

Tesis de Posgrado

Glicoproteínas en tripanosomátidos : especificidad de la oligosacariltransferasa y estructura de oligosacáridos, conteniendo residuos galactofuranosa

Bosch, Margarita

1990

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:

Bosch, Margarita. (1990). Glicoproteínas en tripanosomátidos : especificidad de la oligosacariltransferasa y estructura de oligosacáridos, conteniendo residuos galactofuranosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2299_Bosch.pdf

Cita tipo Chicago:

Bosch, Margarita. "Glicoproteínas en tripanosomátidos : especificidad de la oligosacariltransferasa y estructura de oligosacáridos, conteniendo residuos galactofuranosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2299_Bosch.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

GLICOPROTEINAS EN TRIPANOSOMATIDOS: ESPECIFICIDAD DE LA
OLIGOSACARILTRANSFERASA Y ESTRUCTURA DE OLIGOSACARIDOS
CONTENIENDO RESIDUOS GALACTOFURANOSA

Autor: Margarita Bosch

Director: Armando J. Parodi

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Instituto de Investigaciones Bioquímicas

Fundación Campomar.

Tesis presentada para optar al Título de
Doctor en Ciencias Químicas.

2299
ef. 2

Dedico esta Tesis al Dr Armando José Parodi,

y al Dr Luis Federico Leloir

en signo de admiración y agradecimiento

por todo lo que aprendí de ellos,

y a todos los hombres y mujeres que día a día, y en

silencio trabajan para construir un mundo mejor.

Las investigaciones que se presentan en esta Tesis fueron realizadas con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, de la Universidad de Buenos Aires 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), by the University of Buenos Aires and by the UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

INDICE:

ABREVIATURAS

RESUMEN

1.INTRODUCCION:

- 1.1. Glicoproteínas
- 1.2. Glicoproteínas con enlace O-glicosídico
- 1.3. Síntesis del enlace O-glicosídico
- 1.4. Glicoproteínas con enlace N-glicosídico
- 1.5. El dolicol-P
- 1.6. Ciclo del dolicol
- 1.7. Topología del ensamblado
- 1.8. Casos anómalos del ciclo del dolicol
- 1.9. Transferencia del oligosacárido a proteínas:
 la oligosacariltransferasa
- 1.10. Relación de la oligosacariltransferasa con la membrana
- 1.11. Influencia de los lípidos de la membrana
- 1.12. Especificidad por la secuencia peptídica
- 1.13. Mecanismo de reacción
- 1.14. Especificidad por el oligosacárido unido a dolicol-P-P
- 1.15. Biología molecular de la oligosacariltransferasa
- 1.16. Procesamiento de oligosacáridos unidos a asparagina
- 1.17. Modificaciones que sufren los oligosacáridos tipo
 polimánosa unidos a proteína

1.18. Los tripanosomátidos

1.19. Glicosilación de proteínas en tripanosomátidos

1.20. Procesamiento de oligosacáridos unidos a asparagina en
tripanosomátidos

2. CAPITULO 1:

**Procesamiento de glicoproteínas en tripanosomátidos:
caracterización estructural de varios oligosacáridos
sensibles a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H presentes en
glicoproteínas de Leptomonas samueli.**

2.1 Introducción

2.2 Resultados:

2.2.1. Ausencia de la UDP-Glc:dolicol-P glucosiltransferasa

2.2.2. Perfil de oligosacáridos unidos a proteínas maduras

2.2.3. Análisis de los compuestos obtenidos

2.2.4. Estructura del compuesto IV

2.2.5. Estructura del compuesto VI

2.2.6. Estructura del compuesto VIII

2.2.7. Estructura del compuesto I

2.2.8. Estructura del compuesto II

2.2.9. Estructura del compuesto III

2.2.10. Estructura del compuesto V

2.2.11. Estructura del compuesto VII

2.3. Conclusiones

3. CAPITULO 2

Caracterización de la dolicol difosfato oligosacarido:proteina oligosacariltransferasa de tripanosomátidos y células mamíferas indiferenciadas.

3.1 Parte 1: Oligosacariltransferasa de tripanosomátidos

3.1.1. Resultados

3.1.1.1. Sustratos

3.1.1.1.I. Lipidooligosacáridos

3.1.1.1.II. Sustrato proteico

3.1.1.1.III. Preparación enzimática

3.1.1.2 Ensayo

3.1.1.3. Oligosacariltransferasa de tripanosomátidos

3.1.1.4. Oligosacariltransferasa de mamíferos y hongos

3.1.2. Conclusiones

3.2. Parte 2: Oligosacariltransferasa de células mamíferas indiferenciadas

3.2.1 Resultados

3.2.2. Obtención de la fuente de enzima

3.2.3. Ensayo enzimático

3.2.2. Conclusiones

4. APENDICE:

4.1. Cultivo de protozoarios

4.2. Conservación de cepas

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. MATERIALES

5.1.I. Material biológico

5.1.II. Enzimas

5.1.III. Material radioactivo

5.1.IV. Otros materiales

5.1.V. Buffers, solventes y soluciones

5.1.VI. Medios de cultivo

5.2. METODOS

5.2.I. Electroforesis

5.2.II. Cromatografía

5.2.III. Determinación de radioactividad

5.2.IV. Determinación de proteínas

5.2.V. Tratamientos químicos

5.2.VI. Tratamientos enzimáticos

5.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

5.3.I. Obtención de oligosacáridos patrones

5.3.II. Obtención de sustratos

a. Hexapéptido aceptor

b. Dolicol-P-P-oligosacáridos radioactivos

5.3.III.a. Cultivo de microorganismos

5.3.III.b. Cultivo de células

5.3.IV. Marcaciones "in vivo": obtención de glicoproteínas

marcadas de L. samuelli

5.3.V. Obtención de preparaciones enzimáticas

5.3.V.a. Microsomas de tripanosomátidos

5.3.V.b. Membranas totales de células F9

5.3.V.c. Membranas de Saccharomyces cerevisiae

5.3.V.d Preparaciones enzimáticas a partir de hígado de rata

5.3.VI. Incubaciones "in vitro"

5.3.VI.a. Síntesis de dolicol-P-monosacáridos

5.3.VI.b. Ensayo de la oligosacariltransferasa

6. BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

AcNeu	ácido acetil-neuramínico
ACO	acetato
Asn	asparagina
C-terminal	extremo carboxilo terminal
Ci	curie
cm	centímetro
CMP	citósina 5' monofosfato
cpm	cuentas por minuto
DEAE-celulosa	dietilaminoetil-celulosa
Dol	dolicol
Dol-P	dolicol monofosfato
Dol-P-P	dolicol difosfato
EDTA	etilen diamino tetraacetato
Endo-H	endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
Gal	galactosa
GalNAc	N-acetil galactosamina
GDP	guanosina 5' difosfato
Glc	glucosa
GlcNAc	N-acetil glucosamina
g	unidad de gravedad
g	gramos
h	hora
HF	ácido fluorhídrico
HPLC	cromatografía líquida de alta presión

kD	kilodalton
L	litro
M	molar
Man	manosa
min	minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
ml	mililitro
MOPS	ácido 3 N (morfolin) propanosulfónico
µg	microgramo
µl	microlitro
RE	retículo endoplásmico
REL	retículo endoplásmico liso
RER	retículo endoplásmico rugoso
rpm	revoluciones por minuto
pI	punto isoeléctrico
SA	ácido siálico
s	segundos
Ser	serina
TCA	ácido tricloroacético
Thr	treonina
TLCK	tosil-lisina clorometil cetona
Tris	tris-(hidroximetil)aminometano
UDP	uridina 5' difosfato
UMP	uridina 5' monofosafato
V	volt

RESUMEN:

La N-glicosilación de proteínas comienza en la mayoría de las células eucariotes por la transferencia en bloque al resto amida de una asparagina, de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, preformado sobre dolicol-P-P.

La enzima responsable se denomina oligosacariltransferasa y fué estudiada en numerosos sistemas. Se constató que existe una secuencia aminoacídica consenso para la glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr), y una señal en el oligosacárido: la presencia de los tres residuos glucosa, para efectuar la transferencia.

Una vez transferido a proteínas, el oligosacárido sufre una serie de modificaciones (por sustracción y adición de unidades sacarídicas y no sacarídicas) que en conjunto se denominan procesamiento. Los oligosacáridos adquieren distintas composiciones finales, según las cuales se denomina, a los que están en células de mamífero, tipo polimánosa, tipo complejo o tipo híbrido.

Trypanosomatidae es una familia de protozoarios parásitos, algunos de los cuales producen enfermedades en el hombre y en el ganado. El agente causal de mal de Chagas, el Trypanosoma cruzi, pertenece a esta familia.

El estudio de la N-glicosilación "in vivo" de proteínas en tripanosomátidos demostró que estos son los únicos

eucariotes tipo salvaje, capaces de sintetizar sobre dolicol-P-P y transferir a proteínas oligosacáridos no glucosilados. Además, en algunos estadios, T. cruzi es capaz de transferir simultáneamente dos oligosacáridos diferentes.

Se ha estudiado el procesamiento en organismos de la familia Trypanosomatidae y se han encontrado características comunes a otros eucariotes (reacciones de demanosilación y glucosilación transitoria). Se observó además adición de residuos galactosa en configuración furanósica, en extremos no reductores de oligosacáridos tipo polimánosa.

Se estudió la especificidad de la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos "in vitro", frente a sustratos oligosacarídicos de diferente composición, y se la comparó con la de mamíferos y hongos.

Por otro lado se estudió la estructura de varios oligosacáridos conteniendo residuos galactofuranosa existentes en glicoproteínas de Leptomonas samueli.

Resultados:

- Se diseñó un sistema de ensayo "in vitro" que permite estudiar la especificidad de la oligosacariltransferasa frente al sustrato oligosacarídico. Este ensayo contiene como sustrato dador una serie de oligosacáridos radioactivos (de diferente tamaño: $\text{Glc}_3\text{-}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{-}_7\text{GlcNAc}_2$) unidos a dolicol-P-P y un péptido sintético aceptor con la secuencia consenso de glicosilación.

- La oligosacariltransferasa de hígado de rata y de Saccharomyces cerevisiae demostraron en este sistema tener la misma especificidad por el sustrato oligosacárido ya conocida anteriormente, es decir transfieren preferentemente $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$.

- La actividad de transferasa de T. cruzi (parásito digenético que "in vivo" transfiere $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$), fué inespecífica respecto del sustrato, transfiriendo todos los oligosacáridos presentes en el mismo a la misma velocidad.

- Los tripanosomátidos monogenéticos Leptomonas samueli, Crithidia fasciculata y Blastocrithidia culicis, "in vivo" sintetizan y transfieren a proteínas oligosacáridos no glucosilados y con nueve, siete y seis unidades de manosa respectivamente. Membranas de éstos parásitos con actividad de oligosacariltransferasa fueron capaces de transferir con este sistema tanto unidades no glucosiladas como las glucosiladas, (con las cuales fisiológicamente nunca se encuentran), con la misma eficiencia.

Por lo tanto se concluye que la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos difiere de la de todos los demás eucariotes en que no presenta especificidad frente al sustrato oligosacárido (y por lo tanto no requiere la presencia de residuos de glucosa en el oligosacárido para catalizar una transferencia eficaz).

- Células de teratocarcinoma de ratón, transfieren "in vivo" a proteínas los oligosacáridos $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. "In vitro", membranas de éstas células fueron

capaces de transferir preferentemente $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, igual que la enzima normal de mamíferos, constatando que la inespecificidad frente al sustrato oligosacárido es una característica exclusiva de la familia Trypanosomatidae. Esto sugiere la posible modulación "in vivo" de la especificidad de la oligosacaryltransferasa de células de teratocarcinoma por factores desconocidos.

- La síntesis y transferencia a proteínas de unidades no glucosiladas en L. samueli, se debe a, por lo menos, la incapacidad de estas células de sintetizar dolicol-P-Glc, el dador de glucosa en el ciclo del dolicol de otros eucariotes.
- El procesamiento de oligosacáridos en proteínas de L. samueli involucra la demanosilación parcial de la unidad transferida ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$) y el agregado de residuos galactofuranosa.
- Se describen las estructuras de varios oligosacáridos tipo polimánosa que contienen o no residuos galactofuranosa, presentes en glicoproteínas de L. samueli.
- A diferencia de lo observado en C. fasciculata, el oligosacárido originalmente transferido sufre una elongación por agregado de restos galactofuranosa.
- Durante el curso del presente trabajo se ha desarrollado un método de conservación de éstos parásitos a -70°C , que se ha utilizado con éxito con todas las cepas monogénicas del laboratorio.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

"The Specificity of the Oligosaccharyltransferase from a Murine Teratome Cell Line Towards Oligosaccharides".

Bosch, M and Parodi, A.

Anales de la Asociación Química Argentina , 77 (1) 63-69, (1989)

"Characterization of Dolichol Diphosphate Oligosaccharide:Protein Oligosaccharyltransferase and Glycoprotein-processing Glucosidases Occurring in Trypanosomatid Protozoa".

Bosch, M.; Trombetta, S. Engstrom, U. and Parodi, A.

The Journal of Biological Chemistry, 263, 17360-17365, (1988).

"Synthesis of Dolichol Derivatives and Protein Glycosylation in Trypanosomatids".

Bosch, M.; Trombetta, S. and Parodi, A.

Biochemical Society Transactions, 16, 268-271, (1988).

"Structural Characterization of Several Galactofuranose-containing, High Mannose-Type Oligosaccharides Present in Glycoproteins of the Trypanosomatid Leptomonas samueli".

Moraes, C.; Bosch, M. and Parodi, A.

Biochemistry, 27, 1543-1549 (1988).

ABSTRACT

In most eucariotic cells, N-glycosylation of proteins is initiated by the transfer of an oligosaccharide (Glc₃Man₇GlcNAc₂), preformed on dolicol-P-P, to asparagine residues in polypeptide chains.

The enzyme responsible for this transfer reaction is the oligosaccharyltransferase. A consensus aminoacid sequence for glycosylation appeared to be Asn-Xaa-Ser/Thr. In addition, the presence of the three glucose residues in the transferred oligosaccharide proved to be necessary for the transfer reaction to occur.

Once transferred to proteins, the oligosaccharide undergoes a series of modifications, known as processing. This leads, in mammalian cells, to the formation of high mannose-, complex- or hybrid- type oligosaccharides.

Trypanosomatidae is a family of parasitic protozoa, that includes some species capable of infecting humans, cattle and other mammals. Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease is a member of this family.

The study of the "in vivo" glycosylation of proteins in trypanosomatids demonstrated that they are the only wild type eucaryotes able to synthesize and transfer non-glucosylated oligosaccharides to proteins. (T. cruzi also

transfers two different unglucosylated oligosaccharides simultaneously in some differentiation stages).

As in other eucaryotic cells, processing of oligosaccharides in these organisms involves removal of some mannose units, and addition and removal of glucose units (transient glucosylation). In some particular cases, addition of galactofuranose units to the non-reducing ends of the oligosaccharides has been described.

The aim of this work was to study the specificity of the oligosaccharyltransferase of trypanosomatids with respect to oligosaccharides of different composition, and to compare it with that of the enzyme of other eucaryotes.

The structure of oligosaccharides containing galactofuranose residues in the glycoproteins of these parasites was also investigated.

Results:

- An assay was developed allowing the study of the "in vitro" specificity of the oligosaccharyltransferase towards oligosaccharides. The substrates were a series of radioactive oligosaccharides ($\text{Glc}_1\text{-}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_7\text{-}_9\text{GlcNAc}_2$) linked to dolicol-P-P and a synthetic peptide containing the consensus glycosylation sequence.

- Using this system, rat liver and yeast oligosaccharyltransferases showed the same specificity for the oligosaccharidic substrate observed previously. These enzymes preferentially transfer $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$.

- T. cruzi is a digenetic parasite that transfers "in vivo" $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ to asparagine residues in proteins. All the oligosaccharides present in the donor substrate were transferred "in vitro" by membranes of this parasite at the same rate, irrespective of their composition.

- The monogenetic trypanosomatids Leptomonas samueli, Crithidia fasciculata and Blastocrithidia culicis transfer "in vivo" non glucosylated oligosaccharides to proteins with two N-acetylglucosamine and nine, seven or six mannose units respectively.

Membranes of these parasites were able to transfer "in vitro" non-glucosylated units as well as those containing glucose units (with which they are never present "in vivo") to the synthetic peptide at the same rate. It was concluded that the oligosaccharyltransferase from trypanosomatids differs from those in other eucariotes, because the former one does not require the presence of three glucose units in the oligosaccharide for an efficient transfer to proteins.

Mouse teratocarcinoma cells transfer "in vivo" two oligosaccharides, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Membranes of these cells were found to transfer "in vitro" preferentially $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, the same as mammalian wild type oligosaccharyltransferases. This shows that the enzyme is non-specific with respect to the oligosaccharide of different composition only in organisms of the trypanosomatid family. This result also suggests the existence of an unknown factor modulating "in vivo" the

specificity of the oligosaccharyltransferase in mouse teratocarcinoma cells.

- The synthesis of non-glucosylated oligosaccharides linked to dolichol-P-P in L. samueli appeared to be due to the absence of synthesis of dolichol-P-Glc, the donor of glucose residue in the dolicol pathway.

- Processing of oligosaccharides in proteins of L. samueli was shown to involve the partial demannosylation of the transferred unit, and the addition of galactofuranose residues.

- We describe here the structure of several oligosaccharides of the high mannose type, with or without galactofuranose residues present in mature glycoproteins of L. samueli.

In this parasite the oligosaccharide originally transferred ($\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) was elongated by the addition of galactofuranose residues.

- During the course of the present work a method for the preservation of monogenetic parasites at -70°C was developed and used successfully.

The results presented here have been partially published in the following articles:

"The Specificity of the Oligosaccharyltransferase from a Murine Teratome Cell Line Towards Oligosaccharides".

Bosch, M and Parodi, A.

Anales de la Asociación Química Argentina, 77 (1) 63-69 (1989).

"Characterization of Dolichol Diphosphate Oligosaccharide:Protein Oligosaccharyltransferase and Glycoprotein-processing Glucosidases Occurring in Trypanosomatid Protozoa".

Bosch, M.; Trombetta, S.; Engstrom, U. and Parodi, A.

The Journal of Biological Chemistry, 263, 17360-17365, (1988).

"Synthesis of Dolichol Derivatives and Protein Glycosylation in Trypanosomatids".

Bosch, M.; Trombetta, S. and Parodi, A.

Biochemical Society Transactions, 16, 268-271, (1988).

"Structural Characterization of Several Galactofuranose-containing, High Mannose-Type Oligosaccharides Present in Glycoproteins of the Trypanosomatid Leptomonas samueli".

Moraes, C.; Bosch, M. and Parodi, A.

Biochemistry , 27, 1543-1549, (1988)

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas e instituciones tuvieron que ver con la concreción de este trabajo.

Quisiera recordar a algunos, sabiendo que omitiré a muchos. Tengo la certeza de que, si supieron estar entonces, sabrán disculparme ahora.

En primer lugar debo mi agradecimiento a la Universidad de Buenos Aires, y a muchos docentes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Son responsables de mi primera formación y algunos, depositarios mis primeras admiraciones.

En segundo lugar quiero agradecer la Fundación Campomar, Fundación M. T. Majdalani, Merrel Dow Pharmaceuticals International, a CONICET y a mis padres por el apoyo económico. También a los directivos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por haberme permitido llevar a cabo mi trabajo allí.

Mi director de Tesis merece un agradecimiento especial. En un país donde la investigación científica parece reservada a los románticos o los enajenados, me demostró que la ciencia puede llevarse con la vida misma. El dejó también en mí profundas huellas profesionales: el predominio de lo intelectual, el fanatismo por la eficiencia, y el respeto a la libertad.

A los investigadores del IIB, por su colaboración y su amistad, en particular
a los Dres. J.J. Cazzullo, R. Wolosiuk, M. Garcia y R. Couso
por sus valiosos consejos y aportes
a los Dres. C. Frash y R. Ugalde por cederm e materiales y recomendaciones
al Dr. P. Salas, por su colaboración en la impresión de esta tesis

A los becarios y amigos, a Alejandra, Sonia, Angeles, Gonzalo, Beatriz, Graciela, Sergio, Eduardo, Tony, Toni, Juan, Marcelo y los que omito, por el intercambio y los gratos momentos compartidos

Al personal tecnico y administrativo del Instituto por su eficaz colaboración

A mis padres, por haber sembrado las primeras inquietudes y a Juan, mi marido, heroico copiloto del ultimo tramo.

INTRODUCCION:

1.1 GLICOPROTEINAS

Las glicoproteínas, proteínas sustituidas con azúcares, son compuestos ampliamente distribuidos en los organismos vivientes. Se encuentran formando parte de las células, en los espacios intercelulares y en los fluidos biológicos, donde son compuestos estructurales y tienen funciones enzimáticas. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla I.

La porción sacarídica, una o varias por proteína, está unida covalentemente a ciertos aminoácidos. Generalmente está ramificada, no presenta unidades repetitivas, y contiene relativamente pocos residuos sacarídicos. De los 200 monosacáridos conocidos solo un 10 % forma parte de estos compuestos. Sin embargo la posibilidad de combinación, ramificación y aún sustitución de los mismos los hace muy versátiles en cuanto a su estructura.

La porción oligosacarídica modifica el tamaño, carga, forma e hidrofobicidad de las proteínas, y estabiliza su conformación espacial (Olden y col 1985). En muchos casos es la responsable de las funciones de las mismas (para un ejemplo Parekh y col 1989).

Las glicoproteínas son sintetizadas por la célula, en el sistema de membranas del retículo endoplásmico (RE) y del Aparato de Golgi. De allí son transportadas en forma

GLICOPROTEINA	LOCALIZACION	Contenido en carbohidratos (%)
<u>Enzimas (extracelulares, vacuolares, lisosomales):</u>		
Fosfatasa alcalina	hígado de ratón	18
Carboxipeptidasa Y	levadura	17
Bromelaina	ananá	36
Invertasa	levadura	50
Endo- β -1,3-glucanasa	levadura	24
Proteinasa A	levadura	8.5
<u>Hormonas y factores:</u>		
Gonadotropina coriónica	orina humana	31
Eritropoietina	orina humana	29
Interferón	leucocitos humanos	20
<u>Toxinas</u>		
Killer protoxina	levadura	26
Toxina killer	levadura	13
<u>Lectinas:</u>		
de papa		50
de soja		6
D-Gal específica	levadura	60
<u>Constituyentes de Membrana:</u>		
Glicoforina	eritrocitos humanos	60
Hemaglutinina	virus de influenza	25
Rodopsina	retina bovina	7
Fosfolipasa B ₁	levadura	76
<u>Constituyentes de la pared celular</u>		
GP de 29 kDa	levadura	10
GP de 180 kDa	levadura	88
<u>Estructurales</u>		
Colágeno	piel de rata	0.4
<u>Glicoproteínas séricas:</u>		
IgG inmunoglobulina	suero humano	10
Tiroglobulina	tiroide de ternero	8
Protrombina	suero humano	8

Tabla I: Algunos ejemplos de glicoproteínas

específica a su destino final. El aminoácido aceptor puede ser un hidroxiaminoácido o un residuo asparagina y los monosacáridos son cedidos por los nucleótido-azúcares respectivos, en forma directa, o indirecta por intermedio de derivados de poliprenoles.

Dos tipos de uniones se generan de este modo: la llamada N-glicosídica que se establece entre el resto amida de una asparagina y el carbono anomérico de una N-acetilglucosamina, y la unión O-glicosídica entre el oxígeno del hidroxilo de un hidroxiaminoácido y el carbono anomérico del monosacárido involucrado. Ambos tipos de unión pueden ser caracterizadas químicamente. Además difieren en su modo de síntesis, y presentan características propias (Tabla II).

En la Fig 1 puede observarse un ejemplo de cada tipo de unión.

1.2. GLICOPROTEINAS CON ENLACE O-GLICOSIDICO:

Se han descrito extensivamente en mamíferos y levaduras, pero también se las encontró en vegetales.

El enlace con serina o treonina es el más frecuente, y se da con un residuo de:

a. N-acetilgalactosamina en mucinas (Schachter y Roseman 1980), proteoglicanos (Tanaka y Pigman 1965), proteínas anticongelantes de peces (De Vries y col. 1971), proteínas que determinan especificidad de grupo sanguíneo (Feizi y col 1971), entre otras.

b. xilosa en, por ejemplo, heparina y condroitinsulfato (Lindhal y Roden, 1966) (Fig. 1).

	TIPO DE UNION	
	<u>O-GLICOSIDICA</u>	<u>N-GLICOSIDICA</u>
* <u>Aminoácido involucrado</u>	hidroxiaminoácido (Ser y Thr principalmente)	asparagina
* <u>Monosacárido involucrado</u>	varios: GalNAc,GlcNAc,Man,etc,	GlcNAc
* <u>Lugar de síntesis inicial</u>	Aparato de Golgi (RE ?)	RER
* <u>Adición de residuos inicial</u>	un monosacárido, directo	un oligosacárido, en bloque
* <u>Actividad enzimática responsable</u>	varias enzimas	Oligosacaril transferasa

Tabla II: Características de los dos tipos de uniones glicosídicas en glicoproteínas de eucariotes.

c. manosa en el manano de levaduras (Nakajima y Ballou, 1974) y en glicoproteínas de hongos (Fig. 12 B).

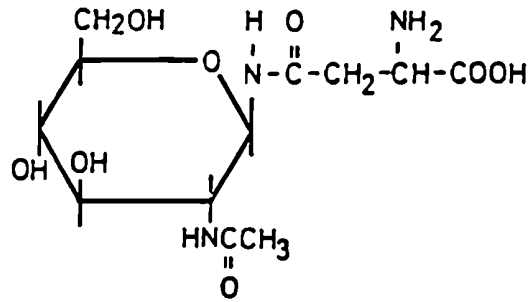
d. N-acetilglucosamina en proteínas citoplasmáticas y del núcleo (Hart y col 1989), por ejemplo proteínas del complejo del poro nuclear (Holt y Hart 1986), factores reguladores de la transcripción en eucariotes (Jackson y Tjian 1988), y porción citoplasmática de proteínas de transmembrana de RE (Abeijon y Hirschberg 1988).

e. También se encontró galactosa y fucosa unidas a Ser/Thr (Muir y Lee 1969, Hallgren y col. 1975).

Se describió la unión entre arabinosa e hidroxiprolina en extensinas (glicoproteínas vegetales) (Lampert 1969) y en colágeno; y entre galactosa e hidroxilisina en glicoproteínas de la membrana basal (Butler y Cunningham 1966; y Spiro 1967). La labilidad a tratamiento ácido (2 N HCl 110°C 30 min) y resistencia a tratamiento alcalino prolongado diferencia estos dos tipos de unión (a hidroxilisina e hidroxiprolina) de las que involucran serina o treonina que son sensibles a beta eliminación (tratamiento alcalino suave en ambiente reductor) (Fig. 1).

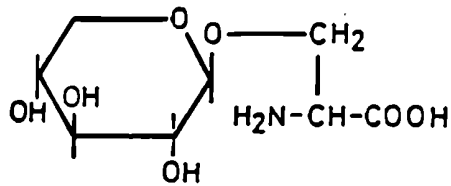
Las glicoproteínas con enlace O-glicosídico presentan una porción oligosacáridica de tamaño variable: de un residuo (Hart y col. 1988) o dos (Spiro 1973), hasta alrededor de veinte o mas. Estos oligosacáridos pueden estar sustituidos por restos no glucosídicos como, por ejemplo sulfato en el keratán sulfato .

Unión N-glicosídica

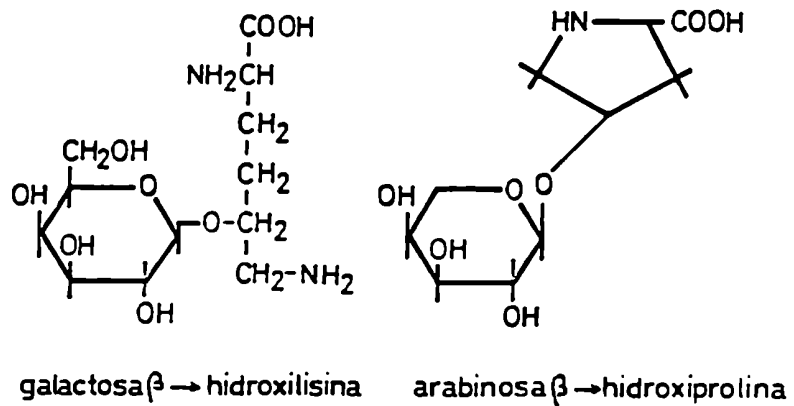


N-acetilglucosamina $\beta \rightarrow$ asparagina

Unión O-glicosídica



xilosa $\beta \rightarrow$ serina



galactosa $\beta \rightarrow$ hidroxilisina

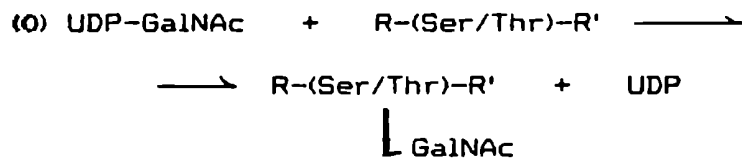
arabinosa $\beta \rightarrow$ hidroxiprolina

Fig. 1 Tipos de unión azúcar-aminoácido encontradas en eucariotes.

1.3. Síntesis del enlace O-glicosídico:

La síntesis ocurre por adición secuencial de residuos a partir de los nucleótido-azúcares respectivos, de modo tal que el producto de una reacción de transferencia es sustrato para la reacción siguiente. No se ha detectado transferencia de estructuras preformadas. Las transferasas involucradas demostraron ser muy específicas respecto del sustrato.

La síntesis se inicia por transferencia del monosacárido desde el nucleótido-azúcar correspondiente (salvo en hongos, como se verá mas adelante) al hidroxiaminoácido en la cadena peptídica según la reacción :



No se conoce hasta la fecha una estructura primaria o secundaria indispensable para que ocurra la reacción de O-glicosilación, si bien Aubert y col. 1976, y Loucheux-Lefebvre y col. 1978 sugieren que es necesaria una cierta estructura secundaria para que la reacción ocurra.

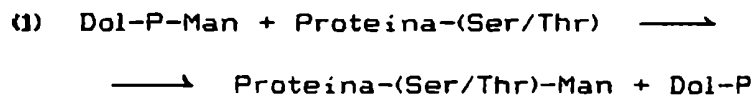
El sitio de iniciación de la síntesis no se ha determinado unívocamente aún. Resultados presentados por Abeijón y Hirshberg (1987) sugieren fuertemente que la enzima responsable del inicio de la O-glicosilación (en glicoproteínas tipo mucina), la UDP-GalNAc:polipéptido GalNAc transferasa, se encuentra, en hígado de rata, en el Aparato de Golgi exclusivamente, con su centro catalítico orientado

hacia el lumen de esta organela. Por otra parte Strous 1979, y Patzelt y Weber 1986, encontraron que la adición de N-acetilgalactosamina a serina o treonina ocurre co o post traduccionalmente en el retículo endoplásmico rugoso (RER) de la mucosa gástrica.

La elongación de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente ocurre en mamíferos por adición sucesiva de monosacáridos a partir de los nucleotido-azúcares correspondientes. Los dadores se sintetizan en el citoplasma (Turnquist y col 1974, Ishihara y Heath 1968) salvo el CMP-AcNeu que se sintetiza en el núcleo; y son transportados al interior de las organelas, donde están las transferasas correspondientes.

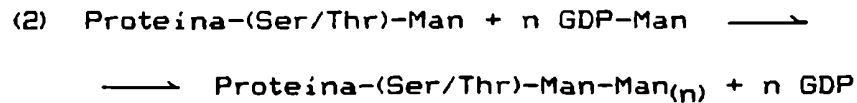
La estructura final del oligosacárido está determinada por el número y tipo de transferasas presentes, como es el caso de los grupos sanguíneos A,B y O (Schachter y Roseman 1980, Beyer y col 1981). También depende de la proporción relativa y de la ubicación subcelular de las diferentes enzimas que determinarán la secuencia biosintética del oligosacárido.

En hongos el primer dador de manosa para una unión de este tipo (Babczinski y Tanner 1973, Sharma y col 1974) es Dol-P-Man según la reacción:



mientras que el dador de los restos manosa

adicionales es GDP-Man (en la Fig. 12 B se muestra el caso de S. cerevisiae)



La reacción (1) parece ocurrir en el RE, donde ocurren las reacciones dependientes de dolicol. La elongación (2) se produce en las cisternas del aparato de Golgi (Haselbeck y Tanner 1983).

Esta reacción no tiene requerimiento específico de secuencia aminoacídica, ni hay evidencias de que alguna conformación espacial del péptido favorezca la unión con los azúcares. Estudios "in vitro" con membranas de levadura, Dol-P-Man radioactivo y péptidos sintéticos sugirieron que residuos de prolina cercana (hacia el lado amino terminal) de serina o treonina facilitarían la transferencia "in vitro" de residuos de manosa al hidroxiaminoácido (Lehle y Bause 1984).

1.4. GLICOPROTEINAS CON ENLACE N-GLICOSIDICO :

Estas glicoproteínas se encuentran en todo el camino secretorio (RE, Aparato de Golgi, sistema de trans Golgi y vesículas asociadas Fig. 9), están en el lumen o insertas en las membranas de estas organelas, pero con la porción oligosacáridica orientada hacia la luz de las mismas. Pueden ser proteínas de secreción o proteínas embebidas en la membrana plasmática, en cuyo caso el oligosacárido se encuentra encarando el exterior celular.

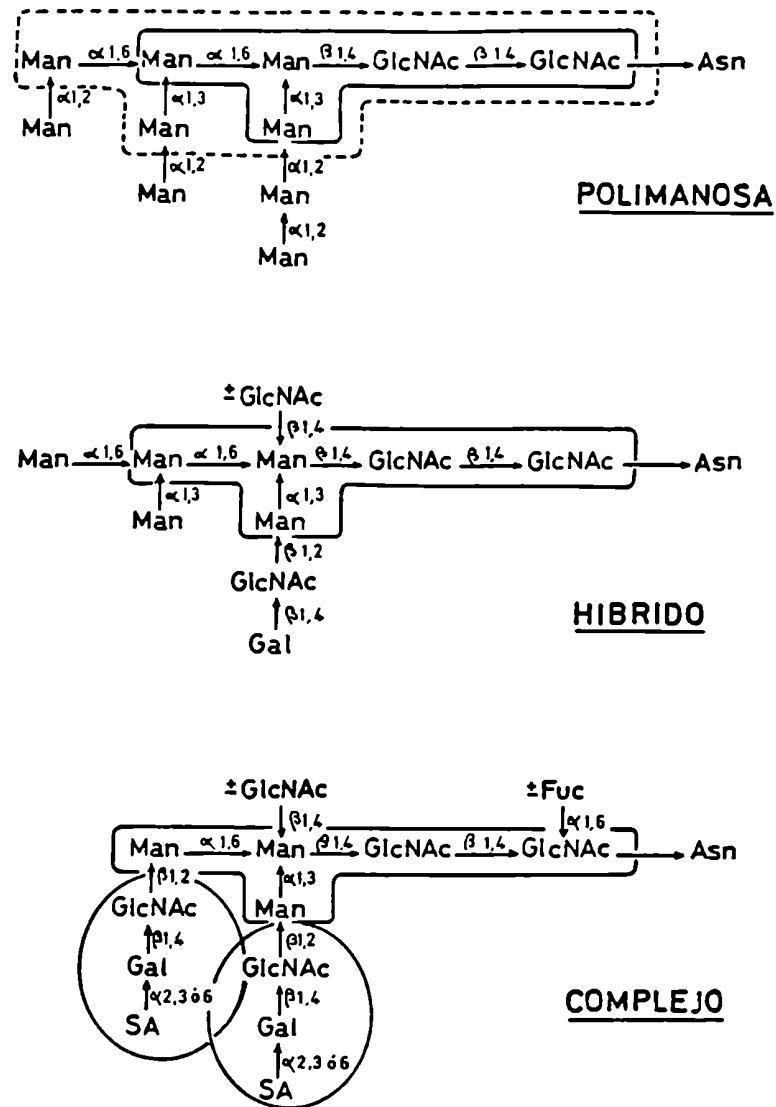


Fig. 2 Clasificación de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente a proteínas, según su composición.

Las áreas recuadradas con la línea continua indican el núcleo de pentasacárido común a todas las estructuras N-glicosídicas, y el área punteada corresponde al heptasacárido típico de las formas "polimanosas". Los fragmentos dentro del óvalo se denominan antenas y son característicos de las formas complejas, aunque se han encontrado también en las formas híbridas. Los residuos señalados con \pm pueden estar ausentes.

Según su composición estos oligosacáridos unidos a asparagina pueden dividirse en tres grupos (Fig. 2):

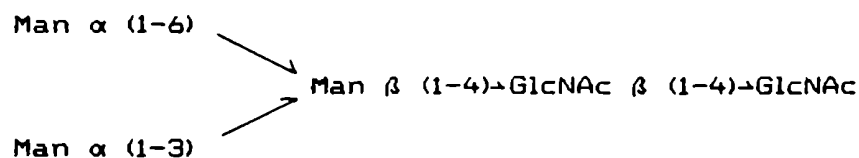
a) Tipo polimánosa: contienen exclusivamente manosa y N-acetilglucosamina.

b) Tipo complejo: además de manosa y N-acetilglucosamina contienen otros azúcares. Una secuencia comúnmente presente en este tipo de oligosacárido es la lactosamina: Gal β 1-4GlcNAc. También es común la secuencia SA-Gal-GlcNAc-Man. Estas ramificaciones de las manosas se llaman antenas. Pueden encontrarse hasta cinco por oligosacárido. La variedad de estructuras encontradas hasta el momento es enorme y se han descrito también sustituciones de manosas con fucosa, xilosa y GlcNAc.

c) Tipo híbrido: tienen una composición intermedia entre el tipo que se denomina complejo y polimánosa.

Estos azúcares pueden a su vez llevar sustituyentes no glicosídicos, como metilo en el hongo Mucor rouxi (Lederkremer y Parodi, 1984), fosfato en las enzimas lisosomales (Kornfeld y Kornfeld 1985), o sulfatos, como por ejemplo en el keratán sulfato (Hubbard e Ivatt 1981).

Cuando se estudió la estructura de los oligosacáridos unidos a asparagina se encontró que los tres tipos mencionados mas arriba poseen una estructura común llamada **núcleo** que está sustituida por diferentes azúcares en los tres casos. El **núcleo** es el siguiente (ver Fig. 2):



Esto se debe a que se sintetizan a partir de un mismo precursor biosintético.

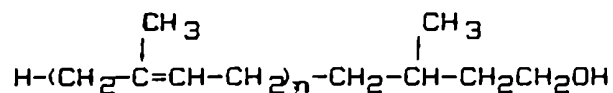
Este precursor es un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, que se ensambla sobre dolicol pirofosfato, en una serie de reacciones secuenciales y ordenadas que en conjunto se denominan "ciclo del dolicol". Una vez ensamblado el oligosacárido, este es transferido en bloque al residuo asparagina de una proteína naciente o recién sintetizada por acción de una enzima que se denominó oligosacariltransferasa. Por esta razón la biosíntesis del oligosacárido en glicoproteínas tipo N-asparagina se considera indirecta (Staneloni y Leloir 1982).

El ciclo del dolicol ocurre en el retículo endoplásmico. La adición de unidades se realiza a partir de dadores nucleotídicos o de poliprenol-fosfatos, que a su vez se sintetizan a partir de nucleotido-azúcares dadores y Dol-P. Varias enzimas del ciclo han sido purificadas. Se encontró que están asociadas a la membrana y algunas requieren fosfolípidos para actuar.

1.5. EL dolicol-P:

El dolicol es un compuesto poliisoprenoide, poliinsaturado, cuyo residuo isopreno terminal está saturado. Este residuo isopreno terminal puede estar como alcohol libre, fosforilado o esterificado con un ácido graso (Hemming 1983, Rip y col 1985).

La estructura del dolicol es :



donde n es el número de unidades isopreno. El largo de la cadena depende del organismo: tiene de 17 a 21 unidades en animales y de 15 a 19 unidades en levaduras, hongos y plantas. Es mas corta cuando se desciende en la escala evolutiva .

Los poliprenoles tienen un efecto sobre las bicapas lipídicas. Experiencias realizadas hasta el momento demuestran que estos aumentan la fluidez de los fosfolípidos en las bicapas, desestabilizan membranas lipídicas, estimulan la formación de micelas invertidas, aumentan la permeabilidad a ciertos sustratos, influyen en la organización y empaque de fosfolípidos y la fusión de vesículas (Lai y Schutzbach 1984, Valtersson y col 1985, de Ropp y Troy 1985, de Ropp y col 1987, van Duijn y col 1987). Todo esto sugiere que el dolicol inserto en las membranas puede conferir características dinámicas a las mismas que favorecerían las reacciones de transferencia de azúcares necesarias para la N-glicosilación de proteínas (Chojnacki y Dallner 1988).

El Dol-P pudo ser sintetizado a partir de dolicol libre en reacciones dependientes de CTP en hígado (Allen y col 1978, Rip y Carroll 1980) y cerebro (Burton y col 1979). También se han descrito las enzimas defosforilantes de Dol-P y Dol-P-P. Esta última estaría involucrada en la

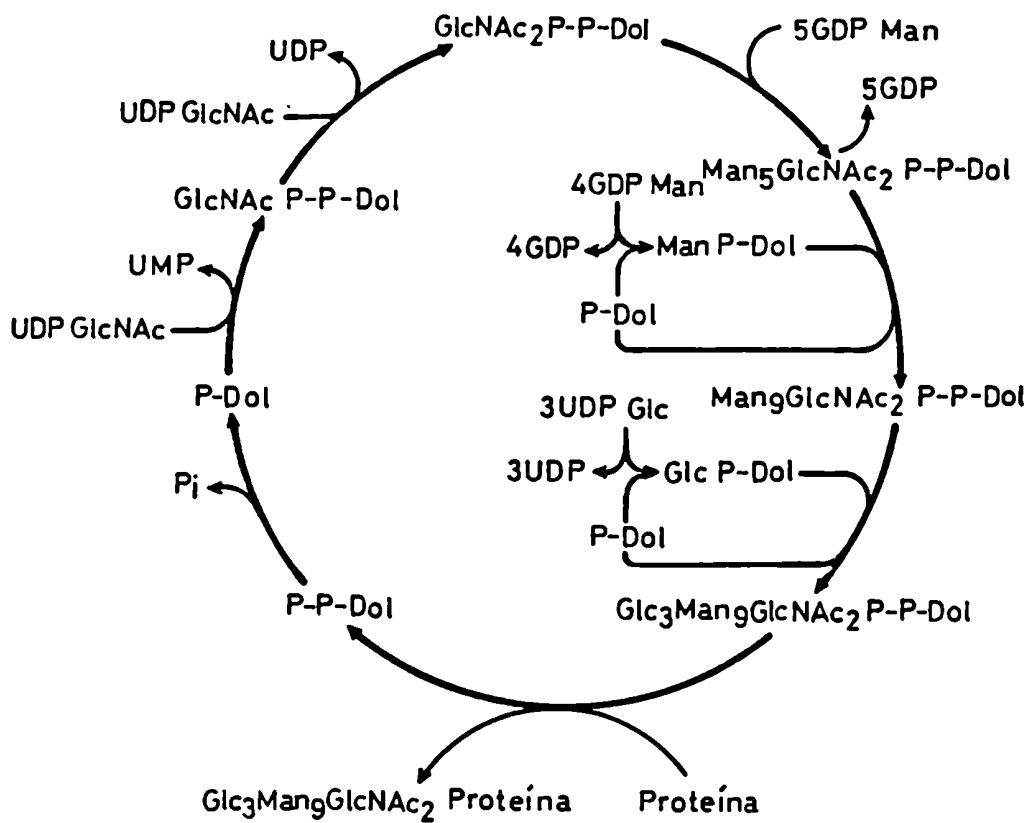


Fig. 3 El ciclo del dolicol.

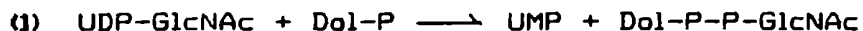
En Abreviaturas se encontrará el significado de las mismas.

regulación del ciclo del dolicol, por producir Dol-P y reintegrarlo al sistema de síntesis (Fig. 3).

Dol-P-P es portador de la unidad oligosacarídica que será transferida a asparagina en proteínas. Además el Dol-P es el dador de algunos restos de manosa y glucosa en la biosíntesis del oligosacárido. Estos lipido-oligosacáridos fueron descubiertos y caracterizados por Leloir y su grupo (Behrens y col 1971, Behrens y col 1973). Como el tamaño del dolicol es diferente con la especie, se pensó que era específico. Sin embargo en experimentos "in vitro" se demostró que la porción sacarídica y no la lipídica es la responsable de la especificidad de las reacciones de transferencia de azúcares.

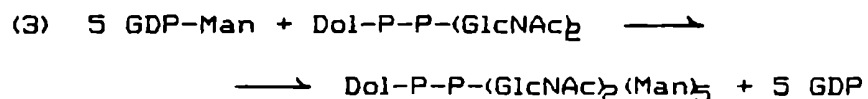
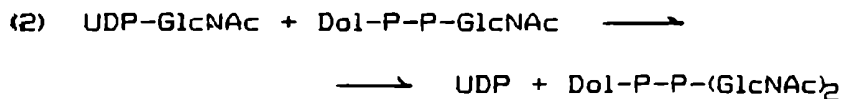
1.6. Ciclo del dolicol:

La síntesis de la unidad oligosacarídica sobre Dol-P-P comienza por la siguiente reacción de transferencia (seguir con la Fig. 3):



Esta reacción es inhibida por tunicamicina, un antibiótico muy usado en el estudio de la biosíntesis de glicoproteínas.

Sigue por la adición de otro residuo N-acetilglucosamina a partir del mismo dador, y de cinco manosas a partir de GDP-Man:



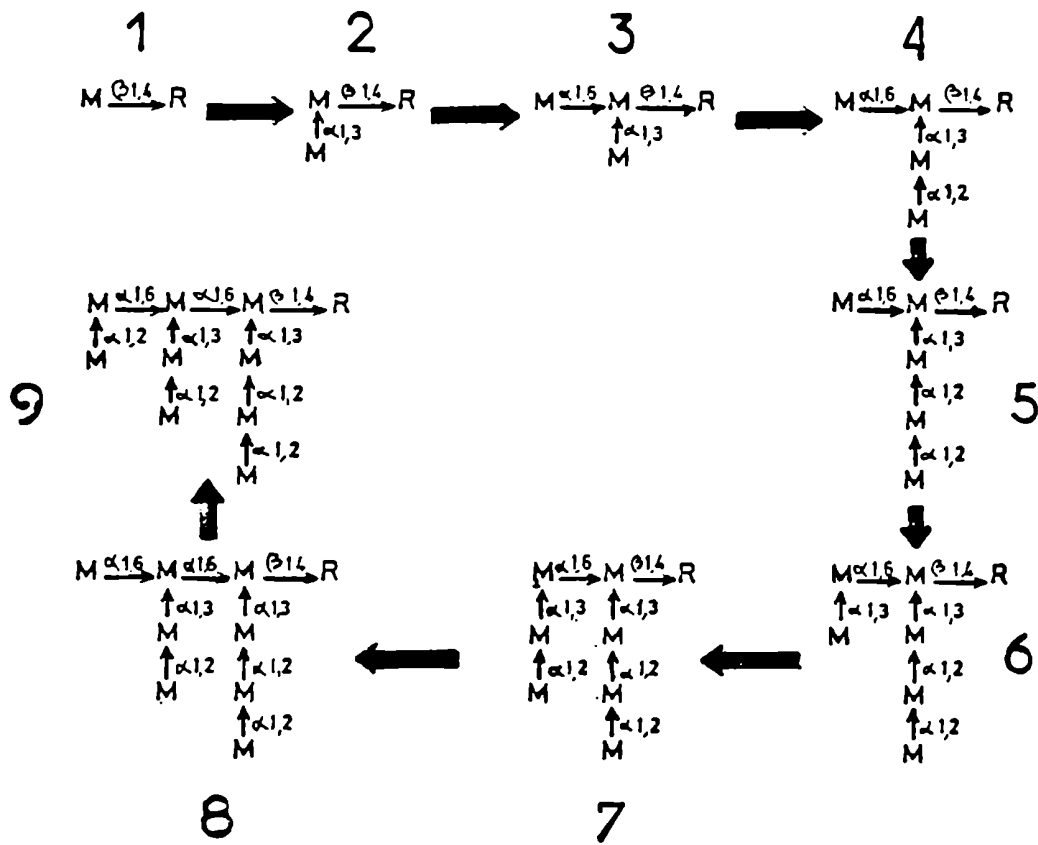
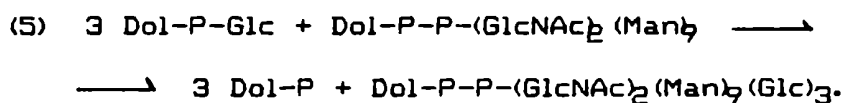
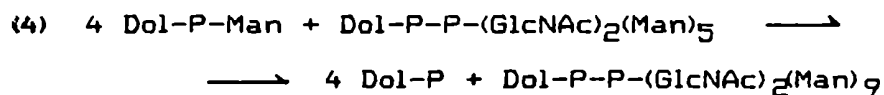


Fig. 4: Orden de adición de restos manosa en el ensamblaje de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$.

R: $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$, M: manosa.

Los residuos restantes se adicionan a partir de Dol-P-Man y Dol-P-Glc. Estos compuestos se sintetizan a partir de Dol-P y el nucleotido-azúcar correspondiente. Experimentos "in vitro" demostraron que ambas actividades sedimentan con la fracción microsomal en un homogenato de hígado de rata.



La adición de residuos es secuencial y ordenada. Debido a esto existe "in vivo" un solo isómero estructural del oligosacárido de cada composición. Por lo tanto, aunque en levadura se ha descrito síntesis "in vitro" de isómeros estructurales, la biosíntesis "in vivo" sigue un camino único.

El orden de adición de restos manosa se esquematiza en la Fig. 4 y en la Fig. 5 se observa la estructura de los intermediarios de la síntesis del oligosacárido sobre Dol-P-P en células ovario de hamster chino según Chapman y col 1979. La estructura del compuesto transferido a proteínas en todos los sistemas estudiados (células de mamífero, plantas, insectos, hongos y levaduras), es la recuadrada con línea punteada en la Fig. 5 y se esquematiza en la Fig. 6, donde el orden de adición de residuos se ha señalado según el alfabeto.

El oligosacárido completo es transferido al residuo asparagina de una proteína naciente o recién sintetizada, y

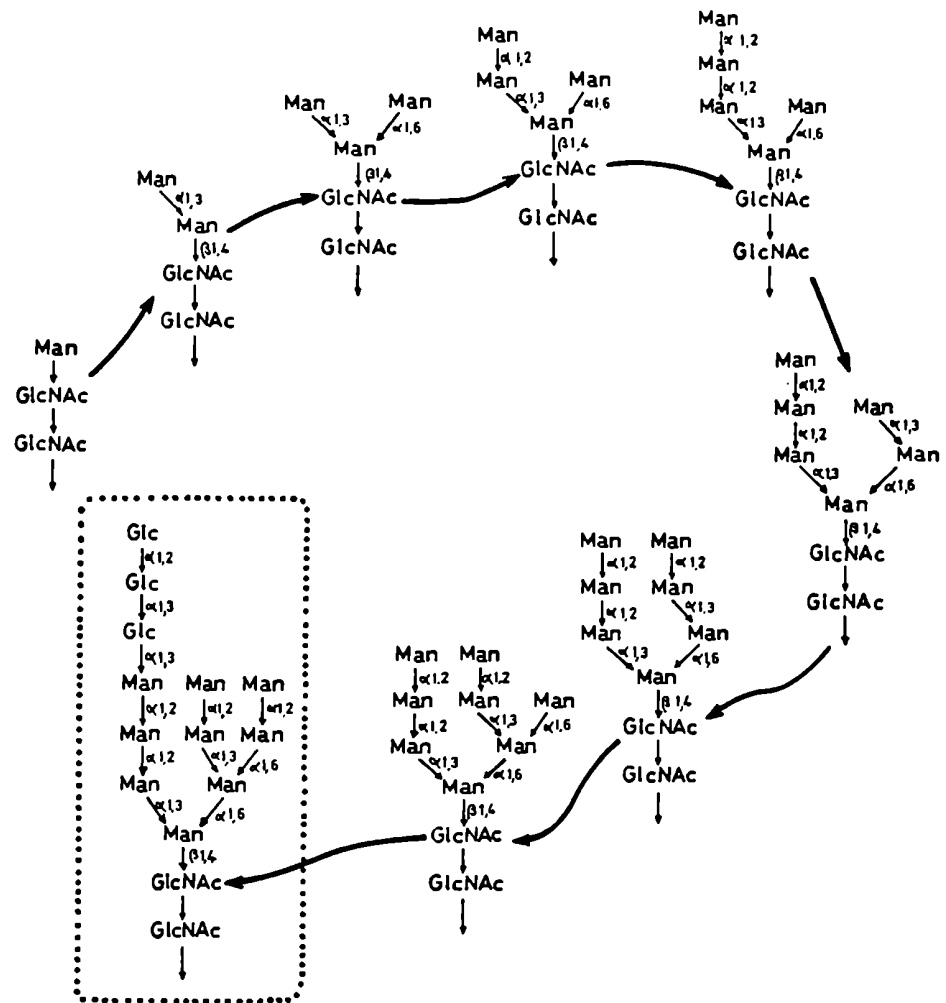


Fig. 5: Secuencia de ensamblado del oligosacárido unido a Dol-P-P, según estudios de Chapman y col (1979) sobre células CHO.

La estructura recuadrada con línea punteada corresponde al compuesto transferido a proteínas en eucariotes superiores.

En Abreviaturas se encontrará el significado de las mismas.

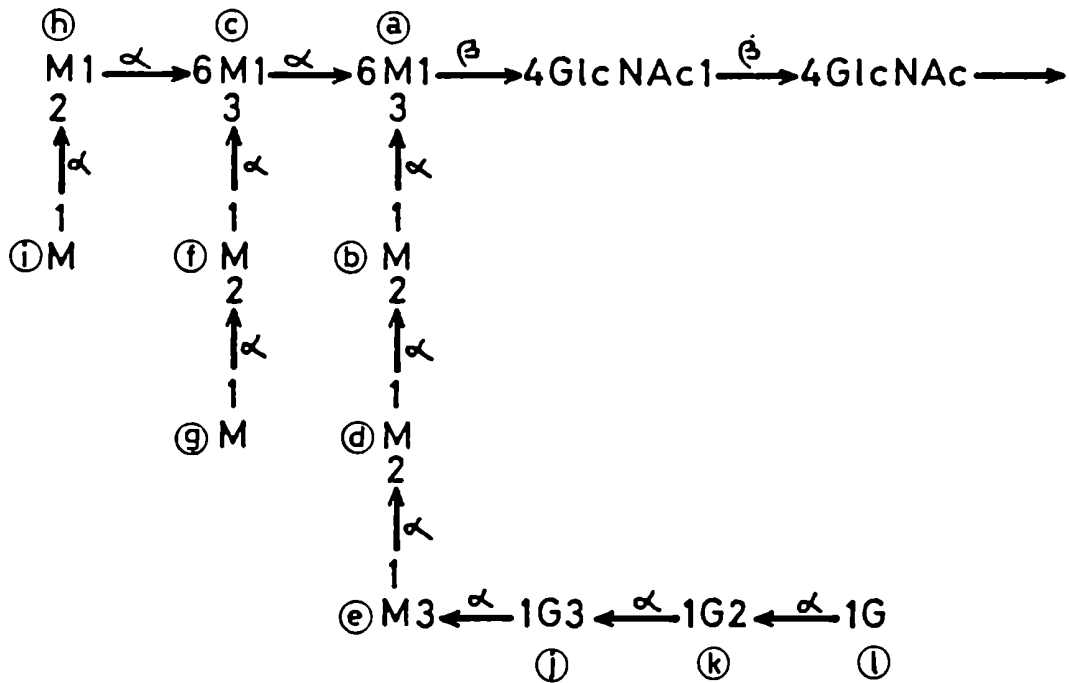


Fig. 6 Estructura de $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unido a Dol-P-P.

Las letras indican, en orden alfabético, la secuencia de adición de residuos de manosa y glucosa en el ensamblaje del oligosacárido en células de mamífero.
 G y M significan glucosa y manosa, respectivamente
 GlcNAc: N-acetil glucosamina.

el Dol-P-P es clivado a Dol-P por una fosfatasa específica, pudiendo así recomenzar el ciclo.

1.7. Topología del ensamblado:

Se ha demostrado que el ciclo del dolicol ocurre en membranas del RE. La síntesis de los nucleotido-azúcares ocurre en citosol mientras que la reacción de transferencia a proteína se lleva a cabo en el lumen del RER, donde se encuentra el oligosacárido completo unido a dolicol. Debe existir por lo tanto, un transporte de los nucleotidoazúcares dadores al lumen del RE.

Perez y Hirshberg 1985, demostraron que UDP-GlcNAc es translocado por membranas derivadas del retículo endoplásmico y el Aparato de Golgi. Este transporte está acoplado a la salida de UMP y se correlacionaría con la transferencia de la hexosa, en el lumen, a Dol-P. (Hannover y Lennarz 1978, 1982, demostraron, usando microsomas sellados de oviducto de gallina, que Dol-P-P-GlcNAc₂ se halla hacia el lumen de los mismos). Idénticas conclusiones se obtuvieron con vesículas de hígado de rata para la translocación de UDP-Glc. Sin embargo no ocurre lo mismo con GDP-Man ya que este no atraviesa las membranas del RE (Carey y col 1980). Snider y Rogers 1984, obtuvieron evidencia de que las especies Dol-P-P-GlcNAc₂Man₃₋₅ se encuentran hacia el lado citosólico del retículo mientras que Dol-P-P-GlcNAc₂Man₆₋₉ se hallan hacia el lado luminal del mismo. Estos datos sugieren que el Dol-P-Man dador debería sintetizarse sobre el lado citosólico y luego translocarse, mientras que Dol-P-Glc podría ser sintetizado

hacia el lado luminal del retículo. Con todas estas evidencias se propuso el modelo de la Fig 7 (Hirschberg y Snider 1987) según el cual, parte del oligosacárido se ensambla hacia el lumen del retículo y parte hacia el lado citosólico, y los sustratos translocan para dar lugar a las reacciones involucradas.

1.8. Casos anómalos de ciclo del dolicol:

Se han descrito una serie de mutantes en el ciclo del dolicol en levadura (Huffaker y Robbins 1983, Runge y col 1984), que sintetizan sobre Dol-P-P y transfieren a proteínas unidades no glucosiladas y con nueve o menos unidades de manosa. Estudiando el defecto metabólico responsable de esta característica se encontró que la ausencia de glucosa en estos oligosacáridos se debía a: a. ausencia de síntesis del Dol-P-Glc, el dador del resto glucosilo, ó b. ausencia de la actividad transferente de glucosas de Dol-P-Glc al Dol-P-P-oligosacárido. Las mutantes que presentaban cada una de estas fallas pudieron recuperar el fenotipo salvaje por recombinación. Por otra parte, la ausencia de ciertos restos manosa se debía a fallas en las manosiltransferasas correspondientes.

Células de linfoma mutantes Thy-1⁻, del grupo de complementación clase E carecen de Glc₃Man₄GlcNAc₂ y acumulan Man₅GlcNAc₂ y Glc₃Man₅GlcNAc₂, unidos a Dol-P-P (Townbridge y Hyman 1979). El defecto consiste en la ausencia de Dol-P-Man en estas células, probablemente por falta de actividad de la GDP-Man:Dol-P manosiltransferasa.

El protozoario ciliado Tetrahymena pyriformis,

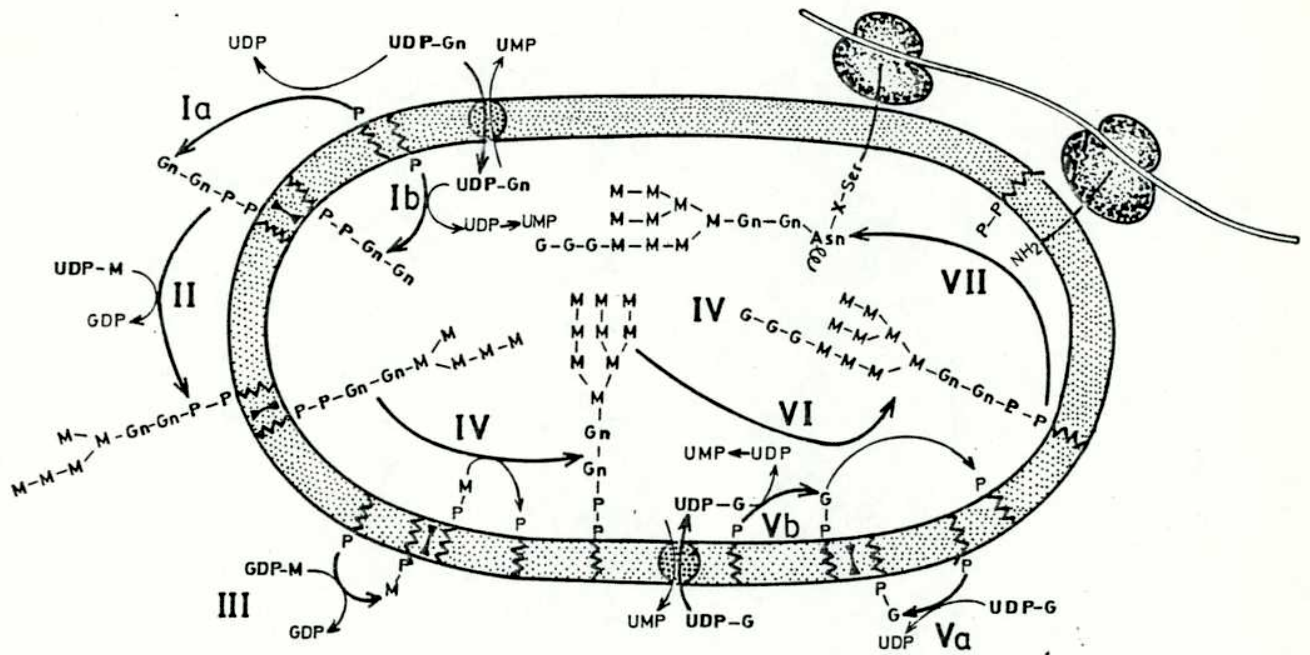


Fig. 7: Topología de la N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso (modelo de Hirschberg y Snider 1987)

P-P : Dol-P; P-P-P : Dol-P-P;
 >>>> : translocasa de dolicol derivados;
 M: manosa, G: glucosa, Gn: glucosamina.
 ⊙ : translocasa de nucleótidos.

sintetiza sobre Dol-P-P el oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, que es transferido a proteínas. (Esta estructura se describió en dos proteínas lisosomales secretadas por este protozoo, Taniguchi y col 1985). Yagodnik y col. 1987 estudiaron el defecto metabólico responsable de este fenotipo en T. pyriformis. Encontraron que, aunque estas células sintetizan Dol-P-Man, no existe en ellas ninguna de las actividades de manosiltransferasa dependientes de Dol-P-Man.

1.9. TRANSFERENCIA DEL OLIGOSACARIDO A PROTEINAS

La oligosacariltransferasa:

La transferencia del oligosacárido preformado sobre Dol-P-P al residuo asparagina de proteínas nacientes o recién sintetizadas en el RE ocurre por acción de la Dol-P-P-oligosacárido: péptido oligosacariltransferasa.

Esta enzima se localiza en membranas del RE. Tiene un pH óptimo cercano a la neutralidad; y en todos los casos requiere Mn^{2+} como cofactor. Nunca pudo ser purificada a homogeneidad porque pierde actividad rápidamente cuando se la solubiliza. Por lo tanto su actividad fué comúnmente medida en microsomas. La enzima parece poseer oligosacáridos tipo polimánosa ya que presenta afinidad por la lectina Concanavalina A. La porción oligosacarídica se encuentra del mismo lado que la actividad catalítica. Ensayos con membranas de oviducto de gallina (Welply y col 1983) y con S. cerevisiae (Lehle y Bause 1984) demostraron que la

reacción ocurre hacia el lumen del RE.

El grupo del Dr. Lennarz diseñó un reactivo de fotoafinidad que lleva la secuencia consenso de glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr ver ítem 1.12) y fué capaz de unirlo a una proteína de 60 kD presente en el RE. La porción de esta proteína de 60 kD que presenta afinidad por el sequón de glicosilación se encuentra hacia el lado luminal del retículo. La unión requiere Mn^{2+} y es desplazada competitivamente por un péptido con una secuencia equivalente. El monómero de 60 kD tiene un pI de 5.2 (Welply y col 1986). No se sabe si la enzima es monomérica o si se compone además de otros polipéptidos. La digestión de vesículas de RE de oviducto de gallina con tripsina inhibió un 70% la actividad de la enzima (Welply y col 1986) pero la asociación con el reactivo no se modificó luego del tratamiento.

1.10. Relación de la oligosacariltransferasa con la membrana:

La oligosacariltransferasa está fuertemente unida a la membrana lipídica ya que la actividad permanece en los microsomas aún luego de someterlos a sonicación o shock hipotónico o hipertónico. La enzima solo puede ser solubilizada por alcali o detergentes, ya que la actividad medida en las membranas disminuye y la cantidad de proteínas en el sobrenadante aumenta. En ningún caso se recuperó actividad en el sobrenadante (Welply y col 1986).

Varios autores comunicaron la solubilización de la enzima en condiciones controladas, usando Nonidet-P 40 y

solubilización en frío (Aubert y col 1982, Das y Heath 1980) aunque estos resultados no pudieron ser repetidos en otros laboratorios. Estudios mas detallados demostraron que los detergentes afectan la actividad de la enzima solubilizada en forma diferencial: en condiciones equivalentes, se encontró una cantidad significativamente mayor de actividad en la fracción solubilizada con deoxicolato que con Tritón X-100 o colato. Este efecto se agudiza por el aumento de fuerza iónica durante la solubilización. Esto llevó al autor (Ronin 1980) a proponer que la enzima está embebida en la membrana pero además está unida a otros componentes de los microsomas por interacciones electrostáticas. Estas interacciones serían importantes para la actividad.

1.11. Influencia de los lípidos de la membrana:

Mediciones sobre la enzima solubilizada demostraron que la actividad se pierde cuando se la separa de los lípidos solubilizados por filtración en columnas o se trata la muestra con fosfolipasa A. La actividad se recupera parcialmente por agregado de DMSO o fosfatidilcolina (Ronin 1980, Franc y Bouchilloux 1984). Resultados semejantes obtuvieron Chalifour y Spiro (1988) estudiando los requerimientos lipídicos de la enzima solubilizada. Solo fosfatidilcolina mantiene la actividad en el material soluble. Otros lípidos tienen un efecto mucho menor sobre la misma: derivados de la fosfatidilcolina con ácidos grasos de diferente largo y saturación, con menor número de grupos metilo en el amonio cuaternario de la colina; o aún la forma D- de la fosfatidilcolina, tuvieron un efecto marcadamente

menor sobre la manutención de la actividad de la enzima solubilizada.

1.12. Especificidad por la secuencia peptídica:

En todos los casos estudiados se observó que el oligosacárido está unido a un residuo asparagina que se encuentra en la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr. Estudiando la secuencia de aminoácidos de proteínas conocidas se encontró que solo un 30% de los sequones Asn-Xaa-Ser/Thr están glicosilados, dando lugar a la suposición de que otros requisitos son necesarios.

Lehle y Bause 1984, llevaron a cabo estudios de especificidad con membranas de levadura y una serie de péptidos sintéticos. Ellos encontraron que la asparagina es insustituible. Ni ácido aspártico ni glutámico fueron aceptores del oligosacárido unido a Dol-P-P. Además la sustitución de Thr o Ser por valina resultó en una no glicosilación del residuo asparagina. Leucina, glicina o alanina en posición Xaa no afectaron la glicosilación mientras que prolina la inhibió.

1.13. Mecanismo de reacción:

Experimentos con microsomas de hígado de rata (Bause y Legler 1981) y péptidos sintéticos demostraron que el hidroxiaminoácido (el tercer aminoácido hacia el extremo C-terminal de asparagina) mas eficiente en la transferencia es treonina. Cuando éste se reemplaza por serina, la V_{max} de la reacción es cuatro veces menor y en presencia de cisteína (no encontrada naturalmente en el sequon de Asn

glicosiladas) la eficiencia de glicosilación es aún dos a tres veces mas baja.

Esto sugirió a los autores que el hidroxiaminoácido tendría una función de "dador de puente hidrógeno". Una unión hidrógeno en la cadena lateral del hidroxiaminoácido con el resto amido de la asparagina aumentaría la hidrofiliidad del par electrónico de la amida resultando en una reactividad mayor frente al dador glicosídico. En base a esto se diseñó un modelo de reacción que se muestra en la Fig 8 (Bause 1984, Bause y Legler 1981).

A partir de estudios conformacionales con modelos tridimensionales, estos autores propusieron además, que una conformación de vuelta beta (" β turns") sería la que expondría adecuadamente el sequon de Asn a la oligosacariltransferasa (Bause y col 1982). Este modelo requiere que la molécula sea flexible.

Ensayos con péptidos cíclicos. y sus análogos lineales, o con péptidos que contienen prolina o cisteina en diferentes posiciones, demostraron que la reacción es mas eficiente cuanto mas flexible es el péptido portador del sequón de Asn, dando apoyo a esta teoría (Bause 1983).

1.14. Especificidad de la oligosacariltransferasa por el oligosacárido unido a dolicol-P-P:

Spiro y col, 1979, estudiando la transferencia de oligosacáridos en microsomas de tiroides, encontraron que sometiendo al Dol-P-P-oligosacárido a digestión con una glucosidasa de tiroides se inhibe significativamente la transferencia a proteínas, mientras que el tratamiento del

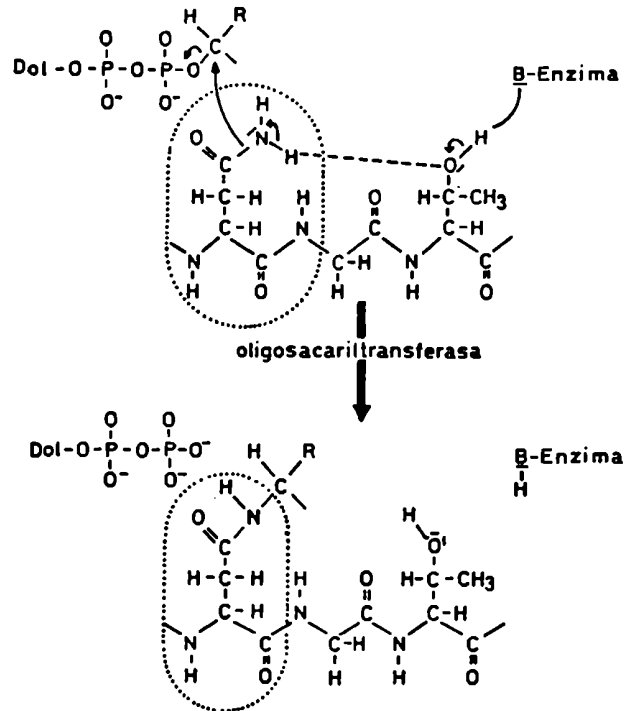


Fig. 8 Modelo para un mecanismo de reacción de la oligosacariltransferasa (Bause 1984, Bause y Legler 1981).

El grupo β amido de la cadena lateral de asparagina (entre puntos) funcionaría como un nucleófilo y, en presencia de la enzima que actuaría sobre el hidroxiaminoácido, se llevaría a cabo la reacción.
R: oligosacárido.

lipido-oligosacárido con una α -manosidasa no la afecta.

Esto sugirió que son necesarios los restos glucosa en el oligosacárido para la transferencia a proteínas. Posteriores estudios confirmaron estos resultados: privando de glucosa o fuente de energía a cortes de tiroides, Spiro y col (1983) encontraron una inhibición de la glicosilación de proteínas. Concomitantemente observaron una desaparición de la especie $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y una acumulación de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a Dol-P-P . Por otra parte ayunando de glucosa células CHO en cultivo se detectó transferencia a proteínas de $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Rearick y col 1981).

La ausencia de ún solo residuo de glucosa (el mas externo) en el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ disminuye drásticamente la velocidad de transferencia de Dol-P-P a proteínas en hígado de rata (Staneloni y col 1980), mientras que, en fibroblastos Nil 8, oligosacáridos conteniendo glucosas son transferidos ocho veces mas rápido que oligosacáridos sin restos glucosa (Turco y col. 1977)

Cuando se estudió con detalle la velocidad de transferencia a proteínas se encontraron resultados interesantes: microsomas de levadura transfieren especies glucosiladas ($\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$) 25 veces mas rápido que no glucosiladas ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$), (Trimble y col 1980);, mas aún, en levadura, la enzima solubilizada es capaz de transferir unidades todavía menores: $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$ y GlcNAc_2 (Sharma y col 1981). El valor de K_m presentado por la enzima para cada sustrato oligosacurídico no difiere significativamente, pero cada sustrato modifica en forma significativa el K_m por el

péptido (en presencia de $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ la enzima tiene diez veces mas afinidad por el péptido aceptor que cuando está en presencia de $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$).

Ballou y col (1986) estudiando mutantes de S. cerevisiae, encontraron que, mutantes incapaces de sintetizar Dol-P-Glc transfieren a asparagina en proteínas el oligosacárido $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. En estos casos se describió una severa hipoglicosilación de la invertasa, enzima secretada por éstas células, demostrando que la incapacidad de glucosilar al precursor lipídico reduce la eficiencia de glicosilación de las proteínas.

Estos y otros resultados similares llevaron a concluir que los tres residuos de glucosa son esenciales para efectuar la transferencia del oligosacárido a proteínas en forma eficiente, mientras que el número de manosas no tiene efecto sobre la misma.

1.15. Biología molecular de la oligosacariltransferasa:

Kaplan y col. 1988, marcando microsomas de oviducto de gallina con un reactivo de fotoafinidad con la secuencia consenso de la glicosilación, encontraron una proteína de 57 kD, capaz de ser glicosilada por los microsomas y deglicosilada por acción de la enzima Endo-H. Ellos consideraron esa proteína una parte de la oligosacariltransferasa y produjeron un anticuerpo contra ella que fué capaz de precipitar una proteína de 57 kD en oviducto de gallina. Con este anticuerpo Geetha-Habbib y col

1988, encontraron un gen en una librería de expresión de cDNA obtenido a partir de mensajeros del mismo tejido y lo secuenciaron. La secuencia obtenida tiene alta homología con proteínas residentes de retículo endoplásmico, de ese mismo peso molecular. Dado que se pierde actividad al unirse el reactivo de fotoafinidad, no hay pruebas de que la unidad de 57 kD sea un componente de la oligosacariltransferasa.

1.16. PROCESAMIENTO DE OLIGOSACARIDOS UNIDOS A ASPARAGINA:

Se llama procesamiento a todas las modificaciones que sufren los oligosacáridos una vez transferidos a proteínas, que los llevarán a su estructura final.

Ocurre a lo largo del camino secretorio, en el lumen de las membranas del RE y del Aparato de Golgi. Griffiths y col 1983, Quinn y col 1983, mostraron que existe una compartimentalización fisiológica del Aparato de Golgi, y llamaron a las cisternas más cercanas al RE "cis" Golgi, a las más alejadas "trans" Golgi y a las intermedias "medio" Golgi (Fig. 9). Estos autores describieron además que el transporte de glicoproteínas es vectorial en el sentido RE → "cis" Golgi → Golgi "medio" → "trans" Golgi → membrana plasmática ó exterior celular. Otros investigadores individualizaron estos compartimientos por técnicas histoquímicas y determinaron que las enzimas procesadoras tienen una distribución precisa en las cisternas del Golgi, que concuerda con la secuencia del procesamiento (Fig. 9).

El primer paso es la separación del residuo glucosa

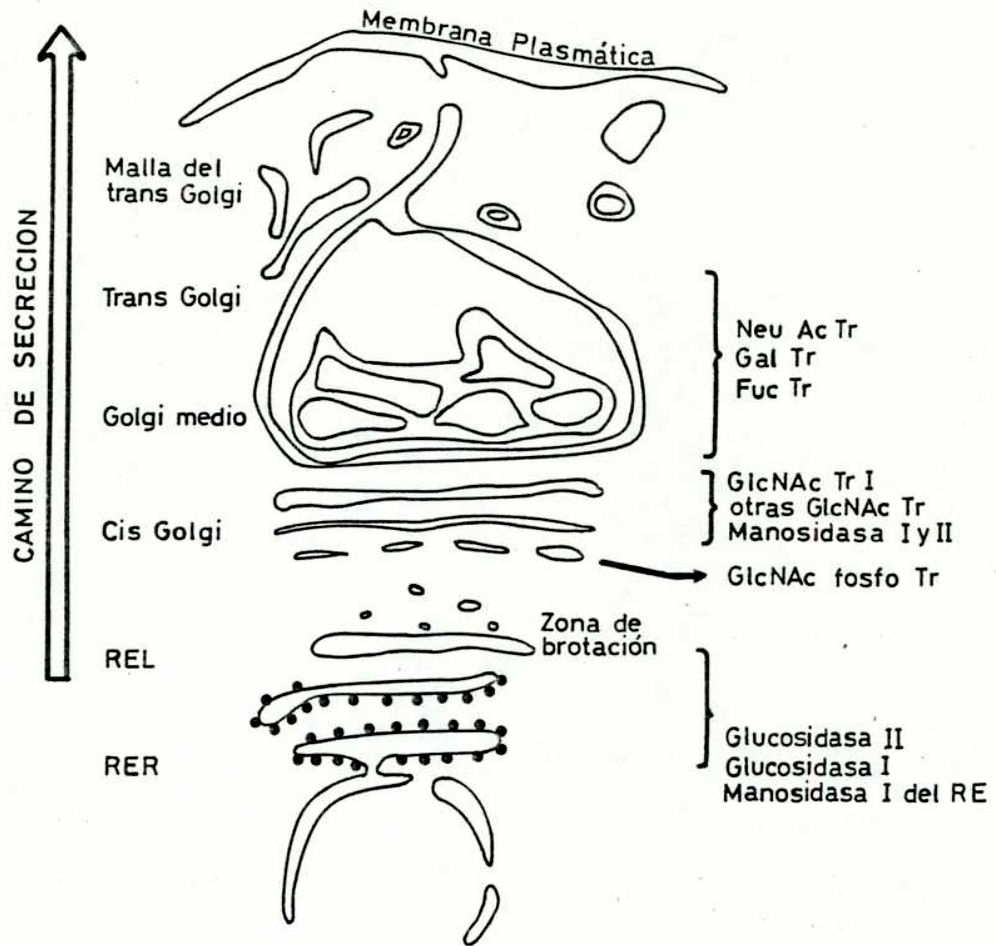


Fig. 9: Esquema del camino secretorio y de la localización subcelular de las enzimas del procesamiento.

Clave: Tr: transferasa, NeuAc: ácido siálico, Gal: galactosa, Fuc: fucosa, ER: retículo endoplásmico, GlicNAc: N-acetilglucosamina, el resto en abreviaturas.

del extremo no reductor (seguir con la Fig 6 para mayor claridad) por acción de la glucosidasa I, de acción específica sobre uniones α 1-2. El producto de esta reacción es sustrato de la glucosidasa II, que es capaz de clivar uniones α 1-3 eliminando los residuos de glucosa restantes (Grinna y Robbins 1979). Ambas enzimas se encuentran en el RE, donde ocurren estas reacciones. Allí también ocurre la remoción del primer residuo de manosa, por acción de una α 1-2 manosidasa. Existen probablemente otras actividades α 1-2 manosidasa en el RE que serían las responsables del clivaje de otras manosas unidas en α 1-2 de glicoproteínas residentes del RE, cuyos oligosacáridos tienen la composición $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$. En el caso de glicoproteínas que migran a través del camino secretorio, la remoción de esos residuos es efectuada por una α 1-2 manosidasa I del Aparato de Golgi (Bischoff y Kornfeld 1983, Opheim y Touster 1978) que dará lugar a un oligosacárido de composición $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$.

La remoción de residuos manosa no sigue un camino único, pudiéndose encontrar "in vivo", isómeros estructurales de los oligosacáridos de igual composición en glicoproteínas maduras (Fig. 10). El procesamiento descrito hasta aquí da lugar a oligosacáridos de tipo polimánosa. De aquí en adelante las glicoproteínas pueden ser procesadas hasta oligosacáridos tipo híbrido o tipo complejo, o bien los oligosacáridos tipo polimánosa ser sustituidos de diferentes formas. Un esquema parcial de lo encontrado hasta el momento se observa en la Fig. 11.

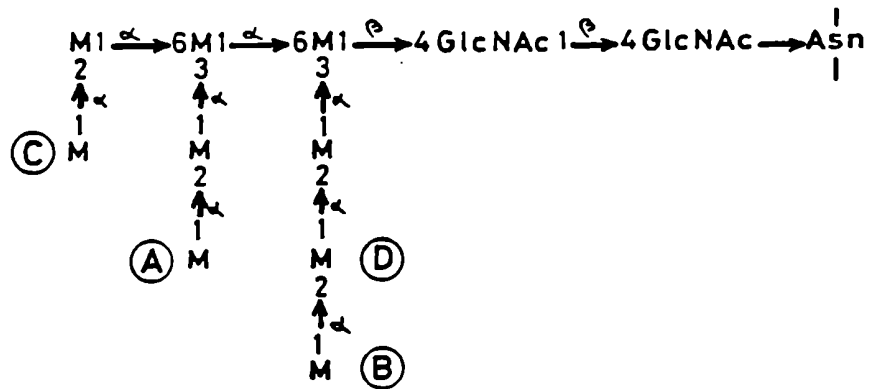


Fig. 10: Orden de remoción de restos manosa del oligosacárido $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína

Las letras indican, según el orden alfabético, la secuencia más abundante de remoción de restos de manosa en células de mamífero. Con menor frecuencia el orden puede ser: B, C, D, y A, dando isómeros estructurales de cada composición.

El oligosacárido $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ no puede sufrir mayor procesamiento si no se le adiciona un resto N-acetilglucosamina en la manosa b (Fig. 6). Esta reacción ocurre en la porción "cis" del aparato de Golgi y está catalizada por la N-acetilglucosaminiltransferasa I (Tabas y Kornfeld 1978, Harpaz y Schachter 1980).

El oligosacárido resultante es sustrato de la manosidasa II del Aparato de Golgi, capaz de hidrolizar uniones α 1-3 y α 1-6, dando como producto el oligosacárido $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$

Posterior adición de residuos N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico, en ese orden, da lugar a oligosacáridos tipo complejo. Las enzimas involucradas en estas reacciones se encuentran a lo largo del camino de secreción, en las cisternas medias y trans del Aparato de Golgi (Fig. 9).

El grado de procesamiento sufrido por una glicoproteína en particular depende en primer lugar de la localización subcelular de la misma. Como ya se mencionó, proteínas residentes del RE poseen oligosacáridos tipo polimanosa. Las que migran a través del Aparato de Golgi sufrirán la acción de las enzimas procesadoras con las que se encuentren. Aparentemente los oligosacáridos mas expuestos al exterior de la molécula glicoproteica son los procesados a tipo complejo.

Otro control importante del procesamiento está dado por la estructura proteica, como se observó en la cadena liviana de la inmunoglobulina sintetizada por células MOPC-

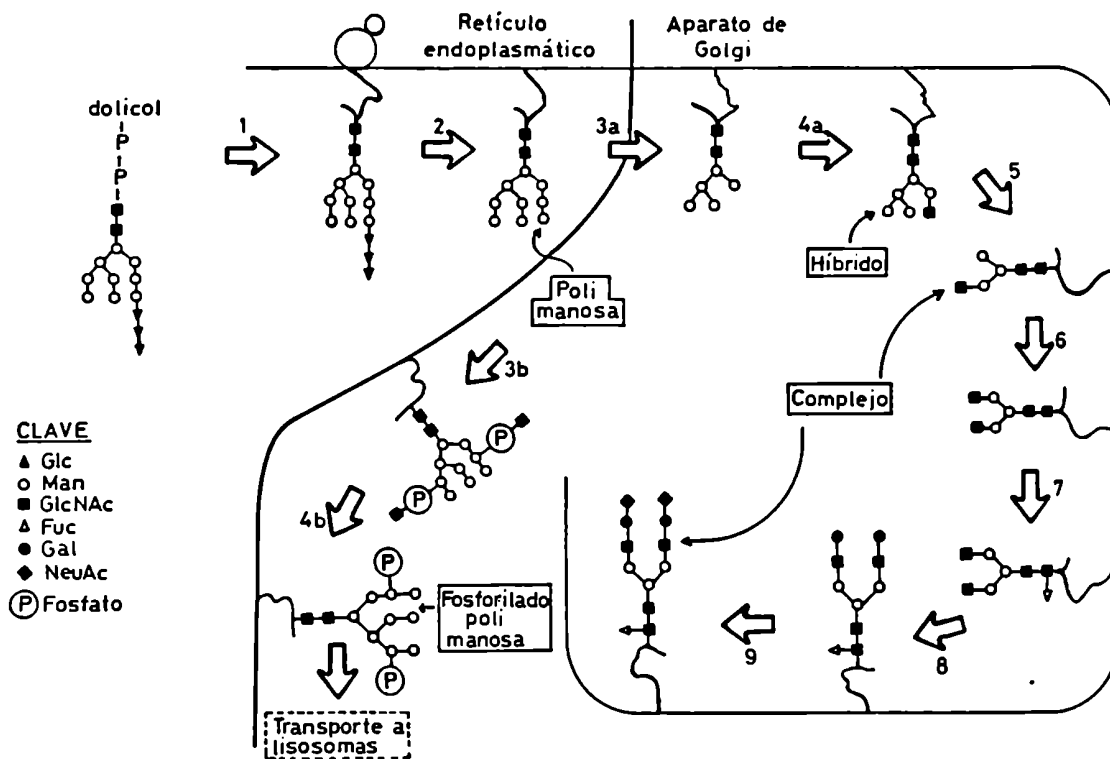


Fig. 11: Esquema del procesamiento en glicoproteínas.

Se esquematizan aquí los caminos metabólicos que llevan a estructuras tipo complejo, tipo híbrido y tipo polimanosa.

Se han descrito otras modificaciones sufridas por oligosacáridos tipo polimanosa (item 1.17 del texto) no presentes aquí. Existe, además, una variedad de estructuras tipo complejo y tipo híbrido, cuya biosíntesis no se ha incluido en el esquema.

46B (Green 1982) y en glicoproteínas del virus Sindbis (Hsieh y col 1983).

1.17. Modificaciones que sufren los oligosacáridos tipo polimánosa unidos a proteína:

A) Un caso muy conocido es la formación de una señal de transporte en las enzimas lisosomales descrita en células de mamífero (Kornfeld y Kornfeld 1985). Esta señal se genera por acción secuencial de dos enzimas situadas en el aparato de Golgi: la N-acetilglucosaminilfosfato-transferasa y una N-acetilglucosaminidasa, que en conjunto generan un resto "manosa-6-P" en el oligosacárido polimánosa. Este conforma una señal que es reconocida por un receptor específico. El receptor se une a la glicoproteína y la transporta hasta el lisosoma. La descarga en el interior del mismo se produce debido al pH ácido de esta organela y el receptor es reciclado al aparato de Golgi.

B) En Dictyostelium discoideum las enzimas lisosomales presentan una sustitución metilfosfato sobre manosas del oligosacárido. Otra sustitución encontrada en las mismas glicoproteínas son restos sulfato en manosas y N-acetilglucosaminas (Kornfeld y Kornfeld 1985).

C) En Saccharomyces cerevisiae, la biosíntesis de un manano constituyente de la pared comienza por la transferencia del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ a proteína. Por acción de las glucosidasas I y II, y una manosidasa de RE se obtiene $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que es elongado por adición de

A
enlace N-glicosidico

B
enlace O-glicosidico

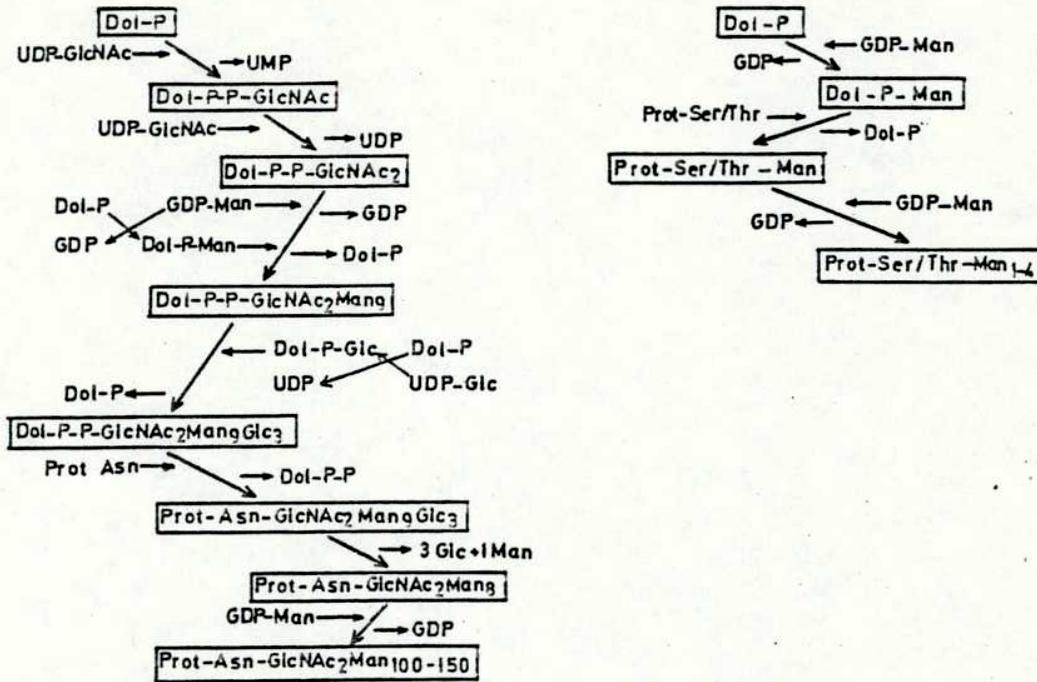


Fig. 12: N-glicosilación y O-glicosilación de proteínas, y procesamiento de glicoproteínas en *Saccharomyces cerevisiae*.

En la sección Abreviaturas se encuentra la clave de las mismas.

un alto número de residuos manosa a partir de GDP-Man (Parodi 1979) (Fig 12 A).

D) El hongo Mucor rouxii tiene en su ciclo de vida una fase de levadura y una fase micelar, por lo que se lo clasifica como dimórfico. Lederkremer y Parodi 1984, encontraron diferencias en el procesamiento de oligosacáridos tipo polimánosa relacionadas con el dimorfismo. En ambos casos el oligosacárido transferido a proteínas es el mismo: $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ y el procesamiento lleva al compuesto a siete manosas y dos N-acetilglucosaminas ($\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$). Este oligosacárido es luego elongado con restos de manosa, posiblemente transferidos a partir de GDP-Man. En la forma micelar, mucho más frecuentemente que en la de levadura, restos metilo son adicionados a restos manosa en posición 3. Los restos metilmanosa generados no pueden ser sustituidos por más unidades de manosa, dando como resultado manoproteínas mas pequeñas (Fig. 13), en la forma micelar.

E) Otra modificación encontrada en mamíferos, insectos, protozoarios y plantas (Parodi y col 1983a, 1983b, 1984a, 1984b, Parodi y Cazzulo 1982) es la glucosilación transitoria de oligosacáridos tipo polimánosa parcialmente procesados.

Oligosacáridos unidos a proteína, de composición $\text{Man}_9\text{-}_5\text{GlcNAc}_2$ son sustituidos transitoriamente con un residuo glucosa (Fig. 14). Este glucosilo es transferido a partir de UDP-Glc a un extremo no reductor presente originalmente en el oligosacárido sintetizado sobre Dol-P-P.

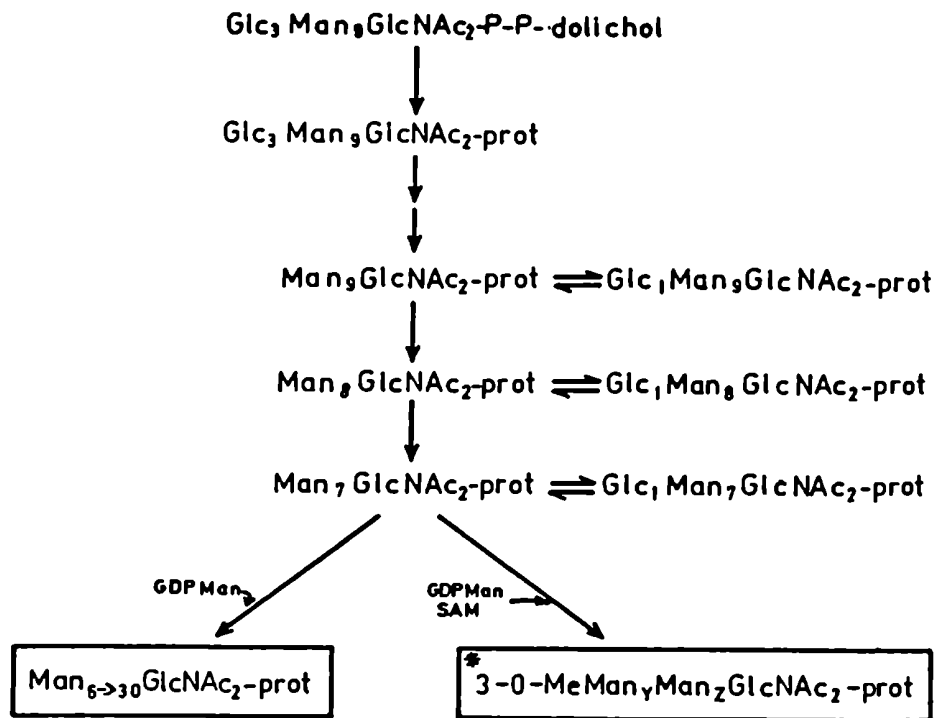


Fig. 13: Transferencia y procesamiento de oligosacáridos con unión N-glicosídica a proteína en *Mucor rouxii* (Lederkremer 1985)

Clave: SAM: S-adenosil metionina, otros: como en Abreviaturas. * : especie mas abundante en la forma micelar.

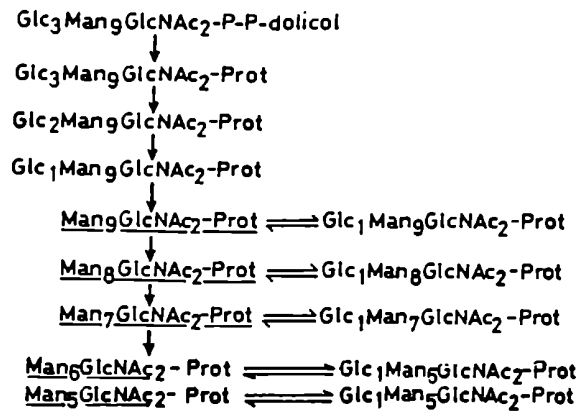


Fig. 14: Glucosilación transitoria de oligosacáridos en glicoproteínas

Los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Mang}_8\text{GlcNAc}_2$ han sido descritos exclusivamente en organismos de la familia Trypanosomatidae (Fig. 18), mientras que los oligosacáridos mayores se encontraron en hongos (Fig. 12), mamíferos, plantas y tripanosomátidos.

Los oligosacáridos subrayados son aquellos presentes en glicoproteínas maduras.

Se ha caracterizado la actividad de glucosiltransferasa "in vitro": se ha obtenido glucosilación de tiroglobulina desnaturalizada a partir UDP-Glc y microsomas de hígado de rata, del hongo Mucor rouxii, de plántulas de poroto y de protozoarios. La glucosilación fue máxima cuando se utilizaron membranas de RER ó REL, y mínima con membranas de aparato de Golgi (Trombetta y col 1989).

No se sabe cual es la función de la glucosilación transitoria pero se sospecha que está involucrada en la regulación del transporte de glicoproteínas del RE al Aparato de Golgi .

1.18. LOS TRIPANOSOMATIDOS:

La ubicación taxonómica de estos organismos se presenta a continuación:

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Los tripanosomátidos son protozoarios monoflagelados parásitos que pertenecen al orden Kinetoplástida por poseer una organela llamada kinetoplasto. El kinetoplasto es una organela ubicada en la base del flagelo, asociada a la mitocondria que contiene abundante DNA.

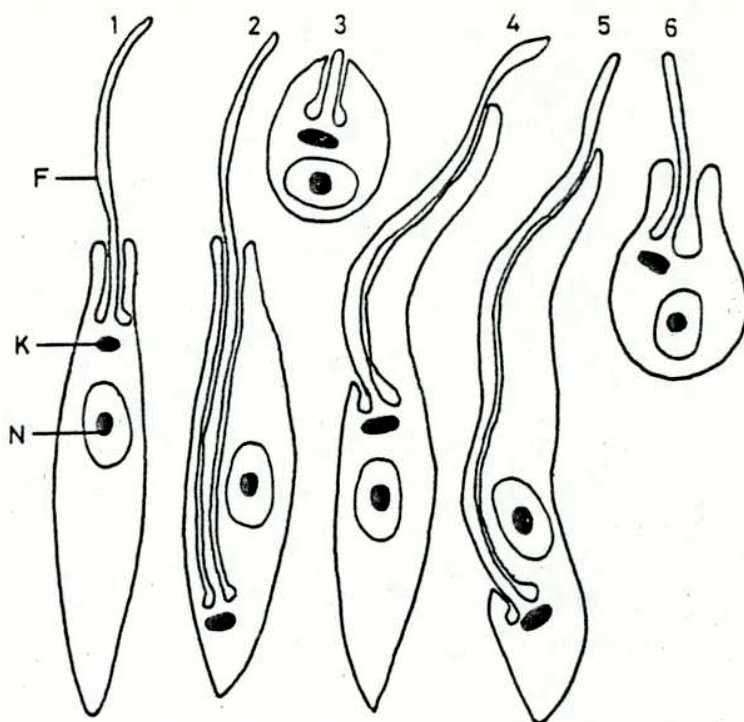


Fig. 15 Morfologías descritas en organismos de la familia Trypanosomatidae.

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

Organismos de esta familia presentan originalidades biológicas respecto a otros procariotes, que los ha hecho objeto de muchos estudios aunque el principal énfasis se debe a que son patógenos para el hombre. Según el ciclo de vida se los ha agrupado en inferiores (o monogenéticos) y superiores (o digenéticos). Es característica la variación morfológica que sufren a lo largo del mismo.

Tripanosomátidos monogenéticos son los que tienen un sólo hospedador. A este grupo pertenecen los géneros **Leptomonas**, **Crithidia**, **Blastocrithidia**, **Herpetomonas** y **Rynchoidomonas**, todos los cuales han sido aislados de insectos (Wallace 1976). Tripanosomátidos digenéticos son los que tienen un ciclo de vida que alterna entre hospedadores diferentes, por ejemplo insectos y mamíferos. A este grupo pertenecen los géneros **Trypanosoma**, **Endotrypanum**, **Leishmania** y **Phytomonas**. Las especies, en tripanosomátidos, se clasifican según el hospedador y la morfología (largo y posición del flagelo, posición del kinetoplasto respecto del núcleo y el cuerpo basal del flagelo, forma del cuerpo al microscopio). Las distintas morfologías descritas se esquematizan en la Fig. 15.

Se ha descrito un ciclo de vida muy sencillo en algunas especies monogenéticas (Wallace 1976) : el parásito se adhiere por el extremo del flagelo al tejido del hospedador y allí adopta la morfología que lo caracteriza. Luego se desprende se redondea y se multiplica para volver a adherirse a los tejidos del hospedador. El pasaje a otros organismos (infección) se realiza por contaminación directa.

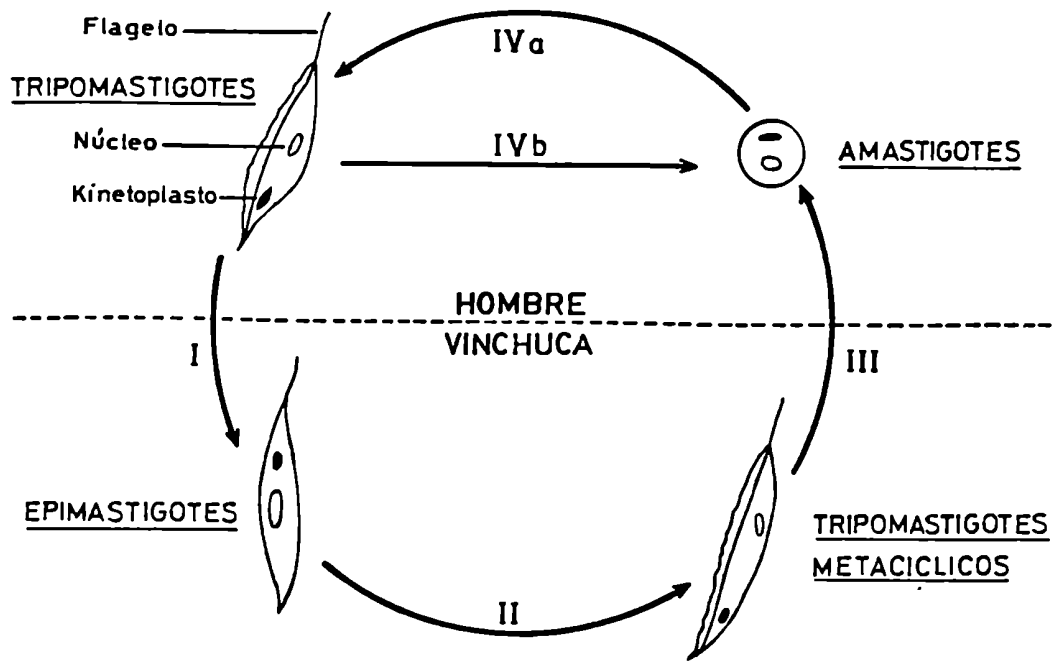


Fig. 16: Ciclo de vida doméstico de *Trypanosoma cruzi*

Como ejemplo de especie digenética, el ciclo de vida del T. cruzi se esquematiza en la Fig. 16. La forma epimastigote de T. cruzi se multiplica en el intestino del insecto vector (Triatoma infestans, vulg. vinchuca) donde se diferencia a tripomastigote (forma infectiva, no replicativa), que es eliminado con las heces del insecto. El tripomastigote penetra al huésped vertebrado a través de mucosas o lesiones cutáneas, y por la circulación del mismo llega a las células. Dentro de ellas se diferencia a la forma amastigote, replicativa. Luego de varias divisiones, los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes que se liberan por lisis celular y son capaces de reinfectar nuevas células o al insecto vector, cuando éste se alimenta de sangre del vertebrado (el vector elimina las heces al mismo tiempo que se alimenta del vertebrado). En el intestino del insecto los tripomastigotes se diferencian nuevamente a epimastigotes, cerrando así el ciclo.

Se ha descrito una gran variedad de vertebrados que pueden ser huéspedes de tripanosomátidos. En el hombre T. cruzi causa lesiones cardíacas e intestinales severas, y puede ser fatal. Organismos del género Leishmania (L. braziliensis, L. tropica, L. donovani, etc.) infectan macrófagos de la piel, mucosas, bazo e hígado produciendo desde lesiones cutáneas leves, hasta graves ulceraciones de piel y mucosas, deformidades permanentes, o lesiones que pueden llevar a la muerte.

1.19. GLICOSILACION DE PROTEINAS EN TRIPANOSOMATIDOS:

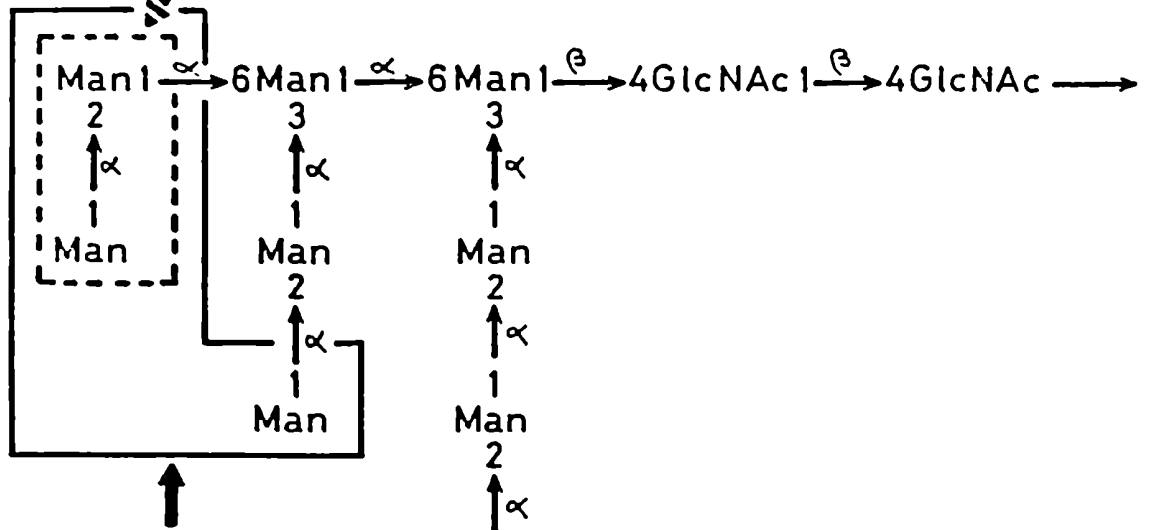
Se ha demostrado que, glicoproteínas de tripanosomátidos tienen un rol en la infección, diferenciación, e inmunidad contra la infección, en vertebrados.

Los tripanosomas africanos (T. brucei, T. evansii, etc) están recubiertos por una envoltura compuesta de una única glicoproteína, que está anclada en la membrana por un glicofosfolípido (Fergusson y Williams 1988). Esta envoltura puede liberarse rápidamente por acción de una fosfolipasa específica del parásito y ser sustituida por otra, con diferente secuencia peptídica. El recambio de la envoltura se ha llamado variación antigénica por ser el mecanismo con el que el parásito evade la respuesta inmune del huésped.

Varias glicoproteínas han sido aisladas de la superficie de células de T. cruzi (Snary y Hudson 1979, Andrews y col 1984), y se ha demostrado la existencia de glicoproteínas específicas para distintos estadios (Nogueira y col 1982, Katzin y Colli 1983). El bloqueo específico por anticuerpos monoclonales sintetizados contra una glicoproteína de superficie de epimastigotes de T. cruzi inhibe la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes "in vitro" (Sher y Snary 1982).

También se demostró que glicoproteínas de superficie de tripomastigotes están involucradas en la penetración a células en cultivo (Katzin y Colli 1983, Andrews y col 1984).

Ausente del oligosacarido
 en: C.fasciculata, C.harmosa
Trypanosoma cruzi y Lenriettii.



Ausente del oligosacarido
 en: B.culicis, L.mexicana
 y L.adleri.

Fig. 17: Estructuras de los oligosacáridos mayoritarios unidos a Dol-P-P en varios tripanosomátidos.

La estructura completa de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ corresponde a los compuestos encontrados en T. cruzi (epimastigotes en cultivo axénico y amastigotes intracelulares), T. dionisii, T. conorhini, H. muscarum, H. samuelpessoai y L. samueli. Los recuadros indican residuos de manosa ausentes en otros tripanosomátidos.

Algunas evidencias de afinidad a lectinas sugieren que los oligosacáridos involucrados estarían unidos a asparagina en la proteína.

En 1981 en el laboratorio del Dr Parodi (IIB, FC) se inició el estudio de la N-glicosilación de proteínas en protozoarios parásitos. Parodi y col 1981, encontraron que Crithidia fasciculata sintetiza sobre dolicol difosfato y transfiere a proteínas un oligosacárido con siete unidades de manosa y dos de N-acetilglucosamina. Fué la primera vez que se describía la transferencia "in vivo" de un oligosacárido no glucosilado a proteínas en eucariotes no mutantes.

Estudios subsiguientes sobre otros tripanosomátidos revelaron que todos ellos sintetizan sobre Dol-P-P oligosacáridos no glucosilados, pero con diferente número de restos manosa, según la especie (Fig. 17). En todos los casos, el oligosacárido mayoritario entre los que se encuentran unidos al Dol-P-P era el que se encontraba unido a proteínas a tiempos cortos. El estudio estructural de los oligosacáridos mayoritarios en distintas especies demostró que éstos son idénticos a los de los intermediarios en el ciclo del dolicol descrito en otros eucariotes (Chapman y col 1979) con el mismo número de unidades (Fig 17).

Se estudió además la presencia de derivados de Dol-P en estos organismos. Todos los tripanosomátidos estudiados resultaron ser deficientes en la formación de Dol-P-Glc, el dador de los restos de glucosa en la síntesis

de $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ en otros eucariotes.

Todas las especies estudiadas sintetizan Dol-P-Man. De la Canal y Parodi 1987, estudiaron los dadores de manosa del ciclo del dolicol en *C. fasciculata* y encontraron que, al igual que en eucariotes superiores, los primeros cinco residuos (a-e en la Fig 6) se transfieren a partir de GDP-Man, mientras que los cuatro últimos (f-i) a partir de Dol-P-Man.

Por lo tanto células con capacidad de sintetizar un oligosacárido con menos de nueve restos manosilo debería tener fallada la manosiltransferasa correspondiente. Esto fué estudiado por los mismos autores (De la Canal y Parodi 1987), mediante experimentos "in vitro" usando membranas de tripanosomátidos, Dol-P-Man e intermediarios del ciclo del dolicol de pequeño tamaño. Ellos encontraron que, en todos los casos estudiados estaba ausente, no solo la actividad responsable de la transferencia del residuo faltante, sino también la de los siguientes residuos. Es decir que, por ejemplo, los tripanosomátidos que sintetizan $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ como derivado de mayor tamaño unido a Dol-P-P resultaron ser deficientes no sólo en la manosiltransferasa responsable de la adición del séptimo residuo de manosa (resultado que por sí solo explicaría el fenotipo observado, ya que siendo la síntesis ordenada, la ausencia del séptimo residuo impide la adición del octavo y noveno), sino también en las enzimas involucradas en la transferencia de los residuos octavo y noveno. Estos experimentos indicaron la existencia de por lo menos tres Dol-P-Man: Dol-P-P-oligosacárido

PARASITO	X ₁₁ -P-P-Dol
<u>Trypanosoma cruzi</u>	
epimastigotes	Man ₇ GlcNAc ₂
tripomastigotes	Man ₇ GlcNAc ₂ y Man ₇ GlcNAc ₂
amastigotes intracelulares	Man ₇ GlcNAc ₂
amastigotes en cultivo	Man ₇ GlcNAc ₂
axénico	y Man ₇ GlcNAc ₂
<u>Trypanosoma conorhini</u>	Man ₉ GlcNAc ₂
<u>Trypanosoma dionisii</u>	Man ₉ GlcNAc ₂
<u>Herpetomonas samuelpessoai</u>	Man ₉ GlcNAc ₂
<u>Herpetomonas muscarum</u>	Man ₉ GlcNAc ₂
<u>Leptomonas samueli</u>	Man ₉ GlcNAc ₂
<u>Crithidia fasciculata</u>	Man ₇ GlcNAc ₂
<u>Crithidia hamosa</u>	Man ₇ GlcNAc ₂
<u>Leishmania enriettii</u>	Man ₇ GlcNAc ₂
<u>Leishmania mexicana</u>	Man ₅ GlcNAc ₂
<u>Leishmania adleri</u>	Man ₅ GlcNAc ₂
<u>Blastocrithidia culicis</u>	Man ₆ GlcNAc ₂

Tabla III: Derivados del Dolicol-P-P en tripanosomátidos. (Estos oligosacáridos son, en todos los casos, los transferidos a proteína)

manosiltransferasas.

Por estos resultados, los tripanosomátidos, antes que mutantes naturales del ciclo del dolicol, serían eslabones en la cadena evolutiva entre las bacterias, que no lo poseen, y los eucariotes superiores en donde es más complejo. En la tabla III se encuentran los derivados mayoritarios de Dol-P-P encontrados en los tripanosomátidos estudiados hasta el momento (que en todos los casos son los transferidos a proteína). Puede encontrarse una correlación entre el género y el número de manosas del oligosacárido transferido; salvo, en el caso de *Leishmania*.

En la tabla III puede observarse también que, en el caso de *T. cruzi*, los oligosacáridos transferidos varían según el estadio del ciclo de vida. Amastigotes intracelulares sintetizan y transfieren $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ exclusivamente, mientras que amastigotes en cultivo axénico sintetizan y transfieren $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y cinco veces menos $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Engel y Parodi, 1985). Estos se diferencian en cultivo a epimastigotes, que glicosilan asparagina exclusivamente con $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, mientras que, la forma infectiva tripomastigote, transfiere a proteínas $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Doyle y col. 1986). Esto implica que, un cambio en el mecanismo de N-glicosilación ocurre durante la diferenciación del mismo.

Como se caracterizó el ciclo del dolicol en tripanosomátidos, se estudió también el largo de la cadena de isoprenos. Mientras que en eucariotes superiores tiene más de 14 unidades, en *T. cruzi* tiene 13 (Parodi y Quesada

Crithidia fasciculata

Crithidia hamosa

Man₇GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₇GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₇GlcNAc₂-Prot

Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Gal₄Man₆GlcNAc₂-Prot

Leishmania mexicana

Man₆GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot

Leishmania adleri

Man₆GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot

Man₅GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₅GlcNAc₂-Prot

Trypanosoma cruzi (epimastigotes y amastigotes intracelulares)

Trypanosoma conorhini

Trypanosoma dionisii

Man₉GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₉GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₉GlcNAc₂-Prot

Man₈GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₈GlcNAc₂-Prot

Man₇GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₇GlcNAc₂-Prot

Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot

Man₅GlcNAc₂ ↓ Prot

Trypanosoma cruzi (amastigotes axénicos)

Man₇GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₇GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₇GlcNAc₂-Prot

Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot

Man₅GlcNAc₂ ↓ Prot

Trypanosoma cruzi (trypomastigotes)

Man₉GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₉GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₉GlcNAc₂-Prot

Man₈GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₈GlcNAc₂-Prot

Man₇GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₇GlcNAc₂-Prot ⇌ Man₇GlcNAc₂-P-P-dolicol

Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Glc₁Man₆GlcNAc₂-Prot ⇌ Man₆GlcNAc₂ ↓ Prot

Man₅GlcNAc₂ ↓ Prot ⇌ Man₅GlcNAc₂-Prot

Fig. 1B: 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.

Como puede observarse T. cruzi presenta un perfil de transferencia y maduración de oligosacáridos diferente según el estadio del ciclo de vida.

Allue 1982) y en C. fasciculata es de 11 unidades (Quesada Allue y Parodi 1983).

1.20. Procesamiento de oligosacáridos unidos a asparagina en tripanosomátidos:

Una vez transferido a proteínas el oligosacárido es procesado al igual que sucede en otros eucariotes. En casi todos los casos estudiados se detectó actividad de α -manosidasa, pero el número máximo de residuos retirados varió con el organismo. Las distintas especies de tripanosomátidos estudiadas hasta la fecha presentan un esquema de maduración diferente, que se muestra en la Fig. 18. En la Fig. 19 se muestran los productos de demanosilación del oligosacárido transferido, detectados en epimastigotes de T. cruzi (Parodi y col 1983).

Algunos puntos son destacables de lo encontrado hasta el momento:

a. Se detectó glucosilación transitoria en todos los organismos estudiados (se esquematiza en la Fig. 18). Se ha constatado recientemente que, membranas de éstos parásitos son capaces de glucosilar oligosacáridos polimanosos presentes en tiroglobulina a partir de UDP-Glc, al igual que lo hacen microsomas de hígado de rata, de hongos y de plántulas de leguminosa. Se ha caracterizado también una actividad similar a la de glucosidasa II de otros eucariotes en estos organismos (Bosch y col 1988a), cuyo sustrato serían los oligosacáridos glucosilados posteriormente a su transferencia a proteínas. Los tripanosomátidos no

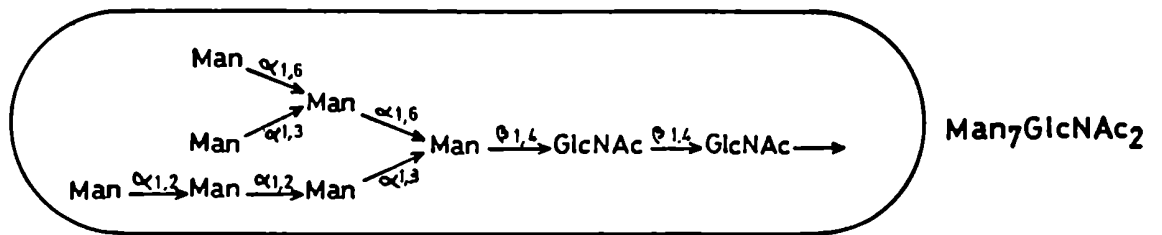
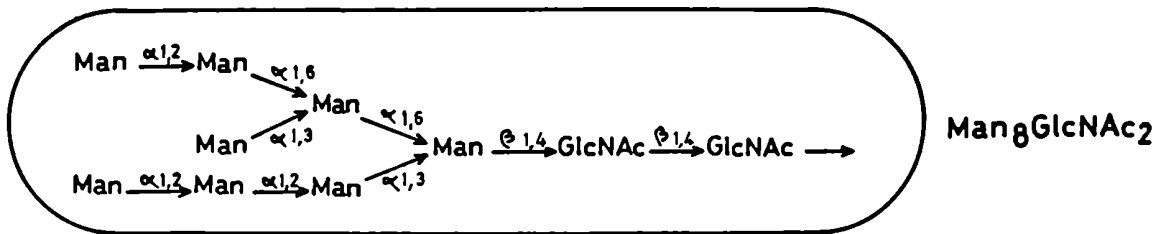
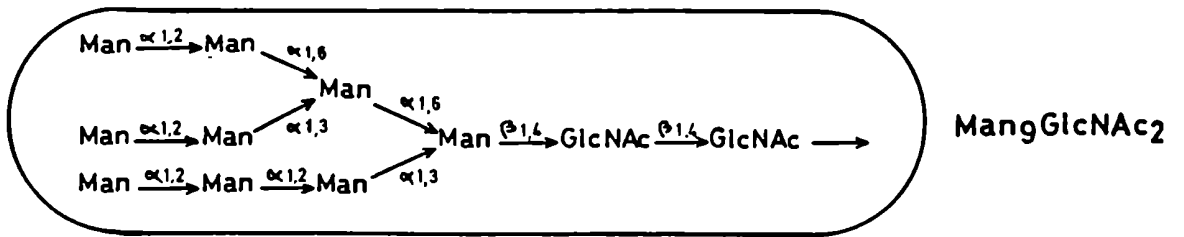


Fig. 19: Productos de maduración del oligosacárido transferido a proteínas por epimastigotes de T. cruzi.

mostraron tener una actividad similar a la de glucosidasa I descrita en otros eucariotes.

b. Se ha descrito también un interesante fenómeno de maduración no observado previamente en otros organismos: la aparición de residuos galactosa en configuración furanósica en oligosacáridos tipo polimanosos de proteínas de C. fasciculata, C. hamosa, L. samueli y H. samuelpessoai (Mendelzon y Parodi 1986, Previato y col. 1986). El caso estudiado en detalle es el de Crithidia, donde la maduración consistió en la sustracción de un solo residuo de manosa de cualquiera de los extremos no reductores originalmente presentes en el oligosacárido transferido y la adición de un residuo galactofuranosa en el restante (Mendelzon y Parodi, 1986) dando lugar a las estructuras mostradas en la Fig. 20

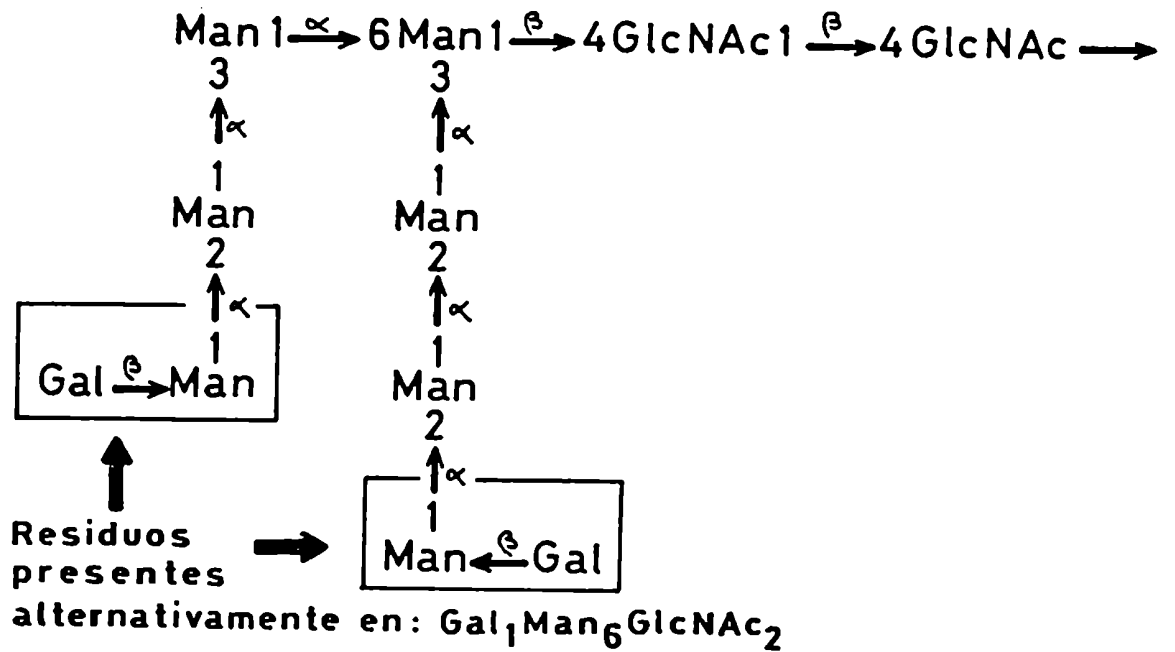


Fig. 20: Estructuras de los oligosacáridos sensibles a Endo-H de *C. fasciculata* que tienen residuos galactofuranosa.

CAPITULO 1:

Procesamiento de glicoproteínas en tripanosomátidos: Caracterización estructural de varios oligosacáridos sensibles a endo- β -N- acetilglucosaminidasa H (Endo-H) presentes en glicoproteínas de *Leptomonas samueli*

INTRODUCCION:

La N-glicosilación de proteínas comienza, en la mayoría de los eucariotes, por la transferencia de un oligosacárido ($\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) de Dol-P-P a residuos de asparagina en proteínas, mientras que, en tripanosomátidos involucra la transferencia de oligosacáridos carentes de glucosa y con nueve, siete o seis residuos manosa, según la especie (Tabla III y Fig. 17). El procesamiento de estos oligosacáridos lleva, en células de mamífero, a la formación de oligosacáridos tipo polimánosa, tipo complejo y/o tipo híbrido. Estos oligosacáridos pueden diferenciarse según la sensibilidad a una enzima, la Endo-H, que es capaz de clivar la unión entre las dos N-acetilglucosaminas del extremo reductor de los oligosacáridos si tienen una estructura tipo polimánosa (Kobata 1979). Los oligosacáridos tipo complejo son resistentes a la enzima y la mayor parte de estructuras tipo híbrido también. Por lo tanto la sensibilidad a esta enzima da una idea del grado de procesamiento sufrido por los oligosacáridos.

En la Fig. 18 se observan los productos de procesamiento (en oligosacáridos sensibles a Endo-H) de algunas especies de la familia Trypanosomatidae.

Crithidia fasciculata y Crithidia hamosa transfieren a proteínas el oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 18). El procesamiento de estos involucra la remoción de una sola manosa de alguno de los dos extremos reductores y la adición, casi simultánea, de un residuo galactofuranosa a la manosa del extremo reductor originalmente presente en el oligosacárido transferido. Se originan así dos isómeros $\text{GalMan}_6\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 19) (Mendelzon y Parodi 1986).

Se han detectado también residuos galactofuranosa en oligosacáridos tipo polimánosa presentes en glicoproteínas de dos especies de tripanosomátidos que transfieren a asparagina $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, Leptomonas samueli y Herpetomonas samuelpessoai. Por tratamiento ácido relativamente suave se liberaron exclusivamente residuos galactosa de oligosacáridos de éstos parásitos. Además por tratamiento de los oligosacáridos con periodato de sodio, en condiciones de ruptura de dioles exocíclicos y reducción con NaBH_4 la galactosa se convirtió en arabinosa (Mendelzon y col 1986)

En este capítulo se describe la caracterización estructural de varios de estos novedosos oligosacáridos sensibles a Endo-H, unidos a proteínas maduras en el tripanosomátido L. samueli, que contienen residuos galactofuranosa, así como el defecto metabólico responsable de la no glucosilación de oligosacáridos unidos a Dol-P-P en éste parásito.

Resultados:

Ausencia de UDP-Glc:Dol-P Glucosiltransferasa:

Se diseñó un experimento in vitro para detectar la capacidad de formar Dol-P-Glc del parásito. Microsomas de L. samueli fueron incubados en presencia de Dol-P de hígado de rata y UDP-[¹⁴C]Glc como se indica en Materiales y Métodos. La incubación se frenó llevándola a una partición Cloroformo/Metanol/H₂O (3:2:1), y de la fase inferior se recuperaron los Dol-P derivados, que se analizaron por hidrólisis ácida y cromatografía en solvente D. No se observó, en esas condiciones síntesis de Dol-P-Glc. En incubaciones equivalentes pero con GDP-[¹⁴C]Man se observó síntesis de Dol-P-Man. Esto indicó que el modelo de ensayo era eficaz.

Para descartar la posibilidad de que existiese en las membranas un inhibidor de la síntesis de Dol-P-Glc ó una enzima que rompiese el producto, se repitió el experimento con membranas de hígado de rata con y sin agregado de

membranas del parásito en la misma incubación. En ambos casos se obtuvo Dol-P-Glc en cantidades proporcionales a la cantidad de enzima de hígado presente.

Para estudiar si el sustrato, UDP-Glc sufría una hidrólisis total e inmediata en las condiciones de incubación, se cuantificó el mismo remanente luego de detenida la reacción. Se encontró al final de la incubación, mas del 50% del sustrato agregado inicialmente, por lo que se descartó también esta posibilidad (ver Materiales y Métodos).

Por lo tanto se concluyó que, al igual que otros parásitos (De la Canal y Parodi 1987), L. samuelli es deficiente en la síntesis del dador de restos glucosilos para formar el oligosacárido que se transferirá a proteínas. Esto concuerda con resultados previos de Previato y col; 1986: cuando células de L. samuelli fueron marcadas con [^{14}C] glucosa por tiempos cortos se encontró Dol-P-Man pero no Dol-P-Glc .

Perfil de oligosacáridos unidos a proteínas maduras:

Se obtuvieron oligosacáridos sensibles a Endo-H de proteínas maduras de L. samuelli por marcación de células intactas con [^{14}C] glucosa y posterior dilución con glucosa fría (ver Materiales y Métodos).

Las proteínas totales, fueron digeridas con una proteasa inespecífica y los glicopéptidos parcialmente purificados por filtración molecular y electroforesis en

medio ácido, se sometieron a tratamiento con Endo-H.

Los oligosacáridos sensibles a la enzima (que pierden movilidad y se purifican en una segunda electroforesis similar a la anterior) fueron separados por tamaño en una cromatografía en papel en solvente A, junto con patrones de composición $\text{Glc}_3\text{-}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Man}_9\text{-}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{-}_8\text{GlcNAc}$. En la Fig. 21 se muestra el perfil obtenido. Se pueden observar compuestos que comigran con los patrones de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (picos IV, VI, y VIII respectivamente) así como cinco compuestos más que están en, o ligeramente delante, de la posición en que migran los patrones $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (picos I, II, III, V, y VII respectivamente).

Análisis de los compuestos obtenidos:

Estas sustancias fueron eluidas y recromatografiadas separadamente por lo menos una vez para eliminar compuestos contaminantes. Luego fueron analizadas, para lo cual se usaron los siguientes métodos:

a. Tamaño: cromatografía en papel en solvente A, con patrones conocidos.

b. Composición: hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en papel en solvente C. La digestión con α -manosidasa comercial también da una idea de la composición ya que esta enzima es una exoglicosidasa específica (cliva uniones de manosas no sustituidas si están en el extremo no reductor y en configuración alfa). Si el compuesto contiene solo manosa

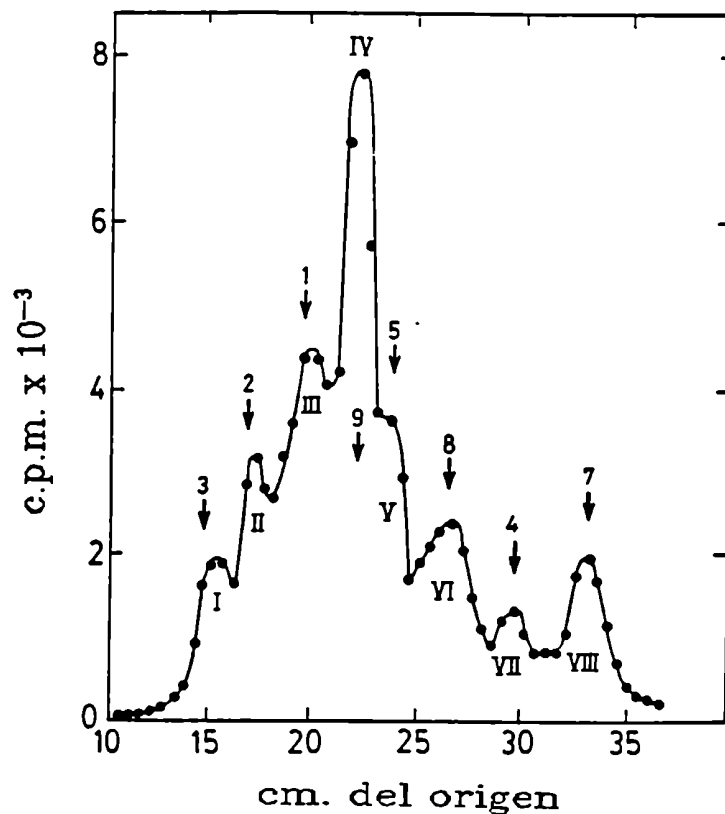


Fig. 2: Perfil de oligosacáridos unidos a proteínas.

Oligosacáridos sensibles a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H, de proteínas obtenidas por marcación de células con (14 C)glucosa, como se indica en Materiales y Métodos, fueron desarrollados en cromatografía en solvente A. Los números romanos indican los compuestos cuya estructura es descrita en esta tesis.

Patrones:

- 1: Glc₁Man₀GlcNAc
- 2: Glc₂Man₀GlcNAc
- 3: Glc₃Man₀GlcNAc
- 4: Glc₁Man₁GlcNAc
- 5: Glc₁Man₀GlcNAc
- 7: Man₁GlcNAc
- 8: Man₀GlcNAc
- 9: Man₀GlcNAc

y N-acetilglucosamina, este será degradado completamente a manosa y ManGlcNAc (la unión entre los dos monosacáridos tiene configuración beta), independientemente de la estructura que el mismo posea. Cualquier sustituyente impedirá la acción de la enzima y se obtendrán productos de digestión parcial.

c. Estructura: acetólisis controlada para efectuar la ruptura de enlaces 1-6 y análisis de los productos por cromatografía en solvente D.

d. Carbono involucrado en la unión: permetilación del compuesto seguido de hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en TLC en solvente E, (para caracterizar los monosacáridos metilados). Por permetilación cada hidroxilo libre en el compuesto se sustituye con un resto metilo, en unión eter, mientras que, los involucrados en uniones o en el anillo (furanósico C4 o piranósico C5) quedan libres.

e. Detección de monosacáridos en forma furanósica: por hidrólisis ácida suave se rompen uniones glicosídicas establecidas por monosacáridos en configuración furanósica, mientras que las uniones glicosídicas establecidas por monosacáridos en configuración piranósica son resistentes y requieren condiciones mas drásticas (hidrólisis ácida fuerte) para clivarse. Compuestos con igual número de metilos pero metilados en diferentes posiciones tienen diferente migración en el sistema de TLC, por lo tanto permetilación seguida de hidrólisis ácida fuerte y TLC en solvente E también dará información sobre la forma furanósica o piranósica de las hexosas.

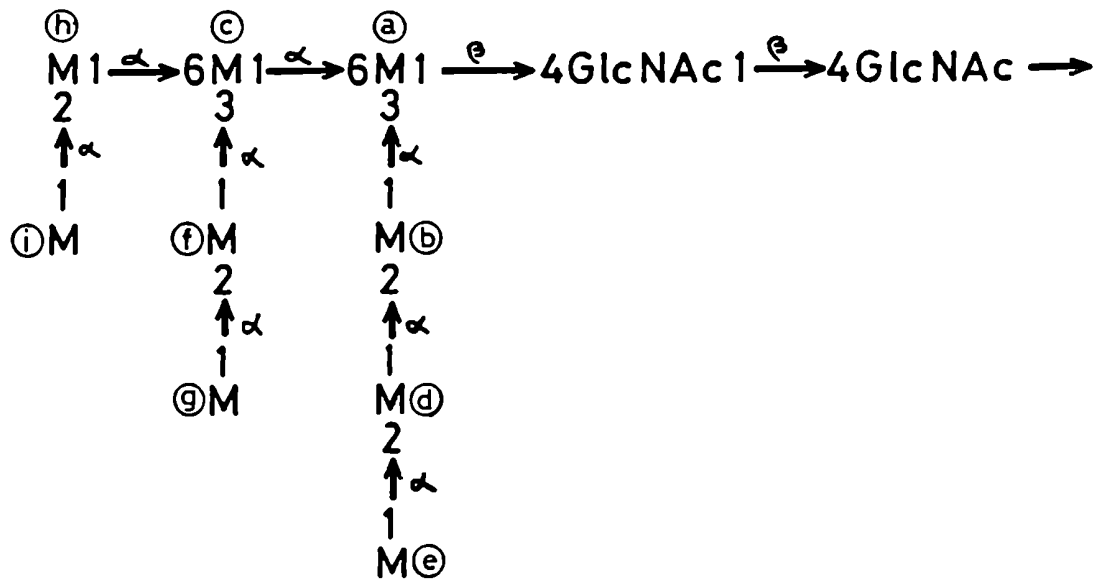


Fig 22: Estructura del oligosacárido transferido a proteínas por *L. samueli*. Las letras indican el orden de adición de residuos manosa en el ensamblaje del oligosacárido sobre Dol-P-P.

Para seguir el análisis de cada compuesto se sugiere consultar la Fig. 22 donde se muestra la estructura del compuesto transferido a proteínas por este parásito. Los restos manosilo se han nombrado con las letras del alfabeto según el orden de adición durante la síntesis "in vivo" del derivado de Dol-P-P.

Estructura del compuesto IV:

Es el que comigra con el patrón $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$. Fué sometido a digestión exhaustiva con α -manosidasa comercial. Los productos fueron cromatografiados en papel en solvente B (Fig. 23), donde tuvieron la movilidad de manosa y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Por lo tanto IV tiene igual composición que el patrón con el que comigra.

Para analizar la estructura se sometió al compuesto IV a acetólisis en condiciones específicas para efectuar la ruptura de enlaces 1-6. Los fragmentos se analizaron por cromatografía en papel en solvente B y el perfil obtenido se muestra en la Fig. 24. La presencia de compuestos que migran como manobiosa, manotriosa y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ revela que la estructura de IV es igual a la del oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ transferido a proteínas (ver Fig. 22), es decir que tiene dos puntos de ramificación y que las ramas contienen dos y tres manosas.

Se sometió a IV a permetilación seguida de hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en capa delgada desarrollada en solvente E.

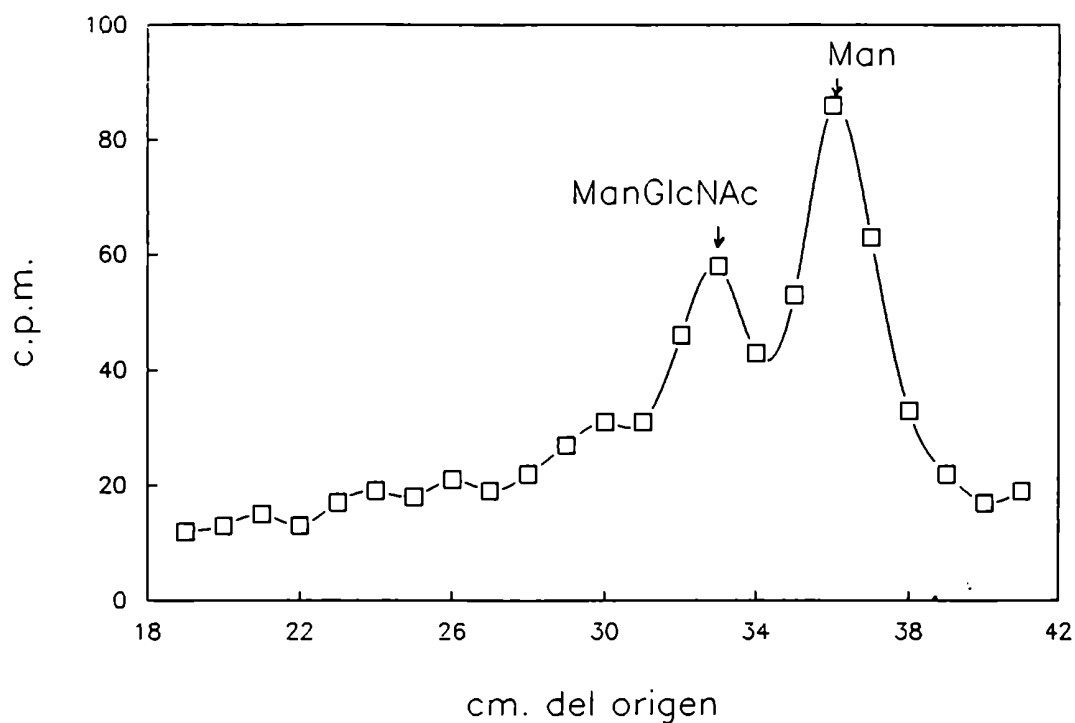


Fig. 23 Digestión con α -manosidasa del compuesto IV.

El compuesto IV (Fig. 21) fué eluido y sometido a digestión con una exoglicosidasa específica. Los productos se analizaron por cromatografía en solvente B.

Los patrones utilizados están indicados en la figura.

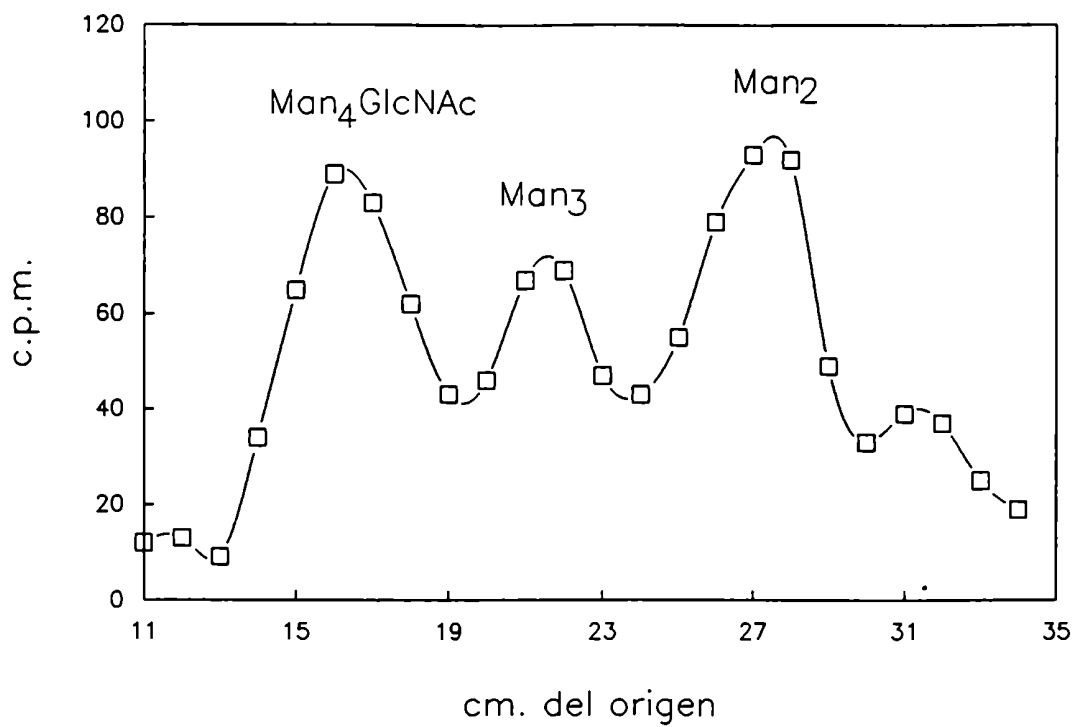


Fig. 24: Acetólisis del compuesto IV.

El compuesto IV (Fig 21) fué sometido a acetólisis y los productos se cromatografiaron en solvente B. Los patrones utilizados están indicados en la figura.

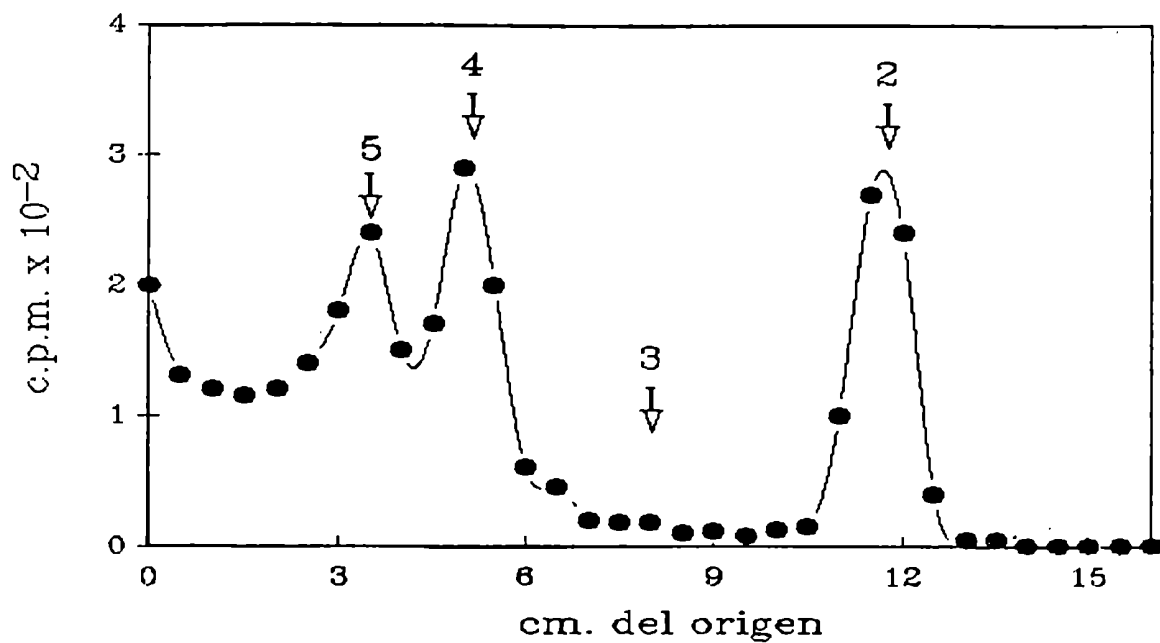


Fig. 25 Permetilación del compuesto IV.

El compuesto IV fué sometido a permetilación seguida de hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en capa delgada, desarrollada en solvente E.

Patrones: 2: 2,3,4,6 tetrametilmanosa
 3: 2,4,6 trimetilmanosa
 4: 3,4,6 trimetilmanosa
 5: 2,4 dimetilmanosa

Como se observa en la Fig. 25 se obtuvieron sustancias que comigraron con los patrones 2,3,4,6-tetrametilmanosa; 3,4,6-trimetilmanosa; y 2,4-dimetilmanosa, lo cual indica que los residuos manosa están involucrados en uniones 1-2, 1-3 y 1-6. Se comprueba entonces la igualdad del compuesto mayoritario unido a proteína con el oligosacárido que este parásito transfiere a proteínas a partir de Dol-P-P.

Estructura del compuesto VI:

Se comportó cromatográficamente como el patrón Man₃GlcNAc y produjo manosa y ManGlcNAc luego de digestión exhaustiva con α -manosidasa. Esto indicó que VI tenía la composición Man₃GlcNAc. Por lo tanto VI debe ser producto de demanosilación del compuesto IV y una manosa debe faltar del extremo no reductor de alguna de las tres ramas.

Para estudiar esto se sometió a VI a acetólisis controlada. Si el residuo faltante fuera e (ver Fig 22 para mayor claridad) se esperaría obtener manobiosa, manotriosa y Man₃GlcNAc como productos. Si faltara el residuo i se esperaría manosa, manotriosa y Man₄GlcNAc; y si VI careciese de g se obtendría Man₄GlcNAc y manobiosa. En este caso el disacárido sería una mezcla de los isómeros ih (Man α (1-2) Man) y fc (Man α (1-3) Man).

El perfil obtenido por acetólisis del compuesto VI se muestra en la Fig. 26. La radioactividad que comigra con manosa en este sistema se atribuyó a ruptura inespecífica del compuesto, debido a que su valor es cercano al nivel basal de conteo. Por los fragmentos obtenidos (manobiosa,

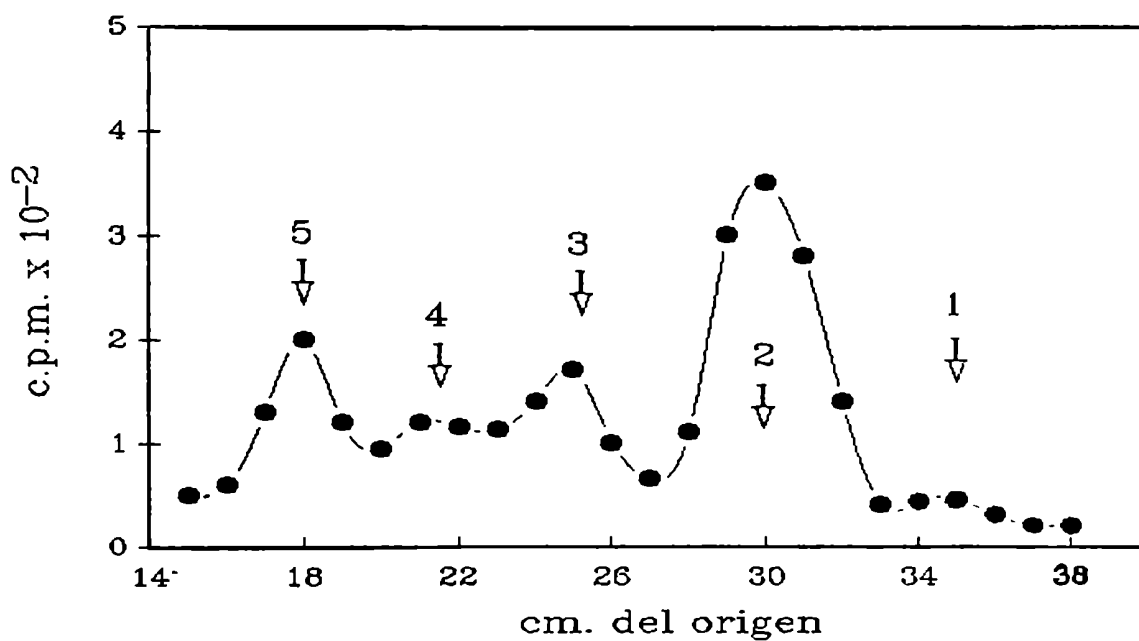


Fig. 26 Acetólisis del compuesto VI.

El compuesto VI fué sometido a acetólisis y el producto fué cromatografiado en papel, en solvente B.

Patrones: 1: manosa
 2: manobiosa
 3: manotriosa
 4: Man₃GlcNAC
 5: Man₄GlcNAC

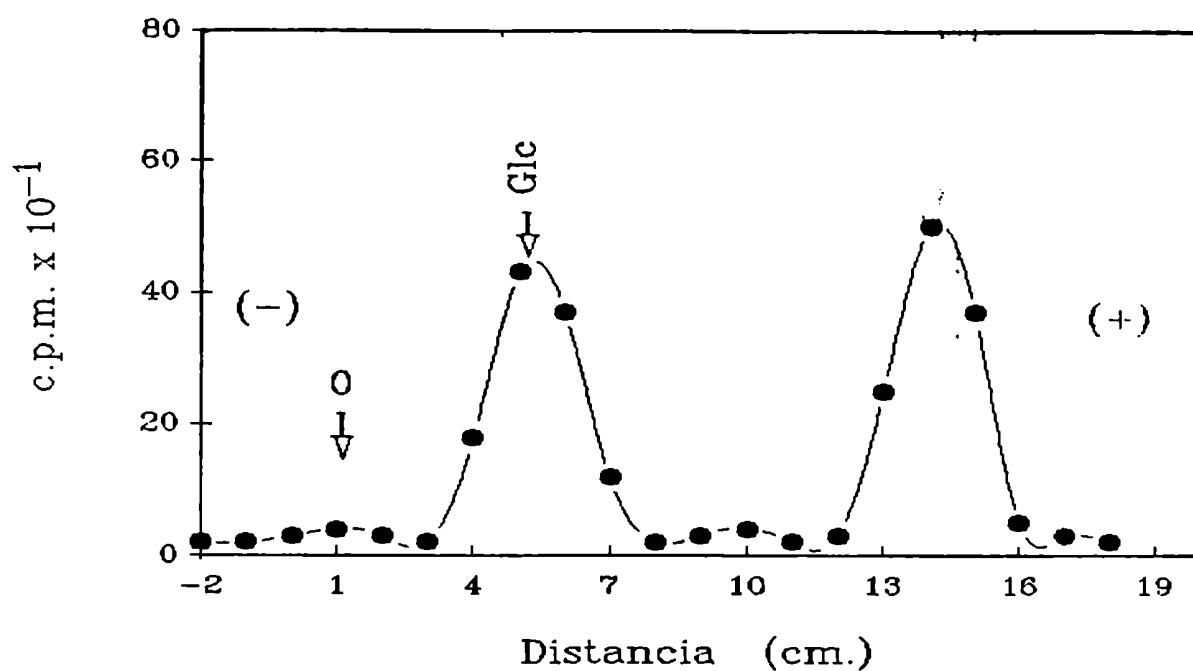


Fig. 27: Análisis de la manobiosa obtenida por acetólisis del compuesto VI (Fig. 26)

El disacárido obtenido como se describe en la Fig. 26, fué sometido a reducción con NaBH_4 y el producto se electroforesizó con Buffer G.

manotriosa, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$) se concluye que VI está compuesto por una mezcla de isómeros de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, que se obtendrían por demanosilación del compuesto IV en posición g ó e. Entonces el compuesto que comigra con manobiosa debe contener los isómeros del disacárido (con unión 1-2 y 1-3). Estos isómeros pueden ser separados por su diferente movilidad en electroforesis en buffer molibdato, luego de tratamiento con borohidruro de sodio. Este compuesto reduce el azúcar del extremo reductor abriendo el anillo. El molibdato es capaz de asociarse a residuos de manosa abiertos siempre que el C3 no esté sustituido. Esto no ocurrirá con la manobiosa fc porque c está sustituida en C3, en cambio el molibdato se asociará a ih dándole movilidad en las condiciones de electroforesis. Como se observa en la Fig 27, se obtuvieron cantidades casi equivalentes de $\text{Man } \alpha (1-2) \text{ Man}$ y $\text{Man } \alpha (1-3) \text{ Man}$. Esto indica que el camino de demanosilación de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ involucra principalmente la remoción del residuo g y en menor cantidad la del residuo e.

Estructura del compuesto VIII:

Este compuesto, que comigra con el patrón $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ fué digerido por α -manosidasa, igual que IV y VI dando como productos manosa y ManGlcNAc . Esto indica que está compuesto por manosa y N-acetilglucosamina exclusivamente. Esto sugiere que VIII es producto de demanosilación del compuesto transferido.

Por acetólisis de VIII se obtuvo manosa (la cantidad obtenida no puede atribuirse en este caso a degradación

inespecífica) y los mismos compuestos obtenidos por degradación de la sustancia VI; pero en diferentes proporciones (Fig. 28). Lo cual indicó que nuevamente nos encontramos frente a una mezcla de isómeros de tamaño.

La reducción con NaBH_4 y electroforesis en papel en buffer molibdato del disacárido obtenido por acetólisis, mostró que éste estaba principalmente compuesto de Man α (1-3) Man, ya que la mayor parte de la radioactividad no migró en la electroforesis.

Tomando la estructura de la Fig. 22 uno puede, con lápiz y papel, encontrar varias estructuras posibles para compuestos con siete residuos manosa que estarían de acuerdo con los resultados obtenidos aquí, sin embargo teniendo en cuenta la estructura de los isómeros presentes en VI (el intermediario de demanosilación entre IV y VIII) solo tres parecen las más probables; y serían las que se obtienen a partir de la demanosilación del compuesto transferido por sustracción de los residuos g é i; ó e y g ó bien e é i (Fig. 22). La estructura de estos isómeros se muestra en la Fig. 29. Sin embargo, la relación de disacáridos obtenida por acetólisis, reducción y electroforesis en molibdato y la cantidad de $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ obtenida por acetólisis del compuesto (Fig. 28) sugiere que el camino de demanosilación preferencial involucra la remoción del residuo g de IV para dar VI y la remoción del residuo i para pasar de VI a VIII. Esto es semejante a lo encontrado en T. cruzi como puede observarse comparando las Figs. 30 y 19.

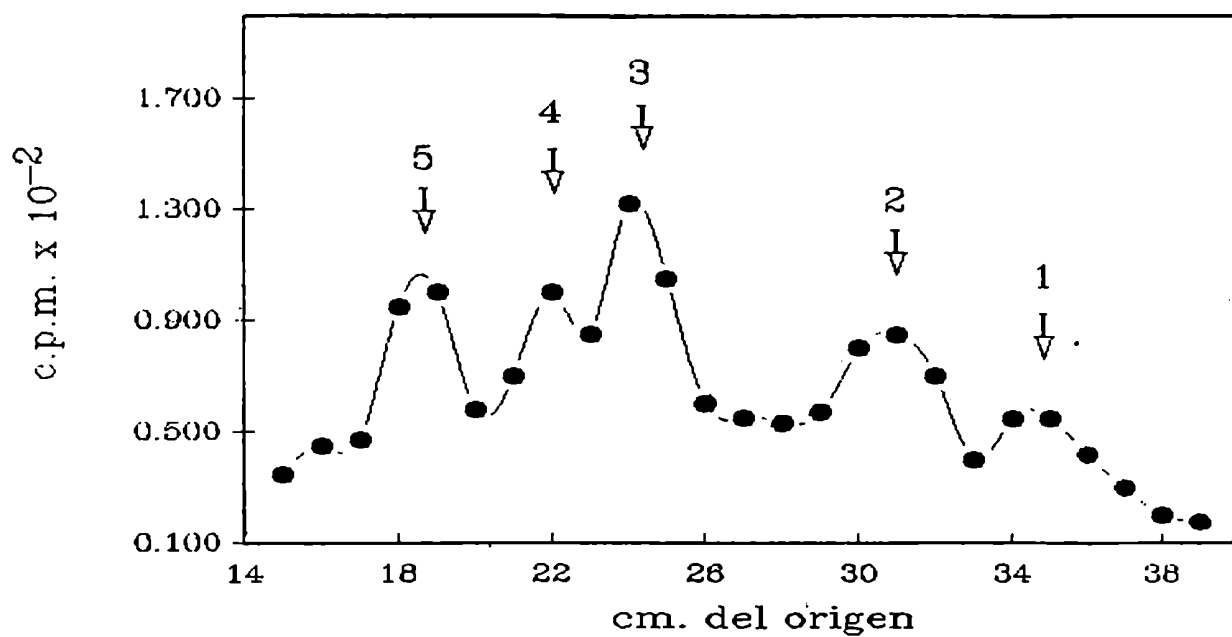


Fig. 28: Acetólisis del compuesto VIII.

El compuesto VIII fué sometido a acetólisis y el producto fué cromatografiado en solvente B.
 Patrones: igual que en la Fig. 26.

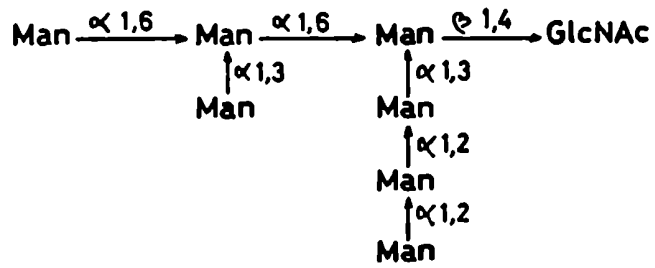
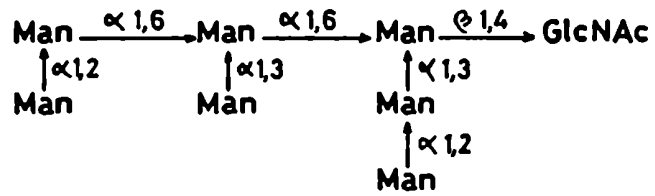
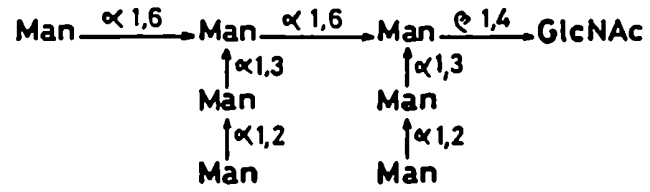


Fig. 29: Estructura del compuesto VIII.

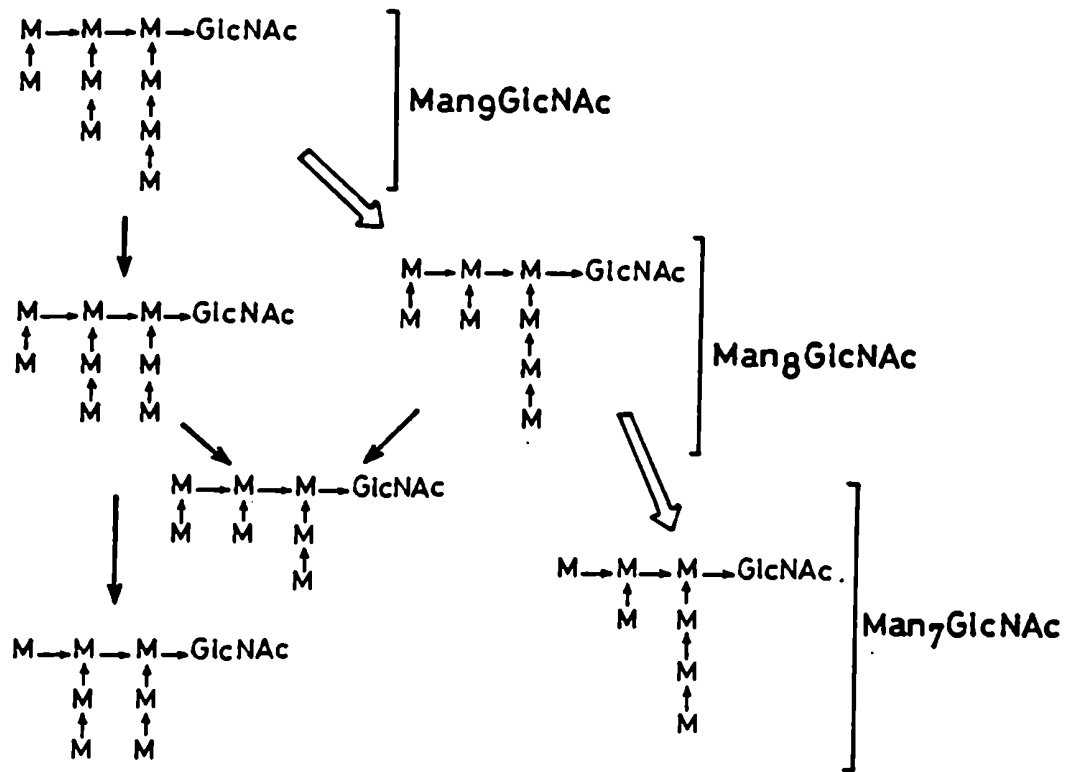


Fig. 30: Camino de demanosilación del oligosacárido transferido a proteínas por *L. samuelli*.

La flecha remarcada indica el camino principal.

Estudio de la estructura del compuesto I :

Como se observa en la Fig. 21 este compuesto migró algo más que el patrón $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}$, indicando que podría ser algo diferente del mismo. Se había descrito que, oligosacáridos tipo polimánosa conteniendo residuos galactofuranosa, migran un poco más que compuestos similares pero que contienen residuos galactopiranososa o glucopiranososa (Mendelzon y Parodi 1986). Además, se había descrito someramente la presencia de residuos galactofuranosa en proteínas de éste parásito.

La degradación exhaustiva con α -manosidasa comercial, en iguales condiciones que los compuestos estudiados previamente y análisis subsiguiente por cromatografía en papel, reveló que dicha enzima no degradó éste compuesto (Fig. 31 A y B). Además no se observó liberación de manosa por cromatografía en solvente B del producto de incubación. La hidrólisis ácida suave del compuesto I bajo condiciones requeridas para la hidrólisis de enlaces de hexofuranosas pero no de hexopiranosas (150 min a 100°C en HCl pH 2.2) dió como resultado la liberación de galactosa con la concomitante producción de un oligosacárido que migró como $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (Fig. 32). Este compuesto fue completamente degradado a manosa y ManGlcNAc por α -manosidasa demostrando que era realmente $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$. El compuesto $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ se obtuvo también sometiendo I primero a degradación exhaustiva con α -manosidasa y luego, a hidrólisis ácida suave.

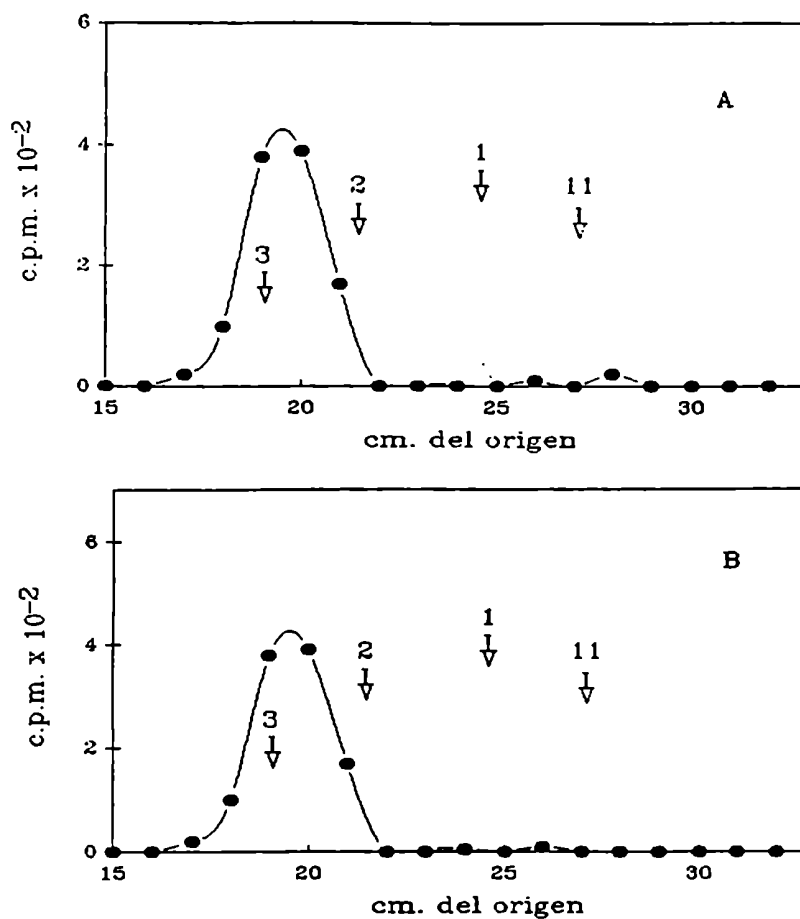


Fig. 3: Análisis del compuesto I.

A) El compuesto I (Fig. 21) fué eluido y sometido a una segunda cromatografía en solvente A.

B) El compuesto I fué sometido a digestión exhaustiva con α -manosidasa comercial y cromatografiado en papel en solvente A.

Patrones: 3: Glc₃Man α GlcNAC
 2: Glc₂Man α GlcNAC
 1: Glc₁Man α GlcNAC
 9: Man α GlcNAC

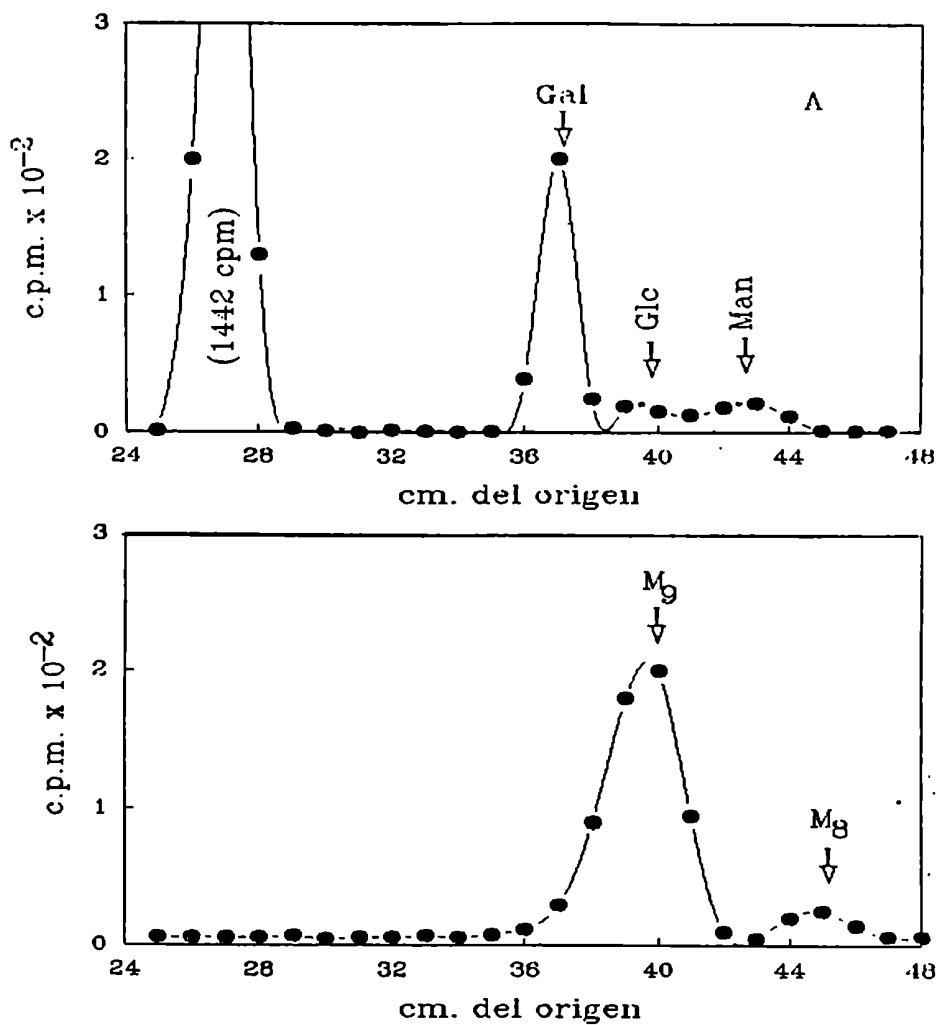


Fig. 32 Hidrólisis ácida suave del compuesto I.

El compuesto I fué sometido a hidrólisis de enlaces establecidos por hexofuranosas (ver Mat. y Met.). El producto se cromatografió en papel en solvente B (A) y el compuesto que migró en el origen fué recromatografiado en solvente A (B).

- Patrones: 5: manosa
 6: glucosa
 7: galactosa
 10: Man β GlcNAc
 11: Man α GlcNAc

La permetilación del compuesto I seguido de hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en capa delgada reveló la presencia de sustancias que comigraron con los patrones de 2,3,5,6-tetrametilgalactosa, 3,4,6-trimetilmanosa y 2,4-dimetilmanosa (Fig. 33). En otras cromatografías en el mismo sistema se observó que la 2,3,4,6-tetrametilgalactosa migra detrás de 2,3,5,6-tetrametilgalactosa (relación de migración 0.78).

Los resultados obtenidos confirman, por lo tanto, la presencia de residuos galactofuranosa. Si se comparan los perfiles obtenidos por permetilación de los compuestos I y IV (Fig. 25 y 33) se observa que el compuesto I no produjo 2,3,4,6-tetrametilmanosa pero produjo mas cantidad del compuesto que comigra con 3,4,6-trimetilmanosa.

Con estos resultados se concluyó que I esta compuesto por 3 galactosas, 9 manosas y 1 N-acetilglucosamina, con un residuo galactofuranosa unido probablemente al carbono 2, de cada uno de los tres extremos no reductores del oligosacárido transferido a proteína (residuos g e i en la Fig. 22) (Fig. 34).

Estructura del compuesto II:

Este compuesto migró algo delante del patrón de 2 glucosas, 9 manosas y 1 N-acetilglucosamina.

Se lo sometió entonces, en primer lugar a hidrólisis ácida suave y los productos se analizaron por cromatografía en solventes B y A. Al igual que I, II produjo galactosa libre y el compuesto Man₉GlcNAC. Cuando se sometió a II a

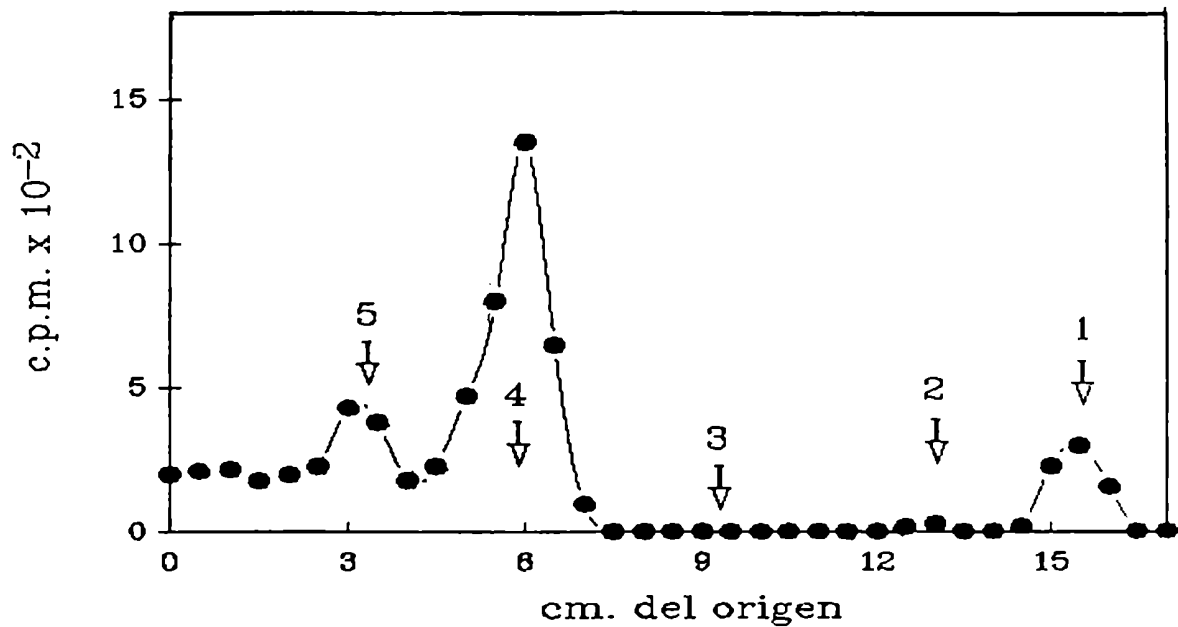


Fig. 33 Permetilación del compuesto I.

El compuesto I (Fig. 31 A) fué sometido a permetilación seguida de hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en capa delgada en solvente E. Patrones: igual que en Fig. 25.

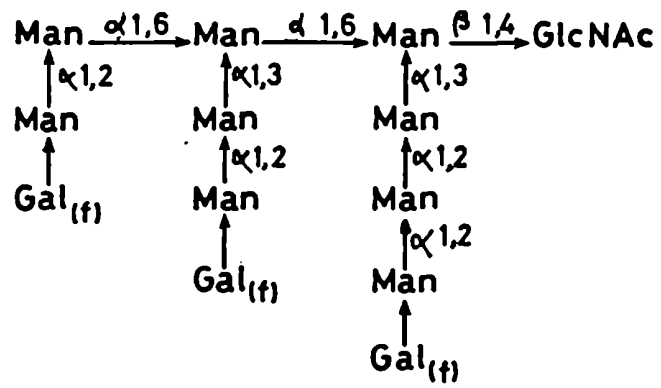


Fig. 34* Estructura del compuesto I.

digestión con α -manosidasa seguido de cromatografía en papel se observaron tres sustancias radioactivas que migraron delante de II (Fig. 35). El tratamiento ácido suave de la mezcla de los tres productos obtenidos con α -manosidasa, dió compuestos que migraron en papel como Man₆GlcNAc, Man₇GlcNAc y Man₈GlcNAc (Fig 36). Estos fueron degradados a manosa y ManGlcNAc por α -manosidasa.

Además, cada uno de los productos de II con α -manosidasa, (mostrados en Fig. 35), sometido individualmente a hidrólisis ácida suave produjeron, respectivamente (del pico menos móvil al mas móvil) Man₆GlcNAc, Man₇GlcNAc y Man₈GlcNAc.

Se sabe que residuos no manosídicos impiden totalmente la digestión por la α -manosidasa usada de residuos teóricamente sensibles a la enzima. Por ejemplo: un solo residuo glucosa, en el oligosacárido Glc₁Man₆GlcNAc, bloquea la digestión del residuo c (Fig. 22) por la α -manosidasa, dando como productos Glc₁Man₅GlcNAc y Glc₁Man₄GlcNAc (Parodi y Cazzulo, 1982). El compuesto mayor es un producto de degradación incompleta, ya que el residuo c queda algo protegido de la enzima por su posición respecto de la antena glucosilada. Por lo tanto se espera que, si la estructura propuesta mas abajo para el compuesto II fuera correcta, residuos galactofuranosa unidos a residuos e ó g, o a residuos e é i en Man₉GlcNAc deben resultar en la producción, luego de tratamientos con α -manosidasa e hidrólisis ácida suave de Man₆GlcNAc y Man₇GlcNAc. Del mismo modo si la galactofuranosa estuviera unida a residuos i y g

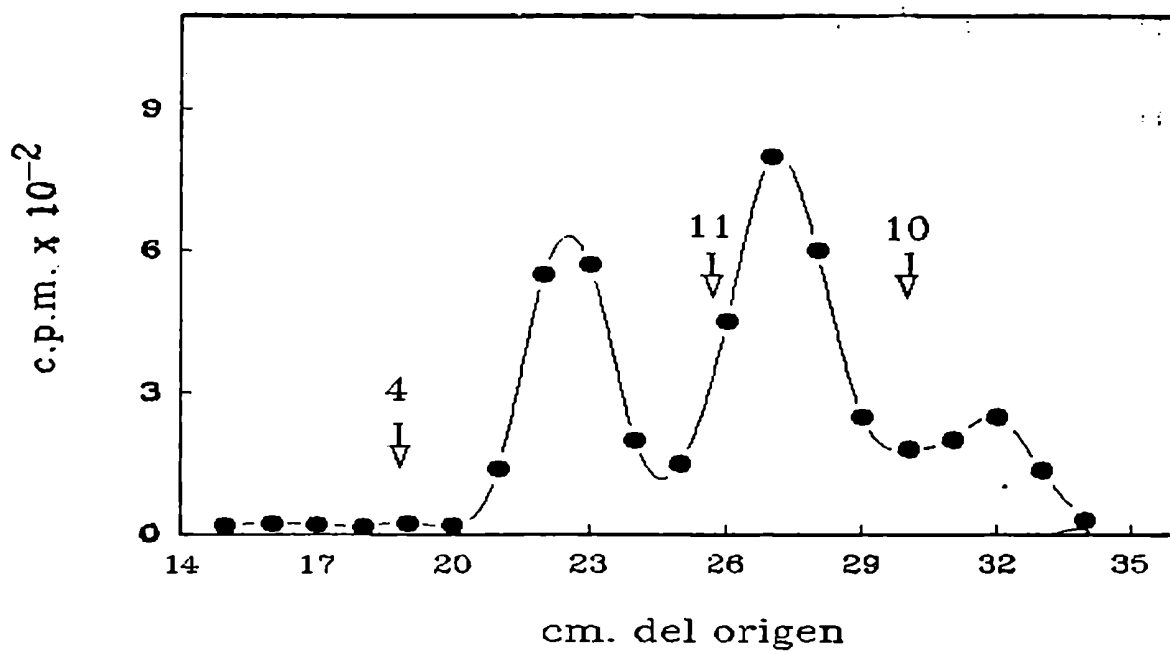


Fig. 35 Análisis del compuesto II.

El compuesto II (Fig. 21) fué sometido a digestión con α -manosidasa y el producto se cromatografió en solvente A.

Patrones: 4: compuesto II
 10: Man₇GlcNAc
 11: Man₇GlcNAc

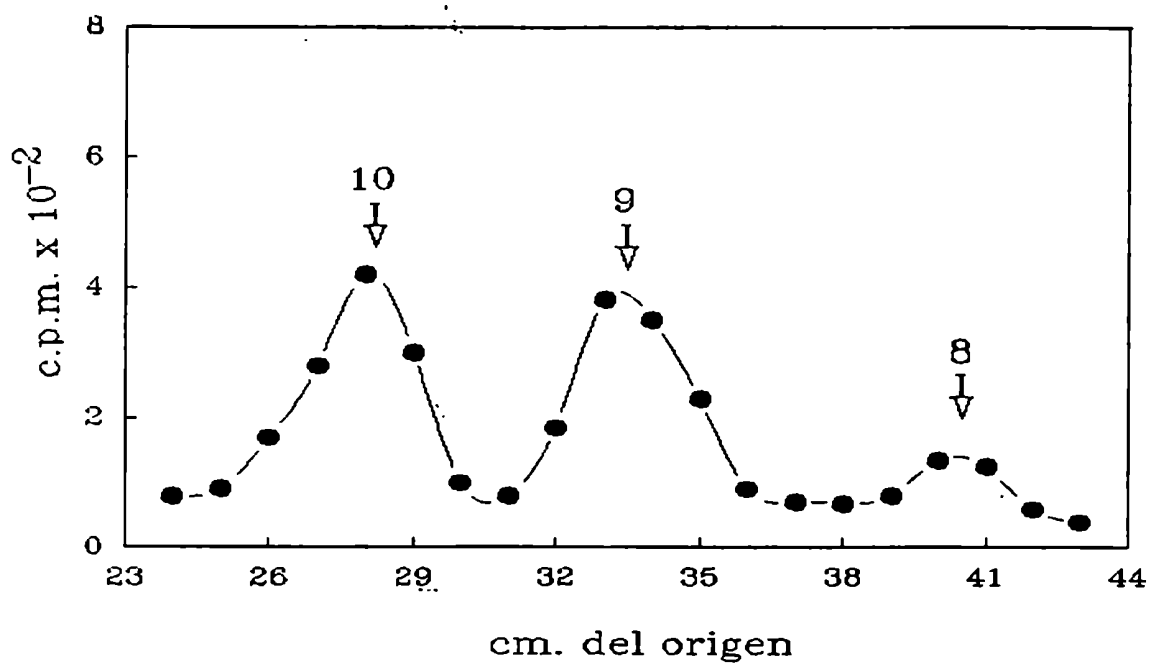


Fig. 36: El compuesto II fué sometido a digestión con α -manosidasa seguida de hidrólisis ácida suave. El producto final se cromatografió en solvente A.

Patrones: 8: Man₆GlcNAc
 9: Man₇GlcNAc
 10: Man₈GlcNAc

ambos tratamientos deberían generar $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$. Por lo tanto, la interpretación que mas se ajusta a estos resultados es que el compuesto II representa al oligosacárido $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ sustituido en dos cualquiera de sus extremos no reductores con una galactosa en forma furanósica. Esta interpretación está reforzada por el hecho de que el compuesto I demostró tener un residuo galactofuranosa en cada uno de los extremos no reductores de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y como se verá mas adelante el compuesto III tiene una galactofuranosa en alguno de estos extremos no reductores. Las estructuras propuestas se representan en la Fig. 37.

Estructura del compuesto III:

Migró igual o algo delante que el patrón $\text{GlcMan}_6\text{GlcNAc}$, como se observa en la Fig. 21. Por tratamiento ácido suave liberó galactosa y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$. Parte del compuesto III fue resistente a este tratamiento.

Digestión exhaustiva con α -manosidasa dió como productos manosa y compuestos que migran igual o algo delante que los patrones $\text{GlcMan}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Esto indica que tienen un sustituyente diferente de manosa, probablemente en el extremo no reductor de alguna rama originalmente presente en el compuesto transferido, ya que de no ser así la digestión completa hubiera dado especies de menor tamaño.

La sustancia que migró en la zona del patrón $\text{GlcMan}_4\text{GlcNAc}$ luego de digestión con α -manosidasa fue

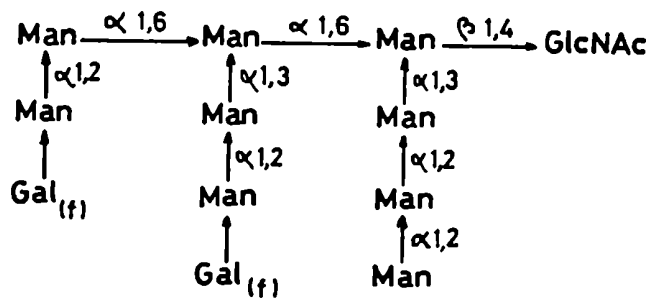
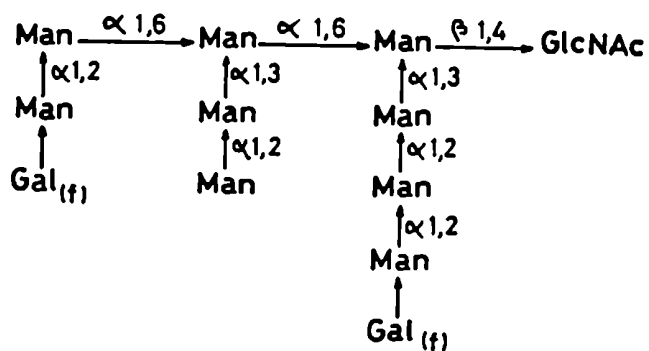
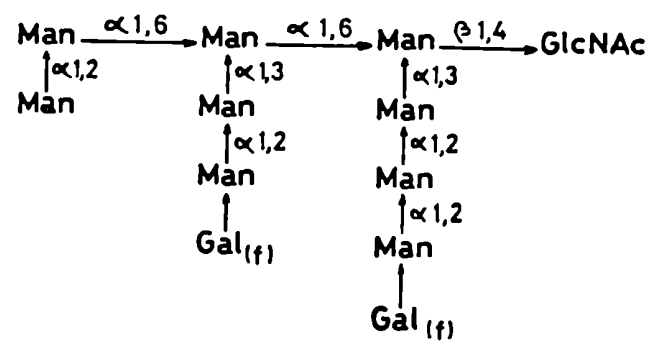


Fig. 37: Estructura del compuesto II.

Como se indica en el texto el compuesto II es una mezcla de isómeros.

sometida a hidrólisis ácida suave. Se obtuvo galactosa y un compuesto que migró como $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ en ese sistema. Nuevamente parte del compuesto original no se modificó (Fig. 38). El compuesto que migró como $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ fué sometido nuevamente a digestión con α -manosidasa dando como productos ManGlcNAc y manosa (Fig. 39). El compuesto que fue resistente se hidrolizó totalmente en medio ácido (1 N HCl, 100°C , 4 h). El producto se analizó por cromatografía en solvente C, lo que mostró que contiene manosa y glucosa.

Estos resultados justificaron la resistencia a hidrólisis ácida suave y revelaron la presencia dos tipos de sustancias en el compuesto III: una glucosilada y otra galactosilada. En el segundo caso parece haber un solo residuo galactosa que se comporta (por su movilidad cromatográfica y sensibilidad a hidrólisis ácida suave) como si estuviera en configuración furanósica.

Para estudiar la estructura del compuesto galactosilado presente en III, el compuesto que migró como $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ luego de tratamiento con α -manosidasa e hidrólisis ácida suave fue sometido a acetólisis. Si la galactosa estuviera unida al residuo g (para mayor claridad seguir con la Fig. 22) se deberían obtener manotriosa y ManGlcNAc ; si estuviera unida a i se debería esperar manosa, manobiosa y ManGlcNAc ; y si estuviera unida a e el compuesto debería ser insensible a acetólisis.

Los productos desarrollados en cromatografía en solvente B revelaron ser una mezcla de todos los fragmentos esperados (Fig. 40), demostrando que el compuesto

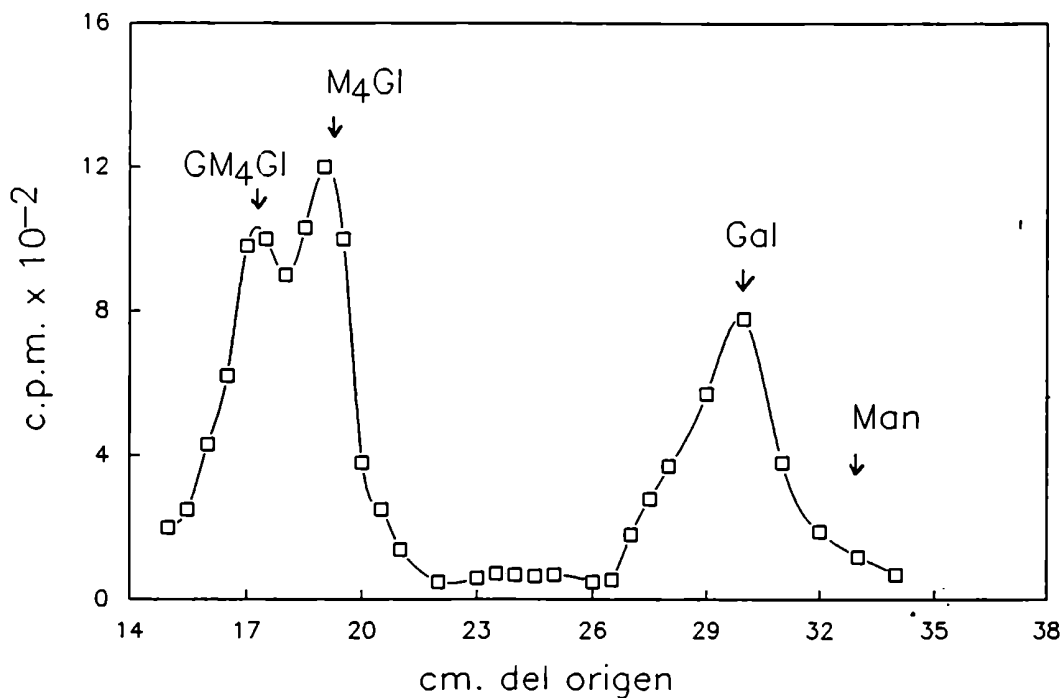


Fig. 3B Análisis del compuesto III.

El compuesto III fué digerido con α -manosidasa, dando como productos manosa y compuestos que migran como el patrón $\text{GlcMan}_3\text{GlcNAc}$ y $\text{GlcMan}_4\text{GlcNAc}$. Este último fué sometido a hidrólisis ácida suave y cromatografía en solvente A.

Patrones: Gal: galactosa
 Man: Manosa
 M_4Glc : $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$
 GM_4Glc : $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$.

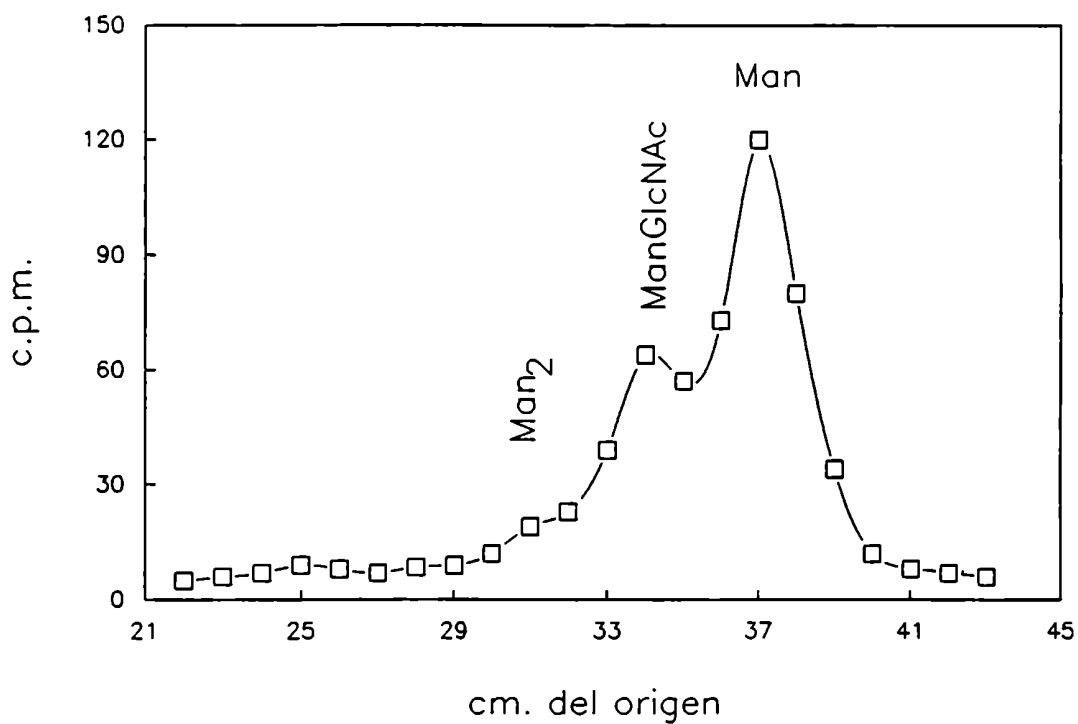


Fig. 39: Digestión con α -manosidasa del compuesto que en la Fig. 38 migró como el patrón M₄Gl.

El producto se cromatografió en solvente D. Los patrones utilizados están indicados en la figura.

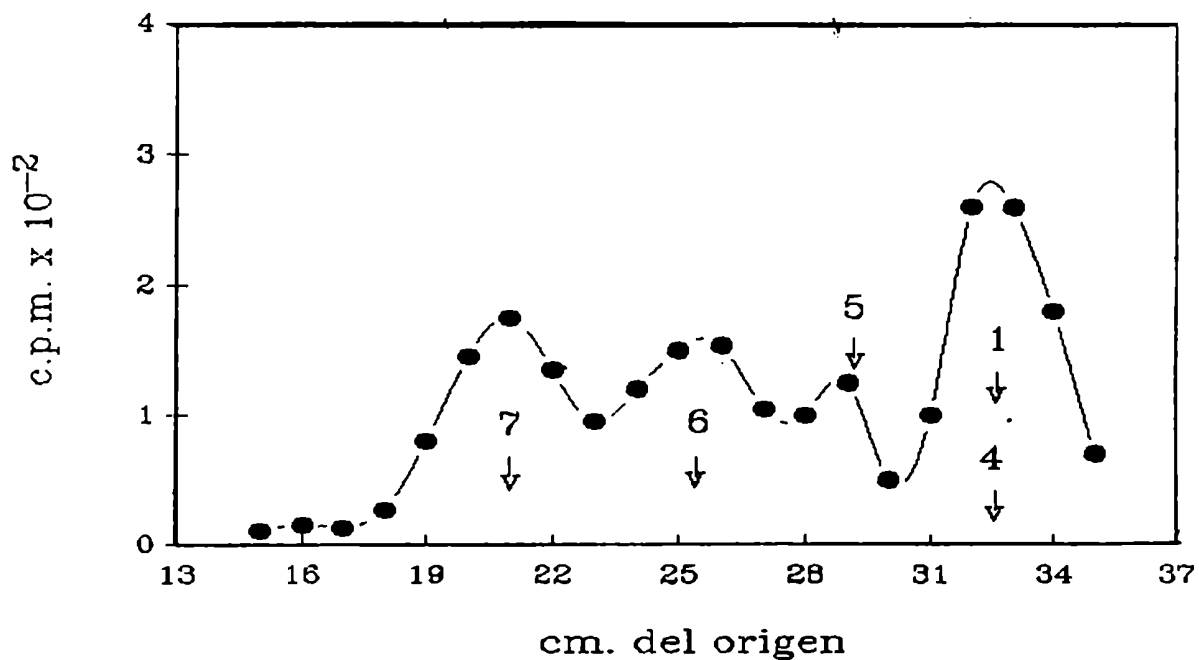


Fig. 40: Acetólisis del compuesto que migra como M₄G₁ en la Fig. 38.

El producto de acetólisis se cromatografió en solvente A:

- Patrones:
- 1: manosa
 - 4: ManGlcNAc
 - 5: manobiosa
 - 6: manotriosa
 - 7: Man₄GlcNAc.

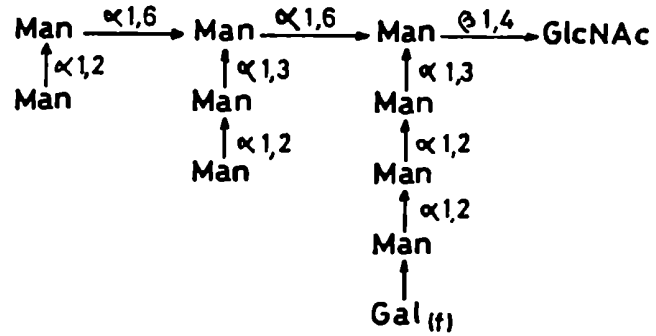
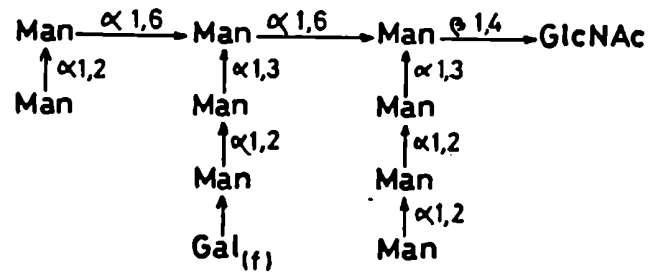
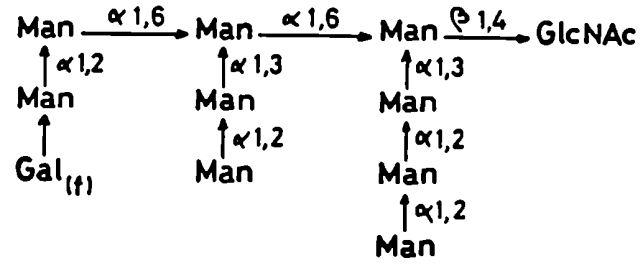


Fig. 4b: Estructuras galactosiladas presentes en el compuesto III.

galactosilado presente en III es a su vez una mezcla de isómeros. El residuo galactosa está unido a los residuos i, e ó g. Los oligosacáridos galactosilados presentes en III se esquematizan en la Fig. 41.

Estructura del compuesto V:

Es el que tiene una movilidad semejante al patrón $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}$. En vista de los resultados obtenidos previamente se lo sometió en primera instancia a un tratamiento ácido suave en las condiciones requeridas para romper uniones glicosídicas establecidas por sacáridos en forma furanosica. Se obtuvo en este caso galactosa y un compuesto que migra, en cromatografía en solvente A como $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, pero parte del compuesto original (V) fué insensible al tratamiento.

Tratando V exhaustivamente con α -manosidasa se obtuvieron compuestos que migraron como manosa e igual o levemente delante de $\text{Glc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Como era de esperar, el compuesto que migró como $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, sometido a hidrólisis ácida suave fue parcialmente degradado, liberando galactosa y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. La sustancia resistente estaba compuesta por glucosa y manosa, como lo demostró la hidrólisis ácida total del mismo y cromatografía en papel en solvente C de los productos.

El compuesto que migró como $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ luego de tratamiento prolongado con α -manosidasa e hidrólisis ácida suave, fué sometido a acetólisis, para analizar la estructura original del compuesto V. Nuevamente se

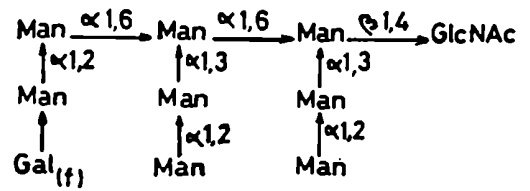
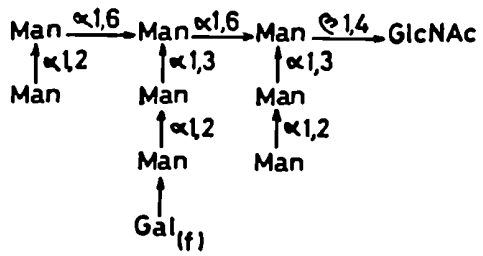
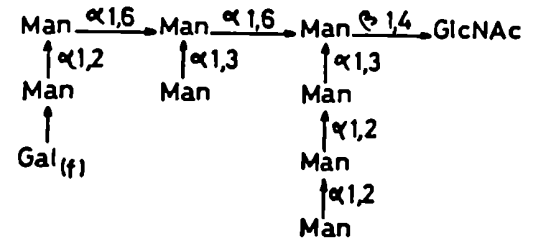
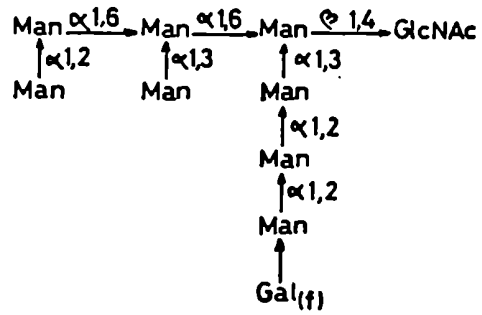


Fig. 42 Estructuras galactosiladas presentes en el compuesto V.

Clave: igual que en la Fig.41.

obtuvieron todos los fragmentos que cabrían esperarse si una galactosa estuviera unida alguno de los dos extremos no reductores en los isómeros de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (que forman parte de la sustancia VI), presentes originalmente en el oligosacárido transferido a proteínas (Fig. 22).

Un esquema de las estructuras propuestas para los oligosacáridos galactosilados presentes en el compuesto V se muestran en la Fig. 42.

Estructura del compuesto VII:

Este compuesto, que comigró con el patrón $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ se comportó de idéntica forma que las sustancias III y V, frente a hidrólisis ácida suave (en este caso dió como producto $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$).

Cuando se digirió VII con α -manosidasa, dió manosa y compuestos de digestión parcial (que migraron como los patrones $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$, Fig 43). El compuesto de digestión parcial ($\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$) fué sometido a hidrólisis ácida suave y nuevamente se obtuvo una fracción resistente al tratamiento, junto a galactosa y $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ (Fig. 44). Este último fué sometido a tratamiento con α -manosidasa y produjo manosa y ManGlcNAc , demostrando que es idéntico al patrón con el que comigra. Cuando éste compuesto ($\text{Man}_4\text{GlcNAc}$) se sometió a acetólisis produjo $\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, manotriosa, manobiosa, ManGlcNAc , y manosa.

La fracción resistente a hidrólisis ácida suave (que migró como $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$) produjo manosa y glucosa luego de hidrólisis ácida total (Fig. 45), mostrando que es igual al

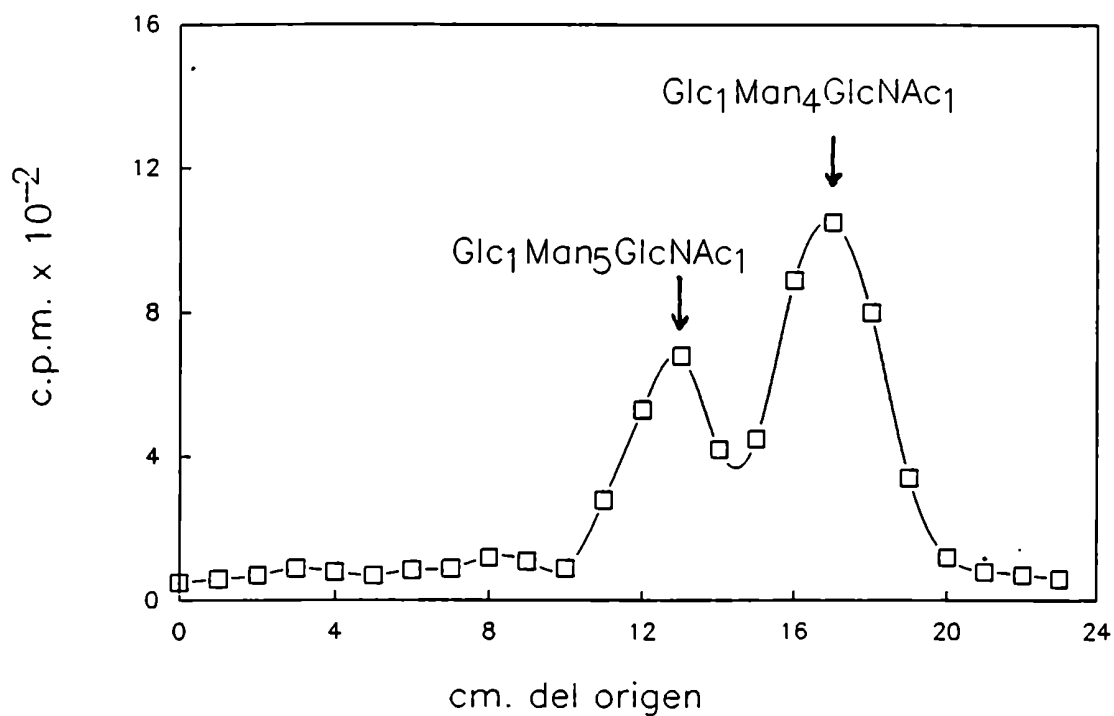


Fig. 43 Análisis del compuesto VII.

El compuesto VII fué sometido a digestión con α -manosidasa y los productos, cromatografiados en solvente A.

Los patrones utilizados están indicados en la figura.

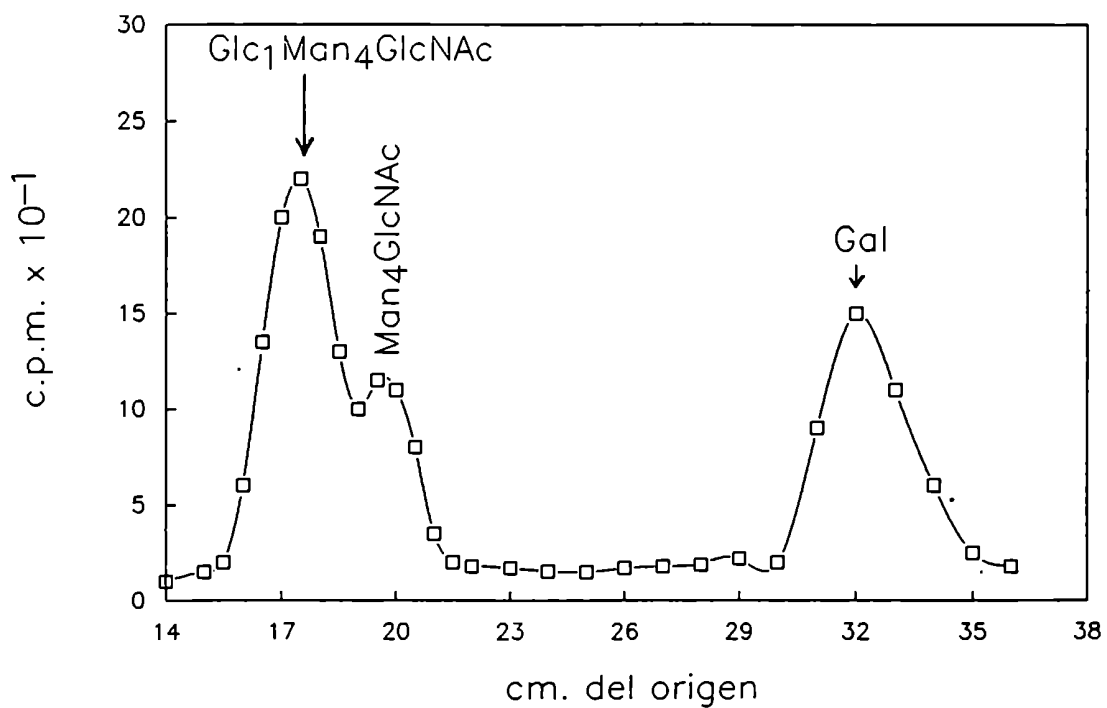


Fig. 44: Hidrólisis ácida suave del compuesto que en la Fig. 43 migra como Glc₁Man₄GlcNAc.

Los productos de hidrólisis se cromatografiaron en solvente A.
 Los patrones utilizados están indicados en la figura.

patrón con el que comigra.

Así se concluyó que VII es también una mezcla de compuestos que contienen siete manosas y un residuo galactofuranosa o glucopiranososa. En el primer caso, (sustitución con galactosa) se detectaron los tres isómeros que se obtienen si al compuesto VIII (isómeros de Man₇GlcNAc) se le adiciona una galactofuranosa en los extremos no reductores originalmente presentes en el oligosacárido transferido a proteína. Un esquema de estos oligosacáridos se muestra en la Fig 46.

CONCLUSIONES DE LA PARTE 1:

Se han caracterizado los oligosacáridos sensibles a Endo-H presentes en glicoproteínas de L. samueli. Cabe destacar que con este método hemos seleccionado estructuras tipo polimanosas, y por el tiempo de dilución de marca utilizado, se las considera ya sometidas a maduración.

Hemos encontrado como especie mayoritaria, el oligosacárido originalmente transferido, que hemos llamado IV, y los productos primarios de demanosilación: compuestos VI y VIII. La presencia de isómeros de estructura en VI y VIII indicaría que existen caminos diferentes de procesamiento. La presencia de éstos oligosacáridos, que contienen solo residuos de manosa y N-acetilglucosamina muestran un procesamiento similar al encontrado previamente en epimastigotes de T. cruzi (Parodi y col 1983; Doyle y col

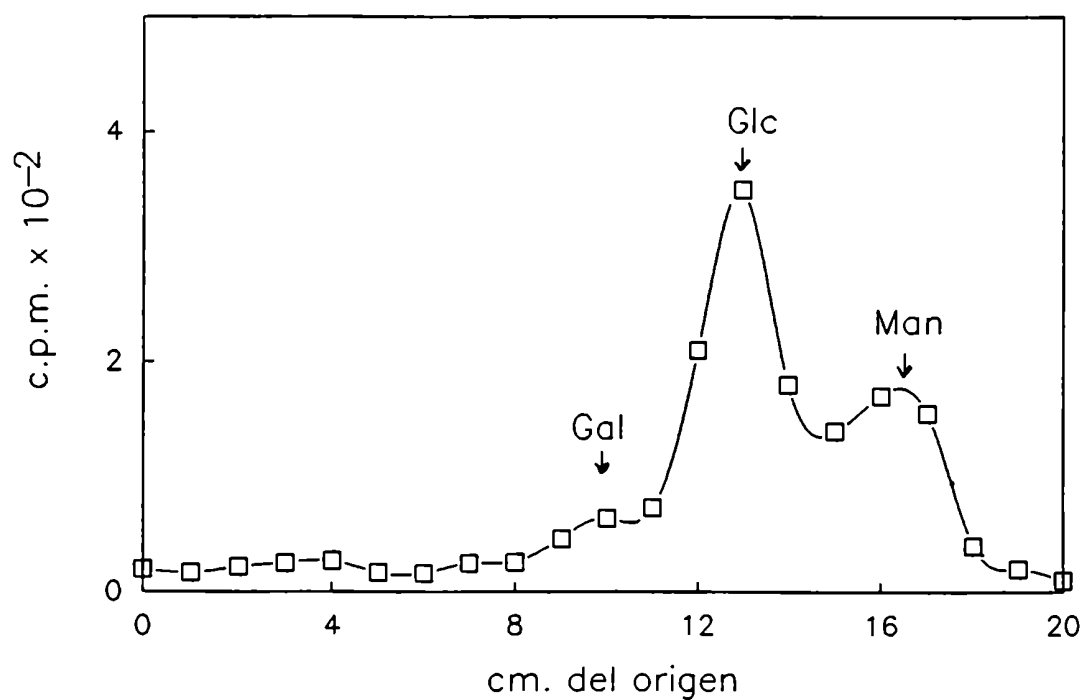


Fig. 43 Hidrólisis ácida total del compuesto que en la Fig. 44 migra como $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$.

Los productos de la hidrólisis se cromatografiaron en solvente C.

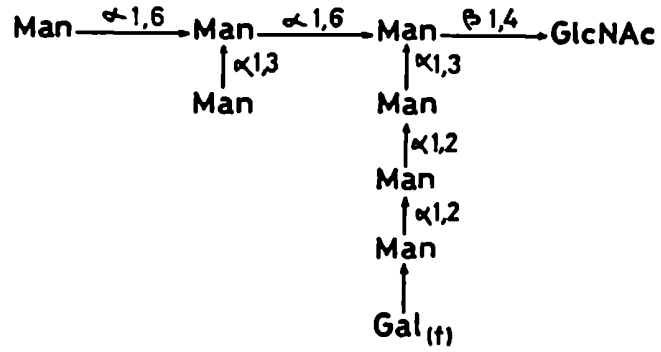
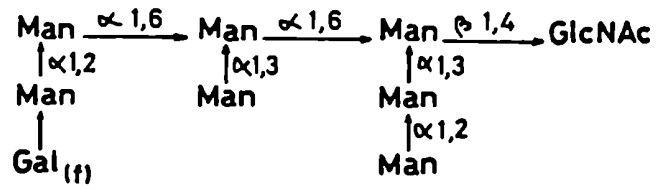
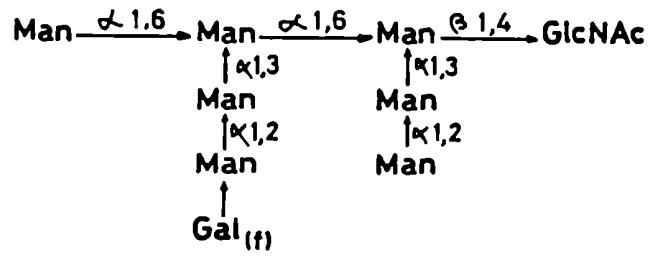


Fig. 46 Estructuras galactosiladas presentes en el compuesto VII.

1986), una especie que sintetiza sobre dolicol y transfiere a proteínas la misma unidad oligosacarídica que L. samuelli (Figs. 19 y 30).

Se ha detectado también la presencia de especies glucosiladas, que están presentes en los picos llamados III, V y VI. La presencia transitoria de compuestos $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a asparagina se detectó en T. cruzi y en otros parásitos que transfieren $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a proteínas, así como en células de mamífero, de plantas y de levadura (Lederkremer 1985, Mendelzon y col 1986, Parodi y col 1983 a y b, 1984b). Sin embargo, compuestos glucosilados aparecen en L. samuelli, luego de sesenta minutos de dilución de marca, mientras que en otros sistemas parecen tener una vida media mucho menor.

Otra característica original encontrada en este protozoo es la presencia de galactosa en configuración furanósica en oligosacáridos tipo polimánosa unidos a asparagina. La estructura de los mismos indicó que en todos los casos ($\text{Gal}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Gal}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Gal}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) los residuos galactosa se encuentran unidos a manosas presentes en el extremo no reductor de las ramas. La demanosilación del compuesto transferido ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) genera nuevos extremos reductores, sin embargo, en todos los casos (isómeros de $\text{Gal}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Gal}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) la galactosa estaba unida a extremos no reductores originalmente presentes en el oligosacárido transferido.

Lo mismo se encontró en los isómeros $\text{Gal}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ aislados de C. fasciculata, como se indicó en la Introducción (Fig. 20). Pero a diferencia de éstos, el oligosacárido transferido en L. samuели aumenta de tamaño por el agregado de residuos galactosa.

Acerca de la función de estos residuos:

a. puede ser una forma de señalización dentro del sistema, como se propuso para la glucosilación transitoria, o

b. podrían ser una protección de las antenas a la demanosilación dado que se encuentran en ramas no procesadas,

c. pueden sencillamente formar parte de glicoproteínas maduras,

Cualquiera sea su función, oligosacáridos conteniendo residuos galactofuranosa unidos a asparagina en proteínas de L. samuели, se diferencian marcadamente de las glicoproteínas que llevan restos galactosa en mamíferos ya que:

a. en los protozoarios estos restos galactosa se encuentran en configuración furanósica y no piranósica como se encuentran en glicoproteínas de mamíferos

b. en mamíferos las glicoproteínas que contienen galactosa tienen oligosacáridos de tipo complejo y estos residuos están en las llamadas antenas cuya composición es $\text{NeuAc}_1\text{Gal}_1\text{GlcNAc}_1$ mientras en protozoos se encontraron en oligosacáridos tipo polimannosa unidos directamente a los residuos manosa. En ambos casos esos oligosacáridos se producen por procesamiento de las unidades transferidas a

asparagina.

No se conoce cual es el dador de restos galactofuranosa en estos protozoarios. Se ha descrito la existencia de UDP-Gal_(f) en el hongo Penicillium charlesii, que estaría involucrado en la biosíntesis de un galactomanano (Garcia-Trejo y col 1971).

Es de esperarse que estos oligosacáridos tipo polimanosa que llevan galactofuranosa, sean altamente antigénicos, dado que estas estructuras no están presentes en células de mamífero y además, son accesibles al medio externo a juzgar por la afinidad observada de parásitos enteros con lectinas apropiadas (Mutharia y Pearson 1987). Sin embargo las especies en las que se los ha encontrado (C. fasciculata, C. hamosa, L. samueli y H. samuelpeessoai, Mendelzon y Parodi 1986, Mendelzon y col 1986) son todas monogenéticas, es decir no infectan mamíferos. Por otro lado no se ha probado experimentalmente la antigenicidad de estos compuestos. Las especies que infectan mamíferos e insectos (T. cruzi, Trypanosoma conorhini, Trypanosoma dionisii y Leishmania mexicana) no poseen galactofuranosa en oligosacáridos tipo polimanosa (Parodi y col 1983a, 1984a, Mendelzon y col 1986).

Residuos galactofuranosa se encuentran en otro tipo de estructuras: en I. brucei, en los determinantes de reacción cruzada de la porción de anclaje de la glicoproteína de superficie (Fergusson y col 1985), pero son antigénicos solo cuando se liberan de las células y no cuando están unidos a la membrana.

En las especies digenéticas T. cruzi, y Leishmania donovani, en que se ha demostrado la presencia de galactosa furanósica, ésta se encuentra en compuestos complejos como el lipopeptidofosfoglicano de T. cruzi (De Lederkremer y Col 1985) (probablemente parte de un sistema de anclaje a membranas) ó en la porción glicosídica del anclaje de un polisacárido en L. donovani.

Arruda y col (1989) obtuvieron dos anticuerpos policlonales contra proteínas involucradas en la penetración de tripomastigotes de T. cruzi, (y por lo tanto expuestas hacia el medio externo), que reconocen específicamente y en forma cruzada galactosa furanósica del lipopeptidofosfoglicano de T. cruzi y de un galactomanano de Dactylium dendroides. El disacárido Gal_(f) (1-3)Man inhibió en un radioinmunoensayo la unión de ambos anticuerpos al antígeno específico. No se ha dilucidado aún la estructura responsable de la antigenicidad de estas proteínas pero se comprobó que éstas son afines por la lectina Concanavalina A, indicando que poseen una porción oligosacarídica tipo polimánosa, lo que las asemeja a las estructuras descritas aquí.

Se ha caracterizado el defecto responsable de la ausencia de glucosa sobre el oligosacárido transferido a proteínas en L. samueli. Los resultados demuestran que no existe una actividad transferente de glucosa de UDP-Glc a Dol-F, mientras que, en las mismas condiciones se observó síntesis de Dol-P-Man a partir de GDP-Man.

Esta deficiencia ha sido observada también en I. cruzi, Leishmania enriettii, B. culicis y C. fasciculata y justifica que, en ausencia del intermediario, el ciclo del dolicol sea incompleto en estos microorganismos.

La ausencia de actividad transferente descarta la hipótesis de una ruptura específica del sustrato ó del producto, ó de la presencia de un inhibidor de la actividad en las membranas, pero no descarta la posibilidad de que exista la Dol-P-Glc:Dol-P-P-oligosacárido glucosiltransferasa.

Caracterización de la Dolicol difosfato oligosacárido:proteína oligosacariltransferasa de tripanosomátidos y células mamíferas indiferenciadas.

PARTE I: Oligosacariltransferasa de tripanosomátidos

Como se detalló en la Introducción la N-glicosilación de proteínas ocurre por transferencia desde Dol-P-P a asparagina en péptidos nacientes o en proteínas recién sintetizadas, de un oligosacárido, $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. En mamíferos, plantas insectos y hongos, el compuesto transferido es siempre el mismo (Fig. 6, Introducción).

Experimentos con sistemas libres de células demostraron que la remoción de una sola glucosa (la unidad mas externa, n en la Fig. 6) drásticamente reduce la velocidad de transferencia. Por otra parte la velocidad de transferencia no se afecta luego de la remoción de residuos manosa del oligosacárido unido a Dol-P-P por medio de una incubación con α -manosidasa. Se han descripto mutantes de S. cerevisiae que no sintetizan Dol-P-Glc, el dador de restos glucosa en el ciclo del dolicol, y sintetizan y transfieren a proteínas el oligosacárido $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Una severa hipoglicosilación de proteínas se encontró en estas células, lo que resultó deletéreo para las mismas (Ballou y col 1986). Estas evidencias, y resultados similares, hicieron suponer que los tres restos glucosa en el oligosacárido son

necesarios para efectuar una N-glicosilación de proteínas eficiente.

Como se mencionó en la Introducción los tripanosomátidos son protozoarios parásitos que, entre otras particularidades, sintetizan sobre Dol-P-P oligosacáridos no glucosilados.

El compuesto de mayor tamaño sintetizado sobre Dol-P-P por estos organismos contiene dos residuos N-acetilglucosamina y ó, 7 ó 9 restos manosa según la especie (Fig. 17). En todos los casos, los oligosacáridos presentes "in vivo" en mayor cantidad resultaron ser los transferidos a asparagina en proteínas.

Los oligosacáridos transferidos tienen la misma estructura que los intermediarios de igual composición del ciclo del dolicol en otros eucariotes. La ausencia de síntesis de Dol-P-Glc en estas células así como la ausencia de ciertas actividades de manosiltransferasas dependientes de Dol-P-Man, (De la Canal y Parodi 1987) son las causas de la biosíntesis incompleta del oligosacárido sobre Dol-P-P.

Esta característica es exclusiva de la familia Trypanosomatidae, ya que otros protozoarios como Euglena grácilis y Tetrahymena pyriformis sintetizan y transfieren oligosacáridos con tres residuos glucosa: $\text{Glc}_3\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ respectivamente.

Se planteó entonces la siguiente pregunta: como es que los tripanosomátidos son capaces de transferir oligosacáridos no glucosilados, si en todos los sistemas

eucarióticos estudiados tres residuos glucosa son necesarios para efectuar una transferencia eficiente y, los que carecen de solo uno de ellos son transferidos muy pobremente?. Sufren ellos también una hipoglicosilación de sus proteínas como la mutante de S. cerevisiae incapaz de sintetizar Dol-P-Glc?. Que características tiene la oligosacariltransferasa de estos organismos para efectuar la glicosilación de asparagina en las condiciones observadas?.

Para estudiar esto se diseñó un sistema de ensayo para la oligosacariltransferasa "in vitro" con el objeto de estudiar la especificidad de la misma frente al sustrato oligosacarídico. Se ensayó también la actividad en membranas de eucariotes ya estudiados para probar el sistema.

Resultados:

1. Sustratos

1.I. Lípido-oligosacáridos: Para cuantificar la transferencia y caracterizar los oligosacáridos transferidos se utilizó una mezcla de sustratos oligosacarídicos radioactivos obtenidos por marcación de crestas de oviducto de gallina como se explica en Materiales y Métodos. Se realizaron incubaciones por tiempo prolongado (cuatro horas) para asegurarse de que los oligosacáridos contienen la misma radioactividad específica. Se obtuvo una mezcla de

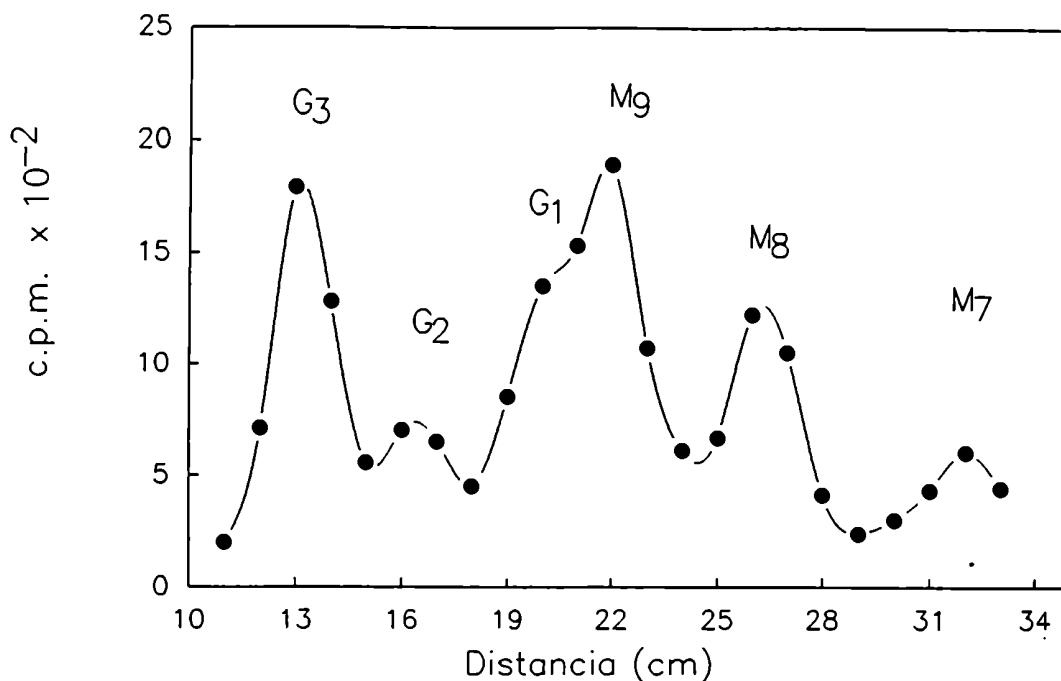


Fig. 48: Perfil de oligosacáridos presentes en la mezcla de sustratos para la reacción de la oligosacaril-transferasa .

Crestas de oviducto de gallina fueron incubadas con (¹⁴C)glucosa y los intermediarios del ciclo del dolicol extraídos y purificados parcialmente como se indica en Materiales y Métodos. El extracto fué hidrolizado en condiciones ácidas suaves para escindir los oligosacáridos del Dol-P-P. Aquellos fueron desarrollados en cromatografía en papel en solvente A.

Patrones: G₃: Glc₃Man₉GlcNAc
 G₂: Glc₂Man₉GlcNAc₂
 G: Glc₁Man₉GlcNAc₂
 M₈: Man₉GlcNAc₂
 M₉: Man₈GlcNAc₂
 M₇: Man₇GlcNAc₂

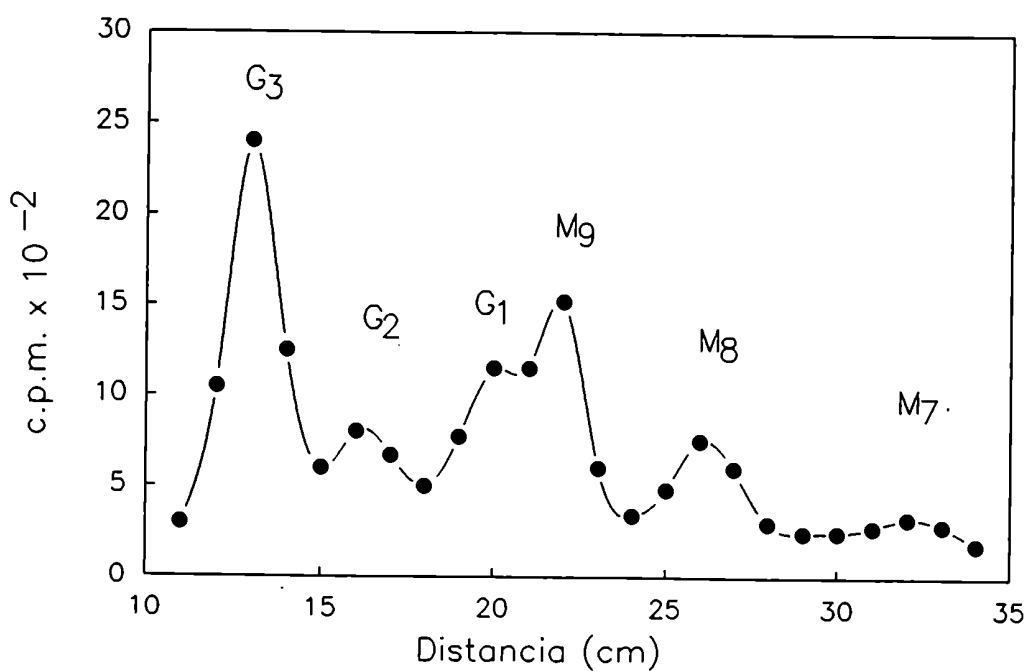


Fig. 49: Perfil de oligosacáridos presentes en la mezcla de sustratos para la reacción de la oligosacariltransferasa

La mezcla de derivados del ciclo del dolicol se obtuvo como se indica en la Fig. 48. Los patrones utilizados son los mismos. El perfil corresponde a otra preparación.

Patrones: igual que en Fig. 48.

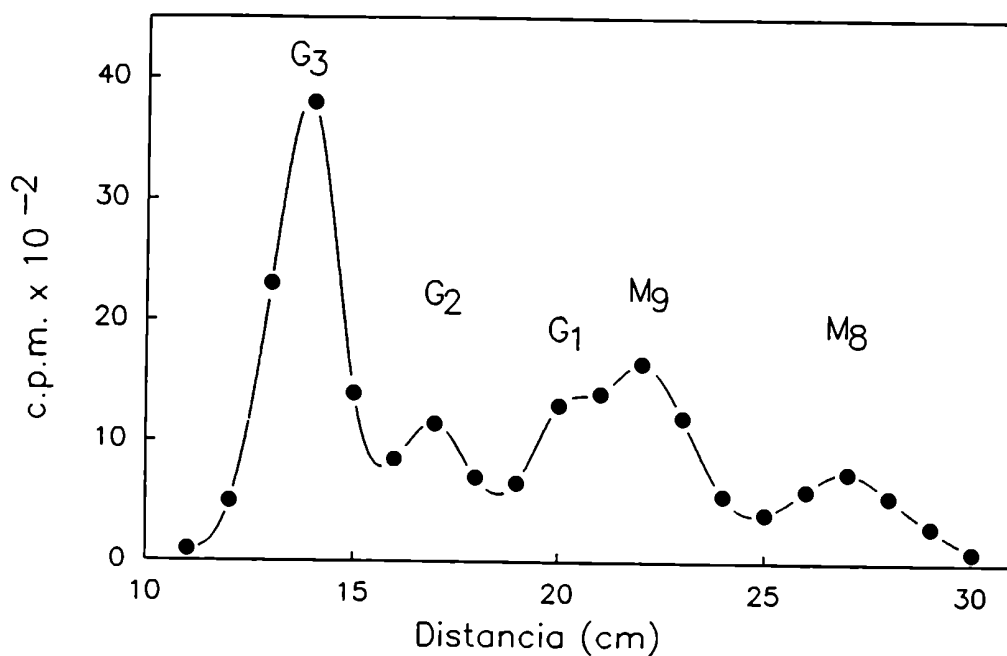


Fig. 50: Perfil de oligosacáridos presentes en la mezcla de sustratos para la reacción de la oligosacariltransferasa

La mezcla de sustratos se obtuvo como se indica en la Fig. 48. El perfil corresponde a otra preparación.

Patrones: idem Fig. 48.

sustratos parcialmente purificados (conteniendo los oligosacáridos (^{14}C) $\text{Glc}_3\text{-}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{-}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a Dol-P-P) (Figs. 48, 49 y 50). Los oligosacáridos $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, intermediarios del ciclo del dolicol, tienen la misma estructura que los oligosacáridos transferidos por tripanosomátidos.

Para corroborar el hecho de que todos los monosacáridos, en los oligosacáridos presentes en el sustrato, están marcados en forma equivalente, se eluyó del papel los oligosacáridos de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, se los sometió a digestión con Endo-H y cromatografía en papel en solvente A. Estos compuestos (privados del residuo N-acetilglucosamina del extremo reductor) fueron sometidos a hidrólisis ácida total y cromatografía en solvente C. (El perfil obtenido del compuesto mayor se muestra en la Fig. 51). La relación de marca fué glucosa/manosa/glucosamina (3.1:8.2:1.0) y manosa/glucosamina (9.3:1.0) para $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ respectivamente. Teniendo en cuenta que $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ es precursor de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, y que la vida media de éste último en células intactas es muy pequeña (aproximadamente ocho minutos) respecto del período de marcación (cuatro horas), se concluye que todos los oligosacáridos presentes en el sustrato tienen la misma radioactividad específica.

1.II. Sustrato proteico: Se ensayó transferencia a proteínas endógenas de microsomas de tripanosomátidos y en

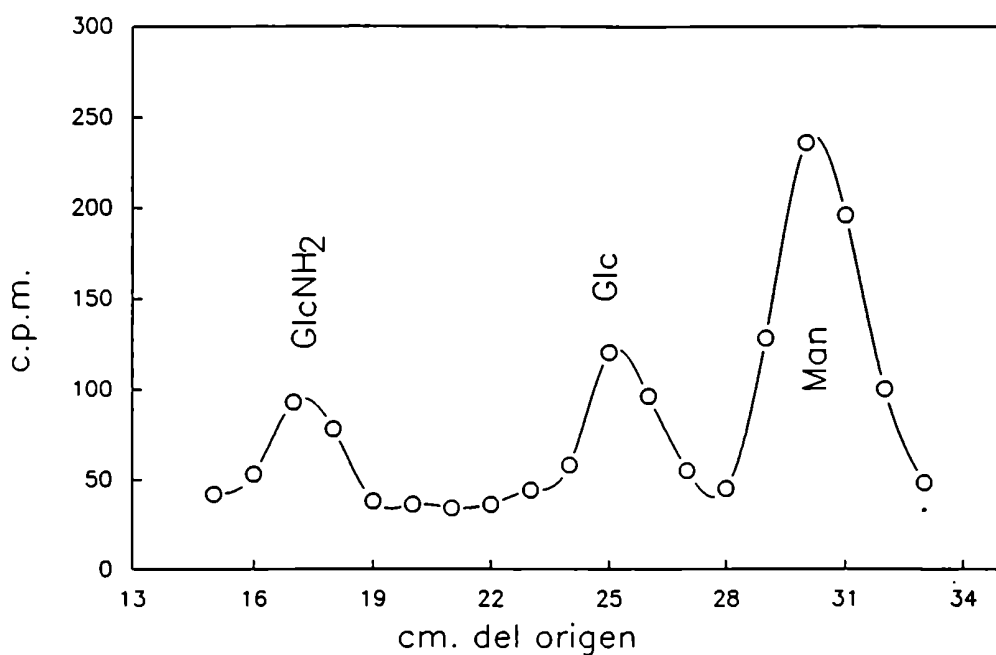


Fig. 51: Radioactividad específica del sustrato oligosacárido.

El oligosacárido que migra como el patrón $\text{Glc}_3\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ en cromatogramas como el de la Fig. 48, fué eluido, digerido con Endo-H y sometido nuevamente a cromatografía en solvente A. El oligosacárido fué sometido entonces a hidrólisis ácida total y los productos analizados por cromatografía en papel en solvente C.

Patrones: Man: manosa
 Glc: glucosa
 GlcNH_2 : glucosamina

todos los casos fué muy pobre. Se sintetizó entonces un hexapéptido con la secuencia consenso de la glicosilación que había resultado óptimo en ensayos llevados a cabo con membranas de S. cerevisiae (Lehle y Bause 1984). Este hexapéptido tiene la secuencia Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val y fué sintetizado en la Universidad de Uppsala (Suecia), según se indica en Materiales y Métodos.

1.III. Preparación Enzimática: al diseñar el ensayo se eligió trabajar con un representante de cada grupo de la familia: los que transfieren a proteínas $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (L. samueli), $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (C. fasciculata) y $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (B. culicis). Todos estos son tripanosomátidos monogenéticos. Se trabajó también con membranas de T. cruzi, agente causal del mal de Chagas, que es un tripanosomátido digenético y transfiere en su forma epimastigote a proteínas, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Como testigos del ensayo se utilizaron membranas de hígado de rata y de S. cerevisiae como fuente enzimática.

Las membranas utilizadas fueron obtenidas como se indica en Materiales y Métodos. En el caso de eucariotes superiores se utilizó el pellet de 100000 x g, y en el caso de tripanosomátidos se usó el pellet que presentó mayor actividad de transferencia (de 17500 ó 100000 x g). En la Tabla IV, se observa un ejemplo con membranas de B. culicis.

2. Ensayo: los ensayos se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos. La reacción se detuvo por el

Tabla IV: Fuente de oligosacariltransferasa de
 tripanosomátidos

		cpm en el sobrenadante de la partición
P 17.3	- péptido	710
	+ péptido	7220
P 100.0	- péptido	510
	+ péptido	6330

Las incubaciones de membranas de B. culicis con y sin péptido aceptor se llevaron a cabo por 15 minutos y fueron procesadas como se indica en Materiales y Métodos. En el sobrenadante de la partición cloroformo/metanol/agua (3:2:1) se encuentran los glicopéptidos formados y material contaminante del sustrato (ver texto) que da cuenta de la radioactividad medida cuando se incuba en ausencia del péptido.

P 17.3: pellet obtenido por centrifugación diferencial (ver Materiales y Métodos) a 17300 x g por 15 minutos

P 100.0: pellet obtenido por centrifugación diferencial (ver Materiales y Métodos) a 100000 x g por una hora.

agregado de cloroformo, metanol y agua en relación final 3:2:1. Se formaron tres fases, donde la fase superior acuosa contiene los glicopéptidos formados. Cuando se sometió la fase superior a electroforesis en ácido fórmico 5%, apareció un compuesto radioactivo móvil sólo cuando se agregó a la incubación el hexapéptido (Fig. 52). También se observó, en todos los casos, material radioactivo neutro (Fig.52). Estos compuestos neutros estuvieron presentes también cuando no se agregó el hexapéptido y la cantidad de compuestos neutros no tuvo relación con los tiempos de incubación empleados. Para cerciorarnos de que no se trataba de productos de degradación del sustrato oligosacarídico o del producto de reacción por acción de glucosidasas y/o manosidasas, el compuesto neutro fué, en todos los casos, eluido y sometido a cromatografía en solvente D. En este sistema, en las condiciones de corrida empleadas compuestos de mas de tres monosacáridos migran cerca del origen, mientras que manosa, glucosa y galactosa se separan y corren muy adelante en el papel. En ningún caso (incubaciones con membranas de tripanosomátidos, hígado de rata, S. cerevisiae o células F9) se encontró manosa ó glucosa radioactivos, por lo que se concluyó que los compuestos neutros son impurezas presentes en el sustrato (un ejemplo de cromatografía se observa en la Fig. 53).

El tratamiento de los glicopéptidos con Endo-H, resultó en la conversión total de la marca en un compuesto inmóvil en electroforesis en ácido fórmico 5% (Fig. 54). Este

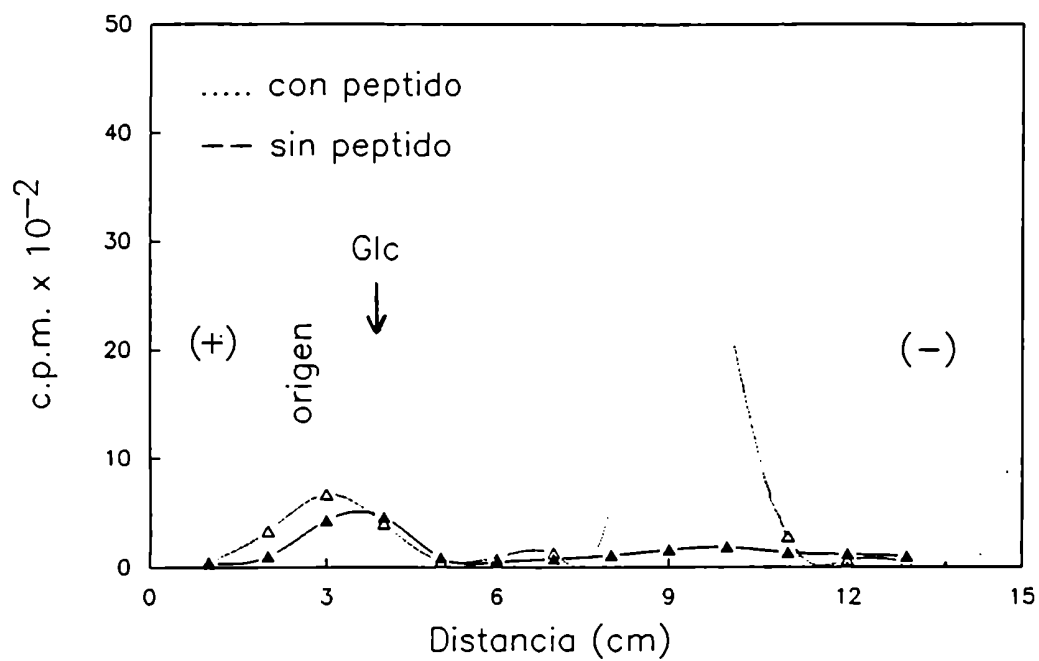


Fig. 52: Productos del ensayo de la oligosacariltransferasa.

El material hidrosoluble obtenido de incubaciones con membranas de B. culicis (según se indica en Materiales y Métodos, sección 3.IV.b.) se sometió a electroforesis en ácido fórmico 5%. Como patrón de neutralidad se usó glucosa (Glc).

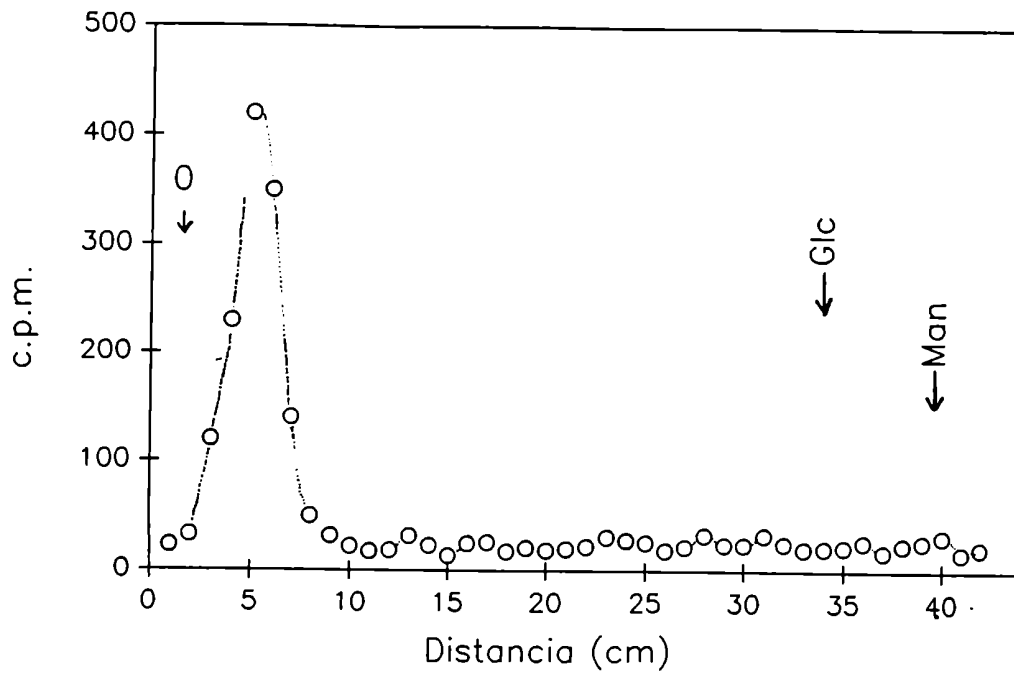


Fig. 53 Análisis de los compuestos neutros en electroforesis obtenidos por incubación con la oligosacariltransferasa.

Los compuestos neutros en electroforesis (como los de la Fig. 52) fueron eluidos y cromatografiados en solvente D.

Patrones: Man: manosa
Glc: glucosa

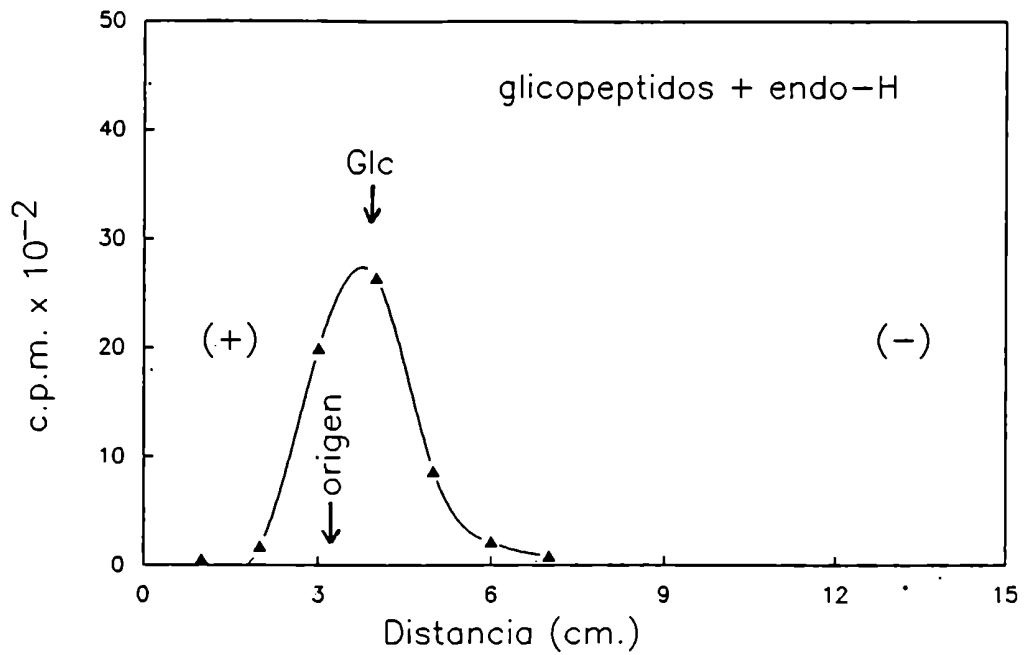


Fig. 54 Tratamiento de glicopéptidos con Endo-H.

Los compuestos móviles en electroforesis como los de la Fig. 52 fueron eluidos, digeridos con Endo-H y sometidos nuevamente a electroforesis en ácido fórmico 5%.

Patrón: Glc: glucosa.

fue en todos los casos eluido y sometido a cromatografía en papel en solvente A, del que se obtuvo el perfil de oligosacáridos transferidos.

Para recuperar el sustrato no reaccionante de la mezcla de incubación, se extrajo la interfase proteica de la partición cloroformo/metanol/agua (3:2:1) con cloroformo/metanol/agua (1:1:0.3) como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos fueron sometidos a hidrólisis ácida suave y partición cloroformo/metanol/agua 3:2:1, y de la fase superior se recuperaron los oligosacáridos no transferidos que se analizaron por cromatografía en papel en solvente A.

Es preciso destacar que, en las condiciones usadas, la incorporación de marca en los glicopéptidos fué proporcional al tiempo de incubación. En las Figs. 55 y 56 se observa la cinética de reacción de ensayos con membranas de T. cruzi y C. fasciculata. De acuerdo a las cinéticas obtenidas para cada organismo, se eligieron tiempos de incubación correspondientes a la porción lineal de la curva, donde la velocidad de reacción es máxima. Esto permite saber cuales oligosacáridos son transferidos con mayor eficiencia, es decir, cual es la especificidad de la oligosacariltransferasa por los oligosacáridos presentes en el sustrato.

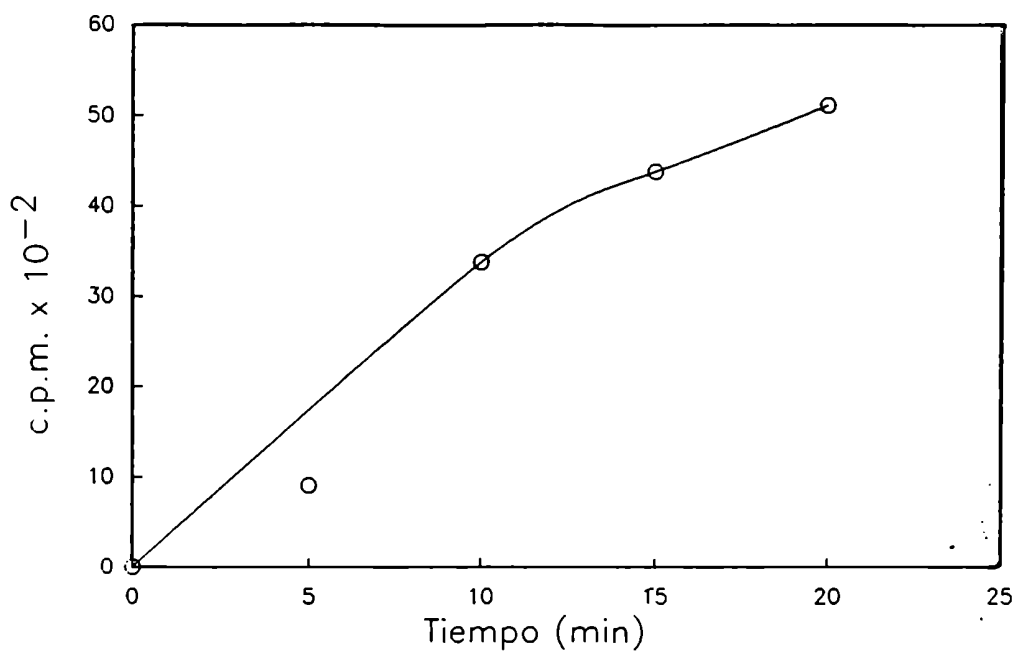


Fig. 55 Cinética de reacción de la oligosacariltransferasa de *T. cruzi*.

Los glicopéptidos obtenidos a diferentes tiempos (material móvil en electroforesis) fueron cuantificados según se indica en Materiales y Métodos. En ordenadas está representada la radioactividad incorporada al hexapeptido y en abscisas los tiempos de reacción.

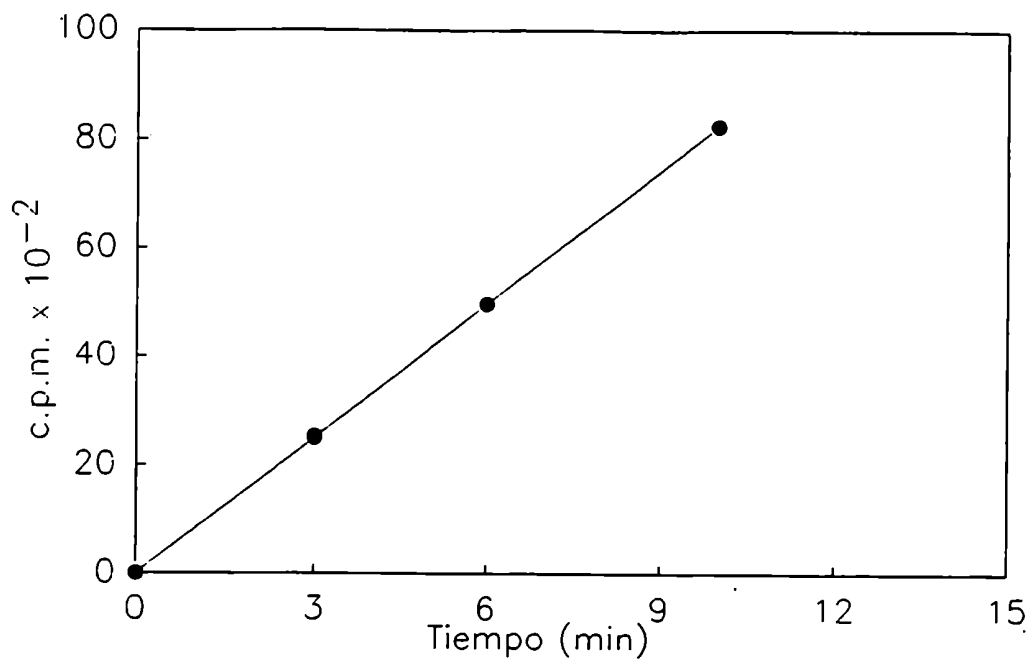


Fig. 56 Cinética de reacción de la oligosacariltransferasa de C. fasciculata.

Los glicopéptidos obtenidos a diferentes tiempos (material móvil en electroforesis) fueron cuantificados según se indica en Materiales y Métodos. En ordenadas está representada la radioactividad incorporada al hexapéptido y en abscisas los tiempos de reacción.

Especificidad de la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos:

El perfil de oligosacáridos transferidos por membranas de T. cruzi al hexapéptido en diez y veinte minutos de incubación se muestra en la Fig. 57, mientras que el perfil de oligosacáridos no transferidos (sustrato no reaccionante) en el mismo tiempo se muestra en la Fig. 58.

Se puede observar que ambos perfiles (oligosacáridos transferidos y no transferidos) son similares entre sí y similares al perfil de oligosacáridos presentes en el sustrato (Fig. 48). Esto significa que la oligosacariltransferasa de T. cruzi es capaz de transferir todos los oligosacáridos presentes en la mezcla de reacción con la misma eficiencia.

En las Figs. 59 y 60 se observan los perfiles de los oligosacáridos transferidos y no transferidos al péptido sintético por membranas de L. samueli a tiempos cortos según la cinética de reacción (no mostrada). En la Fig. 49 se observa el perfil de oligosacáridos presentes en el sustrato usado en estos ensayos.

Como puede observarse en las Figs. 59, 60 y 49, la oligosacariltransferasa de L. samueli presenta la misma inespecificidad frente al sustrato oligosacarídico que se observó en T. cruzi, demostrando que la inespecificidad no es exclusiva de tripanosomátidos digenéticos.

Cuando el ensayo se llevó a cabo con membranas de C. fasciculata se obtuvieron idénticos resultados. En las

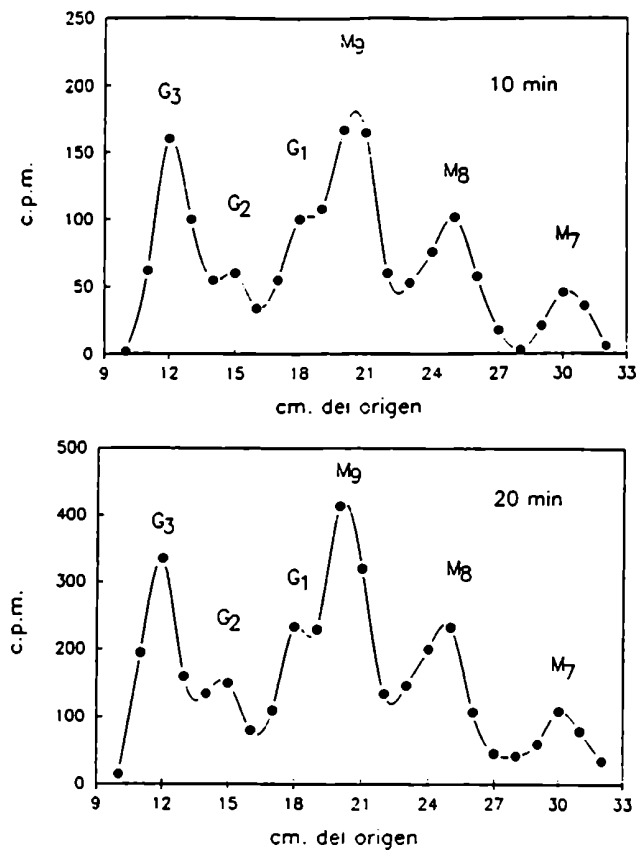


Fig. 57: Perfil de oligosacáridos transferidos por la oligosacariltransferasa de *T. cruzi*.

Los glicopéptidos formados por incubación con membranas de *T. cruzi* luego de diez y veinte minutos de incubación, fueron tratados con Endo-H y los oligosacáridos liberados fueron analizados por cromatografía en solvente A.

Patrones: igual a Fig. 48.

Nota: comparar el perfil obtenido con el del sustrato utilizado, Fig. 48.

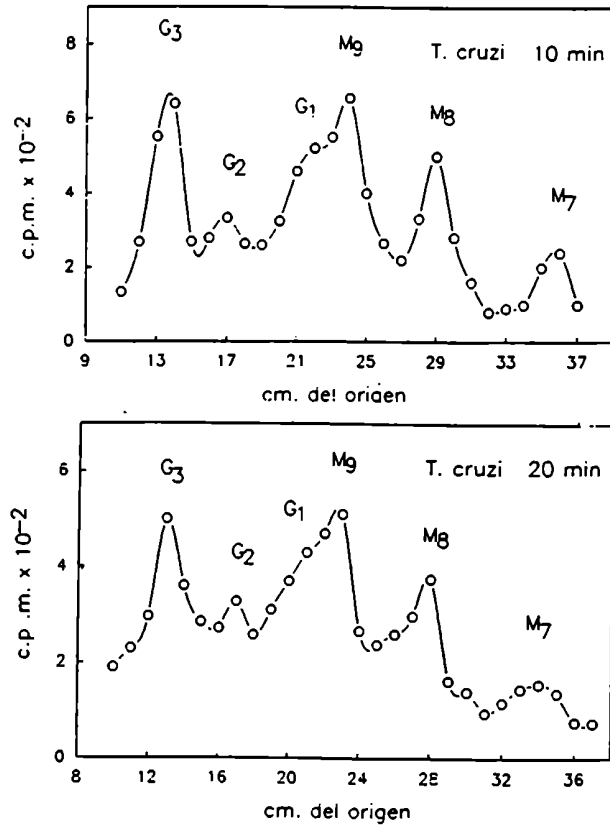


Fig. 5B: Perfil de oligosacáridos remanentes en la mezcla de reacción de la oligosacariltransferasa de T. cruzi.

Los Dol-P-P-oligosacáridos fueron extraídos luego de diez y veinte minutos de incubación, como se indica en Materiales y Métodos. Los oligosacáridos fueron escindidos por hidrólisis ácida suave y se analizaron por cromatografía en solvente A. Patrones: igual a Fig. 48. El perfil del sustrato original se muestra en la Fig. 48.

Figs. 61 y 62 se observa el perfil de oligosacáridos transferidos y no transferidos a tiempos cortos de incubación.

Estos resultados sugieren que la inespecificidad de la oligosacariltransferasa frente al sustrato oligosacárido es una característica de organismos de la familia Trypanosomatidae y es la responsable, junto con la ausencia de Dol-P-Glc en estas células y de ciertas manosiltransferasas dependientes de Dol-P-Man, de la transferencia a proteínas de oligosacáridos no glucosilados y con nueve o menos residuos manosa.

Si esto fuera así membranas de B. culicis, deberían transferir al péptido toda la serie de oligosacáridos presentes en la mezcla de incubación, aunque no esté presente en la misma el oligosacárido transferido "in vivo" por este parásito ($\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$). Como puede observarse en las Figs. 63 y 64, todos los oligosacáridos fueron transferidos con igual eficiencia al péptido aceptor por membranas de B. culicis, independientemente de su contenido en manosa y glucosa.

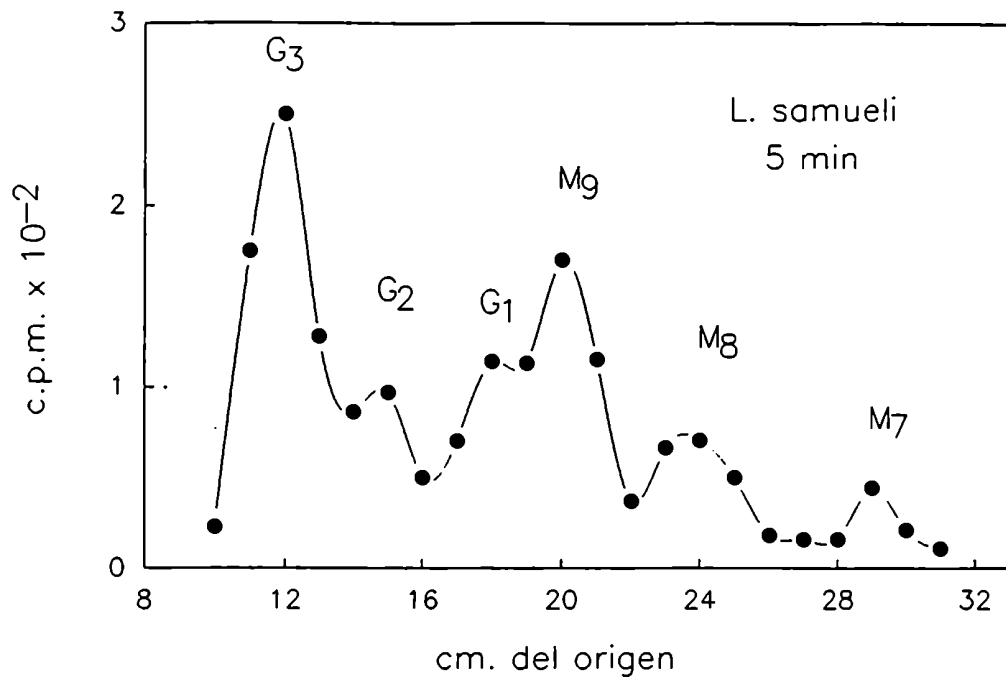


Fig. 59: Perfil de oligosacáridos transferidos por la oligosacaryltransferasa de *L. samueli*.

Los glicopéptidos obtenidos por incubación con membranas de *L. samueli* por cinco minutos, fueron tratados con Endo-H y los oligosacáridos liberados fueron analizados por cromatografía en solvente A. Patrones: igual a Fig. 48.

Nota: comparar el perfil obtenido con el del sustrato utilizado, Fig. 49.

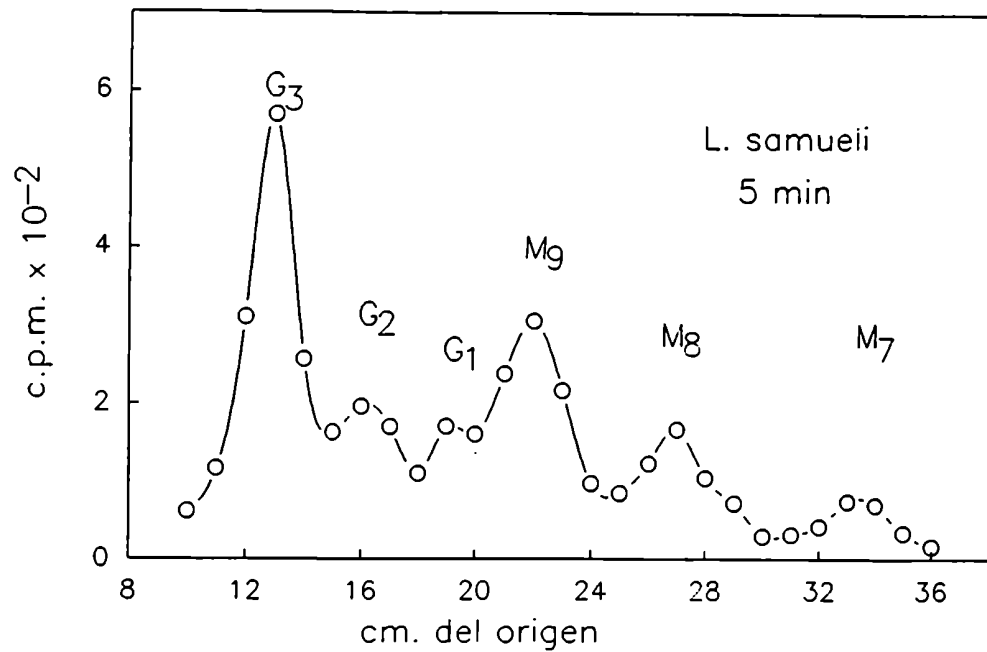


Fig. 60: Perfil de oligosacáridos no transferidos por la oligosacariltransferasa de L. samueli.

El sustrato no reaccionante luego de cinco minutos de incubación, se recuperó como se indica en Materiales y Métodos y se analizó por cromatografía en solvente A.

El perfil del sustrato original es el que se muestra en la Fig. 49.

Patrones: igual a Fig. 48.

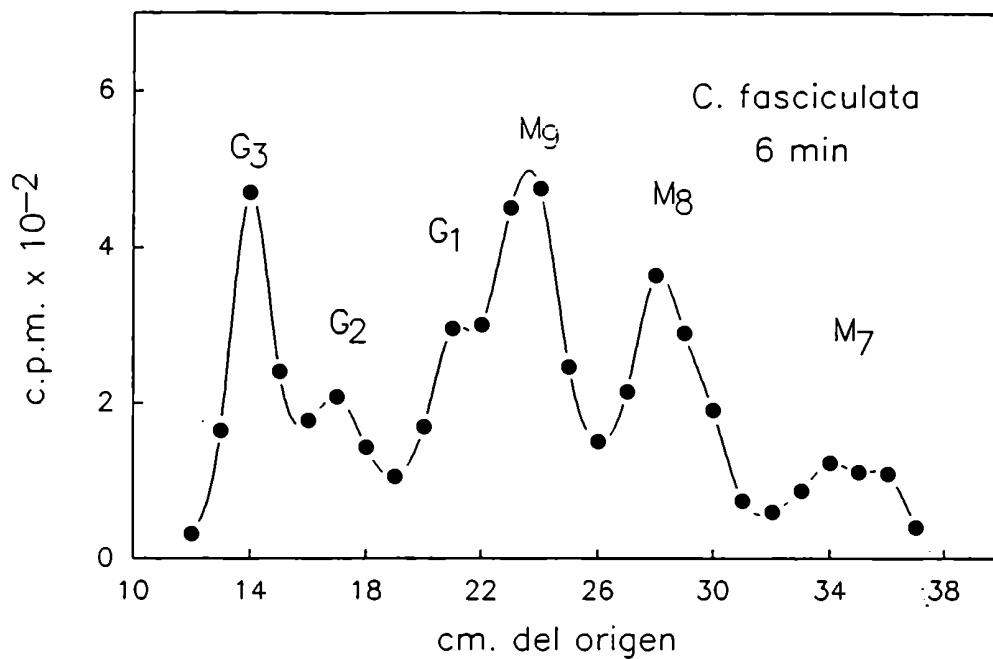


Fig. 61: Perfil de oligosacáridos transferidos a péptido por membranas de *C. fasciculata*.

Los glicopéptidos formados luego de seis minutos de incubación, fueron digeridos con Endo-H y los oligosacáridos analizados por cromatografía en solvente A.

Patrones: igual a Fig. 48. El perfil del sustrato empleado es el que se indica en la Fig. 48.

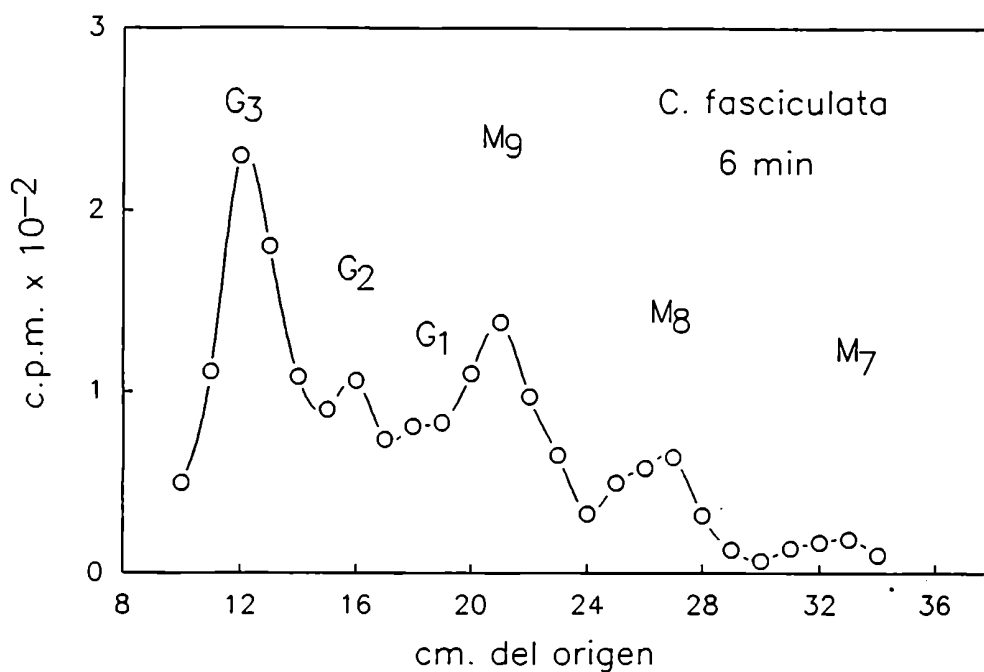


Fig. 62 Perfil de oligosacáridos no transferidos a péptido por membranas de C. fasciculata.

El sustrato remanente en la mezcla luego de seis minutos de incubación, fué extraído, sometido a hidrólisis ácida suave y los oligosacáridos liberados fueron analizados por cromatografía en solvente A.

Patrones: igual a Fig. 48. El perfil del sustrato original es el que se muestra en la Fig. 48.

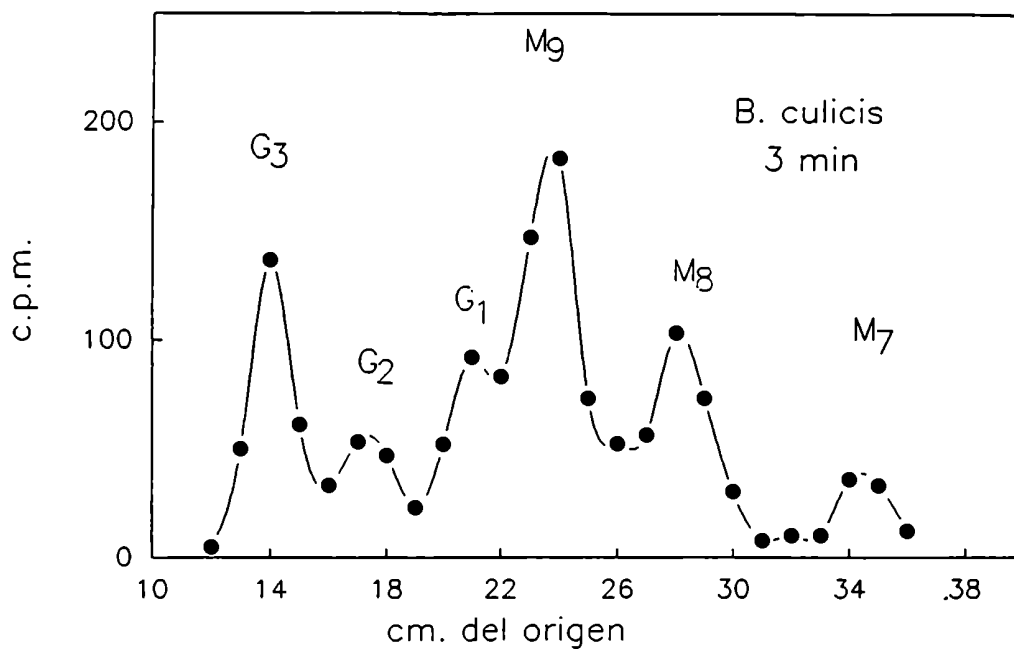


Fig. 48 Perfil de oligosacáridos transferidos por la oligosacariltransferasa de *B. culicis*.

Los glicopéptidos formados por incubación durante tres minutos con membranas de *B. culicis*, fueron digeridos con Endo-H y los oligosacáridos liberados analizados por cromatografía en solvente A. El perfil del sustrato utilizado es el que se muestra en la Fig. 48.

Patrones: igual a Fig. 48.

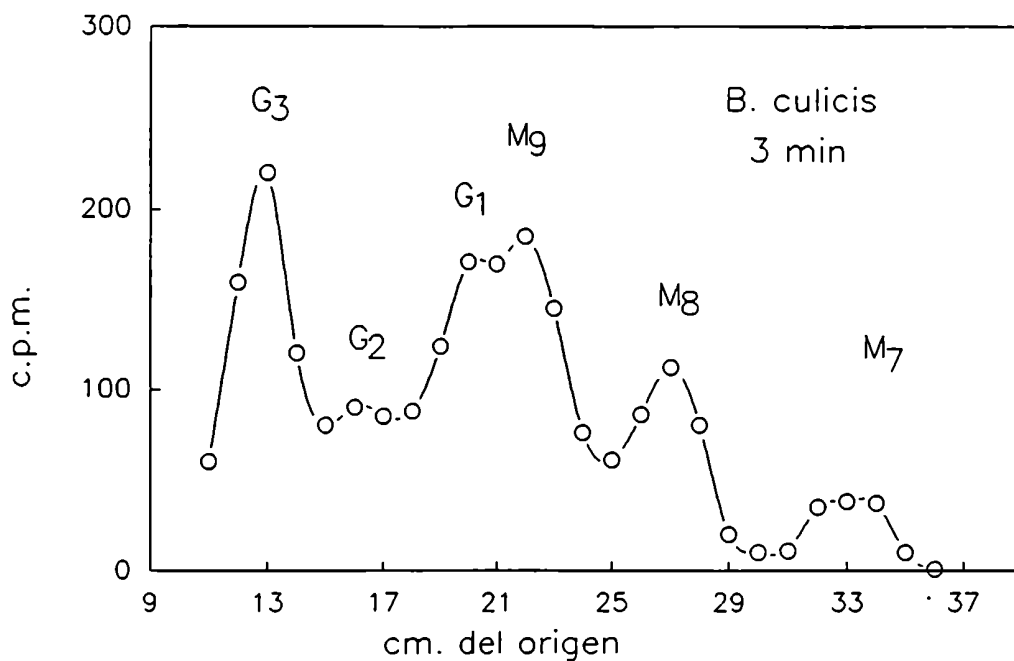


Fig. 64 Perfil de oligosacáridos remanentes en la mezcla de reacción de la oligosacariltransferasa de B. culicis.

El sustrato no transferido por membranas de B. culicis luego de tres minutos de incubación fué extraído y analizado como se indica en Materiales y Métodos.

Patrones: igual a Fig. 48. El perfil del sustrato original es el que se indica en la misma figura.

Oligosacariltransferasa de mamíferos y hongos:

Como control se llevaron a cabo incubaciones con membranas de hígado de rata y de S. cerevisiae. Como se muestra en las Figs. 65 y 67 en ambos casos el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ fue transferido preferentemente. Este desaparece de la mezcla del sustrato con el tiempo de incubación. Las alícuotas estudiadas correspondieron a tiempos de incubación en los cuales las incorporaciones al hexapéptido no fueron lineales respecto de los mismos (Figs. 66 y 68).

Esto no invalida las conclusiones obtenidas en el sentido de que el ensayo permite investigar la especificidad de las enzimas transferentes respecto de los oligosacáridos, además, aún en los tiempos de incubación analizados; (la incorporación llegaba a un valor constante), pudo observarse claramente la preferencia de la oligosacariltransferasa de mamíferos y hongos por el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, previamente observada.

Con estos resultados se confirma que la inespecificidad de la oligosacariltransferasa por el sustrato oligosacárido encontrada "in vitro" es característica de organismos de la familia Trypanosomatidae.

CONCLUSIONES:

El diseño experimental para estudiar "in vitro" la especificidad frente a oligosacáridos de distinta composición de la oligosacariltransferasa fué óptimo, por la claridad de los datos obtenidos y la simplicidad del trabajo en el

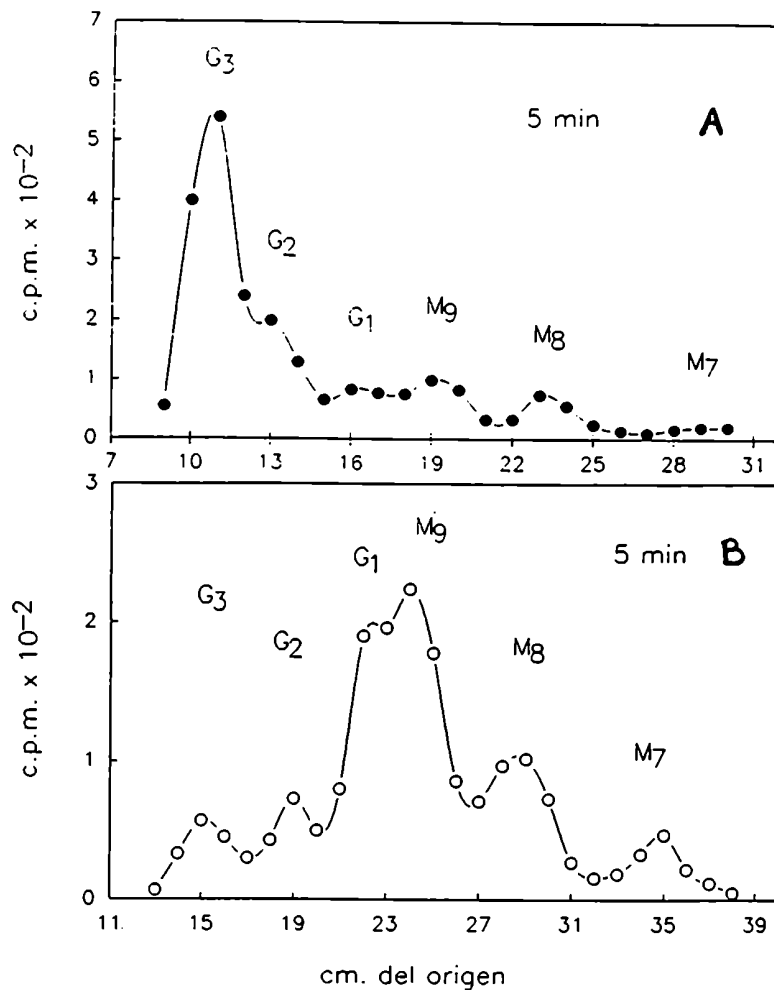


Fig 65 : Incubación con membranas de hígado de rata. Perfil de oligosacáridos transferidos (A) y no transferidos (B) a péptido.

Los oligosacáridos se obtuvieron en ambos casos como se indica en Materiales y Métodos (sección 3.IV.b).

Patrones: igual a Fig. 48. El perfil de oligosacáridos del sustrato original es el mostrado en la Fig. 49.

Nota: los perfiles mostrados corresponden a cinco minutos de incubación, tiempo en el que la cinética de reacción pierde linealidad como puede observarse en la Fig. 66.

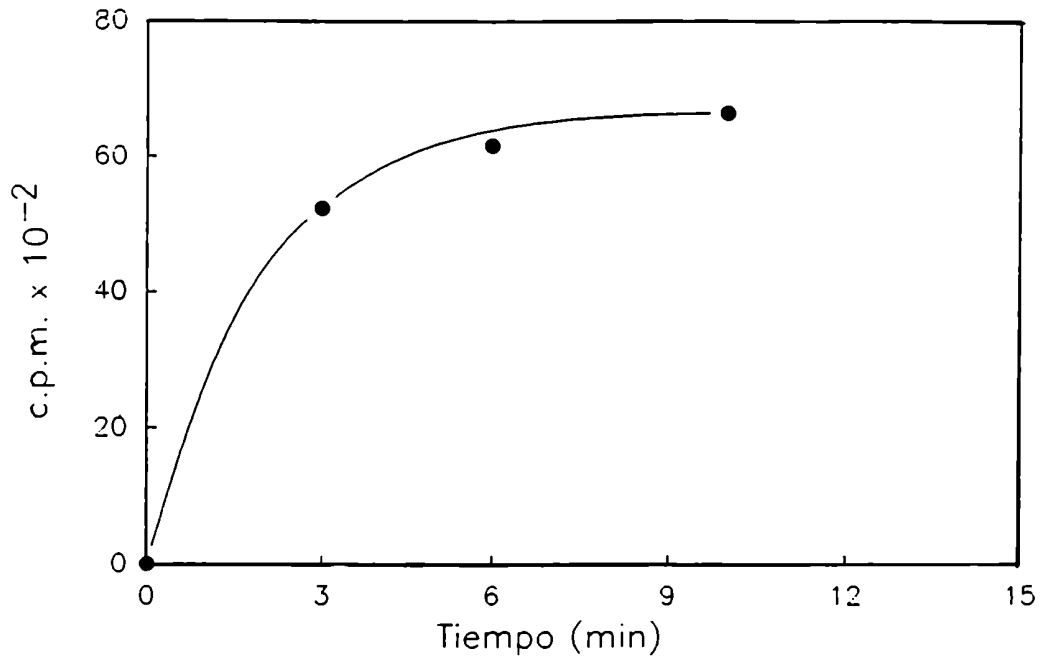
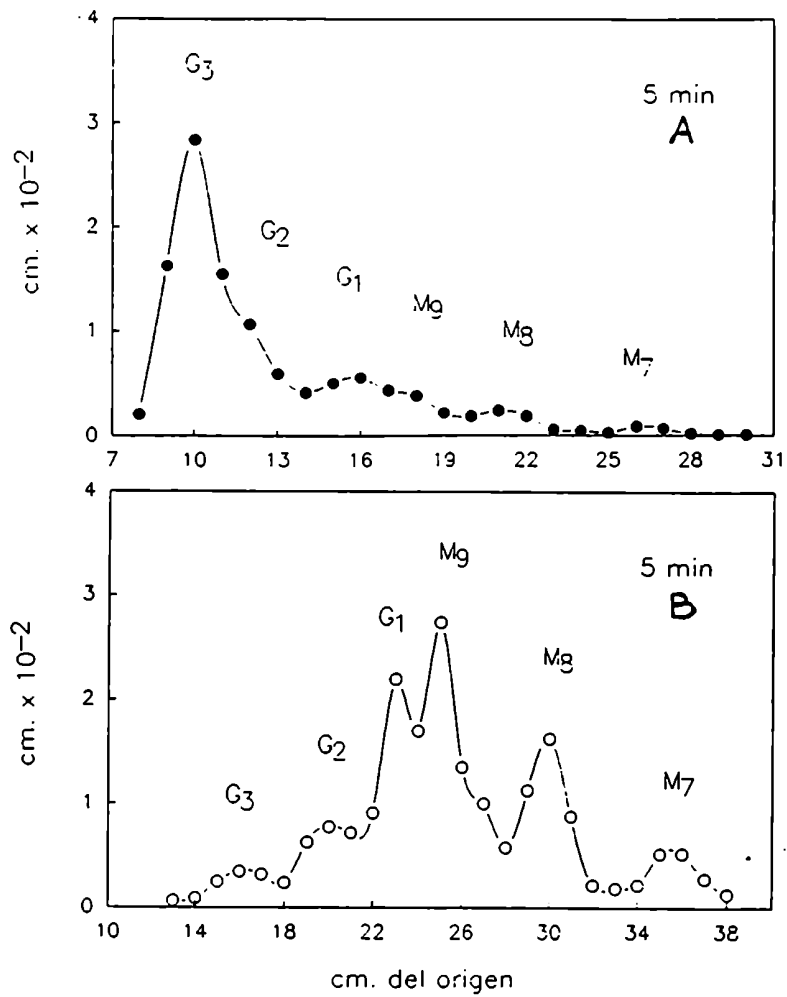


Fig. 66 Cinética de reacción de la oligosacariltransferasa de hígado de rata.

Los glicopéptidos obtenidos a diferentes tiempos de incubación (material móvil en electroforesis) fueron cuantificados según se indica en Materiales y Métodos.

En ordenadas está representada la radioactividad incorporada al hexapéptido y en abscisas los tiempos de reacción.



Figs. 67: Perfil de oligosacáridos transferidos (A) y no transferidos (B) por membranas de S. cerevisiae

Las incubaciones se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos, y los oligosacáridos se analizaron por cromatografía en solvente A. El perfil del sustrato original corresponde al mostrado en la Fig. 49.

Patrones: igual a Fig. 48.

Nota: los perfiles mostrados corresponden a incubaciones por tres minutos, tiempo al que la cinética comienza a perder linealidad, como puede observarse en la Fig. 68.

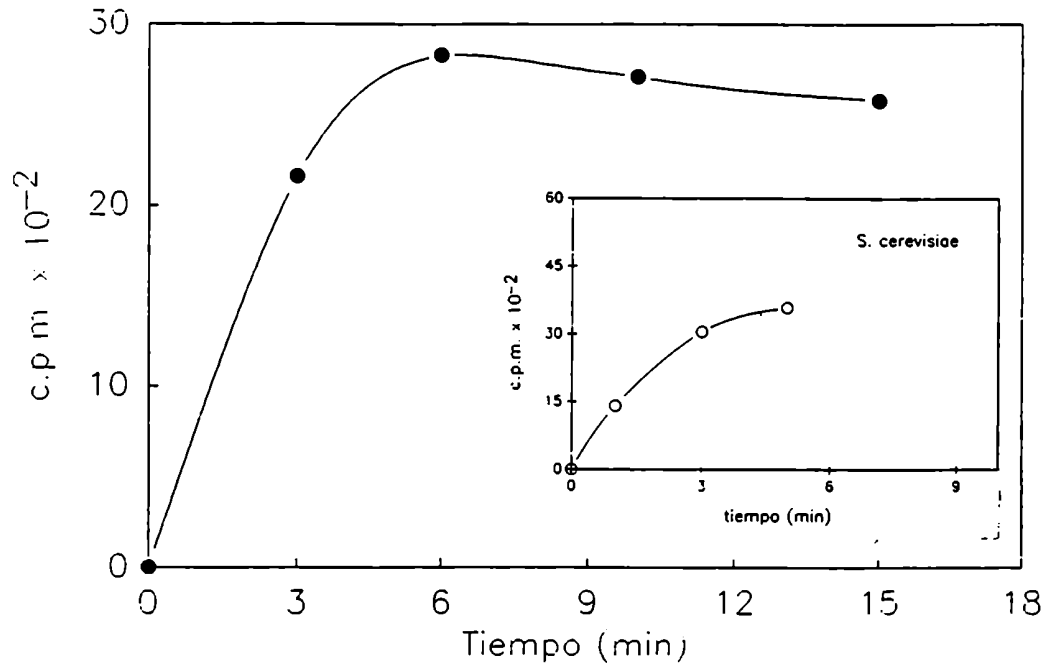


Fig. 6B Cinética de reacción de la oligosacariltransferasa de *S. cerevisiae*.

Los glicopéptidos obtenidos a diferentes tiempos de incubación (material móvil en electroforesis) fueron cuantificados según se indica en Materiales y Métodos.

En ordenadas está representada la radioactividad incorporada al hexapéptido y en abscisas los tiempos de reacción.

laboratorio. Es la primera vez que se comunican estudios "in vitro" de la enzima de tripanosomátidos.

Con este método se pudo estudiar la especificidad de la oligosacariltransferasa de éstos parásitos frente a una serie de oligosacáridos, y se demostró que la capacidad de transferir "in vivo" a proteínas, oligosacáridos no glucosilados, se debe a la falta de especificidad de la enzima involucrada en la transferencia. Por otro lado, organismos en los cuales la presencia de tres glucosas en el oligosacárido es fundamental para la transferencia del mismo "in vivo" a proteínas, mantienen la especificidad de su enzima "in vitro".

Estos experimentos llevados a cabo con sustratos heterólogos demuestran también, que la secuencia aminoacídica de la N-glicosilación es realmente universal, aunque experimentos con péptidos que lleven modificaciones de esta secuencia permitirían saber si existe una diferencia de especificidad frente al sequón de asparagina, entre la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos y la de otros eucariotes.

Según los resultados obtenidos sería de esperar que "in vivo", las oligosacariltransferasas de tripanosomátidos también transfieran distintos oligosacáridos a igual velocidad. Esto ha podido comprobarse en el caso de tripomastigotes y amastigotes en cultivo axénico de T. cruzi. En estas formas del parásito se encuentran dos oligosacáridos unidos a Dol-P-P: $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Luego de tiempos cortos de incubación de células con

$\{^{14}\text{Glc}\}$ glucosa (es decir cuando los oligosacáridos en las glicoproteínas aún no han sido procesados significativamente) se encontraron los mismos oligosacáridos unidos a proteína en proporción relativa similar a la existente en los derivados de Dol-P-P (75% el primero y 25% el segundo para el caso de amastigotes de cultivo axénico), (Engel y Parodi 1985, Doyle y col 1986). Además, la estructura del $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína luego de tiempos cortos de incubación resultó ser igual a la del mismo compuesto unido a Dol-P-P y distinta a la del $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ producido por procesamiento de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ luego de tiempos largos de incubación, lo que confirmó que $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ había sido transferido a partir de Dol-P-P y no producido por demanosilación de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ -proteína.

Esta inespecificidad de la enzima por el sustrato sugiere que el ciclo del dolicol debe estar muy bien sincronizado en estos organismos como para no enfrentar a la enzima una unidad "equivocada". En orden de hipotetizar uno puede suponer también que existe una compartimentalización en el retículo endoplásmico que separe espacialmente la oligosacariltransferasa de los oligosacáridos intermediarios para evitar "transferencias erróneas".

En otras células eucarióticas esta hipotética compartimentalización no sería necesaria ya que la oligosacariltransferasa está especialmente diseñada para

transferir en forma preferencial el producto final del ensamblado.

Se ha encontrado que células de mamíferos en condiciones de bajo contenido energético (ayuno de glucosa, interferencias en la fosforilación oxidativa, etc.) acumulan oligosacáridos unidos a Dol-P-P que no contienen residuos de glucosa y poseen un menor número de manosas que lo normal. Estos compuestos no son transferidos a proteínas posiblemente debido a la especificidad de la oligosacariltransferasa. Una situación similar en tripanosomátidos necesariamente llevaría, de no existir la hipotética compartimentalización, a la transferencia de todos los intermediarios acumulados. No es necesario, por lo tanto, que distintas formas morfológicas de T. cruzi tengan oligosacariltransferasas de especificidad distinta. Una misma enzima puede explicar la transferencia simultánea de dos oligosacáridos en ciertas formas parasitarias. Aparentemente variaciones en el nivel de ciertas manosiltransferasas dependientes de Dol-P-Man y/o de los precursores GDP-Man y/o Dol-P-Man, determinarían la acumulación de dos intermediarios (Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉ y Dol-P-P-GlcNAc₂Man₇) cuyos oligosacáridos son transferidos independientemente de su composición.

PARTE 2: Oligosacariltransferasa de células mamíferas indiferenciadas:

Por sucesivos pasajes de tejido embrional de ratón por testículo y peritoneo de ratones adultos histocompatibles, se pudo originar una serie de líneas celulares (Stevens 1970) de crecimiento anormal. Estos carcinomas embrionales se diferencian "in vivo" y en cultivo ("in vitro") en una amplia gama de tipos celulares. Sin embargo varias líneas pierden la capacidad de diferenciarse, y pueden ser propagadas en cultivo como las células "stem" (células indiferenciadas de alta velocidad de crecimiento que originan por diferenciación otros tipos celulares). Un ejemplo es la línea celular F9 (Bernstine y col 1973).

Una de las características de la superficie de células de carcinoma embrional de ratón es la presencia de oligosacáridos fucosilados de alto peso molecular que contienen un disacárido repetitivo, la lactosamina (Muramatsu y col 1978 y 1983).

Romero y Herscovics (1986a), estudiando la biosíntesis de este lactosaminoglicano en la línea F9, encontraron que un grupo de oligosacáridos en glicoproteínas se convertía a forma compleja en presencia de un inhibidor de glucosidasa I. Estudios mas finos demostraron la presencia de oligosacáridos marcados de composición $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ en proteínas, a tiempos muy cortos de incubación, junto con el oligosacárido normalmente

transferido por células de ratón, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Se encontró también que la estructura de $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ es la misma que la del intermediario metabólico de igual número de unidades del ciclo del dolicol, y difiere del $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ producto de deglucosilación y demanosilación del oligosacárido normalmente transferido, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Esto llevó a los autores a concluir que las células F9 transfieren a proteína oligosacáridos no glucosilados y con menos de nueve residuos de manosa (Romero y Herscovics 1986b).

Dado que células tipo normal de ratón transfieren el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ con alta especificidad, la pérdida de la diferenciación parecería estar acompañada de la pérdida de especificidad en la transferencia.

La característica mostrada por células F9 es semejante al comportamiento de células de amastigotes de cultivo axénico y tripomastigotes de *T. cruzi*, que transfieren "in vivo" a proteínas dos unidades oligosacarídicas diferentes a velocidades similares: $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$.

Se decidió estudiar, entonces la especificidad de la oligosacariltransferasa de células F9 frente a una serie de intermediarios del ciclo del dolicol, usando el modelo de incubación diseñado para membranas de tripanosomátidos.

RESULTADOS

Obtención de la fuente de enzima:

Células F9 se cultivaron "in vitro" según Romero y Herscovics 1986b; pero algunas modificaciones fueron introducidas para optimizar el sistema como se indica en Materiales y Métodos.

Las células, crecidas hasta confluencia, se lavaron, cosecharon y sometieron a ruptura con homogeneizador vidrio-Teflon en presencia de una solución de sacarosa con 2-mercaptoetanol y EDTA. El homogenato se sometió a una centrifugación diferencial y la fracción microsomal fué usada como fuente de enzima.

Ensayo enzimático:

Se ensayó la enzima según el protocolo desarrollado para membranas de tripanosomátidos.

En la Fig. 50 se muestra el perfil de oligosacáridos presentes en la mezcla parcialmente purificada de intermediarios del ciclo del dolicol obtenida a partir de oviducto de gallina que fué usada como sustrato.

La formación de glicopéptido en función del tiempo se muestra en la Fig. 69.

Glicopéptidos formados luego de 3, 6 y 10 minutos de incubación (Fig. 69) se eluyeron del papel, se trataron con Endo-H y el material neutro en una segunda electroforesis, fué analizado por cromatografía en papel en solvente A.

Como puede observarse en la Fig. 70 a, b y c $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ fué el oligosacárido principalmente transferido al péptido.

El perfil de oligosacáridos en el sustrato que no ha reaccionado se muestra en la Fig. 71 a, b y c, donde puede observarse la desaparición con el tiempo del compuesto $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ de la mezcla de incubación.

CONCLUSIONES:

La especificidad de la oligosacariltransferasa de células F9 por los oligosacáridos unidos a Dol-P-P fué, "in vitro", la misma que la de hígado de rata y S. cerevisiae.

Contrariamente a lo que esperábamos, no encontramos con nuestro sistema de ensayo, una similitud de especificidad con la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos. Además, Romero y Herscovics (1986b) encontraron sobre Dol-P-P en células F9, la serie completa de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, (que incluye especies aparentemente no transferidas como $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), en cantidades apreciables. Esto es diferente a lo encontrado en todas las especies de tripanosomátidos estudiados donde el oligosacárido transferido es el o los mas abundantes unidos a Dol-P-P. Si hubiera una similitud entre la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos y de células F9, el perfil de transferencia "in vivo" a proteínas en células F9 debería ser similar al perfil de oligosacáridos unidos a Dol-P-P.

Esto sugeriría que existe un factor desconocido que modifica la especificidad de la enzima de células F9 por los sustratos de la reacción.

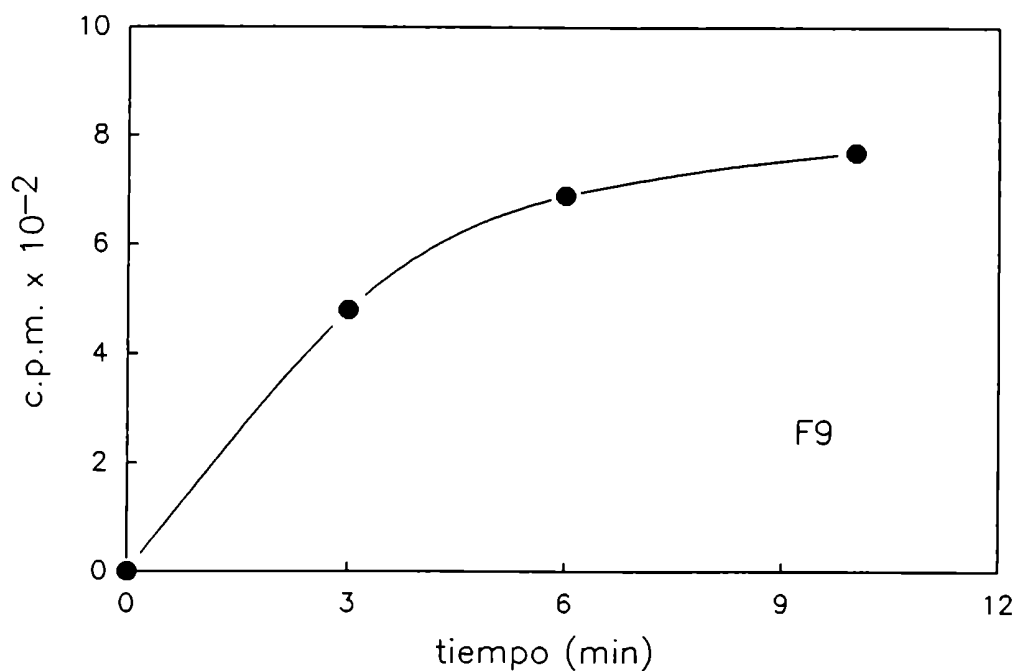


Fig 69: Cinética de reacción de la oligosacariltransferasa de células F9.

Los glicopéptidos obtenidos a diferentes tiempos de incubación con membranas de células F9 (material móvil en electroforesis) fueron cuantificados según se indica en Materiales y Métodos.

En ordenadas está representada la radioactividad incorporada al hexapéptido y en abscisas los tiempos de reacción.

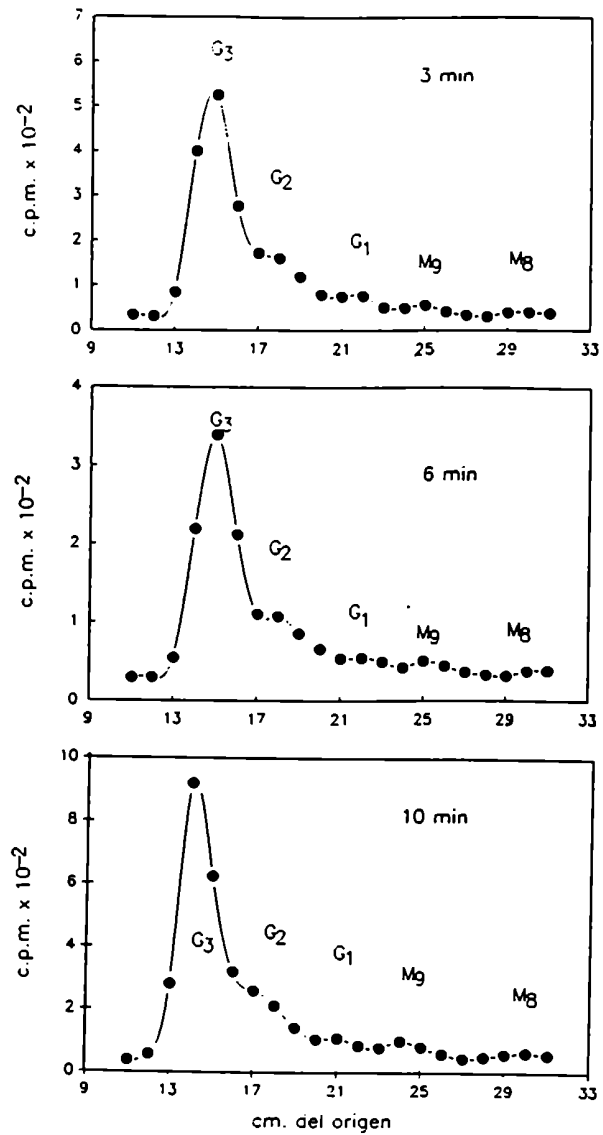


Fig. 70: Perfil de oligosacáridos transferidos por membranas de células F9.

Los glicopéptidos obtenidos a distintos tiempos de incubación fueron digeridos con Endo-H y los oligosacáridos liberados fueron analizados por cromatografía en solvente A. El perfil del sustrato utilizado se muestra en la Fig. 50. Patrones: igual a Fig. 48.

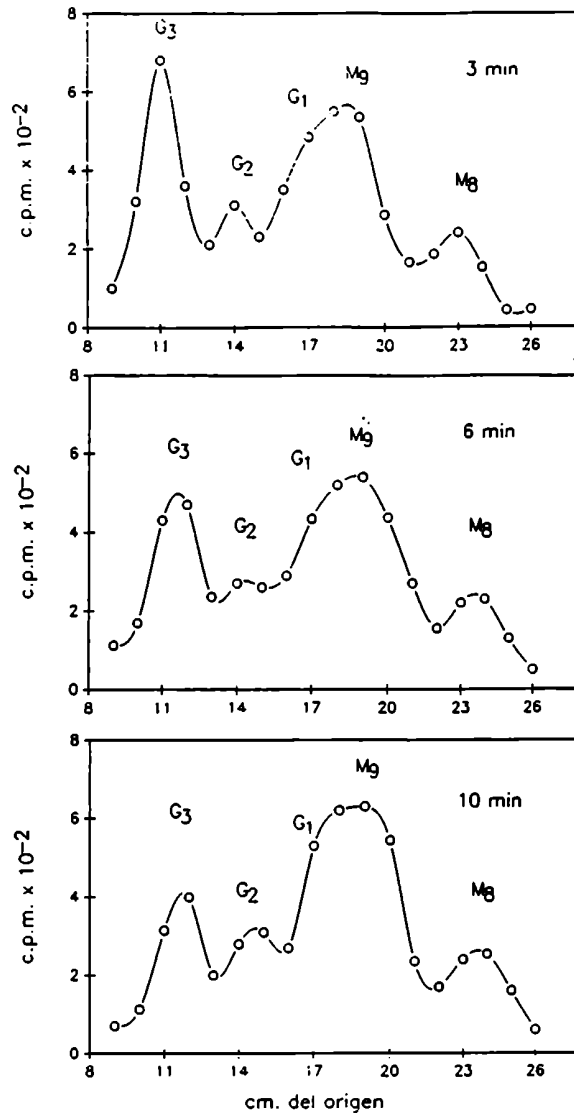


Fig. 71: Perfil de oligosacáridos no transferidos a distintos tiempos por membranas de células F9.

Los sustratos no reaccionantes fueron extraídos de las mezclas de incubación y los oligosacáridos fueron obtenidos del mismo por hidrólisis ácida suave. Los oligosacáridos se analizaron por cromatografía en solvente A. El perfil del sustrato original se muestra en la Fig. 50. Patrones: igual a Fig. 48.

APENDICE:

Cultivo de protozoarios:

Los protozoarios utilizados en esta tesis fueron cultivados en agitación en el medio indicado en Materiales y Métodos.

La rutina de mantenimiento consistía en repicar las células semanalmente en tubos con medio líquido, y una vez crecidas guardarlas en el cuarto frío. Estos cultivos eran usados como inóculo en el momento de iniciar un cultivo a mayor escala.

Con el tiempo la cepa de L. samueli fué perdiendo vigor, dando como resultado un crecimiento retardado y una menor densidad de células al llegar a la fase estacionaria. Esto último sugirió que debía faltar un factor de crecimiento necesario en el medio de cultivo.

Se probó el efecto de adición de caldos y extractos nutritivos. Surgió entonces una contaminación con levaduras en el medio de cultivo gracias a la cual se observó que cultivos contaminados crecían mas vigorosamente que cultivos puros, cualquiera fuese la adición de nutrientes al medio. Se adicionaron a los medios de cultivo concentraciones crecientes de extracto de levadura (del cual los medios originalmente carecen, (ver Materiales y Métodos) y se encontró que el crecimiento es óptimo a concentraciones mayores del 0.5%.

El agregado de extracto de levadura no favoreció,

sin embargo, el crecimiento de una cepa de C. fasciculata que había perdido casi totalmente su capacidad de duplicación. De los nutrientes probados el suero fetal bovino en concentración 1% final resultó ser el que efectuaba una recuperación de la cepa a los niveles originales de crecimiento. Se lo usó como "factor recuperador" de estas células.

Conservación de cepas:

Visto el riesgo que se corría de perder las cepas por accidentes de laboratorio se decidió indagar respecto de un método de conservación que permitiera mantener un stock de las mismas.

Se probó la congelación de células con el agregado de DMSO en nitrógeno líquido. Estas células no dieron lugar a cultivos cuando fueron descongeladas.

Se aplicó entonces una modificación del método de congelación aplicado a líneas celulares de origen animal.

Cultivos de parásitos monogenéticos en el medio apropiado, en fase exponencial tardía de crecimiento fueron llevados a 20% glicerol y 20% suero fetal bovino en esterilidad. Se llevaron a -70°C mediante un descenso lento de la temperatura (por ejemplo, pasaje por cámaras a 4°C , -20°C , -50°C sucesivamente). En estas condiciones los parásitos fueron mantenidos por meses. Al descongelarlos se los llevó a temperatura ambiente rápidamente y fueron capaces de iniciar cultivos con la misma cinética de crecimiento que tienen los cultivos que se repican del modo original (sin pasar por congelación).

Este método fué aplicado a todas las cepas de tripanosomátidos monogenéticos con las que se trabaja en el laboratorio, con óptimos resultados.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. MATERIALES

5.1.I. Material biológico:

5.1.I.a. Leptomonas samueli fué cedida por el Dr. Jaime Angluster (Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro).

5.1.I.b. Blastocrithidia culicis (ATCC 14806) fué cedida por el Dr Wanderley de Souza (Instituto de Biofísica, Universidad Federal de Rio de Janeiro)

5.1.I.c. Epimastigotes de Tripanosoma cruzi cepa Tulahuén stock 2, fueron gentilmente cedidos por el Dr Juan José Cazzulo (IIB, Fund Campomar, Buenos Aires).

5.1.I.d. Crithidia fasciculata (ATCC 11745) fué cedida por el Dr Juan José Cazzulo.

5.1.I.e. Gallinas ponedoras en 75%-80% pico de postura fueron donados por Cargill S.A.

5.1.I.f. Ratas Whistar de 250-300 gr para la preparación de enzimas de hígado se obtuvieron comercialmente.

5.1.I.g. Células F9 de teratoma murino fueron cedidas por el Dr Moshe Yaniv (Instituto Pasteur, Francia)

5.1.I.h. Células de Saccharomyces cerevisiae X-2180-1B fueron cedidas por el Dr Clinton Ballou (Universidad de California, Berkeley, California, U.S.A.)

5.1.II. Enzimas

Las enzimas comerciales se adquirieron según el ítem 1.IV. Las preparaciones de enzimas llevadas a cabo en el laboratorio se detallan en Métodos.

5.1.III. Material radioactivo:

$U-^{14}C$ Glucosa (284 Ci/mol) fué adquirido a New England Nuclear. UDP- (^{14}C) Glc (285 Ci/mol) y GDP- (^{14}C) Man (216.5 Ci/mol) fueron preparados según el método de Wright and Robbins (1965) con algunas modificaciones.

5.1.IV. Otros materiales:

Tosil-lisina clorometil cetona (TLCK), α manosidasa de poroto ("jack bean"), Endo- β -N-acetilglucosaminidasa : H (endo-H), proteasa tipo XIV de Streptomyces griseus, Dol-P grado III, manano y maltosa fueron de SIGMA (USA).

Extracto de levadura, extracto de hígado, infusión de cerebro y corazón, proteosa peptona, gelatina para uso microbiológico, y agar fueron adquiridos a DIFCO .

MEM aminoácidos (sin L-glutamina), MEM aminoácidos no esenciales, MEM solución de vitaminas fueron de GIBCO Labs.

Drogas para cultivo de células fueron de GIBCO Labs. (USA).

Material de plástico para cultivo de células fué de Falcon Lab. Ware (USA).

Suero fetal bovino se adquirió en Bioser (Argentina) y en Flow Laboratories (UK).

El papel para electroforesis y cromatografía fué en todos los casos Schleicher and Schüell 2043a. Las placas de vidrio usadas en TLC fueron silica gel 60 de Merck.

5.1.V. Buffers, solventes y soluciones:

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

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

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

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

E: benceno/acetona/agua/hidróxido de amonio
(50:200:1:1.35)

F: ácido fórmico 5% en agua.

G: 0.1M Na Molibdato, pH 5.0 .

Partición 3:2:1. Cloroformo/metanol/agua en relación
3:2:1.

1:1:0.3 cloroformo/metanol/agua en relación 1:1:0.3

Solución A: (para manipulación de células y fracciones subcelulares) 5mM 2-mercaptoetanol, 5mM NaEDTA pH 7.2, en 0.25 M sacarosa.

Solución de Marcación:

NaHCO ₃	40 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	10 mM
NaCl	85 mM
Na Piruvato	5 mM
Glutamina	2 mM
Solución de Vitaminas	1/100 vol/vol
Solución de aminoácidos no esenciales	1/100 vol/vol
Solución de aminoácidos esenciales	1/50 vol/vol

A la solución de marcación se le adiciona el compuesto radioactivo indicado en cada caso. La solución se agrega al material biológico a la temperatura fisiológica o de marcación.

5.1.VI. Medios de Cultivo:**Medio de cultivo para S. cerevisiae:**

Glucosa	2%
Bacto-peptona	2%
Extracto de Levadura	1%

5.1.VI. Medios de Cultivo:

Medio de cultivo para C. fasciculata y otros tripanosomátidos:

Infusión de hígado	5 gr/l	0.5%
Proteosa peptona	7.5 gr/l	0.75%
Infusión cerebro corazón	7.5 gr/l	0.75%
NaCl	5 gr/l	0.5%
KCl	5 gr/l	0.5%
NaH ₂ PO ₄	0.5 gr/l	0.05%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 gr/l	0.05%
Acido ascórbico	0.2 gr/l	0.02%
Sacarosa	2.5 gr/l	0.25%
Hemina	0.02 gr/l	
MOPS	0.5 gr/l	0.05%
pH final	6.7-7.2	

Se utilizó agua bidestilada y se esterilizó en autoclave.

Medio de cultivo para epimastigotes de T. cruzi:

Infusión cerebro corazón	33gr/l
Triptosa	3gr/l
Na ₂ HPO ₄	4gr/l
KCL	0.4gr/l
Hemina	0.02gr/l
Suero fetal bovino inactivado	10%final

El pH se ajustó a 7.2-7.4.

5.2. METODOS

5.2.I. Electroforesis:

Se llevó a cabo en todos los casos en papel a 25 V/cm por 120 min. Como refrigerante se usó varsol.

5.2.II. Cromatografía:

5.2.II.a. en papel: se desarrollaron en cubas de vidrio o de madera selladas, con los solventes A a D como se indica en cada caso.

5.2.II.b. en placa delgada: se desarrollaron en solvente E, en cubas de vidrio, en placas comerciales.

5.2.II.c. de filtración molecular en columna de Bio-Gel P-6 (120 x 1.25 cm). El solvente de corrida fue isopropanol 7% en agua.

5.2.II.d. de intercambio aniónico en columnas de DEAE-celulosa en forma acetato. El solvente fue cloroformo/metanol/agua (1:1:0.3) y el eluyente formiato de amonio en el mismo solvente. Las columnas se armaron y desarrollaron bajo presión positiva.

5.2.III. Determinación de radioactividad:

5.2.III.a. Para la determinación de radioactividad en cromatogramas y electroforogramas, los mismos fueron cortados en tiras de 0.5 ó 1 cm. Cada tira fue sumergida en

líquido de centelleo (0,5% 2,5 difeniloxazol, 0,025% 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil) benzeno en tolueno) y la radioactividad medida en un contador de centelleo líquido.

5.2.III.b. Para la determinación de compuestos acuosos (sobrenadantes de incubaciones, columnas de Biogel, etc) las fracciones fueron mezcladas con 3 volúmenes de líquido de centelleo descrito por Bray 1960, y medidas como en el caso anterior.

5.2.III. c. en el caso de medir proteínas en tejidos, estas se solubilizaron con 200 μ l de solubilizador de tejidos de New England Nuclear, Protosol (0.5 M, base fuerte en tolueno), se completó con solución de centelleo líquido (tolueno) y se neutralizó con 10 μ l de ácido acético glacial.

5.2.IV. Determinación de proteínas :

La cuantificación de proteínas en las muestras se realizó según el método de Lowry y col 1951, usando albúmina sérica bovina como patrón.

5.2.V. Tratamientos químicos:

5.2.V.a. Hidrólisis ácida: según Engel y PArodi 1985 ó Lederkremer 1985. Distintas condiciones se usaron para efectuar diferentes rupturas: 15 minutos a pH 2,2 (hidrólisis suave), 4 horas en 1 N ClH (hidrólisis ácida fuerte) y 150 minutos a pH 2,2 para liberar hexosas en configuración furanósica.

5.2.V.b. Permetilación:

Se llevó a cabo según el método de Hakomori 1964, y Li y col 1978.

5.2.V.c. Acetólisis:

Se empleó el procedimiento de Kocourek y Ballou 1969, con algunas modificaciones como describen Mendelzon y Parodi, 1986 y Engel y Parodi 1985.

5.2.VII. Tratamientos enzimáticos:

5.2.VII.a. Digestión con proteasa: Las muestras proteicas a digerir fueron suspendidas en buffer Tris-HCl 0.1M, pH 8.0,; 1mM final en CaCl₂. Se agregó una punta de espátula de proteasa comercial y se incubó a 37°C por 4 días, con agregados diarios de enzima en atmósfera de tolueno. La proteólisis fué detenida por calentamiento a 100°C durante 10 min y la mezcla de incubación se concentró. El sobrenadante fué sometido a cromatografía de filtración molecular en una columna de Bio-Gel P6. Las fracciones correspondientes a glicopéptidos de 3 a 20 unidades sacarídicas fueron tomadas juntas, concentradas y sometidas a electroforesis. La fracción que migró hacia el cátodo se llamó "glicopéptidos purificados".

5.2.VII.b. Digestión con Endo-H: Las muestras se disolvieron en 200 µl de buffer trietilamina-acetato 50mM pH 5.5 . Se agregaron 0.01 unidades de Endo-H comercial y se

incubó a 37°C durante 24 hs. La incubación se detuvo evaporando las muestras a sequedad en corriente de aire en un baño a 50°C.

5.2.VII.c. Digestión con α -manosidasas: como se describe en Lederkremer, 1985, Tesis doctoral.

5.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:

5.3.I. Obtención de oligosacáridos patrones :

5.3.I.a. La serie de oligosacáridos (^{14}C)Man₅- α GlcNAc se obtuvo a partir de glicoproteínas sintetizadas por cortes de oviducto de gallina incubadas con (U ^{14}C)glucosa (Parodi y col 1981). Las incubaciones se detuvieron llevando la mezcla a una partición 3:2:1. Las interfases delipidadas se digirieron con proteasa comercial y el producto fué purificado por una columna de filtración molecular seguida de una electroforesis en ácido fórmico 5 % en agua. Los compuestos que migraron se sometieron a digestión con Endo-H y nueva electroforesis, y del pico inmóvil en esta segunda electroforesis se obtuvieron los patrones indicados.

5.3.I.b. (^{14}C)Man₂, (^{14}C)Man₃, (^{14}C)Man₃GlcNAc, y (^{14}C)Man₄GlcNAc se obtuvieron por acetólisis controlada de (^{14}C)Man₅- α GlcNAc.

5.3.I.c. (glucosa- ^{14}C)Glc₁- β Man₇GlcNAc se obtuvieron por hidrólisis ácida suave de los derivados de Dol-P-P formados por incubación de microsomas de hígado de rata con UDP-(^{14}C)Glc como se indica en Parodi y col 1973. Los

oligosacáridos fueron tratados con Endo-H.

5.3.I.d. (glucosa- ^{14}C)Glc₁Man₄GlcNAc y (glucosa- ^{14}C)Glc₁Man₅GlcNAc se obtuvieron por digestión con α -manosidasa de (glucosa- ^{14}C)Glc₁Man₇₋₉GlcNAc obtenido por incubación de glicoproteínas de microsomas de hígado de rata incubadas con UDP-(^{14}C)Glc (Parodi y col 1984).

5.3.I.e. (^{14}C)ManGlcNAc se obtuvo por digestión exhaustiva de (^{14}C)Man₅₋₉GlcNAc con α -manosidasa.

5.3.I.f. 2,3,4,6-tetrametilmanosa, 3,4,6-trimetilmanosa, y 2,4-dimetilmanosa se obtuvieron por permetilación de (^{14}C)Man₉GlcNAc y de (^{14}C)manano de una cepa salvaje de S. cerevisiae (Parodi et al 1981).

5.3.I.g. La permetilación de galactosa libre seguida de hidrólisis ácida fuerte da dos sustancias con diferente migración en TLC en solvente E. El compuesto de mayor migración se identificó como 2,3,5,6-tetrametilgalactosa, ya que fué el único compuesto obtenido por permetilación de (^{14}C)Gal₁Man₆GlcNAc₂ de C. fasciculata, una sustancia en la cual la galactosa se encuentra en forma furanósica como demostraron Mendelzon y Parodi (1986). El compuesto mas lento se identificó como 2,3,4,6-tetrametilgalactosa porque migró igual que el tetrametilderivado obtenido por permetilación de Gal α (1-6)Gal α (1-6)Glc, un compuesto producido por hidrólisis ácida suave de estaquiosa, en la cual las galactosas están en forma piranósica. Se sabe que, una alta proporción de la forma furanósica está presente en soluciones básicas anhidras de galactosa, una condición empleada en la permetilación (Campbell y Bentley, 1972).

5.3.II.Obtención de sustratos

5.3.II.a. El hexapéptido utilizado como aceptor en los experimentos de transferencia fue sintetizado en el Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, Suecia. Para esto se utilizó un sintetizador de Applied Biosystems Modelo 430 A, con programas para química de tert-butiloxycarbonilo. El aminoácido del extremo C-terminal se acopló a una resina de benzidrilamina, que luego de ruptura por HF, produjo un péptido con el C-terminal amidado. El péptido se purificó por HPLC de fase reversa en una columna Nucleosil C₁₈ (10x250 mm) usando un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético.

5.3.II.b. Serie de Dol-P-P-oligosacáridos radioactivos, sustrato para las reacciones de transferencia:

Gallinas ponedoras, en un 75 a 80% del pico de postura, fueron sacrificadas. El oviducto se extrajo y las crestas se cortaron en trozos muy pequeños con tijera. Estos fueron lavados y suspendidos en la solución de marcación, que contenía 500 μ Ci de (U-¹⁴C)glucosa. Se incubaron los cortes por 3 ó 4 h con agitación a 37°C. Al cabo de este tiempo se agregaron cinco volúmenes de cloroformo/metanol (3:2). La interfase formada se sometió nuevamente a la partición y se lavó luego con agua tres veces. La interfase lavada se extrajo entonces con cloroformo/metanol/agua en relación 1:1:0.3, varias veces. Los

extractos se juntaron, secaron bajo flujo de nitrógeno, resuspendieron en un volumen pequeño (1-2 ml) de cloroformo/metanol/agua 1:1:0.3 y se aplicaron a una columna (5 x 0.5 cm) de DEAE celulosa, forma acetato armada y desarrollada a presión en el mismo solvente. La elución de los compuestos se llevó a cabo con 30mM formiato de amonio en cloroformo/metanol/agua 1:1:0.3. El eluido se llevó a seco, sometió a vacío para quitar el formiato de amonio remanente, y se resuspendió en el mismo solvente. Esto constituyó la mezcla de derivados de dolicol radioactivos, parcialmente purificada. Una alícuota se sometió a hidrólisis ácida suave seguida de cromatografía en papel en solvente A para analizar los oligosacáridos unidos a Dol-P-P presentes en el extracto.

5.3.III.a. Cultivo de microorganismos:

Los tripanosomátidos monogenéticos L. samueli, C. fasciculata y B. culicis fueron cultivadas en el medio líquido descrito por Bacchi y col 1974 (5.1.VI), salvo modificación aclarada en el anexo, en un agitador a 150-200 rpm y 28°C.

Trypanosoma cruzi cepa Tulahuén, stock 2, forma epimastigote, fué cultivado en medio líquido (5.1.VI) a 28°C, según se describe en Engel y Parodi 1985.

Saccharomyces cerevisiae se cultivó en el medio que se describe en 5.1.VI, en agitación (150-200 rpm) a 28°C.

5.3.III.b. Cultivo de células:

Células F9 de teratoma murino fueron cultivadas como se indica en Romero y Herscovics, 1986b, con algunas modificaciones. Se utilizó medio Dulbecco esencial modificado comercial (GIBCO) con el agregado de 4,5 gr/l de glucosa, 20% suero fetal bovino de origen nacional, 4mM glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µgr/ml de streptomina.

Se cultivaron en placas de plástico comerciales, de 100 mm de diámetro, a 37°C en estufa con atmosfera controlada. Se replaquearon cada tres días. Se eliminó el agregado de gelatina a las placas de cultivo utilizado por otros autores.

5.3.IV. Marcaciones "in vivo": obtención de glicoproteínas maduras marcadas de Leptomonas samueli:

Células de L. samueli cultivadas hasta fase exponencial tardía de crecimiento fueron cosechadas, lavadas tres veces y resuspendidas en dos volúmenes de solución de marcación.

Esta contuvo 300 a 500 µCi de (U-¹⁴C)glucosa por 0.5 a 1.0 gr de células. Al cabo de una hora de incubación a temperatura ambiente (28°C) y en agitación, la mezcla de incubación se diluyó diez veces con medio fresco conteniendo 10 mM glucosa fría. Al cabo de otros 60 minutos la incubación se detuvo por el agregado de cinco volúmenes de cloroformo/metanol (3:2). La interfase fue sometida a una segunda partición en cloroformo/metanol/agua (3:2:1), luego de la cual fué lavada con 5 ml de agua y extraída tres veces

con cloroformo/metanol/agua (1:1:03). El material remanente (interfase delipidada) fué sometido a una proteólisis exhaustiva seguida de filtración molecular en columnas de Biogel P6. Los glicopéptidos obtenidos, fueron sometidos a electroforesis y el compuesto móvil se eluyó y sometió a digestión con Endo-H. El producto de reacción se electroforetizó nuevamente en ese sistema y el compuesto que no migró fué eluido. (Los compuestos sensibles a la enzima pierden la porción aminoacídica y se vuelven neutros en el sistema de electroforesis en fórmico). Este se analizó en una cromatografía en papel en solvente A.

5.3.V. Obtención de preparaciones enzimáticas:

5.3.V.a. Microsomas de tripanosomátidos :

Cultivos en fase exponencial de crecimiento se cosecharon por centrifugación a 1000 x g y se lavaron dos veces con solución A. Se probaron varios métodos para efectuar la ruptura de las células y se eligió la ruptura en mortero con arena

Las células se rompieron en frío en presencia de TLCK, un inhibidor de proteasas; hasta que la mayor parte de las células estuvieron rotas (por visualización al microscopio optico). Se tomó el homogenato con solución A y se centrifugó a 1000 x g 5 min para retirar restos de células y de arena. El sobrenadante se centrifugó a 17500 x g por 15 min. El pellet se llamó fracción nuclear (aunque contiene también otras organelas) y el sobrenadante se

centrifugó a 100 000 x g por una hora. El pellet obtenido se llamó fracción microsomal. Ambas fracciones (nuclear y microsomal) fueron resuspendidas en solución A hasta una concentración de proteínas de 30-60 mgr/ml y homogeneizadas en un homogeneizador vidrio-Teflon. Se usó en cada caso la fracción que presentó mayor actividad enzimática.

5.3.V.b. Membranas totales de células F9:

Células cultivadas hasta casi confluencia, se pusieron en frío, se les retiró el medio de cultivo y se las lavó con buffer fosfato salino con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este buffer contiene 14 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.14 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM CaCl_2 y 0.1 mM MgCl_2 , pH 7.0-7.2.

Las células se despegaron de la placa mecánicamente, se suspendieron en solución A y se congelaron a -20°C . Cuando se tuvo una cantidad considerable se descongelaron y rompieron por 20 pasajes por homogeneizador vidrio-Teflon. El homogenato se centrifugó a 1000 x g durante diez minutos y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100000 x g una hora. El precipitado obtenido se resuspendió en solución A hasta una concentración final de proteínas de 40-50 mgr/ml, y se usó como fuente de enzima.

5.3.V.c. Membranas de *Saccharomyces cerevisiae*:

Cultivos de levaduras fueron cosechados en fase logarítmica de crecimiento y lavados tres veces con agua destilada. Las células fueron molidas en un mortero con siete veces su peso húmedo de arena, en frío por diez minutos. Luego fueron resuspendidas en diez volúmenes de solución A y la suspensión fué centrifugada a $700 \times g$ 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a $100000 \times g$ por una hora y el pellet obtenido se resuspendió en solución A hasta una concentración de proteínas entre 30 y 60 mg por ml. La suspensión de membranas se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio-Teflon y se usó como preparación enzimática.

5.3.V.d. Preparaciones enzimáticas a partir de hígado de rata:

Hígados de rata recién sacrificadas se trozaron con tijeras, se lavaron con solución A y se suspendieron en 1.5 su peso en solución A. A partir de aquí todos los pasos se realizaron en frío. La suspensión se sometió a un desintegrador Omnimixer y el homogenato obtenido se pasó varias veces por un homogeneizador de vidrio-Teflon. Luego se sometió a una centrifugación diferencial a $3000 \times g$ 5 min; $17500 \times g$ 15 min y $100\ 000 \times g$ 60 min. El pellet de la última centrifugación se resuspendió en solución A hasta una concentración de 20 a 40 mg de proteínas/ml y se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio-Teflon. Esta

preparación, fué utilizada en los ensayos de oligosacariltransferasa y de biosíntesis de Dol-P-P derivados.

5.3.VI. Incubaciones "in vitro":

5.3.VI.a. Síntesis de Dol-P-monosacáridos

Las mezclas de incubación contuvieron en un volumen total de 50 μ l, 0.6% de Tritón X-100, 50 mM buffer Tris maleato pH 7.6, 10mM MgCl₂, 12 mM 5' AMP, 0.4-0.9 mgr de proteína de membrana, diferentes concentraciones de Dol-P de hígado y 9 μ M UDP-(¹⁴C)Glc ó GDP-(¹⁴C)Man. En todos los casos se agregó primero el Dol-P, que fué llevado a seco bajo flujo de nitrógeno y luego resuspendido en el detergente. A continuación se agregaron el resto de los reactivos. Las incubaciones se realizaron a 28°C por cinco o diez minutos. Las reacciones se detuvieron llevandolas a una partición cloroformo/metanol/agua (3:2:1) y las fases inferiores, que contienen los Dol-P derivados, se lavaron tres veces con 0.5 ml de cloroformo:metanol:agua en relación 1:16:16.

Para determinar la cantidad de nucleotidoazúcar remanente al final de la incubación, se tomó una porción de la fase superior, se midió radiactividad y una porción equivalente se sometió a cromatografía en 1M ácido acético:1M acetato de amonio pH 7.4:etanol (26:4:75), en presencia de patrones (UDP-Glc, Glc-6-P, glucosa).

5.3.VI.b. Ensayo de la oligosacariltransferasa.

Los ensayos contuvieron 15000 cpm de un sustrato lipídico obtenido como se indica en el ítem 5.3.II.b. Este se llevó a seco bajo flujo de nitrógeno. Se agregaron 0.2 mg de proteína en membrana, 10 mM de péptido aceptor, 10 mM $MnCl_2$, 100 mM buffer Tris-maleato pH 7.6, 0.3 a 0.6 % Tritón X-100 (según la preparación enzimática). El volumen final fue 50 μ l. Las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-22 °C) por el tiempo indicado en cada caso, se frenaron por adición de un volumen de metanol, se dejaron en hielo por 30 minutos y se centrifugaron. Los glicopéptidos se encuentran en el sobrenadante (metanol 50%) mientras que las membranas son precipitadas en el solvente. El precipitado se lavó una vez con metanol/agua 1:1 y los sobrenadantes se juntaron.

Con este ensayo se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla IV, y se probaron el tipo y concentración de detergente, la incorporación a proteínas endógenas y las condiciones de ensayo.

Cuando se midió incorporación a proteínas endógenas el pellet metanólico se llevó a 10% TCA, se calentó a 100 °C y se recentrifugó. (Con este tratamiento se rompe el lípido-oligosacárido sustrato y los oligosacáridos liberados pasan al sobrenadante). En el pellet se midió radioactividad incorporada.

Los ensayos para cuantificar y analizar los oligosacáridos transferidos al péptido contuvieron en todos los casos 15000 cpm de lípido intermediario (5.3.II.b. llevados a seco bajo flujo de nitrógeno), 50 mM buffer Tris-maleato pH 7.6, 10 mM $MnCl_2$, 0.3 a 0.6% Tritón X-100, 2 mM hexapéptido y 0.5-1.0 mg proteína en membrana, en un volumen de 50 μ l. Las incubaciones se llevaron a cabo como en el ítem anterior pero se detuvieron llevandolas a una partición cloroformo/metanol/agua (3:2:1) De la fase superior de la misma se recuperaron los glicopéptidos y de la interfase proteica el sustrato no reaccionante, por extracción con cloroformo/metanol/agua en relación 1:1:0.3.

Cuando se incubaron membranas de S. cerevisiae e hígado de rata se agregaron a la mezcla de incubación 6 mM kojibiosa, 10 mM maltosa y 15 mg/ml de manano para inhibir las glucosidasas y manosidasas del procesamiento, que pueden estar presentes en las membranas. Experimentos posteriores demostraron que esto no era necesario.

BIBLIOGRAFIA:

- Abeijon, C. and Hirshberg, C. (1987)** J. Biol. Chem. 262, 4153-4159.
- Abeijon, C. and Hirschberg, C. (1988)** Proc. Natl. Acad. Sci USA 85, 1010-1014).
- Allen, C.; Kalin, J.; Sack, J. and Verizzo, D. (1978)**, Biochemistry, 17, 5020-5026.
- Andrews, N.; Katzin, A. and Colli, W. (1984)** Eur. J. Biochem. 140, 599-604.
- Arruda, M.; Colli, W. and Zingales B. (1989)** Eur. J. Biochem. 182, 413-421.
- Aubert, J.; Biserte, G. and Loucheux-Lefebvre, M. (1976)**, Arch. Biochem. Biophys., 175, 410-418.
- Aubert, J.; Chiroutre, M.; Kerckaert, J.; Helbecque, N. and Loucheux Lefebvre, M. (1982)** Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 1550-1559.
- Bacchi, C.; Lambros, C.; Goldberg, B.; Hutner, S. and de Carvalho, G. (1974)** Antimicrob. Agents Chemother. 6, 785-790.
- Babczynski, P. and Tanner, W. (1973)** Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1119-1124.
- Ballou; Gopal, P.; Krummel, B.; Tammi, M. and Ballou, K. (1986)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3081-3085.
- Bause, E.; (1983).** Biochem. J. 209, 331-336.
- Bause, E. (1984)** Biochem. Soc. Trans. 12, 514-517.
- Bause, E.; Hettkamp, H.; and Legler, G. (1982)** Biochem. J. (1982) 203, 761-768.

- Bause, E. and Legler, G. (1981) *Biochem. J.* 195, 639-644.
- Behrens, N.; Parodi, A. and Leloir, L. (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2857-2860.
- Behrens, N.; Carminatti, H.; Staneloni, R.; Leloir, L. and Cantarella, A. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3390-3394.
- Bernstine, E.; Hooper, M.; Grandchamp, S. and Ephrussi, B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 70, 3899-3903.
- Beyer, T.; Sadler, J.; Rearick, J.; Paulson, J. and Hill, R. (1981) *Adv. Enzimol.* 52, 23-175.
- Bischoff, and Kornfeld, S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7907-7910.
- Bosch, M.; Trombetta, S. and Parodi, A. (1988a) *Biochem. Soc. Transac.* 16, 268-271.
- Bosch, M.; Trombetta, S.; Engstrom, U. and Parodi, A. (1988b) *J. Biol. Chem.* 263, 1760-1765.
- Burton, M.; Scher, M. and Waechter, C. (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 7129-7136.
- Buttler, W. and Cunningham, L. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 3882-3886.
- Campbell, L. and Bentley, R. (1972) in *Carbohydrates in Solution* (Isbell, H. Ed.) pp 1-19, ACS Symposium Series 117, American Chemical Society, Washington DC.
- Carey, D.; Sommer, L. and Hirschberg, C. (1980), *Cell*, 19, 597-605.
- Cazzulo, J. and Franke de Cazzulo, B. (1982) *Experientia* 38, 1335-1337.
- Chalifour, R. and Spiro, R. (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 15673-

15680.

Chapman, A.; Li, E. and Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10243-10249.

Chapman, A.; Trowbridge, L.; Hyman, R. and Kornfeld, S. (1979), Cell 17, 509-515.

Chojnacki, T. and Dallner, G. (1988) Biochem. J., 251, 1-9.

Das, R. and Heath, E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3811-3815.

Datema, R. and Schwarz, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11191-11198.

De la Canal, L. and Parodi, A. (1987) J. Biol. Chem. 262, 11128-11133.

De Lederkremer, R. Casal, O. Couto, A and Colli, W. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 539-542.

de Ropp, J.; and Troy, F. (1985) J. Biol. Chem., 260, 15669-15674.

de Ropp, J.; Knudsen, M.; and Troy, F. (1987) Chem. Scr. 27, 95-100.

De Vries, A.; Vandenheede, J. and Feeney, R. (1971) J. Biol. Chem., 246, 305-308.

Doyle, P.; de la Canal, L.; Engel, J. and Parodi, A. (1986) Mol. Biochem. Parasitol. 21, 93-101.

Elhammer, A. and Kornfeld, S. (1986), J. Biol. Chem. 261, 5249-5255.

Engel, J.C. and Parodi, A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 10105-10110.

Feizi, T; Kabat, E.; Vicari, G.; Anderson, B. and Marsh, W. (1971) J. of Immunol., 106, 1578.

- Fergusson, M. Low, M. and Cross, G. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14547-14555.
- Fergusson, M. and Williams, A., (1988), *Ann. Rev. Biochem.* 57, 285-320.
- Franc, J.; and Bouchilloux, S. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, (1984), 800, 166-170.
- Garcia-Trejo, A. Haddock, J. Chittenden, G. and Baddiley, J. (1971) *Biochem. J.* 122, 49-57.
- Geetha-Habbib, M.; Campbell, S. and Schwartz, N. (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 7300-7310.
- Geetha-Habib, M.; Noiva, R; Kaplan, H.; and Lennarz, W. (1988). *Cell*, 54, 1053-1060.
- Green, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9039-9042.
- Griffiths, G.; Quinn, P. and Warren, G. (1983) *J. Cell Biol.* 96, 835-850.
- Grinna, L. and Robbins, P (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 8814-8818.
- Gruner, S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 3665-3669.
- Hakomori, S. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 205-208.
- Hallgren, P.; Lindblad, A. and Svensson, S. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 5312.
- Hannover, J. and Lennarz, W. (1978) *J. Biol. Chem.*, 254, 9237-9246.
- Hannover, J. and Lennarz, W. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 2787-2794.
- Harpaz, N. and Schachter, H. (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 6633-6639.
- Hart G.; Holt, G. and Haltiwanger, R. (1988), *Tibs*, 13. 380-384.

- Hart, G.; Haltiwanger, R.; Holt, G. and Kelly, W. (1989) Ann. Rev. Biochem., 58, 841-874.
- Haselbeck, A. and Tanner, W. (1983) FEBS Lett., 158, 335-338.
- Hemming, F. (1983), in Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, (Potter and Spurgeon Eds) vol 2 PP 305-354, John Wiley, New York.
- Hirschberg, C. and Snider, M. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, 63-87.
- Hoffman, H.; Schwartz, N.; Roden, L. and Prockop, D. (1984), Connect. Tissue Res. 12, 151-163.
- Holt, G. and Hart, G (1986), J. Biol. Chem., 261, 8049-8057.
- Hsieh, P.; Rosner, M. and Robbins, P. (1983) J. Biol. Chem. 258, 2555-2561.
- Hubbard, S. and Ivatt, R. (1981), Ann. Rev. Biochem., 50, 555-583.
- Huffaker, T. and Robbins, P. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7466-7470.
- Ishihara, H. and Heath, E. (1968), J. Biol. Chem., 243, 1110-1117.
- Jackson and Tjian, (1988) Cell, 55, 125-133.
- Kaplan, H.; Naider, F.; and Lennarz, W. (1988). J. Biol. Chem., 263, 7814-7820.
- Katzin, A. and Colli, W. (1983) Biochim. Biophys. Acta 727, 403-411.
- Kobata, A. (1979) Anal. Biochem. 100, 1-14.
- Kocourek, J. and Ballou, C. (1969) J. Bacteriol. 100, 1175-1181.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985), Ann. Rev. Biochem., 54, 631-634.

- Lai, C. and Schutzbach, J. (1984), FEBS Lett., 169, 279-282.
- Lamport, D. (1969), Biochemistry 8, 1155-1156.
- Lang, L.; Reitman, M.; Tang, J. Roberts, R. and Kornfeld, S. (1984) J. Biol. Chem. 259, 14663-14671.
- Lederkremer, G. (1985) Biosíntesis de Glicoproteínas en Mucor rouxii. Tesis Doctoral FCEN, UBA.
- Lederkremer, G. and Parodi, A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12514-12518.
- Lederkremer G. and Parodi A. (1986) Biochim. Biophys. Acta 884, 363-369.
- Lehle, L.; and Bause, E.; (1984). Biochim. Biophys. Acta 799, 246-251.
- Li, E.; Tabas, I. and Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7762-7770.
- Lindhal, J. and Roden, L. (1966) J. Biol. Chem., 241, 2113-2117.
- Louchex-Lefebvre, M.; Aubert, J. and Lolle's, P. (1978), Biophys, J. 23, 323-336.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Mendelzon, D. and Parodi, A. (1986) J. Biol. Chem. 261, 2129-2133.
- Mendelzon, D.; Previato, J. and Parodi, A. (1986) Mol. Biochem. Parasitol. 18, 355-367.
- Mendonca-Previato, L. Gorin, P. and Previato, J. (1979) Biochemistry, 18, 149-154.
- Muir, L. and Lee, Y. (1969) J. Biol. Chem., 244, 2343-2349.
- Muramatsu, T.; Gachelin, G.; Nicolas, F.; Condamine, H.; Jakob, H. and Jakob F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2315-

- Muramatsu, H.; Ishihara, H.; Miyauchi, T.; Gachelin, G.; Fujisaki, T.; Tejima, S. and Muramatsu, T. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)*, 94, 799-810.
- Mutharia, L. and Pearson, T. (1987), *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 165-172.
- Nakajima, T. and Ballou, C. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 7679-7684.
- Nogueira, N. Unkeless, J. and Cohn, Z. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1259-1263.
- Nuwayhid, N.; Glase, J.; Johnson, J.; Conrad, H.; Hauser, S. and Hirshberg, C. (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 12936-12941.
- Olden, K., Bernard, B.; Humphries, M.; Yeo, K.; Newton, S.; Bauer, H. and Parent, J. (1985), *Trends Biochem. Sci.* 10, 78-82.
- Opheim, D. and Touster, O. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1017-1023.
- Parek, R.; Dwek, R.; Rudd, P.; Thomas, J. and Rademacher, T. (1989) *Biochemistry* 28, 7670-7679.
- Parodi, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10051-10060.
- Parodi, A. and Cazzulo, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7641-7645.
- Parodi, A.; Lederkremer, G. and Mendelzon, D. (1983a) *J. Biol. Chem.* 258, 5589-5595.
- Parodi, A.; Mendelzon, D. and Lederkremer, G. (1983b) *J. Biol. Chem.* 258, 8260-8265.

- Parodi, A.; Martin-Barrientos, J. and Engel, J. (1984a)** Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 1-7.
- Parodi, A.; Mendelzon, D.; Lederkremer, G. and Martin-Barrientos, J. (1984b)** J. Biol. Chem. 259, 6351-6357.
- Parodi, A. and Quesada Allue L. A. (1982)** J. Biol. Chem. 257, 7637-7640.
- Parodi, A.; Quesada, L. and Cazzulo, J. (1981)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6201-6205.
- Patzelt, C. and Weber, B. (1986),** EMBO J., 5, 2103-2108.
- Perez, M. and Hirschberg, C. (1985),** J. Biol. Chem., 260, 4671-4678.
- Previato, J.; Mendelzon, D. and Parodi, A. (1986)** Mol. Biochem. Parasitol. 18, 343-353.
- Quesada Allue, L. and Parodi, A. (1983)** Biochem. J. 212, 123-128.
- Quinn, P.; Griffiths, G. and Warren, G. (1983)** J. Cell Biol. 96, 851-856.
- Rearick, J.; Chapman, A. and Kornfeld, S. (1981)** J. Biol. Chem. 256, 6255-6261.
- Reitman, M. and Kornfeld, S. (1981)** J. Biol. Chem. 256, 11977-11980.
- Rip, J. and Carrol, K. (1980),** Can. J. Biochem., 58, 1051-1056.
- Rip, J.; Rugar, C.; Ravi, K. and Carrol, K. (1985),** Prog. Lipid Res. 24, 269-309.
- Romero, P. and Herscovics, A. (1986a)** Carbohydr. Res. 151, 21-28.
- Romero, P. and Herscovics, a. (1986b)** J. Biol. Chem. 261, 15936-15940.

Ronin, C.; (1980). FEBS Lett., 113, 340-344.

Roth, J. (1987) Biochim. Biophys. Acta 906, 405-436.

Runge, K.; Huffaker, T. and Robbins, P. (1984) J. Biol. Chem. 259, 412-417.

Schachter, H. and Roseman, S. (1980) en "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" (Lennarz, ed.) pp. 85-160, Plenum Press, New York.

Schwarz, J.; Capasso, J. and Hirschberg, C. (1984), J. Biol. Chem., 259, 3554-3559.

Sharma, C.; Babczinski, P.; Lehle, L. and Tanner, W. (1974), Eur. J. Biochem., 46, 35-41.

Sharma, C.; Lehle, L.; and Tanner, W. (1981). Eur. J. Biochem. 116, 101-108.

Sher, A. and Snary, D. (1982) Nature 300, 639-640.

Snary, D. and Hudson, L. (1979) FEBS lett. 100, 166-170.

Snider, M. and Rogers, O. (1984), Cell, 36, 753-761.

Sommers, L. and Hirschberg, C., (1982), J. Biol. Chem., 257, 10811-10817.

Spiro, R. (1967) J. Biol. Chem., 242, 4813-4816.

Spiro, R. (1973), Adv. Prot. Chem., 27, 349-352.

Spiro, M.; Spiro, R. and Bhoyroo, V. (1979) J. Biol. Chem., 254, 7668-7674.

Spiro, M; Spiro, R. and Bhoyroo, V. (1983) J. Biol. Chem. 258, 9469-9476.

Staneloni, R.; Ugalde, R.; and Leloir, L. (1980), Eur. J. Biochem., 105, 275-278.

Staneloni, R. and Leloir, L. (1982), CRC Critical Reviews in Biochemistry, 289-326.

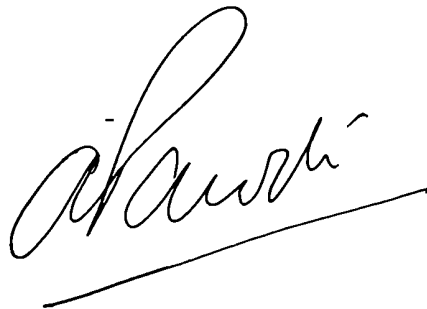
- Strous, G. (1979)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 2691-2698.
- Tabas, I and Kornfeld, S. (1978)** J. Biol. Chem. 253, 7779-7786.
- Tanaka, K.; and Pigman, W. (1965)** J. Biol. Chem., 240, 1487-1492.
- Taniguchi, T.; Mizuochi, T.; Banno, Y. and Kobata, A. (1985)** J. Biol. Chem. 260, 12941-13946.
- Tanner, W. and Lehle, L. (1987)** Biochim. Biophys. Acta 906, 81-99.
- Trimble, R.; Byrd, J. and Maley, F. (1980)** J. Biol. Chem., 255, 11892-11895.
- Trombetta, S.; Bosch, M. and Parodi, A. (1989)** Biochemistry 28, 8108-8116.
- Trowbridge, I.; and Hyman, R. (1979),** Cell 17, 503-508.
- Turco, S.; Stetson, B. and Robbins, P. (1977)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4411-4414.
- Turnquist, R.; Gillett, T.; and Hansen, R. (1974),** J. Biol. Chem., 249, 7695-7702.
- Valtersson, C.; von Duijn, G.; Verkleij, A.; Chojnacki, T.; de Kruijff, B. and Dallner, G. (1985)** J. Biol. Chem., 260, 2742-2751.
- van Duijn, G.; Verkleij, A.; de Kruijff, B.; Valtersson, C.; Dallner, G. and Chojnacki, T. (1987),** Chem. Sci., 27, 95-100.
- Varki, A. and Kornfeld, S. (1983),** J. Biol. Chem., 258, 2808-2818.
- Wallace, F. (1976)** en "Biology of Kinetoplastida" (Lumsden, W & Evans, D. eds) vol 2. Academic. Press., London.

Welply, J.; Shenbagamurthi, P.; Lennarz, W.; and Naider, F.
(1983) J. Biol. Chem., 258, 11856-11863.

Welply, J.; Kaplan, H.; Shenbagamurthi, P.; Naider, F.; and
Lennarz, W (1986) Arch. Biochem. Biophys., 246, 808-819.

Wright, A. and Robbins, P. (1965) Biochim. Biophys. Acta 104,
594-596.

Yagodnik, C.; de la Canal, L. and Parodi, A. (1987)
Biochemistry 26, 5937-5943.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Parodi", with a horizontal line underneath.A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Welply", with a horizontal line underneath.

