvente D los compuestos que migraron como: A, Man₇GlcNAc de C. fasciculata de la Fig. 32 A; B, Man₇GlcNAc de L. enriettii de la Fig. 32 B; C, Man₆GlcNAc de B. culicis de la Fig. 32 C; D, Man₉GlcNAc de T. cruzi de la Fig. 32 D. Las fracciones no mostradas no presentan radioactividad.

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

se sometió a cromatografía en papel en solvente C para su identificación. En la Fig. 35 se muestra que después de 6 h de incubación el sustrato MangGlcNAc no fue degradado a oligosacáridos menores por microsomas del parásito. Idénticos resultados se obtuvieron cuando se incubó durante 20 min. Como en el caso descrito en la sección VI.1.2. este ensayo sólo tiene valor indicativo ya que se desconocen las actividades específicas del sustrato exógeno (MangGlcNAc) y de los sustratos endógenos de C. fasciculata.

Discusión

Aquí se ha presentado el diseño de un ensayo para la medición de actividades de manosiltransferasa Dol-P-Man dependientes. Este método permitió, por primera vez, discriminar entre las diferentes actividades de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasa involucradas en el ciclo del dolicol. Además ha sido utilizado en la determinación de dadores de restos de manosa en los tripanosomátidos y, finalmente, en la caracterización de las deficiencias enzimáticas presentes en ciertos parásitos que conducen al ensamblaje de derivados de Dol-P-P truncados.

En cuanto a los dadores de manosa se han presentado evidencias que indican que en los tripanosomátidos serían los mismos que en células de mamífero: GDP-Man sería el dador de los primeros cinco residuos de manosa en el ciclo del dolicol y los siguientes restos serían transferidos a partir de Dol-P-Man. En el protozoario V. carteri también había sido demostrada la adición de los cinco primeros restos de manosa a partir de GDP-Man (62).

Por otra parte, se ha mostrado que el Dol-P-P-oligosacárido de mayor tamaño que sintetiza "in vitro" cada parásito investigado tiene el mismo

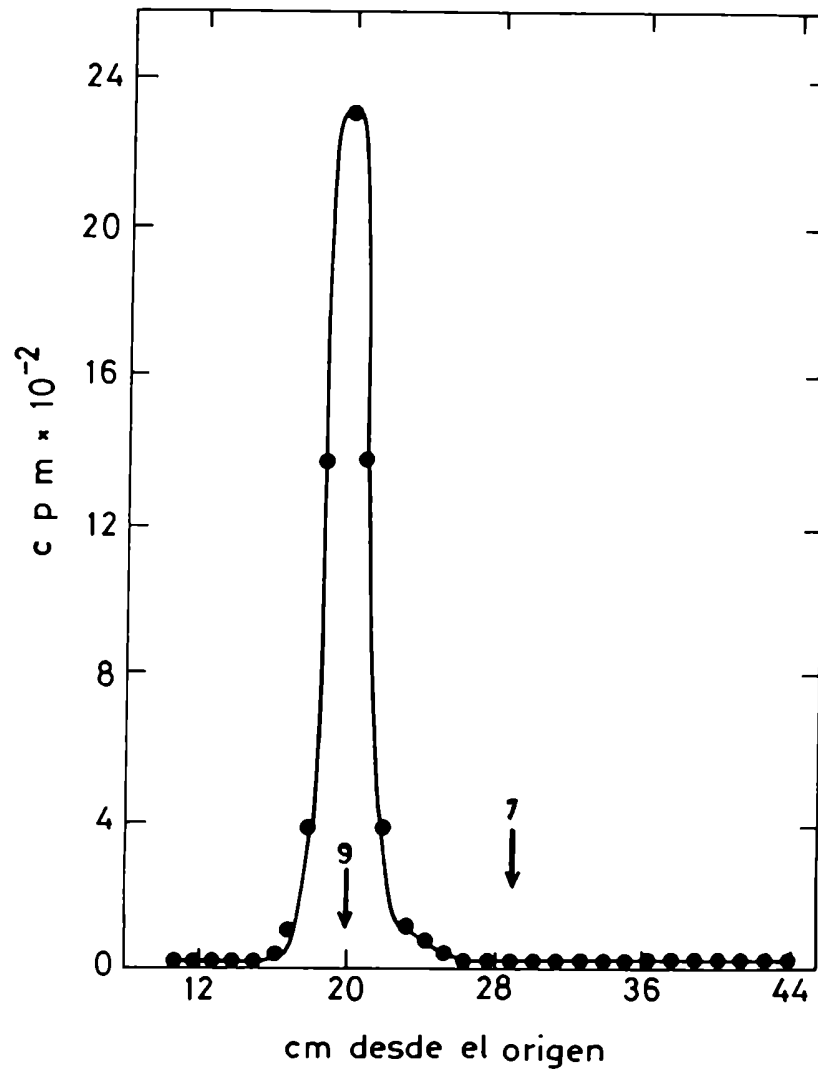


FIGURA 35: Control de degradación de MangGlcNAc por microsomas de C. fasciculata.

Se incubaron preparaciones de membrana de C. fasciculata con el oligosacárido MangGlcNAc (18.000 cpm) proveniente de glicoproteínas de T. cruzi. Después de 6 h de incubación se recuperaron los oligosacáridos presentes en el ensayo como se describe en Materiales y Métodos y se sometieron a cromatografía en papel con solvente C.

Standards: 9, MangGlcNAc₂; 7, Man₇GlcNAc₂.

número de residuos de manosa y la misma estructura que el compuesto que cada uno acumula y transfiere a proteínas "in vivo". Por ejemplo, B. culicis que incubada con (U-¹⁴C)glucosa acumula $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, "in vitro" sintetiza el mismo lípido-oligosacárido y ningún otro derivado de mayor tamaño. La incapacidad de sintetizar $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ indicaría la existencia de un bloqueo en la adición del séptimo residuo de manosa y permite explicar la síntesis "in vivo" de un derivado truncado. Más sorprendente es el hecho que, a pesar de que en el ensayo se proveen derivados de Dol-P-P de siete y ocho restos de manosa que pueden actuar como sustrato, el sistema microsomal es incapaz de sintetizar $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Este resultado pone de manifiesto la ausencia de actividad de otra/s manosiltransferasa/s responsable/s de la adición del octavo y noveno residuo de manosa en el ciclo del dolicol. Paralelamente, microsomas de C. fasciculata y L. enriettii que "in vivo" acumulan $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ no mostraron síntesis de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ni de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Nuevamente se observa no sólo la ausencia de la actividad que "per se" evita "in vivo" la síntesis de derivados de mayor tamaño (adición del octavo resto de manosa), sino también la ausencia de la transferasa siguiente.

Las evidencias actuales no nos permiten saber si la misma enzima introduce el octavo y el noveno resto de manosa. Por una parte resulta llamativo el hecho que cada vez que está ausente el octavo residuo de manosa también falte el noveno y que hasta el momento no se haya encontrado ningún organismo que transfiera "in vivo" $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Por otra parte, según el concepto de "una enzima, un enlace glicosídico" (138) resulta difícil imaginar que la misma enzima pueda catalizar la adición de un resto de manosa en posición α -1,6 (residuo h en la Fig. 5) y otro en α -1,2 (residuo i).

Concluyendo, los resultados presentados indican que existen al menos tres

manosiltransferasas Dol-P-Man dependientes involucradas en el ciclo del dolicol; ellas son las responsables de la adición del sexto, séptimo y octavo/noveno residuo de manosa. Si bien se asumía que la entrada de cada resto de manosa era catalizada por una enzima diferente, aquí se demuestra por primera vez la existencia de varias actividades de Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasa distintas.

Hace varios años se sugirió que el ciclo del dolicol tal como se presentó en la Fig. 4 habría sido adquirido tempranamente en la evolución y que sería característico de toda célula eucariótica actual (55). Los resultados que acaban de presentarse muestran que los tripanosomátidos, eucariotes inferiores, no responden al esquema clásico del ciclo del dolicol. A continuación se discute brevemente el aspecto evolutivo de la cuestión.

En la Introducción de esta tesis se comentó que los tripanosomátidos podrían configurar una suerte de "mutantes naturales" de la N-glicosilación de proteínas. Cuando se formuló esta especulación (111) la única evidencia existente era la síntesis "in vivo" de derivados de Dol-P-P truncados en algunos tripanosomátidos. Los resultados que se presentan en este capítulo muestran la ausencia de actividad de ciertas Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido manosiltransferasas en varias especies y permiten explicar la síntesis de derivados de menos de nueve unidades de manosa. Sin embargo, esta información no es suficiente como para definir a los tripanosomátidos como "mutantes naturales". Sería interesante determinar si los defectos enzimáticos observados surgieron como consecuencia de mutaciones o rearrreglos en el genoma de un ancestro que sintetizaba $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, o si se trata de organismos que nunca tuvieron un ciclo del dolicol completo. Si éste último es el caso, los tripanosomátidos no serían mutantes sino organismos que presentan un ciclo

del dolicol incompleto. Este podría considerarse como una forma intermediaria hacia la evolución del ciclo tal como aparece en el resto de los eucariotes. Esta especulación resulta atractiva dado que hasta el momento no existen indicios acerca de la evolución del ciclo del dolicol entre los procariotes (que no lo poseen) y los eucariotes que sintetizan $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

Recientemente se realizó en nuestro laboratorio el estudio de los derivados de dolicol en el protozoario ciliado Tetrahymena pyriformis. Esos estudios, no incluidos en esta tesis, revelaron que células intactas son capaces de sintetizar Dol-P-Glc , Dol-P-Man y $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ como derivado de mayor tamaño (139). La síntesis de Dol-P-Man también fue demostrada en sistemas libres de células, de modo que no sería la ausencia del supuesto dador de restos manosilo la responsable de la síntesis de un derivado de Dol-P-P truncado. Ensayos de manosiltransferasa semejantes al descrito en este capítulo permitieron demostrar que T. pyriformis es deficiente en todas las manosiltransferasas Dol-P-Man dependientes. De tal manera, los tripanosomátidos no son los únicos protozoarios donde alteraciones en la adición de ciertos restos de manosa conducen a la síntesis de derivados de Dol-P-P "incompletos" y por consecuencia presentan un mecanismo de N-glicosilación diferente al resto de los eucariotes. Estos resultados tienden a fortalecer la especulación evolutiva según la cual algunos protozoarios presentarían formas intermediarias del ciclo del dolicol.

Indudablemente, el uso de sondas de DNA permitiría aclarar el origen de la deficiencia enzimática observada en algunos tripanosomátidos y podría contribuir al conocimiento de la evolución del mecanismo de N-glicosilación de proteínas. Como un primer paso hacia el logro de ese objetivo se intentó la purificación de $\text{Dol-P-Man:Dol-P-P-oligosacárido}$ manosiltransferasas de

hígado de rata. Se logró solubilizar estas actividades, pero los intentos de purificación no prosperaron debido a su inestabilidad.

CAPITULO VII

GLICOSILACION Y PROCESAMIENTO DE GLICOPROTEINAS EN DIFERENTES ESTADIOS DE T. cruzi

Antecedentes y Objetivos

En 1982 se presentaron los primeros estudios acerca del mecanismo de N-glicosilación de proteínas en T. cruzi (85,86,110). Esos estudios indicaron que $\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2$ es el oligosacárido que se transfiere de Dol-P-P a proteínas en la forma epimastigote de cultivo axénico. Posteriormente (115) se determinó que en amastigotes de cultivo axénico (cepa CA-I, clones 70, 71 y 72) se sintetizan 4-5 veces más de $\text{Man}_7\text{GlcNAC}_2\text{-P-P-Dol}$ que del derivado $\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2$ y que ambos oligosacáridos se transfieren a proteínas en proporción directa a la cantidad de cada Dol-P-P-oligosacárido sintetizado. Se demostró que la síntesis de estos dos derivados en amastigotes axénicos no era debida a la falta de nutrientes en el medio de marcación de las células, dado que por incubación en un medio conteniendo glucosa 3 mM y suero se obtenían los mismos derivados de Dol-P-P que en un medio con glucosa 0,2 mM y sin suero. En vista de estos resultados se concluyó que durante la diferenciación de T. cruzi se produce un cambio en el tamaño del oligosacárido transferido a proteínas (115). Estudios de diferenciación "in vitro" de amastigotes a epimastigotes permitieron confirmar esta modificación en el mecanismo de N-glicosilación durante el pasaje de una forma a la otra.

Una consecuencia importante de la alteración mencionada es que determina una diferencia en el tamaño y la estructura de los oligosacáridos unidos a proteína en cada forma del parásito (115). Se recuerda al lector que en las

Figs. 14 y 15 se ha presentado el mecanismo de glicosilación y procesamiento de glicoproteínas en epimastigotes y amastigotes axénicos de T. cruzi y la estructura de los oligosacáridos transferidos en cada caso.

Oportunamente se discutió el papel de las glicoproteínas en la adhesión y penetración de T. cruzi en células hospedadoras y su importancia como antígenos de superficie. Al respecto, sería posible que diferencias en el tamaño y la estructura de los oligosacáridos, generadas por una alteración en el mecanismo de N-glicosilación durante la diferenciación de los parásitos, tuvieran influencia sobre el grado de infectividad de los mismos. Sin embargo, los estudios comentados más arriba fueron realizados en formas no infectivas y de cultivo axénico de T. cruzi; de tal manera, hasta el momento no se poseían datos acerca del mecanismo de glicosilación de proteínas en aquellos estadios donde un cambio en la porción sacarídica de las glicoproteínas podría influenciar las propiedades infectivas, antigénica y/o de diferenciación del parásito, en particular en los tripomastigotes (forma infectiva) y en los amastigotes intracelulares de mamíferos. Ya se ha mencionado que, si bien la morfología de los amastigotes obtenidos por cultivo axénico es la misma que la de aquellos que se encuentran dentro de células de mamífero, no hay evidencias de que metabólicamente ambas formas sean idénticas; de ahí la importancia de examinar el mecanismo de N-glicosilación en amastigotes intracelulares que son las formas que se encuentran en la naturaleza.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos acerca del mecanismo de N-glicosilación de proteínas y la estructura de oligosacáridos de alta manosa en tripomastigotes y amastigotes intracelulares de T. cruzi. También se investigó la presencia de oligosacáridos de tipo complejo en la

forma infectiva y una no infectiva del parásito. Estos estudios se realizaron en varios clones de T. cruzi con la intención de generalizar las observaciones descartando posibles comportamientos exclusivos de un clon.

VII. Resultados

VII.1. Oligosacáridos unidos a Dol-P-P

Amastigotes intracelulares, tripomastigotes, amastigotes de cultivo axénico y epimastigotes de T. cruzi fueron incubados durante 3-15 min en presencia de (U-¹⁴C)glucosa. Para comparar el comportamiento de las cuatro formas del parásito interesaba eliminar posibles variaciones en el mecanismo de N-glicosilación de proteínas producidas por las diferentes temperaturas de crecimiento de cada una (habitualmente 28°C para las formas axénicas y 37°C para las intracelulares y sanguíneas de mamífero); es por eso que las incubaciones con la marca radioactiva se realizaron en todos los casos a 37°C. Terminadas las incubaciones se extrajeron los derivados de Dol-P-P como se describió en Materiales y Métodos y se sometieron a hidrólisis ácida suave para liberar los oligosacáridos.

VII.1.1. Tamaño

Los oligosacáridos liberados de Dol-P-P se sembraron en papel y se cromatografiaron con solvente C. La Fig. 36 muestra el perfil cromatográfico obtenido para las cuatro formas del clon CA-I/72 y la Fig. 37 para tres formas de Miranda 88 (M 88) y una de Miranda 80 (M 80). Cabe recordar que el análisis de minicírculos de DNA kinetoplástico de los clones M 88 y M 80 no

ha revelado diferencias entre los dos tipos de células (121). En cambio existen diferencias entre CA-I/72 y M 80/88.

Un primer análisis de las Figs. 36 y 37 indica que para una misma forma del parásito no se detectan diferencias cualitativas ni cuantitativas relevantes en los oligosacáridos unidos a Dol-P-P sintetizados por los clones CA-I/72 y M 88 (M 80).

Analizando detalladamente se observa que los amastigotes intracelulares de T. cruzi clones CA-I/72 y M 88 sintetizaron casi exclusivamente $\text{MangGlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. La pequeña proporción de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que se observa en las Figs. 36 A y 37 A podría provenir del 10-19% de contaminación con tripomastigotes presente en las preparaciones de amastigotes intracelulares CA-I/72 y M 88, respectivamente (ver II.1.4.). Esta explicación resulta razonable debido a que los derivados de Dol-P-P sintetizados por tripomastigotes de ambos clones fueron MangGlcNAc_2 y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, encontrándose el primero en mayor proporción (Figs. 36 B y 37 B).

En amastigotes CA-I/72 y CA-I/71 cultivados axenicamente había sido descrita la formación de MangGlcNAc_2 y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a Dol-P-P, por incubación de las células a 28°C en presencia de ($\text{U-}^{14}\text{C}$)glucosa (115). Aquí se presentan los resultados obtenidos por incubación a 37°C de amastigotes axénicos de los clones CA-I/72 (Fig. 36 C) y M 80 (Fig. 37 C). Los oligosacáridos sintetizados como derivados de Dol-P-P fueron en los dos casos MangGlcNAc_2 y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, pero estos clones se diferencian en las proporciones relativas de cada oligosacárido. Los derivados mayoritarios son $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en el clon CA-I/72 y MangGlcNAc_2 en M 80.

Acerca de los epimastigotes de los clones CA-I/70/71/72 se había informado la síntesis de MangGlcNAc_2 como principal derivado de Dol-P-P a

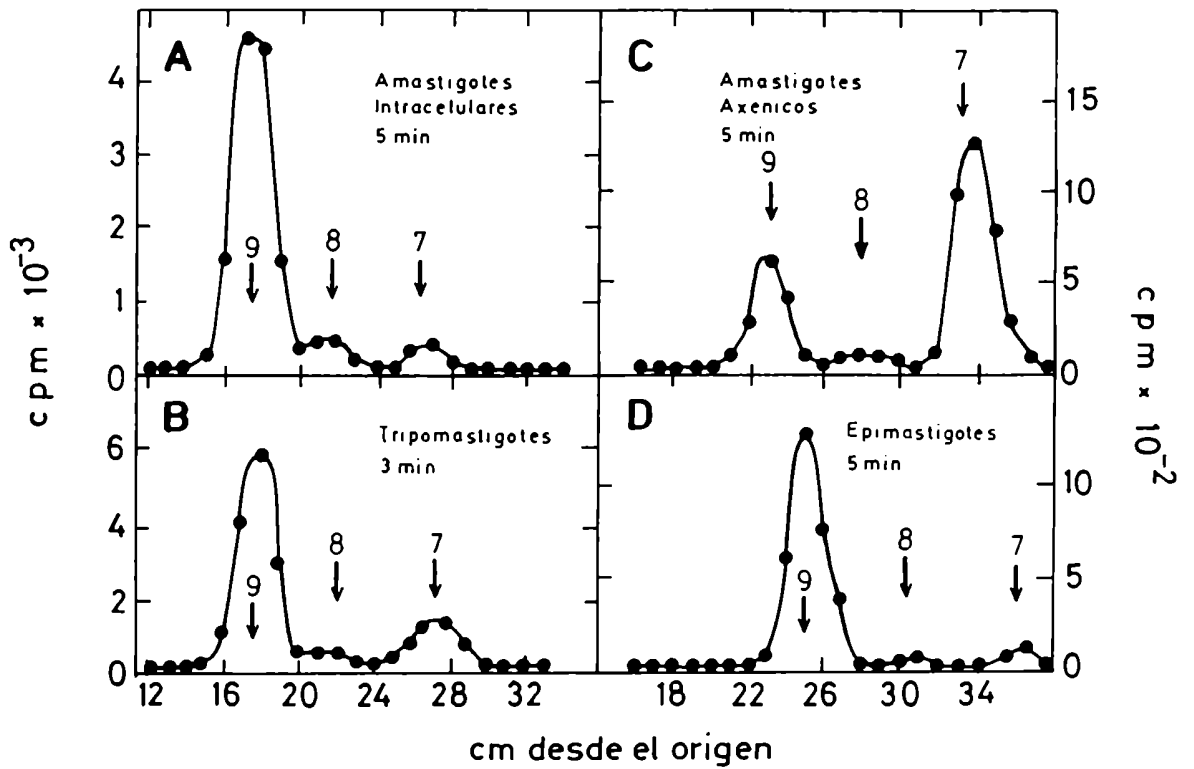


FIGURA 36: Oligosacáridos unidos a Dol-P-P en *T. cruzi* clon CA-I/72.

Amastigotes intracelulares (A), tripomastigotes (B), amastigotes axénicos (C) y epimastigotes (D) de *T. cruzi* fueron incubados con ($U-^{14}C$)glucosa a $37^{\circ}C$ por los tiempos indicados en cada panel. Se aislaron los oligosacáridos derivados de Dol-P-P y se sometieron a cromatografía en papel con solvente C. Las fracciones que no se muestran no presentaron radioactividad.

Standards: 9, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$; 8, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$; 7, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$.

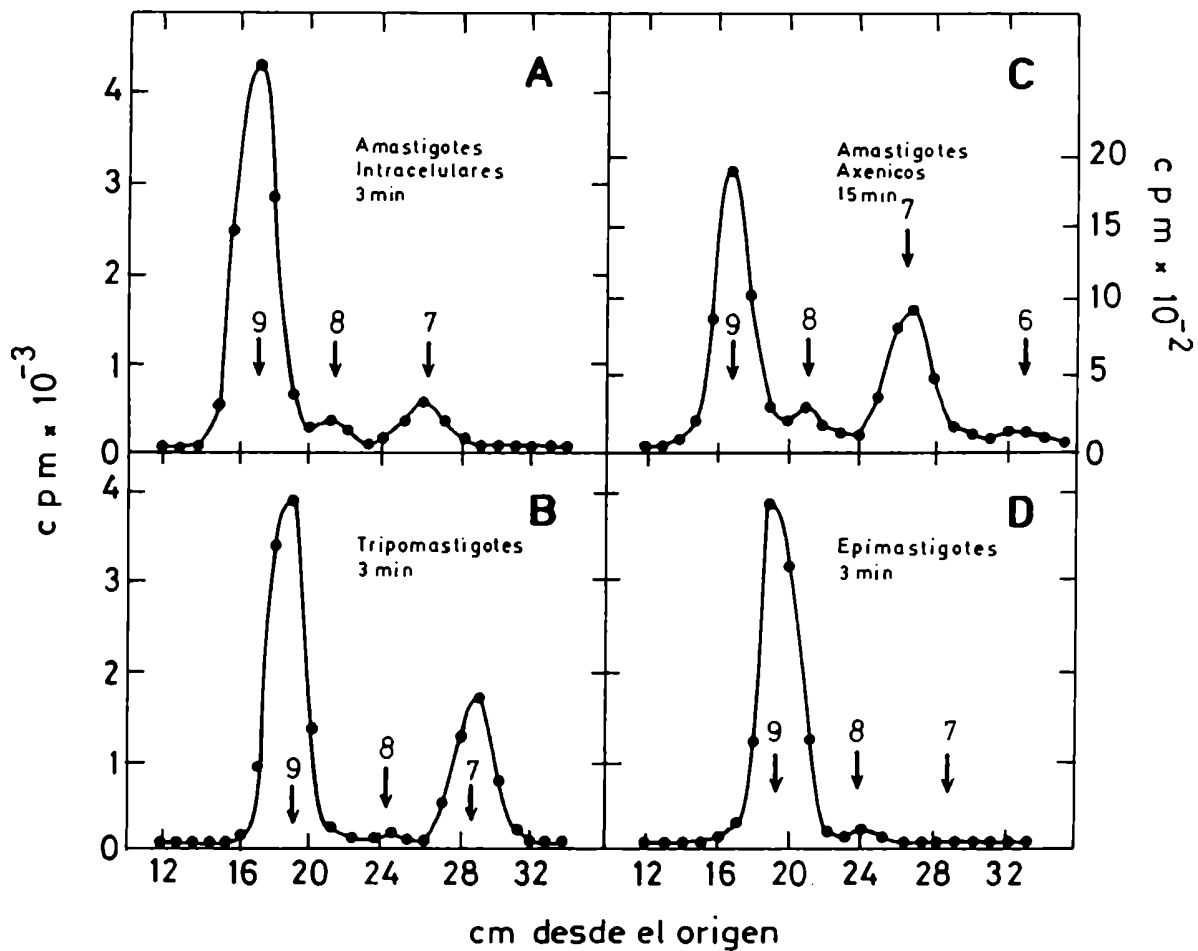


FIGURA 37: Oligosacáridos unidos a Dol-P-P en *T. cruzi* clon Miranda 88/80. Amastigotes intracelulares (A), tripomastigotes (B) y epimastigotes (D) del clon M 88 y amastigotes axénicos del clon M 80 (C) fueron incubados a 37°C con glucosa radioactiva, los tiempos indicados en cada panel. Para detalles ver Fig. 36.

28°C (115). El mismo resultado había sido descripto previamente para la cepa Tulahuen 2 (110). En las Figs. 36 D y 37 D se muestra que a 37°C tanto células CA-I/72 como M 88 sintetizaron sólo MangGlcNAc₂-P-P-Dol.

Resumiendo, los resultados presentados indican que, de acuerdo a su migración en papel, Man₇GlcNAc₂ y MangGlcNAc₂ son los derivados de Dol-P-P sintetizados por tripomastigotes y amastigotes axénicos, aunque en diferentes proporciones. En cambio, los epimastigotes y amastigotes intracelulares forman aparentemente sólo MangGlcNAc₂.

VII.1.2. Estructura

A continuación se presentan estudios estructurales que confirman la identidad de los oligosacáridos unidos a Dol-P-P sintetizados por tripomastigotes de T. cruzi.

Los compuestos que migraron como MangGlcNAc₂ y Man₇GlcNAc₂ en la Fig. 37 B fueron eluidos y tratados con endo-H; los oligosacáridos liberados fueron sometidos a acetólisis y los productos del tratamiento se cromatografiaron en papel con solvente D (Fig. 38).

La Fig. 38 A muestra que por acetólisis del supuesto MangGlcNAc se obtuvieron manobiosa, manotriosa y Man₄GlcNAc. Cuando se sometió a acetólisis el oligosacárido Man₇GlcNAc los productos fueron manotriosa y Man₄GlcNAc (Fig. 38 B).

Concluyendo, el análisis estructural revela que los derivados de Dol-P-P, MangGlcNAc₂ y Man₇GlcNAc₂ sintetizados por tripomastigotes del clon M 88, tienen la misma estructura que aquellos acumulados por epimastigotes (86) y amastigotes axénicos (115), respectivamente (ver Fig. 14). Además, la

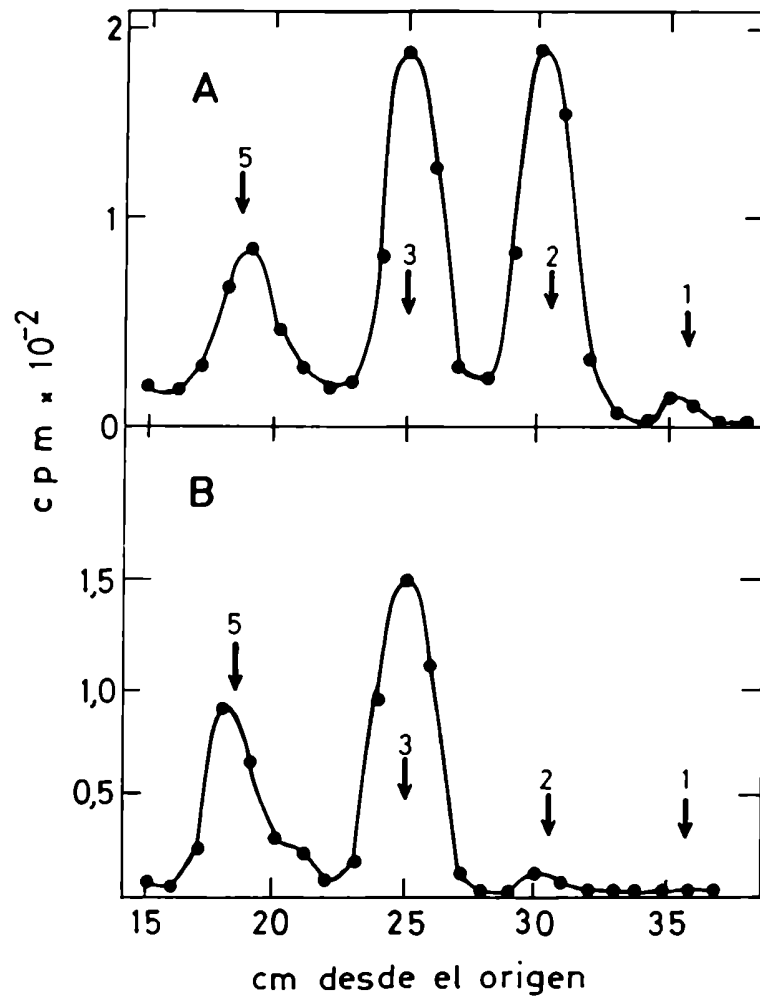


FIGURA 38: Acetólisis de oligosacáridos unidos a Dol-P-P en tripomastigotes. Se sometieron a tratamiento con endo-H y luego a acetólisis los oligosacáridos que migraron en la Fig. 37 B como $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (panel A) y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (panel B). Los productos de acetólisis se sembraron en papel y se cromatografiaron con solvente D; las fracciones que no se muestran no presentaron radioactividad. Standards: 1, manósa; 2, Man_2 ; 3, Man_3 ; 5, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$.

estructura de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ es la misma que la del intermediario del ciclo del dolicol en células de mamífero.

VII.2. Oligosacáridos tipo alta manosa unidos a proteína

Interesaba determinar si los derivados de Dol-P-P detectados en tripomastigotes y amastigotes intracelulares eran transferidos a proteínas. Para ello los parásitos fueron incubados durante 3-5 min con (U- ^{14}C)glucosa. Las incubaciones fueron detenidas mediante una partición de Folch; la interfase de dicha partición se extrajo con solvente 1103 para obtener los derivados de Dol-P-P y el material remanente de la interfase se trató con una proteasa. Los glicopéptidos resultantes fueron purificados por cromatografía de filtración en Bio-Gel P-6 y posterior electroforesis en papel con ácido fórmico 5%. Los compuestos radioactivos que migraron hacia el cátodo fueron eluidos y tratados con endo-H. En una segunda electroforesis en ácido fórmico se recuperó el material neutro que contenía los oligosacáridos sensibles a endo-H. El tamaño de los mismos fue determinado por cromatografía en papel.

También se propuso determinar el tamaño de los productos del procesamiento presentes en glicoproteínas maduras de la forma infectiva de T. cruzi. Se procedió entonces a realizar incubaciones de 60 min con la marca radioactiva y otros 60 min después de diluir el medio de incubación; de ahí en más el procedimiento no difirió del descrito más arriba.

VII.2.1. Tamaño

Los oligosacáridos sensibles a endo-H provenientes de la marcación de tripomastigotes y amastigotes intracelulares durante 3-5 min con glucosa radioactiva se cromatografiaron en papel con solvente C. La Fig. 39 muestra los resultados obtenidos.

Puede observarse una gran similitud entre los perfiles de oligosacáridos provenientes de tripomastigotes de los clones CA-I/72 y M 88 (Fig. 39 A y B, respectivamente). Se destaca en ambos casos la presencia de los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$. Oligosacáridos de la misma composición originados por la glucosilación transitoria de oligosacáridos de alta manosa ya han sido descritos en epimastigotes de T. cruzi (85,86) y en otros tripanosomátidos y eucariotes superiores (ver I.6.). El oligosacárido $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ no se detecta como un pico neto, pero se presume su existencia debido a la formación de "hombros" entre los compuestos que migran como $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$.

Por otra parte, en tripomastigotes, la existencia de $\text{Glc}_{0-1}\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ como oligosacáridos mayoritarios en la Fig. 39 A y B indica que $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ha sido transferido a proteínas a partir del derivado de Dol-P-P descrito en la sección anterior. En cuanto a $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$, dado que su proporción relativa es menor que la de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, no se puede determinar si proviene de la transferencia directa a partir del derivado de Dol-P-P acumulado o de la demanosilación de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína. El estudio estructural de los oligosacáridos que se presenta más adelante permite aclarar este punto.

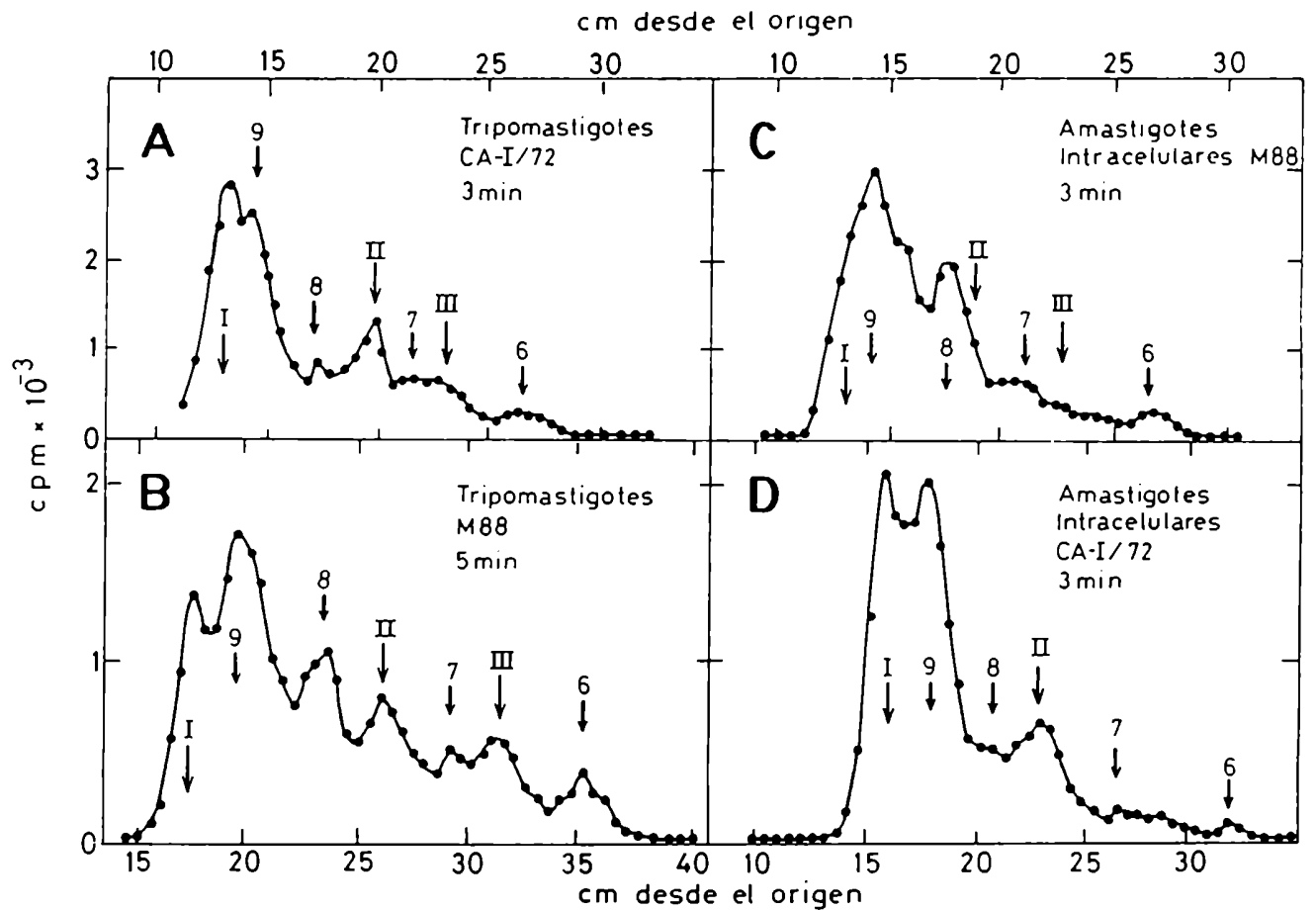


FIGURA 39: Oligosacáridos sensibles a endo-H en glicoproteínas de T. cruzi. Tripomastigotes (A,B) y amastigotes intracelulares (C,D) de T. cruzi de los clones que se indican en cada panel fueron incubados a 37°C por 3-5 min con (U-¹⁴C)glucosa. Se purificaron los glicopéptidos radioactivos, se trataron con endo-H y el material sensible se cromatografió en papel con solvente C. Las fracciones que no se muestran no llevaban radioactividad. Standards: I, Glc₁Man₉GlcNAc; 9, Man₉GlcNAc; 8, Man₈GlcNAc; II, Glc₁Man₇GlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; III, Glc₁Man₆GlcNAc; 6, Man₆GlcNAc.

Los perfiles obtenidos para amastigotes intracelulares de los clones M 88 y CA-I/72 (Fig. 39 C y D) muestran que, al igual que en tripomastigotes, el oligosacárido Man₉GlcNAc₂ fue transferido a residuos de asparagina en los polipéptidos a partir del derivado de Dol-P-P. Además, los resultados indican que la pequeña cantidad de Man₇GlcNAc₂ unido a Dol-P-P detectado en amastigotes (Fig. 36 A y 37 A) no se debe a que fue inmediatamente transferido a proteínas, dado que la proporción de este oligosacárido unido a proteínas es muy baja en relación a Man₉GlcNAc.

Por otra parte, la Fig. 39 C y D también muestra, a tiempos cortos de marcación con (U-¹⁴C)glucosa, la existencia de oligosacáridos glucosilados en amastigotes intracelulares.

De la observación de la Fig. 39 se insinúa una diferencia entre los tripomastigotes y los amastigotes intracelulares: las proporciones relativas de Man₆₋₇GlcNAc son mayores en los tripomastigotes, lo que podría determinar un tamaño promedio menor de los oligosacáridos de alta manosa presentes en las glicoproteínas de la forma infectiva. Para confirmar esta observación se estudiaron los oligosacáridos sensibles a endo-H de glicoproteínas maduras de tripomastigotes y se los comparó con aquellos presentes en una forma no infectiva (epimastigotes).

La Fig. 40 permite confirmar que en las glicoproteínas maduras de tripomastigotes el tamaño promedio de los oligosacáridos es más pequeño que en los epimastigotes, independientemente del clon del cual provengan. Sin embargo, este hecho es más notable en los tripomastigotes del clon CA-I/72 donde se observa un pico prominente de Man₅GlcNAc (panel A).

Finalmente, en la Fig. 40 A y B también puede observarse que en los dos clones de tripomastigotes los compuestos glucosilados que se detectaban a

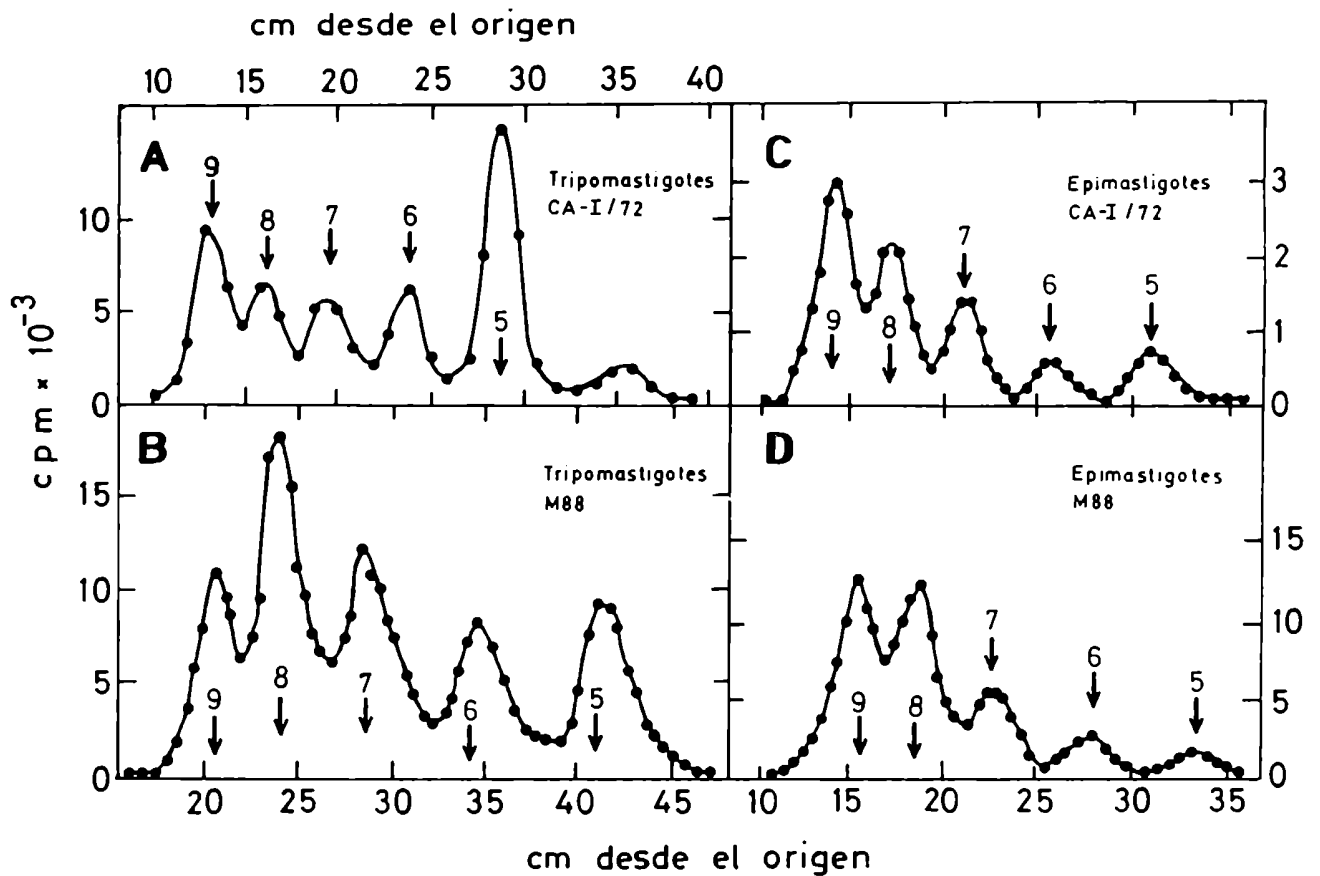


FIGURA 40: Oligosacáridos sensibles a endo-H en glicoproteínas maduras de T. cruzi.

Tripomastigotes (A,B) y epimastigotes (C,D) se incubaron durante 60 min con (U-¹⁴C)glucosa y luego de ser diluidos con medio de cultivo se incubaron por otros 60 min más, siempre a 37°C. De los glicopéptidos se aislaron los oligosacáridos sensibles a endo-H, se sembraron en papel y se sometieron a cromatografía con solvente C. No se presentan las fracciones que carecían de radioactividad. Standards: 9, MangGlcNAc; 8, MangGlcNAc; 7, Man₇GlcNAc; 6, Man₆GlcNAc; 5, Man₅GlcNAc.

tiempos cortos de marcación (Fig. 39) han desaparecido.

VII.2.2. Estructura

Se realizó el análisis estructural de los oligosacáridos detectados en glicoproteínas maduras de tripomastigotes con el objeto de establecer el orden de remoción de residuos de manosa durante el procesamiento de los oligosacáridos de alta manosa. Para ello los oligosacáridos que migraron como MangGlcNAc y Man₇GlcNAc en la Fig. 40, provenientes de tripomastigotes M 88 y CA-I/72, fueron sometidos a acetólisis. Los productos del tratamiento se identificaron por cromatografía en papel con solvente D (Fig. 41 A-D).

En la Fig. 41 B y D se observa que los productos de acetólisis de MangGlcNAc de ambos clones fueron Man₂, Man₃ y Man₄GlcNAc. Para facilitar la comprensión de los resultados que se presentan a continuación se sugiere la observación de la Fig. 5.

El fragmento de manobiosa producido por acetólisis de MangGlcNAc del clon M 88 fue reducido con NaBH₄ y sometido a electroforesis en 0,1 M molibdato de sodio pH 5,0. Como se describió en el Capítulo VI, sección 1.2., bajo estas condiciones migran los fragmentos que llevan restos de manitol con enlaces α -1,2 y no migran los que tienen enlaces α -1,3. Los resultados obtenidos indican que el fragmento de manobiosa consistía en una mezcla de Man α (1 \rightarrow 2)Man y Man α (1 \rightarrow 3)Man, en proporciones similares. Estas evidencias sugieren que en los tripomastigotes el primer paso en la principal ruta de procesamiento consiste en la remoción del residuo de manosa g de la Fig. 5.

Por otra parte, la acetólisis de Man₇GlcNAc de la Fig. 40 A y B originó una serie de fragmentos similares a los que rindió MangGlcNAc y además

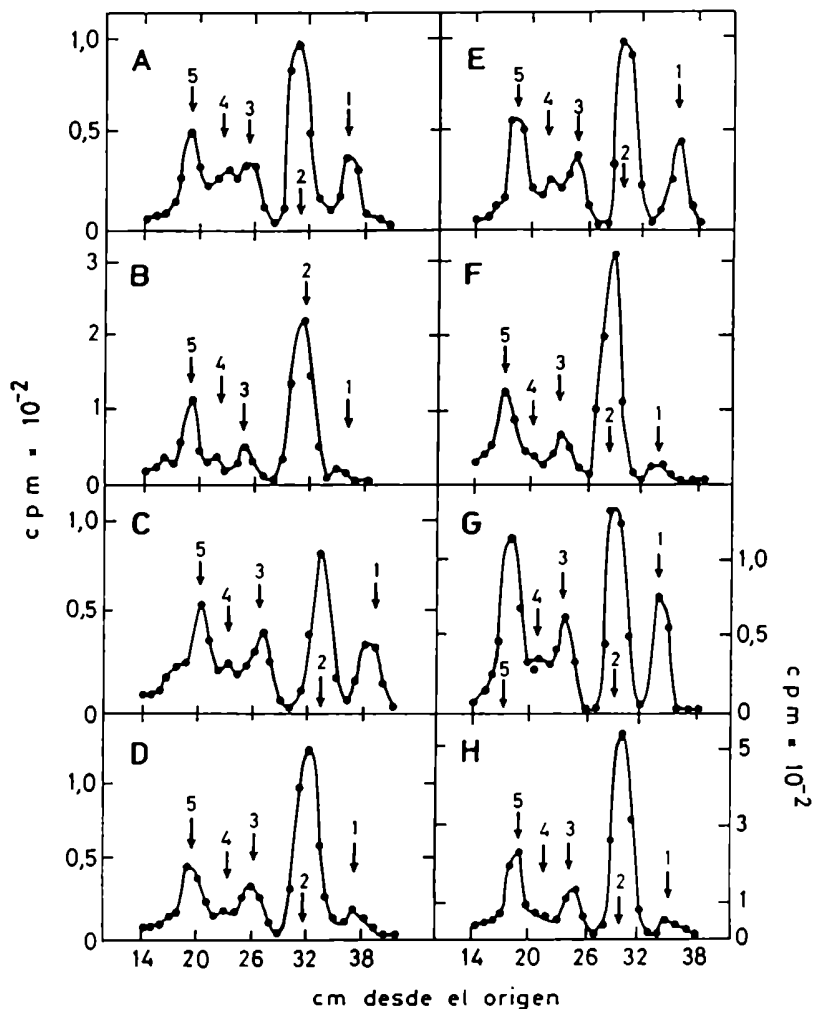


FIGURA 41: Acetólisis de oligosacáridos unidos a proteínas.

Se eluyeron de los respectivos cromatogramas de la Fig. 40 y se sometieron a acetólisis diferentes oligosacáridos provenientes de glicoproteínas de tripomastigotes (A-D) y epimastigotes (E-H). Los productos se cromatografiaron en papel con solvente D. Oligosacáridos tratados: $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (A,E) y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (B,F) de M 88; $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (C,G) y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (D,H) de CA-I/72. Las fracciones no representadas no llevaban radioactividad. Standards: 1, manosa; 2, Man_2 ; 3, Man_3 ; 4, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$; 5, $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$.

se detectó una mayor proporción de manosa (Fig. 41 A y C). Nuevamente se realizó el análisis del fragmento de manobiosa proveniente del clon M 88 por reducción y electroforesis en molibdato de sodio, pero en este caso la marca radioactiva no migró. Se interpreta entonces que la estructura de la manobiosa era $\text{Man}_2(1 \rightarrow 3)\text{Man}$. Se concluye así que el segundo residuo de manosa que se remueve en el principal camino de procesamiento en tripomastigotes es el denominado i en la Fig. 5.

Resultados similares a los presentados para $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ de tripomastigotes fueron obtenidos para los mismos oligosacáridos de los clones CA-I/72 y M 88 de epimastigotes provenientes de glicoproteínas maduras (de la Fig. 40). Los perfiles de cromatografía de los productos de acetólisis aparecen en la Fig. 41 E-H.

De acuerdo con las evidencias presentadas, en la Fig. 42 se propone la principal ruta de procesamiento que seguirían los oligosacáridos de alta manosa en tripomastigotes y epimastigotes de T. cruzi.

En la sección 1.1. de este capítulo se mostró que los tripomastigotes acumulan $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Ya se han presentado evidencias de la transferencia a proteínas del oligosacárido de nueve restos de manosa pero no así de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Con el objeto de determinar si el oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ se transfiere a proteínas se estudiaron las estructuras de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ obtenidos de glicoproteínas provenientes de tripomastigotes incubados 3-5 min con ($U\text{-}^{14}\text{C}$)glucosa.

Los oligosacáridos que migraron como $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ en las Fig. 39 A y B (correspondientes a los clones CA-I/72 y M 88, respectivamente) fueron repurificados por cromatografía en papel y luego sometidos a acetólisis. Los productos de este tratamiento se identificaron por cromatografía en

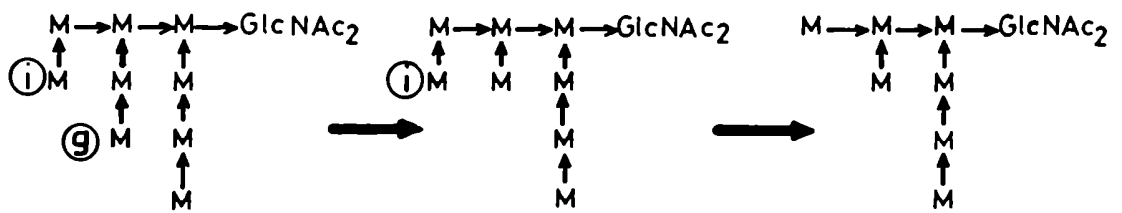


FIGURA 42: Secuencia propuesta para la remoción de residuos de manosa en la principal ruta de procesamiento de oligosacáridos de alta manosa en tripomastigotes y epimastigotes de T. cruzi. Para mayores detalles ver Fig. 9. M= manosa.

papel con solvente D (Fig. 43). $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ proveniente del clon M 88 (panel A) o CA-I/72 (panel B) rindió fundamentalmente mantriosa y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, indicando que a los 3-5 min de marcación el oligosacárido unido a proteína tiene la misma estructura que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unido a Dol-P-P (ver sección 1.2.).

Anteriormente se describió la estructura de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ originado por demanosilación de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ en glicoproteínas maduras de tripomastigotes (ver Fig. 42). El hecho que a tiempos cortos de marcación se detecte la misma estructura que la correspondiente al derivado de Dol-P-P y no aquella observada en glicoproteínas maduras, indica que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ fue transferido a proteínas en los tripomastigotes M 88 y CA-I/72. Resultados semejantes fueron descritos por Engel & Parodi (115) en amastigotes axénicos, donde se demostró la transferencia de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ además de la de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$.

En cuanto a la estructura de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ obtenido a tiempos cortos de marcación, los productos de acetólisis detectados indican que sería idéntica a la del oligosacárido de glicoproteínas maduras (Fig. 43 C y D) y diferente de la del derivado de Dol-P-P intermediario en el ciclo del dolicol, confirmando que proviene de la demanosilación de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Es de hacer notar que según los resultados obtenidos en el estudio estructural es imposible que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ provenga, a tiempos cortos de marcación, de la demanosilación de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$.

VII.3. Oligosacáridos tipo complejo unidos a proteína

Los oligosacáridos tipo complejo en los glicopéptidos son resistentes al tratamiento con la enzima endo-H y a la β -eliminación. El primer tratamiento escinde la mayoría de los oligosacáridos de alta manosa y el segundo

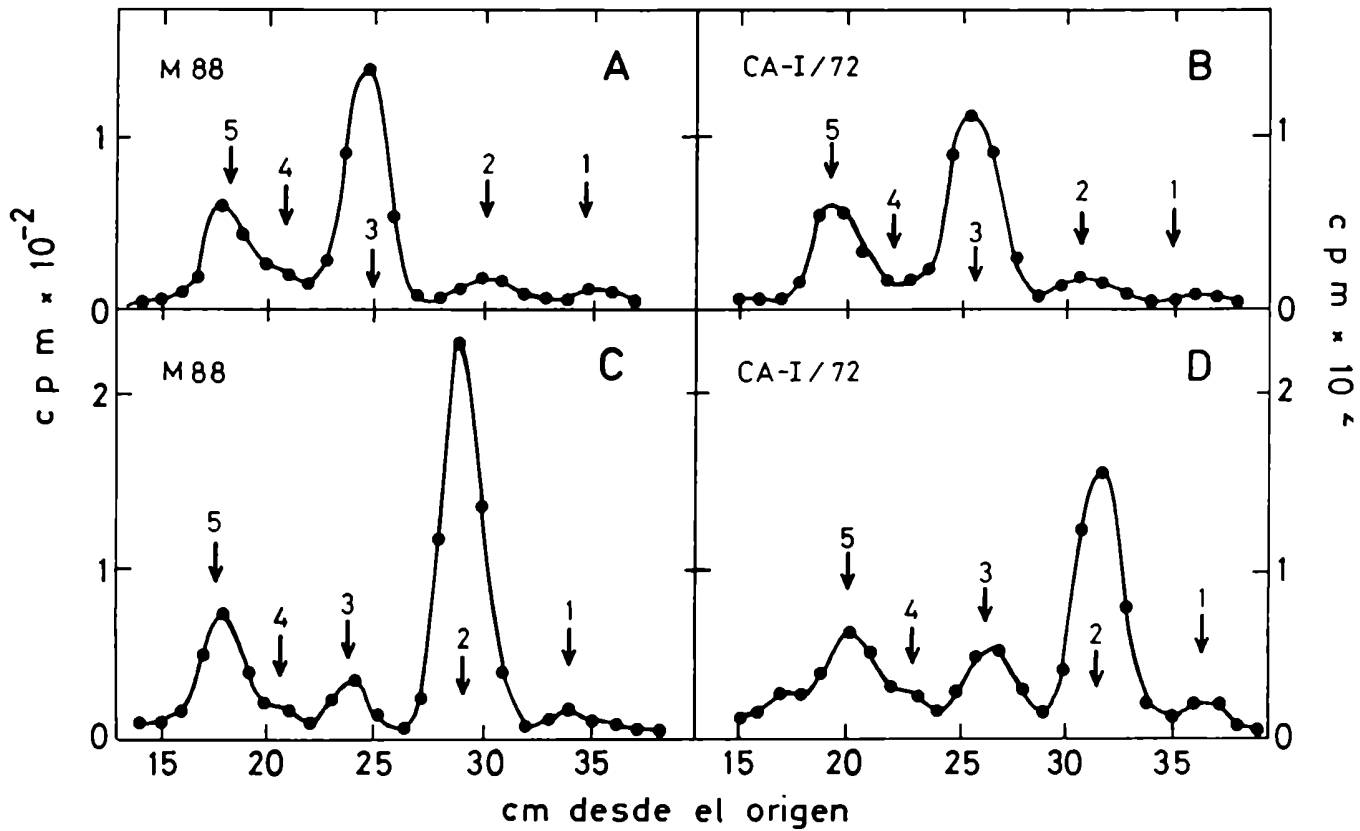


FIGURA 43: Acetólisis de oligosacáridos unidos a proteína de tripomastigotes. Se sometieron a acetólisis los oligosacáridos que migraron como Man₇GlcNAc (A,B) y Man₈GlcNAc (C,D) en la Fig. 39 A-B después de haber sido repurificados por cromatografía en papel. En cada panel se indica el clon del cual provienen. Los productos fueron sometidos a cromatografía en papel con solvente D. Standards: 1, manosa; 2, Man₂; 3, Man₃; 4, Man₃GlcNAc; 5, Man₄GlcNAc.

aquellos con uniones O-glicosídicas a proteínas (140).

La presencia de oligosacáridos tipo complejo en T. cruzi ha sido motivo de controversia (94). Se decidió entonces iniciar su búsqueda en glicoproteínas de las formas tripomastigote y epimastigote de cultivo de T. cruzi. Para ello se incubaron los parásitos con (U-¹⁴C)glucosa durante 60 min seguidos de 60 min de "chase". A continuación se obtuvo un precipitado metanólico como se indicó en la sección II.2.8., se hidrolizaron los residuos de ácido siálico y el material desialidado se digirió con una proteasa para obtener los glicopéptidos. Los glicopéptidos purificados fueron tratados con la enzima endo-H y el material resistente fue sometido a β -eliminación. Finalmente, en los glicopéptidos que resistieron a los dos tratamientos se examinó la presencia de galactosa; si existieran en la preparación oligosacáridos tipo complejo debería detectarse la presencia de este monosacárido que, por otra parte, nunca está presente en oligosacáridos de alta manosa (ver Introducción).

Se realizó la hidrólisis total del material resistente a endo-H y a β -eliminación. Los productos obtenidos fueron desalados y sometidos a electroforesis en 5% ácido fórmico. Este último tratamiento permite eliminar los residuos de aminoácidos y de glucosamina, mientras que en el material neutro se recuperan el resto de los azúcares. Estos se cromatografiaron en papel con solvente B. En la Fig. 44 se muestran los perfiles obtenidos para los clones M 88 y CA-I/72 de epimastigotes y tripomastigotes. Se observa la presencia de galactosa en el material proveniente de ambas formas del parásito y de los dos clones ensayados.

Es llamativo el hecho que tanto epimastigotes como tripomastigotes del clon CA-I/72 (Fig. 44 C,D) presenten una relación de radioactividad

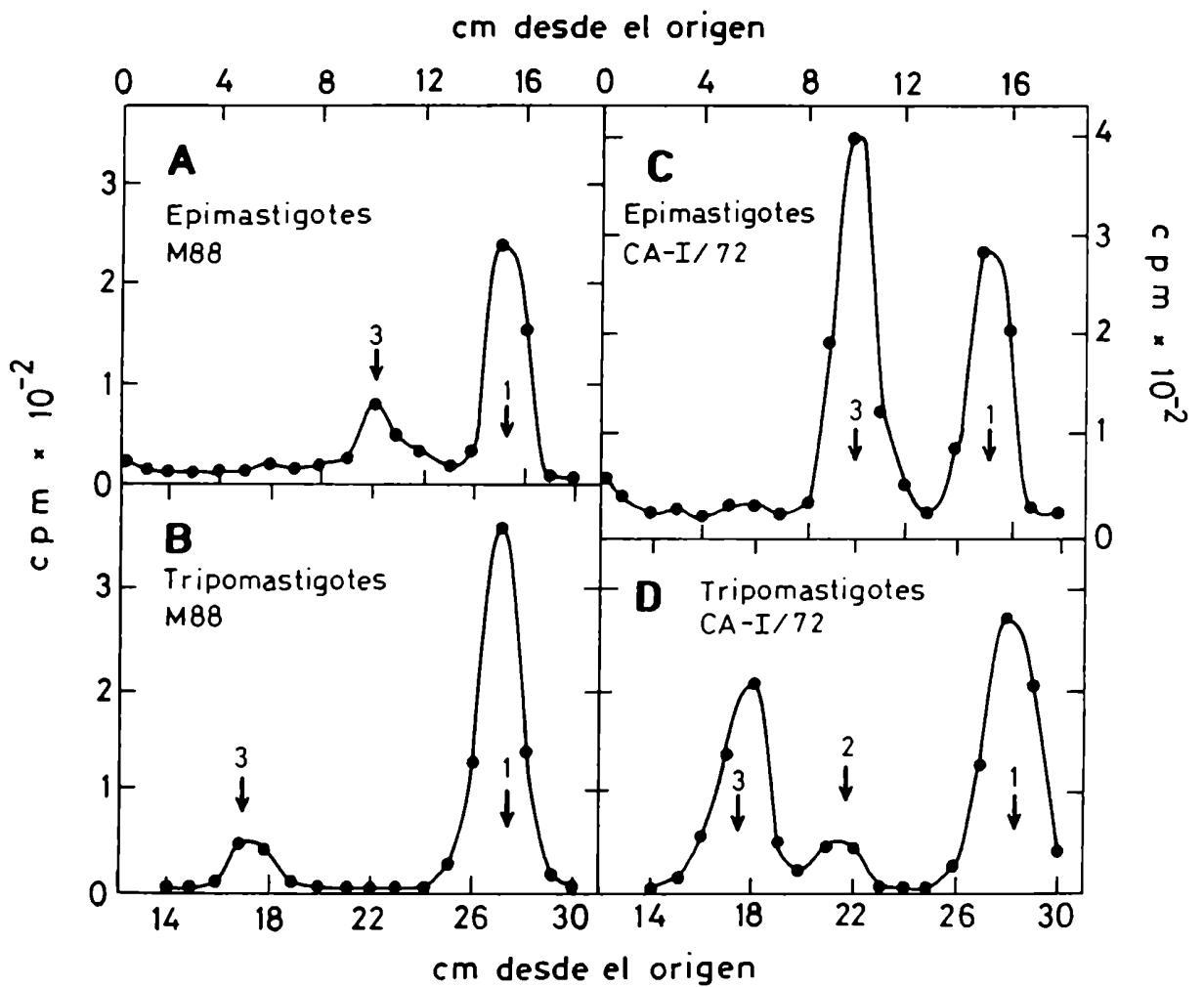


FIGURA 44: Oligosacáridos tipo complejo en glicoproteínas de *T. cruzi*.

Epimastigotes (A,C) y tripomastigotes (B,D) de los clones M 88 y CA-I/72 fueron incubados durante 60 min con (U-¹⁴C)glucosa seguidos de 60 min de "chase". Se obtuvieron los glicopéptidos radioactivos resistentes a endo-H y a β -eliminación. Ese material fue sometido a hidrólisis total y los productos se cromatografiaron en papel con solvente B. Para detalles ver II.2.8. Standards: 1, manosa; 2, glucosa; 3, galactosa.

galactosa/manosa mayor que los parásitos del clon M 88. Lamentablemente la escasez de material no permitió realizar estudios más detallados al respecto.

El haber detectado residuos de galactosa radioactivos en los compuestos resistentes a endo-H y β -eliminación permite concluir que en epimastigotes y tripomastigotes se sintetizan glicoproteínas con oligosacáridos tipo complejo. Sin embargo, la cantidad sintetizada es muy inferior a la de las glicoproteínas con oligosacáridos tipo alta manosa. Hemos calculado que la radioactividad presente en restos de manosa de los compuestos endo-H y β -eliminación resistentes fue sólo un 3-5% de la detectada en los mismos residuos de oligosacáridos sensibles a endo-H. En realidad, este porcentaje podría ser menor aún dado que ciertos oligosacáridos tipo alta manosa con 5 ó 4 restos de manosa son resistentes a los tratamientos enzimático y alcalino a los que se sometieron las muestras (141).

Discusión

Estudios previos habían revelado la acumulación y transferencia a proteínas de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en epimastigotes de T. cruzi de clones de la cepa CA-I y de la cepa Tulahuen (85,110,115) y de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en amastigotes axénicos de clones CA-I (115). Aquí se presentan evidencias que indican que epimastigotes y amastigotes axénicos del clon Miranda 80/88 acumulan los mismos derivados de Dol-P-P que fueron descritos para aquellos clones no relacionados. Por lo tanto, se concluye que las diferencias observadas en el mecanismo de N-glicosilación en ambas formas del parásito no son exclusivas de un clon sino que, por el contrario, serían universales.

También se describe por primera vez el mecanismo de glicosilación de pro-

teínas en las formas tripomastigote y amastigotes intracelulares. Así se determinó que mientras los últimos acumulan como derivado de Dol-P-P y transfieren a proteínas sólo MangGlcNAc_2 , los tripomastigotes transfieren $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y MangGlcNAc_2 . En la Fig. 45 se presenta de manera resumida el mecanismo de N-glicosilación propuesto para ambas formas del parásito.

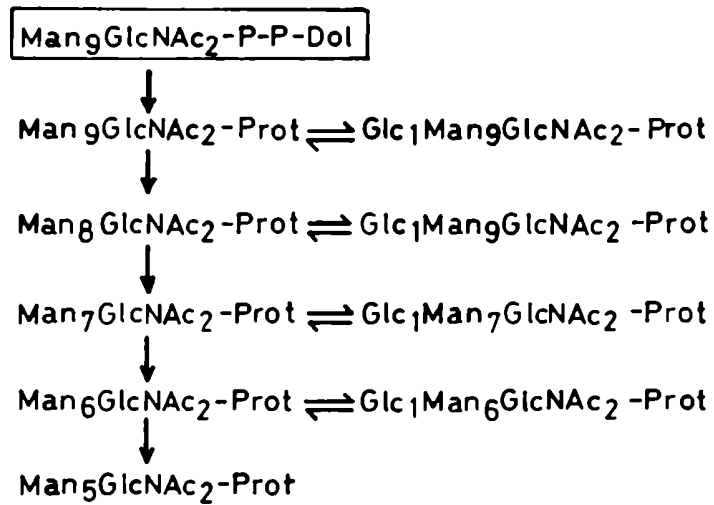
La transferencia a proteínas de oligosacáridos de distinto tamaño durante la diferenciación de T. cruzi no puede ser atribuida a las condiciones de marcación de los parásitos, dado que en todos los casos las incubaciones se realizaron a 37°C y en medios semejantes. Por otra parte, las formas que crecieron en un mismo medio también presentaron diferentes mecanismos de N-glicosilación (tripomastigotes y amastigotes intracelulares, epimastigotes y amastigotes axénicos).

De tal manera, en lo referente al mecanismo de N-glicosilación, los tripomastigotes tendrían un comportamiento similar a los amastigotes axénicos y los epimastigotes a los amastigotes intracelulares. Es importante destacar que aquí se demuestra claramente una diferencia metabólica entre los amastigotes de ambos orígenes, si bien se presumía que podían ser distintos (ver Introducción).

En cuanto a los oligosacáridos unidos a proteína, se detectó la glucosilación transitoria de oligosacáridos de alta manosa en tripomastigotes y amastigotes intracelulares. Este fenómeno ya había sido estudiado en epimastigotes y amastigotes axénicos (85,86,115).

Estudios estructurales permitieron establecer el orden de remoción de los primeros restos de manosa durante el procesamiento de oligosacáridos de alta manosa. Los resultados obtenidos indican que sería el mismo en epimastigotes y tripomastigotes (ver Fig. 42). Paralelamente en tripomastigotes se observó

AMASTIGOTES INTRACELULARES



TRIPOMASTIGOTES

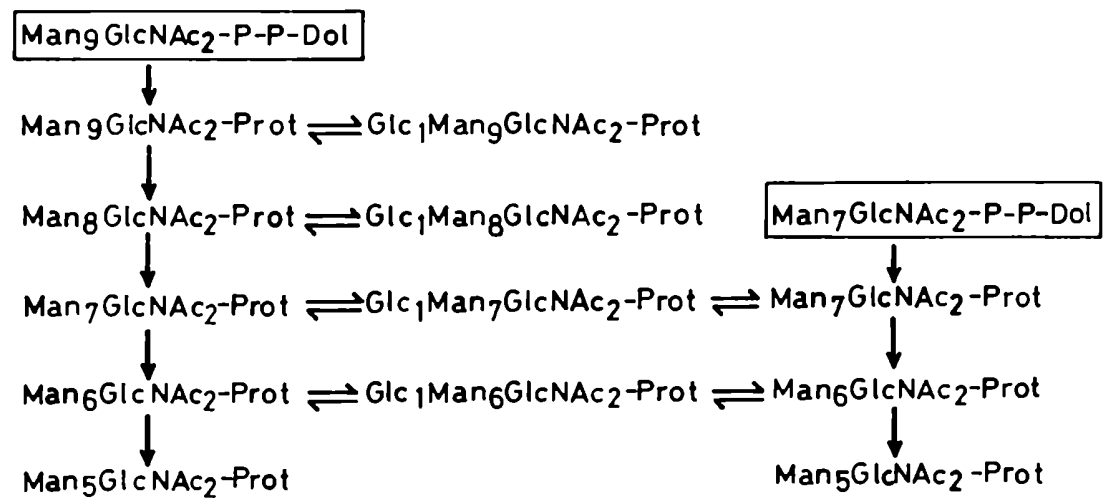


FIGURA 45: Mecanismo de N-glicosilación de proteínas propuesto para amastigotes intracelulares y tripomastigotes de T. cruzi.

un mayor grado de procesamiento que en epimastigotes. La formación de oligosacáridos unidos a proteína con un tamaño promedio menor podría ser originada por la transferencia de Man₇GlcNAc₂ además de Man₉GlcNAc₂. Sin embargo, no se puede descartar que los tripomastigotes tengan enzimas procesadoras muy activas que originen oligosacáridos más pequeños.

Otra consecuencia importante de la transferencia de Man₇GlcNAc₂ en tripomastigotes está relacionada con la estructura de los oligosacáridos que se detectan unidos a proteína. Así, parte del compuesto que contiene siete restos de manosa tiene la misma estructura que Man₇GlcNAc₂ unido a lípido, mientras que en epimastigotes la estructura del isómero principal del mismo tamaño es diferente porque proviene de la demanosilación de Man₉GlcNAc₂ y Man₈GlcNAc₂.

Por el momento desconocemos la relación que pueda tener el mecanismo de N-glicosilación de proteínas con la infectividad de T. cruzi. Podría especularse que la transferencia a proteínas de Man₇GlcNAc₂ influyera sobre la infectividad de los tripomastigotes, ya sea por determinar una estructura diferente en los oligosacáridos de alta manosa o un tamaño promedio menor de los mismos. Sin embargo, los amastigotes axénicos que transfieren el mismo oligosacárido no son capaces de producir infección en células de mamíferos (J.C. Engel, resultados no publicados). De acuerdo a esta observación podría presuponerse que el tamaño y la estructura del oligosacárido transferido no determina "per se" la infectividad. Pero es necesario considerar las limitaciones de la metodología empleada, dado que se trabaja con glicoproteínas totales del parásito. Al respecto, el estudio del mecanismo de procesamiento y transporte intracelular de proteínas individuales de T. cruzi podría aportar datos interesantes, así como para proteínas virales permitió determinar

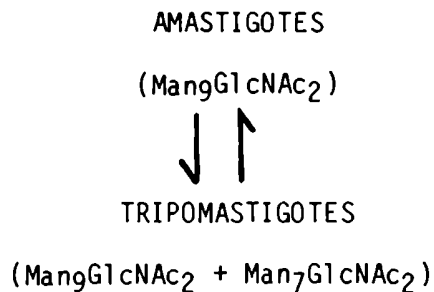
que existía más de una ruta intracelular para la biosíntesis de glicoproteínas con oligosacáridos tipo complejo (79).

Recientemente se presentaron evidencias que sugieren la existencia de por lo menos dos rutas celulares para la N-glicosilación de proteínas y el procesamiento en células de eucariotes superiores. Estas diferirían en su capacidad de marcarse con azúcares exógenos, en el tamaño de los oligosacáridos de alta manosa que generan y en su susceptibilidad a la inhibición por altos niveles de glucosamina (142,143). En el caso de los tripomastigotes podría pensarse que determinadas proteínas sean las que reciban $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y sigan una ruta de procesamiento específica, diferente de la de aquellas que reciben $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ por N-glicosilación. Finalmente, no puede descartarse que sea la porción proteica la que determine el grado de procesamiento de los oligosacáridos y de alguna manera la infectividad (ver Introducción).

T. cruzi es el primer eucariote donde se ha demostrado claramente una modificación en el tamaño del oligosacárido transferido a proteínas durante la diferenciación. Previamente se habían descrito cambios en la estructura de los oligosacáridos unidos a proteína durante la transformación maligna y la diferenciación de células de mamíferos. También ciertas proteínas virales pueden presentar, en un sitio de glicosilación determinado, oligosacáridos de alta manosa o complejos de acuerdo al hospedador donde crezcan (144). En todos estos casos la alteración se produce en el procesamiento de los oligosacáridos una vez unidos a la proteína, mientras que en T. cruzi la modificación primaria se da en el tamaño del oligosacárido transferido de Dol-P-P a proteína.

Recordará el lector que los amastigotes intracelulares son formas reproductivas, no infectivas, que se diferencian intracelularmente a tripomastigo-

tes quienes lisan las células hospedadoras para pasar al torrente sanguíneo y nuevamente colonizar células y diferenciarse a amastigotes. De tal manera, es interesante recalcar que el cambio de oligosacárido transferido de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en amastigotes intracelulares, a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en tripomastigotes, se da en un solo paso de diferenciación, tal como se esquematiza a continuación:



En cuanto al estudio de los oligosacáridos tipo complejo aquí se ha mostrado la presencia de restos de galactosa en el material endo-H y β -eliminación resistente proveniente de epimastigotes y tripomastigotes, lo que indica la síntesis de oligosacáridos tipo complejo.

Anteriormente Parodi y col. no habían detectado la presencia de oligosacáridos complejos en epimastigotes siguiendo una metodología diferente a la presentada aquí (86). Si bien en esta oportunidad han sido detectados, su ínfima proporción en relación a los oligosacáridos de alta manosa no permitió una caracterización exhaustiva.

Estudios previos acerca de las glicoproteínas de superficie de epimastigotes y tripomastigotes indicaron la ausencia de glicoproteínas capaces de unirse a las lectinas de soja y germen de trigo en la forma no infectiva (103). Como esas lectinas reconocen β -galactosa, β -N-acetilglucosamina y ácido siálico, se pensó que los epimastigotes carecerían de glicoproteínas con oligosacáridos tipo complejo. Por el contrario, Previato y col. (145)

mostraron que epimastigotes de T. cruzi eran aglutinados por las mismas lectinas. Los resultados presentados en esta tesis indican la presencia de oligosacáridos tipo complejo en las glicoproteínas de tripomastigotes y epimastigotes; el haber detectado estos compuestos en ambas formas del parásito indica que la ausencia o presencia de los mismos no determina la infectividad.

REFERENCIAS

1. Gottschalk, A. (1972) en: "Glycoproteins. Their composition, structure and function" (Gottschalk, A., ed.) pp. 24-30, Elsevier, Amsterdam.
2. Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. & Vliegthart, J.F. (1982) *Experientia* 38, 1129-1158.
3. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 1-34, Plenum Press, Nueva York.
4. Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C. & Hill, R.L. (1981) *Adv. Enzymol.* 52, 23-175.
5. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
6. Yamashita, K., Kammerling, J.P. & Kobata, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3099-3106.
7. Schachter, H. & Roseman, S. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 85-160, Plenum Press, Nueva York.
8. Mc Guire, E.J. & Roseman, S. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3745-3749.
9. Schachter, H., Mc Guire, E.J. & Roseman, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5321-5328.
10. Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. & Carminatti, H. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3268-3272.
11. Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 559, 1-37.
12. Hubbard, S.C. & Ivatt, R.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50, 555-583.
13. Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1982) *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 12, 289-326.

14. Turco, S.J., Stetson, B. & Robbins, P.W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4411-4414.
15. Hoflack, B., Cacan, R. & Verbert, A. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 285-290.
16. Spiro, M.J., Spiro, R.G. & Bhoyroo, V.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7668-7674.
17. Trimble, R.B., Byrd, J.C. & Maley, F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 11892-11895.
18. Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7762-7770.
19. Robbins, P.W., Hubbard, S.C., Turco, S.J. & Wirth, D.F. (1977) Cell 12, 893-900.
20. Staneloni, R.J., Tolmasky, M.E., Petriella, C., Ugalde, R.A. & Leloir, L.F. (1980) Biochem. J. 191, 257-260.
21. Parodi, A.J. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 210, 372-382.
22. Romero, P.A. & Herscovics, A. (1986) J. Biol. Chem. 261, 15936-15940.
23. Runge, K.W., Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1984) J. Biol. Chem. 259, 412-417.
24. Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7466-7470.
25. Lehle, L. (1980) Eur. J. Biochem. 109, 589-601.
26. Trowbridge, I. & Hyman, R. (1979) Cell 17, 503-508.
27. Chapman, A., Trowbridge, I., Hyman, R. & Kornfeld, S. (1979) Cell 17, 509-515.
28. Rearick, J.I., Chapman, A. & Kornfeld, S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6255-6261.
29. Gershman, H. & Robbins, P.W. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7774-7780.

30. Datema, R. & Schwartz, R.T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11191-11198.
31. Marshall, R.D. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41, 673-702.
32. Struck, D.K. & Lennarz, W.J. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 35-83, Plenum Press, Nueva York.
33. Bause, E. & Legler, G. (1981) *Biochem. J.* 195, 639-644.
34. Pless, D.D. & Lennarz, W.J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 134-138.
35. Quesada-Allue, L.A. & Parodi, A.J. (1983) *Biochem. J.* 212, 123-128.
36. Wright, A., Dankert, M., Fennessey, P. & Robbins, P.W. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1798-1803.
37. Warren, C.D. & Jeanloz, R.W. (1974) *Carbohydr. Res.* 37, 252-260.
38. Tkacz, J. & Lampen, J.O. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 248-251.
39. Kornfeld, S., Gregory, W. & Chapman, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11649-11654.
40. Chapman, A., Fujimoto, K. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4441-4446.
41. Rearick, J.I., Fujimoto, K. & Kornfeld, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3762-3769.
42. Parodi, A.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8343-8352.
43. Staneloni, R.J., Ugalde, R.A. & Leloir, L.F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105, 275-278.
44. Chapman, A., Li, E. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10243-10249.
45. Heifetz, A. & Elbein, A.D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75,

- 20-28.
46. Schutzbach, J.S., Springfield, J.D. & Jensen, J.W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4170-4175.
 47. Villemez, C.L. & Carlo, P.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8174-8178.
 48. Jensen, J.W. & Schutzbach, J.S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12899-12904.
 49. Huffaker, T.C. & Robbins, P.W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3203-3210.
 50. Prakash, Ch., Katial, A. & Vijay, I. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 895-899.
 51. Vijay, I.K. & Perdew, G.H. (1983) *Arch. Biochem. & Biophys.* 220, 605-614.
 52. Pérez, M. & Hirschberg, C.B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 6822-6830.
 53. Snider, M.D., Sultzman, L.A. & Robbins, P.W. (1980) *Cell* 21, 385-392.
 54. Hirschberg, C.B. & Snider, M.D. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* (en prensa).
 55. Quesada-Allue, L.A. (1979) Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
 56. Gold, M.H. & Hahn, H.J. (1976) *Biochemistry* 15, 1808-1814.
 57. Letoublon, R.C.P., Comte, J. & Got, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40, 95-101.
 58. Lederkremer, G.Z. (1985) Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
 59. Crean, E.V. & Rossomando, E.F. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 498, 439-441.
 60. Keenan, R.W., Kruczek, M. & Fusinato, L. (1975) *Archs. Biochem. Biophys.* 167, 697-705.
 61. Keenan, R.W., Matula, J.M. & Holloman, L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 326, 84-92.
 62. Müller, T., Bause, E. & Jaenicke, L. (1984) *Eur. J. Biochem.* 138, 153-159.
 63. Mendelzon, D.H. (1986) Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.

64. Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8814-8818.
65. Ugalde, R.A., Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1174-1181.
66. Bischoff, J. & Kornfeld, R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7907-7910.
67. Opheim, D.J. & Touster, O. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1017-1023.
68. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11655-11663.
69. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7779-7786.
70. Harpaz, N. & Schachter, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4894-4902.
71. Liscum, L., Cummings, R.D., Anderson, R.G.W., De Martino, G.N., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7165-7169.
72. Griffiths, G., Quinn, P. & Warren, G. (1983) *J. Cell Biol.* 96, 835-850.
73. Quinn, P., Griffiths, G. & Warren, G. (1983) *J. Cell Biol.* 96, 851-856.
74. Griffiths, G., Brands, R., Burke, B., Louvard, D. & Warren, G. (1982) *J. Cell Biol.* 95, 781-792.
75. Roth, J. & Berger, E.G. (1982) *J. Cell Biol.* 93, 223-229.
76. Dunphy, W.G. & Rothman, J.E. (1985) *Cell* 40, 463-472.
77. Green, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9039-9042.
78. Hsieh, P., Rosner, M.R., Robbins, P.W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2555-2561.
79. Strous, G.J.A.M. & Lodish, H.F. (1980) *Cell* 22, 709-713.
80. Tabas, I. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6633-6639.
81. Hasilik, A., Klein, V., Waheed, A., Strecker, G. & von Figura, K. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7074-7078.
82. Neufeld, E.F. & Ashwell, G. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 241-266, Plenum Press,

Nueva York.

83. Lang, L., Reitman, M., Tang, J., Roberts, R.M. & Kornfeld, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 259, 14663-14671.
84. Waheed, A., Hasilik, A. & von Figura, K. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12322-12331.
85. Parodi, A.J. & Cazzulo, J.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7641-7645.
86. Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. & Mendelzon, D.H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5589-5595.
87. Parodi, A.J., Mendelzon, D.H., Lederkremer, G.Z. & Martín-Barrientos, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6351-6357.
88. Parodi, A.J., Mendelzon, D.H. & Lederkremer, G.Z. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8260-8265.
89. Olden, K., Bernard, B.A., Humphries, M.J., Yeo, T-K., Yeo, K-T., White, S.L., Newton, S.A., Bauer, H.C. & Parent, J.B. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10, 78-82.
90. Olden, K., Parent, J.B. & White, S.L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 650, 209-232.
91. Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R. III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G. (1980) *J. Protozool.* 27, 37-58.
92. Johnson, L.P. (1968) en: "The Biology of Euglena" (D. Buetow, ed.) vol. 1, pp. 1-26, Academic Press, Nueva York.
93. Vickerman, K. & Preston, T.M. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 1, pp. 36-88, Academic Press, Londres.

94. De Souza, W. (1984) *International Review of Cytology* 86, 197-275.
95. Wallace, F.G. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 213-240, Academic Press, Londres.
96. Miles, M.A. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 117-196, Academic Press, Londres.
97. Lainson, R. & Shaw, J.J. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 2, pp. 2-116, Academic Press, Londres.
98. Vickerman, K. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 1, pp. 1-34, Academic Press, Londres.
99. Dvorak, J. (1984) *J. Cell. Biochem.* 24, 357-371.
100. Piras, R., Piras, M.M. & Henriquez, D. (1982) *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 83-92.
101. Villata, F. & Kierszenbaum, F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 736, 39-44.
102. Nogueira, N., Unkeless, J. & Cohn, Z. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1259-1263.
103. Katzin, A.M. & Colli, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 727, 403-411.
104. Andrews, N.W., Katzin, A.M. & Colli, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140, 599-604.
105. Peterson, D.S., Wrightsman, R.A. & Manning, J.E. (1986) *Nature* 322, 566-568.
106. Sher, A. & Snary, D. (1982) *Nature* 300, 639-640.
107. Snary, D., Ferguson, M.A.J., Scott, M.T. & Allen, A.K. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 343-356.
108. Parodi, A.J., Quesada-Allue, L.A. & Cazzulo, J.J. (1981) *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA 78, 6201-6205.
109. Katial, A., Prakash, C. & Vijay, I.K. (1984) Eur. J. Biochem. 141, 521-526.
110. Parodi, A.J. & Quesada-Allue, L. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7637-7640.
111. Previato, J.O., Mendelzon, D.H. & Parodi, A.J. (1986) Mol. Biochem. Parasitol. 18, 343-353.
112. Mendelzon, D.H., Previato, J.O. & Parodi, A.J. (1986) Mol. Biochem. Parasitol. 18, 355-367.
113. Parodi, A.J., Martín-Barrientos, J. & Engel, J.C. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 1-7.
114. Mendelzon, D.H. & Parodi, A.J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 2129-2133.
115. Engel, J.C. & Parodi, A.J. (1985) J. Biol. Chem. 260, 10105-10110.
116. Wright, A. & Robbins, P.W. (1965) Biochim. Biophys. Acta 104, 594-596.
117. Iñón de Iannino, N. (1983) Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
118. Bacchi, C.J., Lambros, C., Goldberg, B., Hutner, S.H. & de Carvalho, G.D.F. (1974) Antimicrob. Agents. Chemother. 6, 785-790.
119. Moore, E., Gerner, R. & Franklin, A. (1967) J. Am. Med. Assoc. 199, 519-524.
120. Engel, J.C. (1983) Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
121. Macina, R.A., Sánchez, D.O., Affranchino, J.L., Engel, J.C. & Frasch, A.C.C. (1985) Mol. Biochem. Parasitol. 16, 61-74.
122. Eagle, M.H. (1959) Science 130, 432-437.
123. Gottlieb, C., Baenziger, J. & Kornfeld, S. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3303-3309.
124. Baenziger, J. & Kornfeld, S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7270-7281.
125. Kocourek, J. & Ballou, C.E. (1969) J. Bacteriol. 100, 1175-1181.

126. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
127. Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
128. Kobata, A. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 1-4.
129. Hubbard, S.C. & Robbins, P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4568-4576.
130. Hutner, S.H. & Bacchi, C.J. (1976) en: "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds.) vol. 1, pp. 654-683, Academic Press, Londres.
131. Briles, E.B., Li, E. & Kornfeld, S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1107-1116.
132. Stanley, P. (1980) *ACS Symp. Ser.* 128, 214-221.
133. Deutscher, S.L. & Hirschberg, C.B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 96-100.
134. Deutscher, S.L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Briles, E.I.B. & Hirschberg, C.B. (1984) *Cell* 39, 295-299.
135. Bourne, E.J., Hutson, D.H. & Wiegel, H. (1959) *Chem. Ind. (Londres)* 1047-1048.
136. Vijay, I.K. & Perdew, G.H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11221-11226.
137. Vijay, I.K. & Perdew, G.H. (1982) *FEBS Lett.* 139, 321-324.
138. Hagopian, A. & Eylar, E.H. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 422-433.
139. Yagodnik, C., de la Canal, L. & Parodi, A.J. (1987) *Biochemistry* (en prensa).
140. Zinn, A.B., Plantner, J.J. & Carlson, D.M. (1977) en: "The glycoconjugates" (Horowitz, M.I. & Pigman, W., eds.) vol. 1, pp. 65, Academic Press, Nueva York.
141. Li, E. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2754-2758.
142. Kedersha, N.L., Tkacz, J.S. & Berg, R.A. (1985) *Biochemistry* 24,

5960-5967.

143. Ivatt, R.J. (1985) *Biochemistry* 24, 7314-7320.

144. Hsieh, P., Rosner, M.R. & Robbins, P.W. (1982) *J. Biol. Chem.* 258,
2548-2554.

145. Previato, J.O., Andrade, A.F.B., Pessolani, M.C.V. & Mendonça-Previato,
L. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 85-96.

Armando

ARMANDO J. PASSO



L. de la Canal

L. de la Canal



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS

Buenos Aires, 30 de Octubre de 1987.-

A los Sres. Miembros de la
Subcomisión de Doctorado del
Instituto de Investigaciones
Bioquímicas-Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales
S/D

De mi mayor consideración:

Me dirijo a Uds. con el objeto de presentar el trabajo de Tesis, que para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas ha desarrollado la Licenciada Laura de la Canal.

En nuestro laboratorio habíamos encontrado que los tripanosomátidos (protozoarios parásitos, algunos de los cuales son agentes causales de enfermedades endémicas en países en desarrollo) transfieren de un derivado de dolicol difosfato a proteína, oligosacáridos no glucosilados conteniendo, además de 2 residuos de N-acetilglucosamina, 6, 7 o 9 residuos de manosa dependiendo de las especies. En esto los tripanosomátidos se diferencian de los mamíferos, plantas, hongos e insectos, los cuales transfieren todos el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

El trabajo experimental de la Licenciada de la Canal consta de cinco partes. En la primera de ellas estudió el mecanismo de glicosilación en un nuevo tripanosomátido, la Leishmania enriettii, encontrando que era similar al que tiene lugar en especies del género Crithidia, y distinto al conocido para otras dos especies del género Leishmania (L. mexicana y L. adleri). El caso de las Leishmanias es el único conocido en el cual especies del mismo género no comparten el mismo mecanismo de glicosilación. En la segunda parte estudió el mecanismo de glicosilación en un protozoario no tripanosomátido, la Euglena gracilis, microorganismo de vida libre, con el objeto de investigar si todos



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS

////////

los protozoarios presentaban particularidades en su mecanismo de glicosilación o si era una particularidad de los tripanosomátidos. Encontró que el mecanismo en Euglena gracilis era similar al que ocurre en eucariotes superiores. En las tercera y cuarta partes estudió las características enzimáticas que determinan los fenotipos observados en tripanosomátidos. Determinó que estos protozoarios son incapaces de sintetizar dolicol-P-Glc, el dador de los residuos glucosa en $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -P-P-dolicol en mamíferos y hongos, lo que explica la ausencia² de oligosacáridos glicosilados en tripanosomátidos. Además encontró que las especies que forman $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ -P-P-dolicol o $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ -P-P-dolicol in vivo son deficientes no solo en la adición del residuo de manosa faltante siguiente, defecto que por sí explicaría los fenotipos observados, sino en la adición de todos los residuos de manosa faltantes. Es ésta la primera demostración que existen por lo menos 3 manosiltransferasas distintas dependientes de dolicol-P-Man en el ensamblado de dolicol-P-P-oligosacáridos. En la última parte de la Tesis, la Lic. de la Canal estudió el mecanismo de glicosilación de proteínas en las diversas formas del parásito Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas. Encontró que las formas no infectivas (epimastigotes y amastigote) comparten el mismo mecanismo de glicosilación en el cual $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ es transferido a proteínas, pero que en la forma infectiva, trypomastigote, existe un mecanismo adicional, en el cual se transfiere $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Es este el primer caso de una célula eucariote en el cual se transfieren simultáneamente dos oligosacáridos.

Todos estos estudios se han realizado utilizando precursores radioactivos y las técnicas usuales en el tema.

Saluda a Uds. muy cordialmente,

Dr. Armando J. Parodi
Director de Tesis