

## Tesis de Posgrado

# Glicosilaciones no convencionales en protozoarios

Merello, Silvana

1995

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Merello, Silvana. (1995). Glicosilaciones no convencionales en protozoarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2731\\_Merello.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2731_Merello.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Merello, Silvana. "Glicosilaciones no convencionales en protozoarios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2731\\_Merello.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2731_Merello.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Título

**Glicosilaciones no convencionales en protozoarios**

Autor: Silvana Merello

Director: Dr. Armando J. Parodi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Bs. As.  
(orientación en Ciencias Químicas)

1995

2731

52

Cuando falleció el Dr. Roberto O. Couso en Agosto de 1992 aún no se había iniciado el trámite para ser designado Director de la presente Tesis Doctoral por parte de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Es por ello que mi nombre figura como tal en el presente ejemplar y no el suyo, como debería haber sido. Sirva esta nota como aclaración y como recuerdo para un amigo que aunque se fue sigue entre nosotros.

Armando J. Parodi

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto O. Couso " Beto" por sus siempre sabias y humanas enseñanzas que las recordaré por el resto de mi vida.

Al Dr. Armando J. Parodi por la ayuda, los consejos y el tiempo brindado para la continuación y concreción de esta tesis.

Al Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por permitirme realizar este trabajo de tesis en sus instalaciones.

A mis compañeros de laboratorio pasados y presentes:

E. Guillén por su "hermético silencio"

Vivian Alvarez "la más..." por su incondicional ayuda y su sincera amistad.

Eduardo Cafferata "el Caffé" por su musulmana amistad.

A todos mis amigos del Instituto que sin ellos hubiera sido muy difícil continuar para la conclusión de esta tesis:

Alejandro Rabossi, Graciela Boccaccio, Pablo Wapner, Carlos Labriola, Martín Radrizzani, Victoria Rosato, Andrea Rostchild, Karin Hagelin, Ariane Sonvico, Alfredo Curá, Belén Cadenas, Fernando Ardila, Antonio Utaro, Antonio Coira, Pablo Varela, Laura Cremona, Diego Comerci, Denise Muñoz, Carolina y Mariela.

Al Dr. Ricardo Wolosiuk por sus consejos.

Al Dr. Tomás Santa Coloma por su paciencia y ayuda.

Al Dr. Marcelo Dankert por sus largas charlas.

Al Dr. Luis Quesada por aquellas jornadas en el 107.

A Ami Curto, Susana Raffo, Marta Bravo y Mario Saxon por su asistencia técnica.

A todo el personal del I.I.B.

En especial quiero agradecerles a mi mamá, mi hermano, mis abuelos y Guillermo por su incesante e incondicional apoyo y amor que me brindaron desde siempre.

*A memoria de Beto y de mi papá  
que me acompañan desde algún lugar del cosmos.*

## INDICE

ABREVIATURAS	1
<b>PARTE I</b>	
<b>Identificación de nuevos monosacáridos en oligosacáridos unidos a asparagina en <i>Blastocrithidia culicis</i> y en <i>Endotrypanum schaudinni</i></b>	
RESUMEN	2
INTRODUCCION	4
Características generales de glicoproteínas	4
Glicosilación de proteínas	6
Procesamiento de glicoproteínas	10
Tripanosomátidos	12
Generalidades, taxonomía y biología	12
N-glicosilación en tripanosomátidos	14
Objetivos del trabajo	17
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	18
Materiales	18
Células	18
Medios de cultivo para el crecimiento de <i>B. culicis</i> y <i>E. schaudinni</i> y marcación con [ <sup>14</sup> C] glucosa	18
Aislamientos de compuestos radioactivos de <i>B. culicis</i> y <i>E. schaudinni</i>	19
Dolicol-P-P-oligosacáridos	19

---

Glicopéptidos	19
Oligosacáridos sensibles y resistentes a endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H)	20
Métodos	20
Hidrólisis ácidas	20
Reducción de oligosacáridos con NaBH <sub>4</sub>	20
Oxidación suave con NaIO <sub>4</sub> , reducción e hidrólisis	21
$\beta$ -eliminación	21
Tratamientos enzimáticos	21
Endo H	21
$\alpha$ -manosidasa	21
N-glicanasa	22
Cromatografías y electroforesis	22
Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	22
Cromatografía de afinidad por concanavalina A-Sepharosa	22
Cromatografías en papel	23
Electroforesis en papel	23
Determinación de radioactividad	23
Marcadores	24
RESULTADOS	25
<i>B. culicis</i>	25
Patrón de los oligosacáridos sensibles a Endo H y composición de los monosacáridos	25
Monosacáridos componentes de los oligosacáridos resistentes a Endo H y a $\beta$ -eliminación	27
Las sustancias X, Y y Z están presentes en glicopéptidos resistentes a Endo H pero sensibles a N-glicanasa	29
Identificación de las sustancias X, Y y Z	30
Degradación con $\alpha$ -manosidasa de los compuestos sensibles a Endo H	32

Tamaño del "núcleo" de los oligosacáridos sensibles a Endo H	32
Composición monosacáridica de algunos de los componentes de las fracciones I y II	34
<i>E.schaudinni</i>	35
Oligosacáridos transferidos a partir de derivados de dolicol-P-P	35
Patrón de los oligosacáridos sensibles a Endo H	36
Composición monosacáridica de los compuestos sensibles a Endo H	38
Caracterización de la configuración de la galactosa e identificación del compuesto de $R_{\text{man}}=1.6$	39
Composición monosacáridica de los glicopéptidos resistentes a Endo H	41
Identificación de los "núcleos" de polimánosa presentes en los oligosacáridos sensibles a Endo H	42
DISCUSION	45
REFERENCIAS	48
<b>PARTE II</b>	
<b>Caracterización y purificación parcial de una nueva actividad enzimática en <i>Dictyostelium discoideum</i></b>	
RESUMEN	53



INTRODUCCION	54
Generalidades	54
Características generales de glicosilación de proteínas en <i>D. discoideum</i>	55
Estructura y biosíntesis de las enzimas lisosomales	56
Características generales en células de mamíferos	56
Características en <i>D. discoideum</i>	59
Antecedentes y objetivos del presente trabajo	61
 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	 62
Materiales	62
Células	62
Medio de cultivo para <i>D. discoideum</i>	
Preparaciones	63
Soluciones utilizadas	63
Preparación de extractos crudos y membranas solubilizadas	63
Medición de la actividad enzimática	64
Preparación de oligopéptidos	64
Aislamiento de glicopéptidos radioactivos por medio de concanavalina A-Sepharose	64
Pasos de purificación enzimática	65
Desnaturalización de tiroglobulina y uteroferrina	66
Identificación de glicosilación de proteínas endógenas solubles y unidas a membrana	66
Marcación <i>in vivo</i>	66
Fraccionamiento subcelular	67
Métodos	68
Hidrólisis ácida fuerte	68
Hidrólisis ácida débil	68
Hidrólisis básica	68

Preparación de apomucina	68
Delipidificación	69
Preparación de [ $\beta$ - <sup>32</sup> P]UDP-GlcNAc	69
Precipitación con ácido fosfotúngstico	69
Determinación del producto por QAE-Sephadex	69
Fosfatasa alcalina	70
Cromatografías en papel	70
Determinación de radioactividad	70
RESULTADOS	71
Caracterización de los productos de reacción	71
Purificación parcial de la actividad enzimática y dependencia de aceptores exógenos	74
Algunas propiedades de la enzima parcialmente purificada	76
Proteínas glicosiladas <i>in vivo</i> y en un extracto crudo de células de <i>D. discoideum</i>	77
Distribución subcelular de la UDP-GlcNAc: Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	79
DISCUSION	82
REFERENCIAS	87

## ABREVIATURAS NO CONVENCIONALES

E-64	trans epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidino) butano
Endo H	Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GlcNAc fosfodiesterasa	N-acetilglucosamina-1-fosfodiester $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa
GlcNAc fosfotransferasa	UDP-N-acetilglucosamina: enzima lisosomal N-acetilglucosamina-fosfotransferasa
GSI	<i>Griffonia simplicifolia</i> I
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
MES	2-[N-morfolino] etanosulfonato
Mono Q	Q Sepharose Fast Flow
MOPS	[3-(N-morfolino)-ácido propanosulfónico], pH 7.0.
MPR	receptor de manosa 6-P
RER	retículo endoplasmático rugoso
PBS	Buffer fosfato salino (1.44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8g NaCl, 0.2 g KCl por litro de agua deionizada, pH 7.4)
PMSF	fluoruro de fenil metano sulfonilo
PTA	ácido fosfotúngstico
TKM	Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
WHA	Aglutinina de germen de trigo ó wheat germ agglutinin

## **PARTE I**

**Identificación de nuevos monosacáridos en oligosacáridos unidos a asparagina en *Blastocrithidia culicis* y en *Endotrypanum schaudinni*.**

## RESUMEN

El mecanismo de glicosilación de los residuos de asparagina de las proteínas es similar en todos los eucariotas: un oligosacárido preformado es transferido co-traduccionalmente a la proteína en el retículo endoplasmático. Comienza entonces en dicha localización subcelular el procesamiento del mismo.

Posteriormente en el aparato de Golgi continúa este proceso que habrá de conducir finalmente a la gran diversidad de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente a las proteínas.

Los tripanosomátidos son parásitos de considerable importancia médica y económica dado que existe una gran variedad de organismos (vertebrados, invertebrados y plantas) que pueden ser infectados por dichos parásitos.

La N-glicosilación en tripanosomátidos presenta características especiales como la existencia de moléculas de dolicol extremadamente cortas, la incapacidad de sintetizar oligosacáridos glucosilados unidos a dolicol-P-P, la presencia de oligosacariltransferasas que en sistemas libres de células catalizan la transferencia de oligosacáridos glucosilados y no glucosilados a la misma velocidad, el hecho de que ciertas especies solamente transfieran compuestos truncados ( $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ) y, uno ó dos oligosacáridos ( $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  y/o  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  simultáneamente) dependiendo del estadio de diferenciación, la adición de galactofuranosas a compuestos de alta manosa y finalmente la adición de ácido siálico a través de una *trans*-sialidasa y no por una enzima dependiente de CMP-siálico.

En base a esto se decidió estudiar a dos tripanosomátidos con el objeto de determinar la presencia de otras características distintivas.

Por un lado se analizó a *Blastocrithidia culicis*, un tripanosomátido monogenético que vive en forma libre en el intestino de varias especies de mosquitos.

Ese protozoo transfiere  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  en N-glicosilación. En el presente trabajo se encontró que los oligosacáridos sensibles a endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H, obtenidos a partir de glicoproteínas totales del parásito, contienen residuos de manosa, xilosa y ramnosa. La composición de alguno de ellos fue la siguiente:

$\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Rha}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Rha}_2\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Xyl}_1\text{Rha}_2\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Xyl}_1\text{Rha}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Xyl}_2\text{Rha}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ .

En oligosacáridos resistentes a endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H pero sensibles a N-glicanasa, se halló la presencia de unidades de manosa, xilosa, ramnosa y ribosa.

Por el otro lado se analizaron las glicoproteínas de *Endotrypanum schaudinni*, tripanosomátido

digenético que alterna su ciclo de vida entre un invertebrado y un vertebrado (perezoso). Se encontró que este parásito transfiere  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  en la N-glicosilación de proteínas. Los oligosacáridos sensibles a endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H se identificaron como  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Rib}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  y/o  $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  conteniendo dos residuos de ribosa ó galactosa ó uno de cada uno,  $\text{Rib}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Gal}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Las galactosas se hallan en configuración furanosa.

Los glicopéptidos resistentes a endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H que fueron retenidos por concanavalina A-Sepharose y eluidos con  $\alpha$ -metilmanósido contienen residuos de manosa, galactosa y ribosa.

Es importante de mencionar que es la primera vez que se describe la presencia de residuos de ribosa en glicoconjugados de eucariotas, de residuos de ramnosa en oligosacáridos unidos a asparagina y de unidades de xilosa en compuestos del tipo de alta manosa. Finalmente, la presencia de galactofuranosas había sido descrita en varias especies monogenéticas, pero tan sólo en un tripanosomátido digenético como *Trypanosoma cruzi*.

Parte de los resultados mostrados en la primera parte de esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

-Novel (rhamnosyl and ribosyl) and uncommon (xylosyl) monosaccharide residues are present in asparagine-linked oligosaccharides of the trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*.

Silvana Merello, Marcia Tosta Xavier, and Armando J. Parodi. *J. Biol. Chem.* (1994) **269**, 20294-20298.

-The presence of galactofuranose and ribose units in asparagine-linked oligosaccharides of the digenetic trypanosomatid *Endotrypanum schaudinni*.

Silvana Merello, Marcia Tosta Xavier, and Armando J. Parodi. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1995) **69**, 73-79.

## INTRODUCCION

### Características generales de glicoproteínas

Las glicoproteínas son proteínas que contienen uno ó más heterosacáridos, generalmente ramificados, con un número de residuos de azúcar relativamente pequeño, carentes de unidades repetitivas unidos covalentemente.

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en todos los organismos vivientes y se los encuentra formando parte de las membranas celulares, en la porción soluble, en la matriz extracelular como así también en los fluidos intercelulares.

Los roles biológicos de los oligosacáridos unidos a las proteínas abarcan un gran espectro que incluye desde una función puramente estructural hasta aquellas cruciales para el desarrollo, crecimiento, función ó sobrevivencia de un organismo (Varki A.,1993).

La mayor parte de las proteínas solubles y unidas a membrana que pasan a través del aparato secretorio son glicosiladas. En contraposición, pocas proteínas del citosol ó nucleares sufren este tipo de modificación.

La clasificación de las glicoproteínas se realiza según la naturaleza de la unión aminoácido-azúcar. En base a este criterio, las glicoproteínas pueden dividirse en dos grandes grupos:

- 1- La unión **N-glicosídica** se establece entre la amida de una asparagina y el carbono anomérico de una N-acetilglucosamina.
- 2- La unión **O-glicosídica** se produce entre el oxígeno del hidroxilo de un hidroxiaminoácido y el carbono anomérico del monosacárido involucrado.

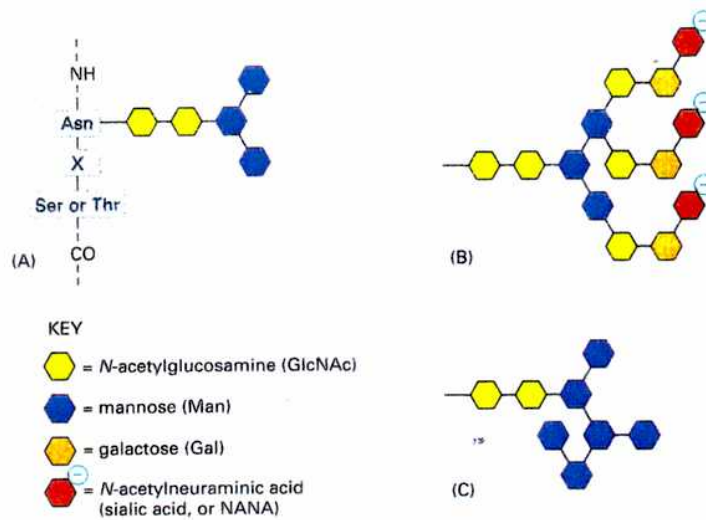
Ambos tipos de unión difieren tanto en lugar como modo de síntesis. La unión O-glicosídica ocurre principalmente en el compartimiento de Golgi, aunque también se ha observado en citoplasma y núcleo (Holt *et al.*, 1987; Haltiwanger *et al.*, 1990; Haltiwanger *et al.*,1992)

La N-glicosilación es iniciada en el retículo endoplasmático y completada en el aparato de Golgi. Básicamente podemos definir dos grandes grupos de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente que ejemplificaremos con los que se encuentran en células de mamíferos:

- 1- **Los oligosacáridos del tipo de alta manosa** se caracterizan porque no sufren el agregado de

ningún azúcar nuevo en el aparato de Golgi, tan sólo contienen N-acetilglucosaminas y varios residuos de manosa. Poseen un núcleo heptasacárido común (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) y la variabilidad está dada por el número y posición de residuos de manosa en unión α (1-2) unidos a los residuos de manosa de los extremos no reductores del núcleo (Fig. 1C).

**2-Los oligosacáridos del tipo complejo**, en contraste, contienen un núcleo pentasacárido (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) y la variabilidad estructural está dada por el número de antenas unidas a los residuos de manosa. Estas antenas están compuestas por residuos de N-acetilglucosaminas, galactosas y ácido siálico (Fig. 1B).



**Fig.1 Principales clases de oligosacáridos unidos a asparagina encontrados en glicoproteínas maduras.** (B), oligosacárido del tipo complejo; (C), oligosacárido del tipo de alta manosa. En el panel (A) se muestran los residuos de azúcares que conforman el núcleo de los oligosacáridos complejos. Tomado de Alberts *et al.*, 1994.

Además podemos considerar como una variante a los **oligosacáridos de tipo híbrido** que presentan características de los dos grupos antes mencionados.

En algunos casos distintos tipos de oligosacáridos están unidos (en distinto lugares) a la misma cadena polipeptídica.



## Glicosilación de proteínas

Algunas proteínas son modificadas por el agregado de azúcares con enlace **O-glicosídico**. La biosíntesis de este tipo de oligosacáridos ocurre por adición secuencial de residuos de azúcares a la proteína a partir de los nucleótido-azúcares correspondientes.

En un principio se describió la síntesis de este tipo de oligosacáridos como propio del aparato de Golgi. Sin embargo, actualmente es conocida su síntesis en núcleo y citoplasma (Holt *et al.*, 1987; Haltiwanger *et al.*, 1990; Haltiwanger *et al.*, 1992). Existen varias glicosiltransferasas responsables de la adición de distintos azúcares a los hidroxilos libres de residuos de serina y treonina en las proteínas. Por ejemplo, sin considerar la elongación de las cadenas de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente, hay descritos hasta el momento al menos 8 diferentes azúcares reductores terminales unidos a serina ó treonina (Gooley *et al.*, 1994). Hasta el momento es imposible predecir una única secuencia aminoácida consenso de glicosilación.

La estructura final del oligosacárido está determinada por varios factores. En primer lugar, es evidente que la misma se encuentra bajo control genético a nivel de expresión del número y del tipo de glicosiltransferasas que serán producidas en una célula determinada. Un ejemplo lo constituyen los grupos sanguíneos A, B y O, los cuales están determinados por la estructura de los carbohidratos presentes en glicoproteínas y glicolípidos de la superficie del eritrocito (Schachter y Roseman., 1980; Beyer *et al.*, 1981).

Otro factor que influye sobre la estructura final del oligosacárido unido a la proteína es la proporción relativa de cada una de las glicosiltransferasas presentes en la célula. Por ejemplo se encontró que la diferencia entre los oligosacáridos de las mucinas maxilares ovina y porcina es debida a que la relación sialiltransferasa/ galactosiltransferasa es 10-30 veces mayor en la glándula ovina. Por ello, la mayoría de los residuos de N-acetilgalactosamina unidos O-glicosídicamente a la proteína ovina recibirá antes un residuo de ácido siálico, impidiendo de este modo la elongación de la cadena con residuos de galactosa (Berger *et al.*, 1982; Schachter *et al.*, 1971).

Por último, la disponibilidad de sustratos dadores de azúcares y la accesibilidad de las enzimas a los sitios de glicosilación también son de importancia en la determinación de la estructura final de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a las proteínas (Schachter y Roseman, 1980; Beyer *et al.*, 1981).

La glicosilación de proteínas con enlace del tipo **N-glicosídico** ocurre por un mecanismo totalmente distinto.

Muchas proteínas luego de su translocación hacia el retículo endoplasmático son modificadas en el lumen del mismo por la adición covalente de un oligosacárido preformado.

La estructura del precursor de todos los oligosacáridos con unión N-glicosídica ya sea en plantas, animales como en eucariotas inferiores, consiste en un oligosacárido que contiene 3 glucosas, 9 manosas y 2 N-acetilglucosaminas (Hubbard e Ivatt, 1981; Kornfeld y Kornfeld., 1985; Parodi y Leloir, 1979) (ver excepciones más adelante). Este oligosacárido está unido por un residuo pirofosforil a dolicol, un lípido de cadena larga (aproximadamente 20 unidades isopreno) (Fig. 2).

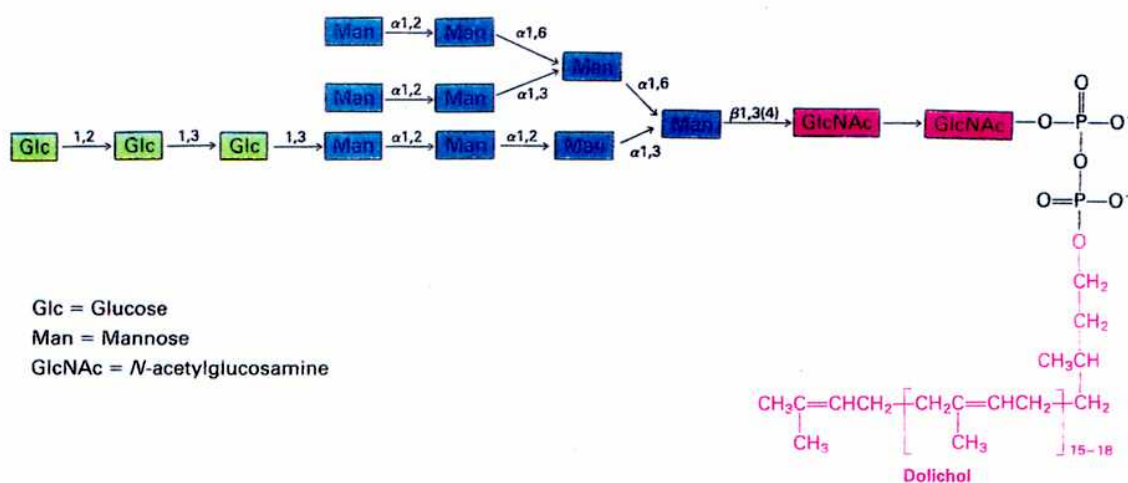
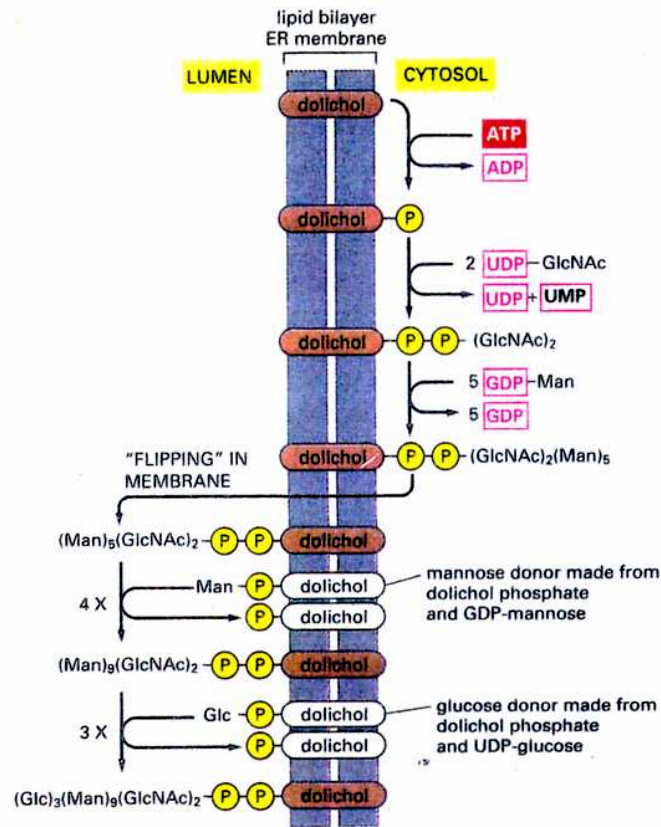


Fig.2 Estructura del oligosacárido precursor unido a dolicol-P-P. Tomado de Darnell *et al.*, 1990.

El dolicol pirofosforil-oligosacárido es formado en el retículo endoplasmático, donde la porción oligosacáridica está orientada hacia el lumen del retículo. La biogénesis de este precursor se realiza mediante la adición secuencial de monosacáridos al dolicol fosfato (Fig. 3).



**Fig.3. Síntesis del oligosacárido precursor unido al lípido en el retículo endoplasmático.** El oligosacárido es ensamblado azúcar por azúcar sobre el lípido portador, dolichol. El primer residuo está unido a dolichol por un puente pirofosfato. La síntesis del oligosacárido comienza en el lado citosólico de las membranas del retículo endoplasmático. Luego de incorporar  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  la síntesis continúa en la cara luminal del mismo mediante una translocación del lípido intermediario. Todas las subsecuentes reacciones de transferencias de azúcares se realizan en la cara luminal a partir de dolichol-P-Man y dolichol-P-Glc. Tomado de Alberts *et al.*, 1994.

La cadena oligosacáridica completa es transferida en bloque por la oligosacariltransferasa a residuos de asparagina de los polipéptidos nacientes en determinadas secuencias que se identificaron como  $\text{Asn-X-Ser}$  ó  $\text{Asn-X-Thr}$ , donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Bause, 1983). La transferencia está localizada en la cara luminal del retículo endoplasmático (Fig.4).

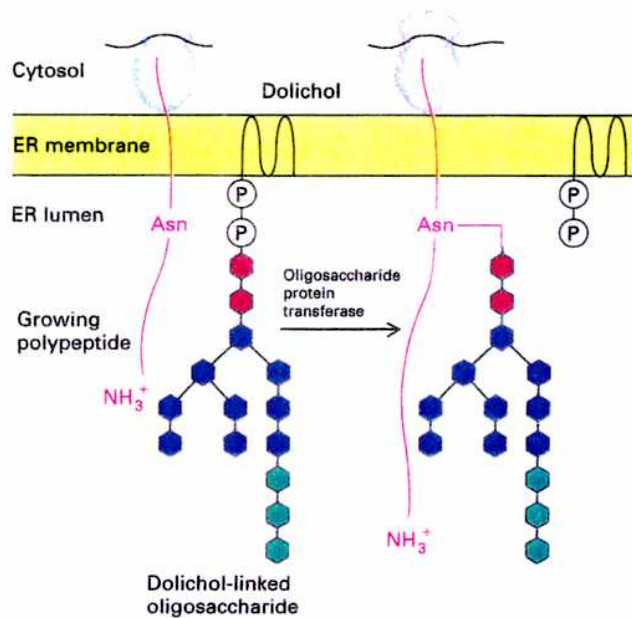


Fig.4. Transferencia catalizada por una oligosacariltransferasa del oligosacárido preformado unido a dolicol a residuos de asparagina de las proteínas nacientes en el retículo endoplasmático. Tomado de Darnell *et al.*, 1990.

Posteriormente los oligosacáridos comienzan a sufrir una serie de modificaciones (procesamiento) que habrán de conducir finalmente a la gran diversidad estructural de los oligosacáridos unidos N-glicosidicamente a las proteínas.

### Procesamiento de glicoproteínas

La primera etapa del procesamiento ocurre en el retículo endoplasmático inmediatamente después de la transferencia del oligosacárido a la proteína, que consiste en la remoción de 3 residuos de glucosa y uno de manosa. Varias enzimas participan de esta reacción. La primera, denominada glucosidasa I, remueve sólo el residuo de glucosa terminal. La segunda actividad (glucosidasa II), hidroliza los dos residuos de glucosa restantes para dar  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Ambas glucosidasas están localizadas en los retículos endoplasmáticos liso y rugoso (Grinna *et al.*, 1979). Finalmente manosidasas son las encargadas de remover uno ó dos residuos de manosa (Fig.5).

Se ha descrito y demostrado la presencia de una glucosilación transitoria de los oligosacáridos

de las proteínas (Parodi *et al.*, 1983b; Parodi *et al.*, 1984 a; Lederkremer y Parodi, 1986) . La unidad de glucosa es transferida por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, a partir de UDP-Glc, a oligosacáridos  $\text{Man}_{7,9}\text{GlcNAc}_2$ . La transferencia se realiza a la misma manosa y con la misma unión  $\alpha(1-3)$  como en  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$  (Trombetta *et al.*, 1989). Dicho residuo será posteriormente hidrolizado por la glucosidasa II. Esta reacción descrita originalmente en *Trypanosoma cruzi* (Parodi *et al.*, 1983a) se ha observado en células de animales y vegetales (Parodi *et al.*, 1983b, Parodi *et al.*, 1984b). Su función es desconocida hasta el presente, pero resultados recientes sugieren que podría estar relacionada con el correcto plegamiento de las proteínas en el retículo endoplasmático ó con el mecanismo por el cual las células degradan a las proteínas mal plegadas en el mismo compartimiento subcelular (Sousa *et al.*, 1992; Trombetta y Parodi, 1992).

Posteriores modificaciones que ocurren en el aparato de Golgi habrán de conducir finalmente a la gran diversidad de oligosacáridos unidos N-glicosidicamente a las proteínas.

Veremos las reacciones que ocurren en células de mamíferos. El paso siguiente está catalizado por la manosidasa I que remueve residuos de manosa que se encuentran unidos por uniones  $\alpha(1-2)$ . El número de residuos de manosa hidrolizados puede variar dependiendo de la glicoproteína (Hubbard e Ivatt, 1981). El orden de remoción de los residuos de manosa no es único, sino que puede mostrar cierta variación dependiendo de la glicoproteína y de la célula involucrada. El procesamiento descrito hasta aquí habrá de dar como producto glicoproteínas conteniendo oligosacáridos de alta manosa.

Como se muestra en la figura 5, la continuación del procesamiento de los oligosacáridos sigue una vía altamente ordenada y requiere del agregado de una N-acetilglucosamina a un residuo de manosa. Este paso está catalizado por la N-acetilglucosaminiltransferasa I.

Hasta este punto la unión entre los dos residuos de N-acetilglucosamina del núcleo es sensible al ataque por una endoglicosidasa específica (endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H, ó Endo H).

A partir de aquí, al continuar el procesamiento esta unión se vuelve resistente a la acción de dicha enzima (Fig. 5).

Posteriormente la manosidasa II remueve otros dos residuos de manosas que no pertenecen al núcleo. Esto da como resultado el núcleo de 3 manosas que está presente en los oligosacáridos complejos. La adición posterior de residuos de N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y fucosa, a partir de sus nucleótido-azúcares respectivos, dará origen a los oligosacáridos complejos. En el caso de no ser hidrolizados los dos últimos residuos de manosa, los oligosacáridos resultantes serán del tipo híbrido.



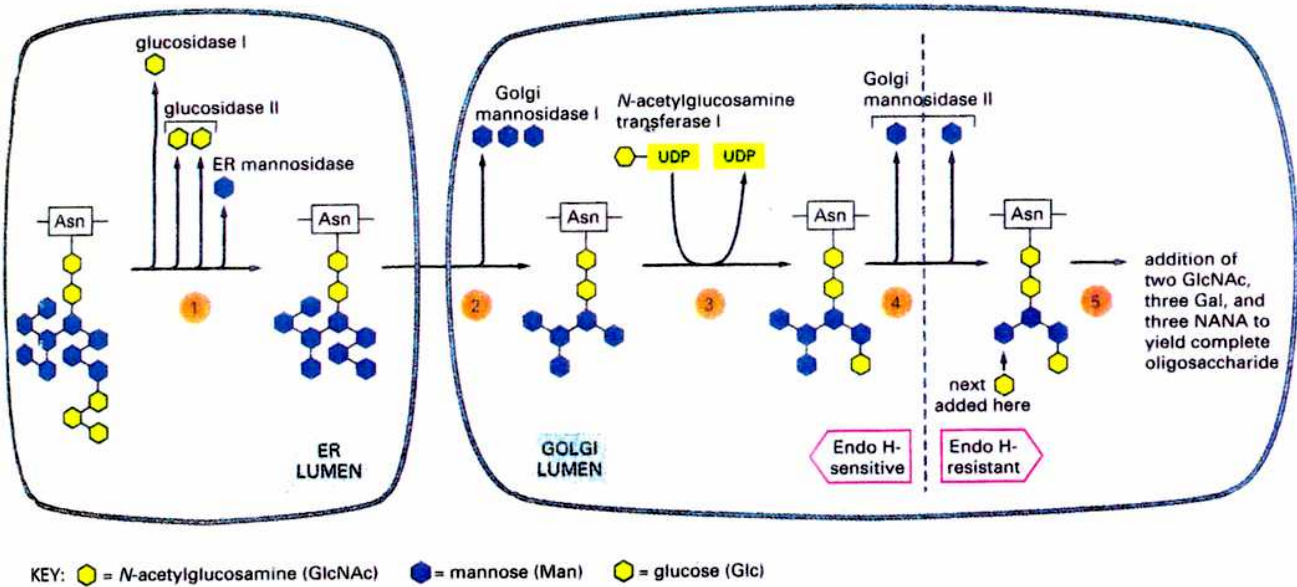


Fig.5. Procesamiento de los N-oligosacáridos en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Tomado de Alberts *et al.*, 1994.

Una interesante ramificación del camino principal de procesamiento es la formación de oligosacáridos fosforilados en enzimas lisosomales. El primer paso consiste en la transferencia de un residuo de GlcNAc-P, a partir de UDP-GlcNAc, a un oligosacárido de alta manosa. Posteriormente es hidrolizado por la acción de una N-acetilglucosaminil fosfodiesterasa, de modo de exponer uno ó más residuos de Man 6-P (Tabas y Kornfeld, 1980; Hasilik *et al.*, 1980; Waheed *et al.*, 1981; Varki y Kornfeld, 1980). En la membrana del aparato de Golgi existen receptores para Man 6-P que se unen a las glicoproteínas que contienen estos residuos. Se forman vesículas que se funden con los lisosomas y se disocia el complejo enzima-receptor. Se produce la liberación de la enzima lisosomal al interior del lisosoma y el reciclado del receptor (ver capítulo II).

## Tripanosomátidos

### Generalidades, taxonomía y biología

Los tripanosomátidos son protozoarios flagelados cuyas características comunes son la posesión de un sólo flagelo libre ó unido al cuerpo celular a través de una membrana ondulante, y la presencia de una organela subcelular ubicada en la base del flagelo, conectada a la mitocondria y que contiene DNA en cantidades que exceden a las encontradas normalmente en mitocondrias de otras células. Esta estructura se denomina kinetoplasto, y todos los protozoarios flagelados que los contienen se clasifican dentro de un mismo orden taxonómico, el orden Kinetoplastida. Dentro del orden Kinetoplastida, el suborden Trypanosomatina reúne a aquellos que poseen un sólo flagelo; dentro del suborden, la familia Trypanosomatidae es la única descrita hasta el momento (Vickerman, 1976). Una característica común a los tripanosomátidos consiste en que todos son parásitos obligados, y no se encuentran en la naturaleza en forma libre, aunque muchos de ellos han podido ser cultivados axénicamente en el laboratorio. El árbol taxonómico de los tripanosomátidos puede resumirse de la siguiente forma:

Reino: **Protista**

Subreino: **Protozoa**

Phylum: **Sarcomastigophora**

Subphylum: **Mastigophora**

Clase: **Zoomastigophorea**

Orden: **Kinetoplastida**

Suborden: **Trypanosomatina**

Familia: **Trypanosomatidae**

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

Algunos géneros, denominados tripanosomátidos monogenéticos, desarrollan todo su ciclo en un huésped invertebrado, generalmente un insecto. Tal es el caso de los géneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* y *Rynchoidomonas*, los cuales han sido aislados solamente de insectos y no se ha descrito el caso de ningún vertebrado que sea capaz de hospedarlos (Wallace, 1976).

Los demás géneros, denominados tripanosomátidos digenéticos, alternan su ciclo de vida entre dos huéspedes: uno, un insecto que representa el vector en el que los flagelados se desarrollan primariamente en el intestino ó en las glándulas salivales; el otro, un vertebrado ó planta donde habitan en la sangre y/o varios tejidos (*Leishmania*, *Endotrypanum* y *Trypanosoma*) y en la savia (*Phytomonas*) respectivamente.

Los tripanosomátidos se caracterizan por los cambios morfológicos que sufren a lo largo de su ciclo de vida (Hoare, 1972).

Por ejemplo, entre los parásitos monogenéticos, encontramos que *Blastocrithidia* posee dos estadios que comprenden una forma (a) promastigote y (b) amastigote, siendo la última forma la que representa el estado infeccioso.

A su vez entre los tripanosomátidos digenéticos, a modo de ejemplo, el género *Endotrypanum* comprende los estadios (a) promastigote y (b) amastigote en el hospedador intermediario (flebotomo) y la típica forma epimastigote en el vertebrado hospedador (perezoso).

En la Fig. 6 pueden observarse las distintas formas de algunos tripanosomátidos.

Dado que existe una extraordinaria variedad de vertebrados que pueden ser huéspedes de tripanosomátidos es que estos protozoarios son de considerable importancia médica y económica. Ejemplos que pueden citarse son: la enfermedad de Chagas transmitida por *Trypanosoma cruzi*, la enfermedad del sueño causada por *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma b. rhodesiense*, y varias formas de leishmaniasis (visceral, mucocutánea y cutánea) producidas por varias especies que pertenecen al género *Leishmania*. Por otro lado, *Trypanosoma b. brucei*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma vivax* causan nagana en Africa, enfermedad que afecta al ganado, mientras que *Trypanosoma evansi* afecta a camellos y caballos (Vickerman, 1976).

Otro aspecto de los tripanosomátidos es que poseen características únicas ó bien que por varias razones esos rasgos distintivos primero se encontraron ó fueron exhaustivamente descriptos en estos parásitos, como la adición del miniexón y el *trans*- ensamblado del precursor de los transcritos de mRNA, la transcripción multicistronica, el uso de trypanotina en lugar de glutatión, una inusual estructura de DNA mitocondrial (kinetoplasto), anclas de glicosil-fosfatidilinositol en proteínas unidas a membrana, la existencia del glicosoma y la fermentación aeróbica de la glucosa, una cadena respiratoria ramificada con un inusual citocromo c, el editado de RNA de varios transcritos mitocondriales y en el caso de tripanosomas africanos, un repertorio virtualmente ilimitado de una glicoproteína antigénica que es fundamental para la evasión de la respuesta inmune del huésped (Borst, 1986, 1991; Opperdoes, 1987; Cross, 1990; Perry y Agabian, 1991; Stuart, 1991; Walsh *et al.*, 1991; Cazzulo, 1992). En consecuencia, no es de sorprender que la N-glicosilación en tripanosomátidos presente rasgos distintivos.



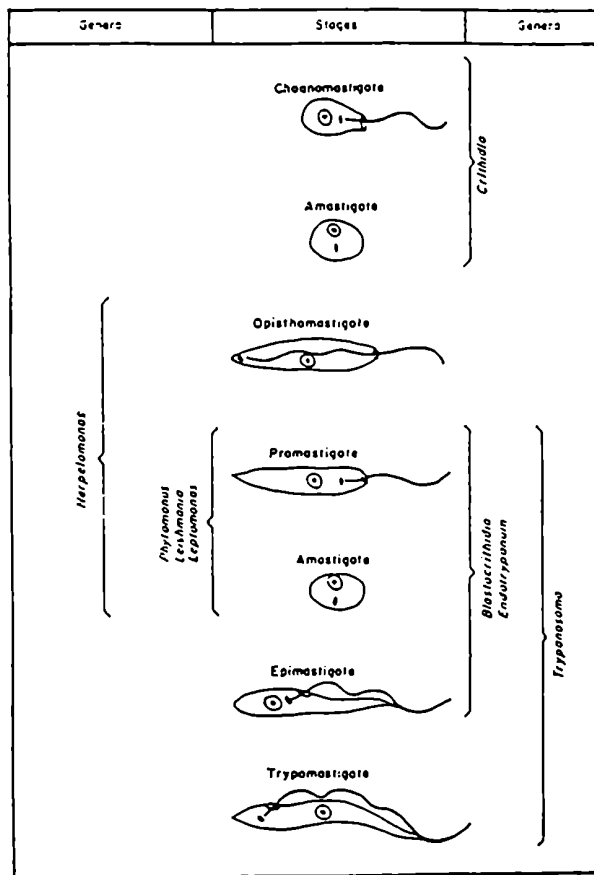


Fig. 6. Diagrama de los estadios de desarrollo de algunos géneros de Trypanosomatidae

### N-glicosilación en tripanosomátidos

La N-glicosilación en tripanosomátidos presenta algunas diferencias con respecto a lo descrito para la mayoría de las células eucariotas.

La glicosilación de los residuos de asparagina en las proteínas es iniciada por la transferencia en bloque de un oligosacárido preformado a partir de dolicol-P-P.

Los poliprenoles involucrados en la reacción son similares pero más cortos (10-13 unidades isopreno) a los dolicoles de mamíferos, plantas y hongos (17-21, 16-20 y 15-20 unidades isopreno respectivamente).

Los tripanosomátidos son el único tipo de células conocidas que transfieren *in vivo* oligosacáridos no glucosilados a las proteínas en N-glicosilación.

La composición de los oligosacáridos varía según las especies siendo  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  para *T. cruzi*, *Trypanosoma conorhini*, *Trypanosoma dionisii*, *Leptomonas samueli*, *Herpetomonas samuelpessoai* y *Herpetomonas muscarum*, mientras que *C. fasciculata*, *Crithidia hamosa* y *Leishmania enriettii* transfieren  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ . El oligosacárido en *Leishmania mexicana*, *Leishmania adleri* y *B. culicis* posee una composición de  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  (Parodi *et al.*, 1981; Parodi y Quesada Allué, 1982; Previato *et al.*, 1986; de la Canal y Parodi, 1987).

De estos datos se puede concluir que el mismo oligosacárido puede ser transferido tanto por parásitos monogenéticos como digenéticos.

Además distintas especies, que pertenecen al mismo género como *L. mexicana*, *L. adleri* y *L. enriettii*, pueden transferir distintos oligosacáridos.

Las estructuras de los oligosacáridos transferidos en tripanosomátidos es igual a la descrita para los intermediarios en la síntesis de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  en otros eucariotas.

Se encontró que los tripanosomátidos no sintetizan dolicol-P-Glc, que es el dador de las unidades de glucosa en el oligosacárido completo (Parodi y Quesada-Allué 1982, de la Canal y Parodi 1987). Estos parásitos sintetizan dolicol-P-Man. Sin embargo, las especies que transfieren  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  ó  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  carecen de las manosiltransferasas dependientes de dolicol-P-Man responsables de la adición del séptimo, octavo y noveno, ó del octavo y noveno residuos de manosa, respectivamente (de la Canal y Parodi, 1987).

Se conoce que la presencia de los tres residuos de glucosa en los oligosacáridos unidos a lípidos es necesaria para la catálisis eficiente de las oligosacariltransferasas de mamíferos, plantas y hongos. En consecuencia, la incapacidad de los tripanosomátidos de sintetizar oligosacáridos glucosilados unidos a lípidos presentó un posible problema con respecto a la eficiencia de la N-glicosilación de proteínas *in vivo*.

Experimentos realizados en un sistema libre de células mostraron, sin embargo, que la oligosacariltransferasa de tripanosomátidos difiere de todas las otras conocidas ya que puede transferir  $\text{Man}_{6,9}\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Glc}_{1,3}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  a la misma velocidad (Bosh *et al.*, 1988).

El procesamiento de los oligosacáridos comienza en el retículo endoplasmático. Por otro lado, existe una firme evidencia de que tanto el retículo endoplasmático como el aparato de Golgi contienen  $\alpha(1,2)$  manosidasas, aunque pocas enzimas han sido caracterizadas.

Se describió la presencia de una enzima de especificidad semejante a la glucosidasa II, pero ninguna actividad similar a la de la glucosidasa I en *T. cruzi*, *C. fasciculata* y *L. samueli* (Bosch *et al.*, 1988).

En oligosacáridos unidos N-glicosídicamente se detectó por primera vez la presencia, transitoria, de unidades de glucosa (Parodi y Cazzulo, 1982; Parodi *et al.*, 1983a, 1984a; Mendelzon y Parodi,

1986 y Mendelzon *et al.*, 1986). En un principio se pensó que este proceso de glucosilación estaba restringido a tripanosomátidos. Sin embargo posteriormente se lo encontró en células de mamíferos, plantas y hongos (Parodi *et al.*, 1983b 1984b; Lederkremer y Parodi, 1986). Dicha reacción está catalizada por la UDP-Glc: glicoproteína glucotransferasa y utiliza UDP-Glc como sustrato dador (Trombetta *et al.*, 1989; Trombetta y Parodi 1992). La unidad de glucosa se transfiere en la misma manosa y con la misma unión  $\alpha(1,3)$  que la encontrada en  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$  (Trombetta *et al.*, 1989). Dado que dicha actividad está localizada en el retículo endoplasmático se sugiere que la glucosidasa II es responsable de la deglucosilación *in vivo*.

Se asume que el procesamiento posterior de los oligosacáridos ocurre en el aparato de Golgi de tripanosomátidos, al igual que en células de mamíferos. Sin embargo, no hay estudios de localización subcelular para la formación de al menos parte de los compuestos del tipo alta manosa como los del tipo complejo.

Han sido publicados detalles de las estructuras de oligosacáridos del tipo alta manosa presentes en *T. cruzi*, *L. mexicana*, *C. fasciculata*, *T. brucei* y *L. samueli* (Parodi *et al.*, 1983a, 1984a; Mendelzon y Parodi, 1986; Bangs *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1988; Olafson *et al.*, 1990; Zamze *et al.*, 1990). Ellos presentan estructuras similares a las encontradas en mamíferos, excepto que en parásitos que transfieren  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  fueron determinadas estructuras raramente encontradas en eucariotas superiores.

En tripanosomátidos monogenéticos como *L. samueli*, *H. samuelpessoai*, *C. fasciculata* y *C. hamosa* se encontró que compuestos del tipo alta manosa contienen unidades de galactosas unidas directamente a residuos de manosa y no en la secuencia Gal-GlcNAc-Man (Mendelzon y Parodi, 1986; Mendelzon *et al.*, 1986, Moraes *et al.*, 1988 y González-Clemente *et al.*, 1990).

En todos los casos, las galactosas se encontraban en configuración furanosa y unidos a una unidad de manosa externa.

En *T. brucei* se describió la presencia de oligosacáridos biantenarios del tipo complejo que tienen en algunos casos galactosas terminales unidas en unión  $\alpha$  ó extensiones poli-N-acetilactosamina, pero carentes de ácido siálico (Bangs *et al.*, 1988; Zamze *et al.*, 1991).

En *T. cruzi* se hallaron oligosacáridos del tipo complejo que contenían residuos de galactosas unidas en unión  $\alpha$ , fucosa y ácido siálico (Couto *et al.*, 1987, 1990).

En este parásito la adición de ácido siálico en las glicoproteínas está mediada por una *trans*-sialidasa localizada en la superficie externa del parásito y no por una sialiltransferasa intracelular dependiente de CMP-siálico como en otros eucariotas (Zingales *et al.*, 1987).

## Objetivos del trabajo

Como se mencionó anteriormente, los tripanosomátidos constituyen un grupo de considerable importancia médica y económica para países en desarrollo. Además, estos protozoarios poseen características únicas ó bien que por varias razones esos rasgos distintivos primero se encontraron ó fueron extensivamente descriptos en estos parásitos y luego se extendieron a distintos organismos. Entre los rasgos particulares se encontró que la N-glicosilación presenta características distintivas tanto en composición como en estructura con respecto a eucariotas superiores.

Con el objeto de ampliar y generalizar estas observaciones se decidió analizar los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas maduras de dos tripanosomátidos.

Por un lado se eligió a *B. culicis*, una especie del grupo de los monogenéticos que vive en forma libre en el intestino de varias especies de mosquitos. Estos protozoarios transfieren en N-glicosilación  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$  a las proteínas (Previato *et al.*, 1986). La estructura de este oligosacárido ( $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ) es idéntica a la del intermediario con igual composición en la síntesis de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolicol}$  en células de mamíferos.

Por otro lado se estudió a *E. schaudinni* que pertenece al grupo de los digenéticos. Este parásito crece en flebótomos y en eritorcitos de perezosos de América Central y del Sur.

El hallazgo de características inusuales en tripanosomátidos nos permitiría acercarnos de distintas formas a la solución de los problemas que causan dichos parásitos.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### Materiales

La Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (Endo-H) de *Streptomyces griseus*; la  $\alpha$ -manosidasa de poroto de chanco, la proteasa tipo XIV (Pronasa) de *Streptomyces griseus*, la hemina, el MOPS y los monosacáridos marcadores fueron comprados en Sigma (St. Louis, MO, USA) . La enzima N-glicanasa se obtuvo de Genzyme Corp. (Boston, MA. USA). La concanavalina A-Sepharose fue comprada en Pharmacia (Uppsala, Suecia). El Brain Heart Infusion, la Tryptose, el Liver Infusion y la Proteose Peptone fueron compradas en Difco (Detroit, MI, USA). La [ $^{14}$ C] glucosa (320 Ci/mol), fue de ARC (St Louis, MO,USA).

### Células

Las células de *B. culicis* y de *E. schaudinni* fueron cedidas por el Dr. W de Souza ( Instituto de Biofísica, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil).

### Medios de cultivo para el crecimiento de *B. culicis* y *E. schaudinni* y marcación con [ $^{14}$ C] glucosa

Las cultivos de *B. culicis* se realizaron en 50 ml de 33 g/l de Brain-Heart Infusion, 3 g/l Tryptose, 0.4 g/l glucosa, 0.8 g/l KCl, 20 mg/l hemina, 3.2 g/l  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  y 1 mCi de [ $^{14}$ C] glucosa.

Por otra parte las células de *E. schaudinni* se crecieron en 100 ml de 5 g/l de Liver Infusion, 7,5 g/l de Proteose Peptone, 7.5 g/l de Bovine Heart Infusion , 5 g/l NaCl, 2 g/l KCl , 0.2 g/l ácido ascórbico, 0.5 g/l  $\text{H}_2\text{Na PO}_4$ , 0.5 g/l  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g/l sacarosa, 0.5 g/l MOPS, 20 mg/l hemina a pH 6.8 -7.2.

Todos los cultivos se realizaron en presencia de 1 mCi de [ $^{14}$ C]glucosa, salvo una marcación con un pulso de [ $^{14}$ C]glucosa durante 15 min que fue realizada según lo indicado en el texto en la sección de Resultados según el procedimiento descrito por Parodi *et al.*, 1983a.

Los cultivos celulares así marcados, fueron cosechados en fase exponencial.

En el caso de *B. culicis* se obtuvo un rendimiento de 0.8-1 g/50 ml de medio y para *E. schaudinni* de 0.7-0.9 g/100 ml de medio. Los precipitados, obtenidos por centrifugación a 1.000 x g durante 5 min, se resuspendieron en 1 ml de agua.

Se agregaron 2 ml de metanol y 3 ml de cloroformo y la mezcla fue agitada vigorosamente.

### **Aislamientos de compuestos radiactivos de *B. culicis* y *E. schaudinni***

#### **Dolicol-P-P-oligosacáridos**

A partir del cultivo marcado con un pulso de [<sup>14</sup>C]glucosa se realizó una partición en cloroformo / metanol / agua (3:2:1), se recuperó la interfase y se sometió a una segunda partición en iguales condiciones. La interfase obtenida fue lavada con 5 ml de agua y extraída 3 veces con 5 ml cada vez con cloroformo / metanol / agua (1:1:0.3). Los extractos fueron reunidos y evaporados a sequedad. El residuo fue solubilizado en 1 ml del mismo solvente y sembrado en una columna (0.5 x 5 cm) de DEAE-celulosa, forma acetato, equilibrada con cloroformo / metanol / agua (1:1:0.3). La columna se lavó con 10 ml del mismo solvente, y posteriormente se eluyó con 10 ml de soluciones de formiato de amonio 10 y 30 mM en el mismo solvente. Se recogieron fracciones de 1 ml y se reunieron aquellas fracciones que eluyeron con formiato de amonio 30 mM. Los dolicol-P-P-oligosacáridos así obtenidos fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

#### **Glicopéptidos**

Después de ser delipidificadas las interfases de las particiones cloroformo / metanol / agua (3:2:1) se lavaron con 5 ml de metanol y tres veces con 5 ml de agua. Los precipitados se resuspendieron en 5 ml de solución reguladora Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y 1mM CaCl<sub>2</sub>, se agregó 50 mg de Pronasa e incubó a 37 °C durante toda la noche.

Las proteólisis se detuvieron por calentamiento a 100 °C por 10 min. La solución se concentró a 1 ml y el sobrenadante se centrifugó a baja velocidad. Posteriormente dicho

sobrenadante fue desalado a través de una columna de 1,2 x 57 cm de Sephadex G 10 equilibrada con 7 % de 2-propanol.

El material obtenido en el volumen de exclusión se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 10 %. Las sustancias positivamente cargadas que migraron entre 8-20 cm hacia el cátodo se eluyeron y llevaron a sequedad. Esta fracción será designada como "glicopéptidos purificados".

### **Oligosacáridos sensibles y resistentes a Endo H**

Los glicopéptidos purificados fueron tratados con Endo H (ver Tratamientos enzimáticos). Luego de la incubación, la muestra se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 10%.

Las sustancias neutras, representan los "oligosacáridos sensibles a Endo H", mientras que el material que continúa migrando hacia el cátodo constituye los "glicopéptidos resistentes a Endo H"

## **Métodos**

### **Hidrólisis ácidas**

Las hidrólisis ácidas se realizaron bajo las condiciones especificadas en el texto en la sección de Resultados.

Luego del tratamiento, las soluciones fueron cargadas en una pipeta Pasteur conteniendo la resina AG 1-X4 (Bio Rad, forma acetato).

### **Reducción de oligosacáridos con NaBH<sub>4</sub>**

La reducción de los compuestos a sus respectivos alditoles se realizó en presencia de 0.1 N NaBH<sub>4</sub> durante 16 h a temperatura ambiente.

### **Oxidación suave con $\text{NaIO}_4$ , reducción e hidrólisis.**

Se utilizó el procedimiento descrito por de Lederkremer *et al.*, 1980, con ligeras modificaciones.

Las muestras fueron disueltas en 0.5 ml de solución de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y se agregaron 0.34 ml de solución de  $\text{NaIO}_4$  50 mM. Después de 30 min a temperatura ambiente, se agregó exceso de  $\text{NaBH}_4$  sólido, y se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. El exceso de  $\text{NaBH}_4$  fue destruido mediante el agregado de ácido acético glacial, y las muestras fueron tratadas con una resina catiónica (Dowex 50, forma  $\text{H}^+$ ), llevadas a sequedad y evaporadas reiteradamente con metanol para eliminar el ácido bórico. Finalmente, las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida fuerte.

### **$\beta$ -eliminación**

Se realizó en 1 ml de 0.1 N NaOH, 50 mM  $\text{NaBH}_4$  a 45 °C durante 14 h. Se desaló en columna de Sephadex G-10 según indicado más arriba para posteriores tratamientos.

### **Tratamientos enzimáticos**

#### **Endo H**

Las muestras fueron disueltas en 200  $\mu\text{l}$  de solución reguladora trietilamina-acetato 50 mM pH 5.5.

Se agregaron 0.01 unidades de Endo H y se incubó a 37 °C durante 24 h. La incubación se detuvo evaporando las muestras a sequedad en corriente de aire.

#### **$\alpha$ -manosidasa**

Para el tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa se dializaron 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión enzimática (aproximadamente 10 unidades) por 6 h contra 250 ml de solución reguladora citrato de



sodio 0.05 M pH 4.5, 0.1 mM de acetato de zinc. La solución enzimática se agregó a tubos de ensayo conteniendo las muestras secas, y se incubó 16 h a 37 °C. Finalizada la incubación se agregó 1 ml de agua y se calentó durante 3 min a 100 °C. Se centrifugó para eliminar la proteína desnaturalizada, y el sobrenadante se trató con una resina mixta (Amberlite MB-3, formas protón y acetato). Finalmente, se evaporó a sequedad en corriente de aire para posteriores análisis.

### **N-glicanasa**

Los glicopéptidos resistentes a Endo H, previamente llevados a seco, se incubaron en presencia de 1.5 unidades de N-glicanasa en 0.3 ml de solución reguladora 60 mM trietilamina-acetato pH 7.5, por 16 h a 37 °C.

### **Cromatografías y electroforesis**

#### **Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Se realizó con una columna Aminex HPX-878 (Bio Rad, Hercules, CA, USA) a 40 °C con una velocidad de flujo de 0.4 ml/min de 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los marcadores fueron detectados por medio de un detector de índice de refracción Modelo 2142 (Pharmacia, Uppsala, Suecia).

#### **Cromatografía de afinidad por concanavalina A-Sepharose**

Los glicopéptidos Endo H resistentes se aplicaron en una pipeta Pasteur que contenía 0.6 ml de dicha resina en solución reguladora de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 50 mM.

La resina fue lavada con 3 ml de la misma solución y el material retenido se eluyó con 2 ml de 0.1 M de  $\alpha$ -metilmanósido.

El glicósido fue removido a través de una columna de 1,2 x 57 cm de Sephadex G 10 en 7 % de 2-propanol. Los glicopéptidos recuperados en el volumen de exclusión de la última columna se sometieron a hidrólisis ácida fuerte.

### **Cromatografías en papel**

Las cromatografías fueron realizadas en papel Whatman 1.

Los solventes utilizados fueron los siguientes:

- (2) 1-propanol/ nitrometano/ agua (5:2:4)
- (3) 1-butanol/ piridina/ agua (10:3:3)
- (4) 1-butanol/ piridina/ agua (4:3:4)
- (5) nitrometano/ácido acético/ 95% etanol/ agua saturada en ácido bórico (8:1:1:1)

### **Electroforesis en papel**

Se realizaron en papel Whatman 1 lavado. Los solventes y las condiciones de corrida fueron las siguientes:

- (1) ácido fórmico 10 %: 25 V/cm, 120-180 min (ver Resultados).
- (6) borax 1.9 %, pH 9.4: 17 V/cm, 150 min.

### **Determinación de radioactividad**

Para la determinación de radioactividad en cromatogramas y electroforogramas, los papeles fueron cortados en tiras de 1 cm de ancho. Cada tira fue sumergida en líquido de centelleo [ 0.5 % 2.5 difeniloxazol, 0.025 % 1.4-bis 2-(4-metil-5-feniloxazol) benceno] en tolueno y la radioactividad contada en contador de centelleo. Las fracciones líquidas se midieron

mediante el agregado de 3 volúmenes de líquido de centelleo descrito por Bray, 1960, y contadas con el mismo instrumento que antes.

### **Marcadores**

Los marcadores [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{Man}_{5,9}\text{GlcNAc}$  se obtuvieron a partir de oviducto de gallina, y los [ $\text{glucosa-}^{14}\text{C}$ ]  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7,9}\text{GlcNAc}$  fueron preparados como se describió previamente (Parodi *et al.*, 1981; Trombetta *et al.*, 1989).

El tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa de [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{Man}_{5,9}\text{GlcNAc}$  y [ $\text{glucosa-}^{14}\text{C}$ ]  $\text{Glc}_1\text{Man}_{7,9}\text{GlcNAc}$  produjo la liberación de [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$  y [ $\text{glucosa-}^{14}\text{C}$ ]  $\text{Glc}_1\text{Man}_{4,5}\text{GlcNAc}$  (Engel y Parodi, 1985)

El tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa de [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  obtenido a partir de dolicol-P-P-oligosacáridos, aislados de *T. cruzi*, liberó [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$  (Engel y Parodi, 1985; Parodi y Quesada Allué, 1982).

## RESULTADOS

### **Identificación de nuevos monosacáridos en oligosacáridos unidos a asparagina en *Blastocrithidia culicis* y en *Endotrypanum schaudinni*.**

#### *B. culicis*

#### **Patrón de los oligosacáridos sensibles a Endo H y composición en monosacáridos.**

Células de *B. culicis* fueron crecidas en presencia de [<sup>14</sup>C]glucosa y las proteínas totales de la célula se digirieron con una proteasa inespecífica.

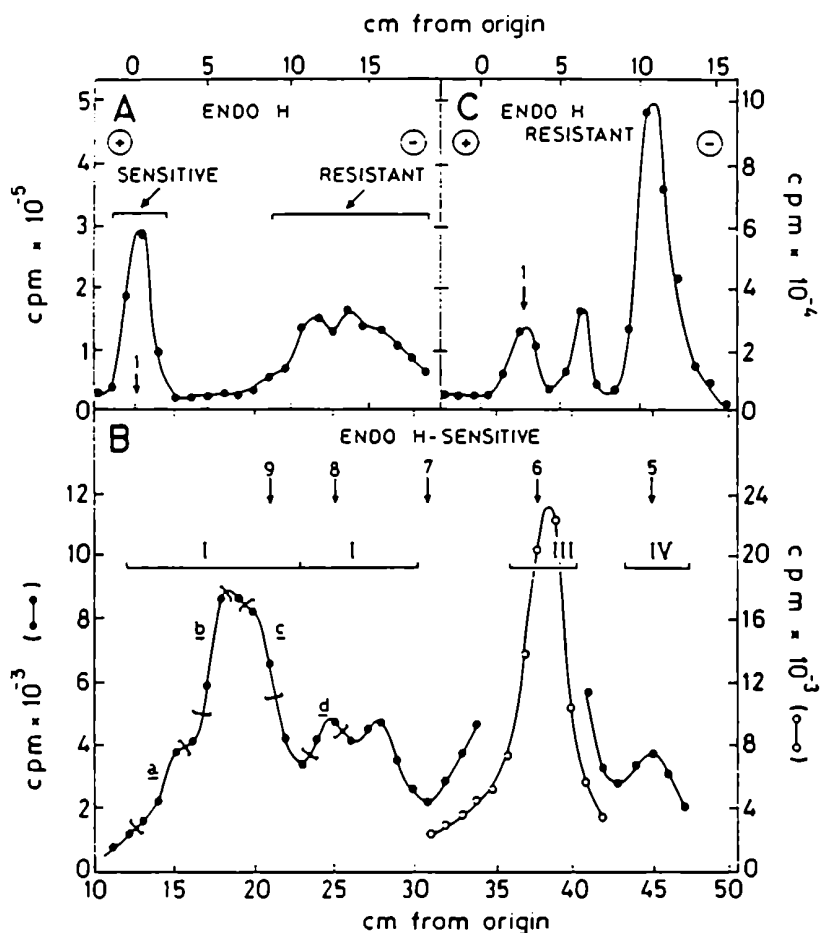
Los glicopéptidos resultantes fueron tratados con Endo H y sometidos a electroforesis en papel en 10 % de ácido fórmico (Fig. 1A)

El material neutro (compuestos sensibles a Endo H) se sembró en cromatografía en papel con marcadores externos de [<sup>14</sup>C] Man<sub>5,9</sub>GlcNAc. El patrón obtenido es mostrado en la Fig. 1B. Se observó un pico principal que migró levemente por delante del marcador Man<sub>6</sub>GlcNAc y varios compuestos que migraron más lento que el marcador Man<sub>6</sub>GlcNAc. Los compuestos mostrados en la Fig. 1 B se dividieron en 4 fracciones (Fig. 1 B, I-IV) para análisis posteriores.

Por hidrólisis ácida fuerte ( 1 N HCl 4 h 100°C) de los compuestos se obtuvo, en todas las fracciones, la liberación de sustancias que migraron como los marcadores de manosa y glucosamina en cromatografía en papel (Fig. 2, A-C).

Sin embargo, la hidrólisis de las fracciones I y II produjo la liberación de otras dos sustancias marcadas X e Y que migraron por delante del marcador de manosa (el perfil de compuestos liberados por la fracción I está mostrado en la Fig. 2 A; un patrón similar se obtuvo al someter a hidrólisis la fracción II)

La hidrólisis de la fracción III produjo, además de manosa y glucosamina, una sustancia de mayor migración (Fig. 2 B, sustancia Y) mientras que la fracción IV tan sólo liberó unidades de manosa y glucosamina (Fig. 2 C).



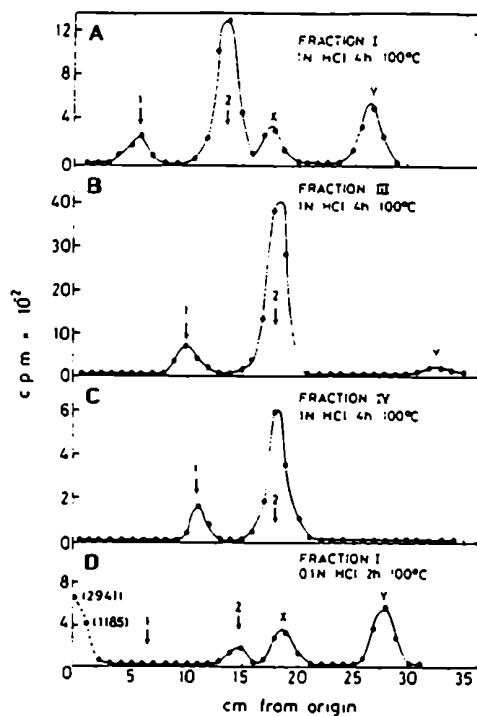
**Fig.1: Patrón de oligosacáridos sensibles a Endo H y de glicopéptidos resistentes a Endo H y a  $\beta$ -eliminación.** Panel A. Los glicopéptidos obtenidos de glicoproteínas totales fueron tratados con Endo H y sometidos a electroforesis en solvente 1 por 3 h a 25 V/cm.

Panel B. Las sustancias neutras del panel A (sensibles a Endo H) fueron corridas en cromatografía en papel en solvente 2.

El significado de I, II, III, IV, a, b, c y d está expresado en "Resultados".

Panel C. Las sustancias cargadas del panel A (resistentes a Endo H) fueron incubadas con 0.1 N NaOH 50 mM NaBH<sub>4</sub> por 14 h a 45 °C. Luego de desalar, las muestras fueron sometidas a electroforesis en papel como se indicó arriba por 150 min.

Se utilizaron los siguientes marcadores externos: 1, glucosa; 5, Man<sub>5</sub>GlcNAc; 6, Man<sub>6</sub>GlcNAc; 7, Man<sub>7</sub>GlcNAc; 8, Man<sub>8</sub>GlcNAc y 9, Man<sub>9</sub>GlcNAc.



**Fig.2: Composición monosacáridica de los oligosacáridos sensibles a Endo H.** Las fracciones I, III y IV de la Fig. 1 B fueron tratadas con 1 N HCl por 4 h a 100 °C (paneles A-C), ó la fracción I fue tratada con 0.1 N HCl por 2 h a 100 °C (panel D). Los hidrolizados se sometieron a cromatografía en papel en solvente 3. Se utilizaron los siguientes marcadores: 1, glucosamina y 2, manosa. El significado de X e Y se halla explicado en el texto.

### **Monosacáridos componentes de los oligosacáridos resistentes a Endo H y a $\beta$ -eliminación**

Los compuestos positivamente cargados, obtenidos por electroforesis en papel en 10 % de ácido fórmico luego de tratamiento con Endo H (glicopéptidos resistentes a Endo H, Fig. 1 A), fueron tratados con 0.1 N NaOH, 50 mM NaBH<sub>4</sub>, por 14 h a 45 °C, neutralizados, desalados, y sujetos a una segunda electroforesis en papel en 10 % de ácido fórmico.

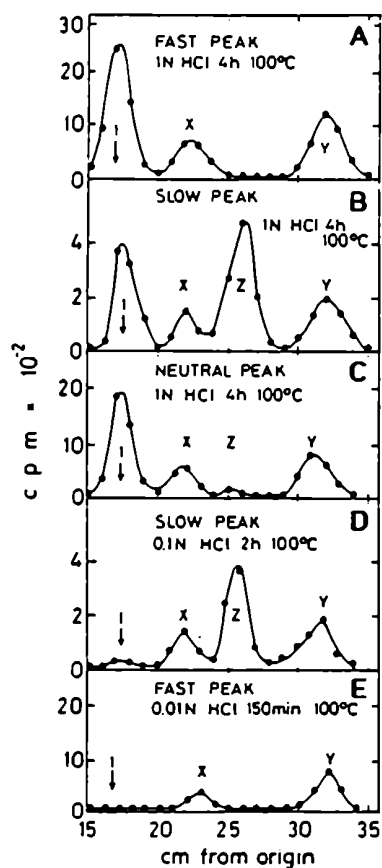
Se observaron tres picos, dos positivamente cargados y uno neutro (Fig. 1C).

Los glicopéptidos del pico de mayor movilidad de la Fig. 1 C, fueron sometidos a hidrólisis ácida fuerte, que dió como resultado la liberación de sustancias que migraron en

cromatografía en papel como manosa y como las sustancias X e Y según se las denominó más arriba (Fig. 3A).

Por otro lado, los picos que migraron más lento en la Fig. 1C, produjeron bajo tratamiento ácido fuerte, sustancias que migraron como manosa, como las sustancias denominadas X e Y y un nuevo compuesto (sustancia Z) que migró entre las sustancias X e Y (Fig. 3 B).

La hidrólisis ácida fuerte de los compuestos neutros de la Fig. 1 C reveló la presencia de manosa y de las sustancias X, Y y Z (Fig. 3 C).



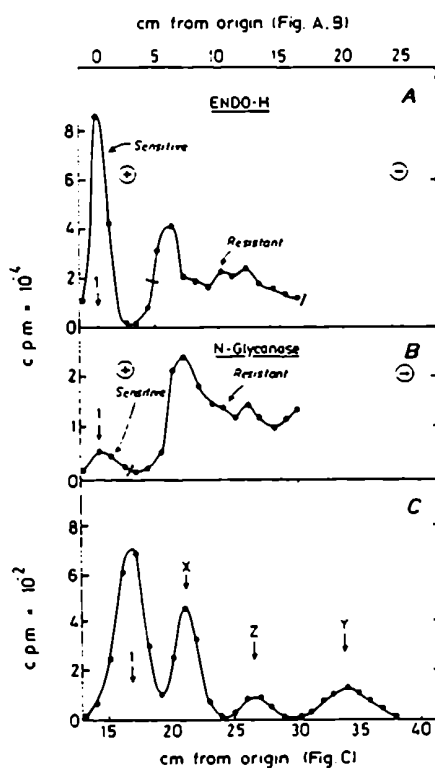
**Fig.3: Composición monosacáridica de los glicopéptidos resistentes a Endo H.** Las sustancias del pico de mayor movilidad (paneles A y E), las de menor movilidad (paneles B y D) y las del pico neutro (panel C) de la Fig. 1 C se trataron con 1 N HCl por 4 h a 100 °C (paneles A, B y C), con 0.1 N HCl por 2 h a 100 °C (panel D), ó con 0.01 N HCl por 150 min a 100 °C (panel E) y se sometieron a cromatografía en papel en solvente 3. Se utilizaron los siguientes marcadores: 1, manosa. El significado de X, Y y Z se halla explicado en el texto.

**Las sustancias X, Y y Z están presentes en glicopéptidos resistentes a Endo H pero sensibles a N-glicanasa.**

Los glicopéptidos resistentes a Endo H (Fig. 4 A) fueron tratados con N-glicanasa y sometidos a electroforesis en papel en 10 % de ácido fórmico (Fig. 4 B).

Las sustancias neutras liberadas se trataron con hidrólisis ácida fuerte seguida de cromatografía en papel.

Como se muestra en la Fig. 4 C, además de manosa aparecieron las sustancias X, Y y Z en el cromatograma.



**Fig.4 :En los oligosacáridos sensibles a N-glicanasa pero resistentes a Endo H se halló la presencia de manosa y de las sustancias X, Y y Z.** Los glicopéptidos totales fueron tratados con Endo H y corridos en electroforesis en papel en solvente 1 por 120 min (panel A). Los glicopéptidos resistentes a Endo H fueron tratados con N-glicanasa y sometidos a electroforesis en papel como se indicó arriba (panel B). Los compuestos neutros del panel B fueron tratados con 1 N HCl por 4 h 100 °C para posterior cromatografía en papel en solvente 3 (panel C). Se utilizó el siguiente marcador: 1, manosa.



El hecho de que sólo una pequeña porción de los oligosacáridos haya sido liberada por el tratamiento con N-glicanasa a partir de los glicopéptidos resistentes a Endo H, pudo deberse a que se utilizó una proteasa inespecífica (Pronasa) para generar los glicopéptidos de las glicoproteínas. Pocos glicopéptidos poseían por lo tanto, residuos de asparagina con los grupos amino y carboxilo unidos a otros aminoácidos. Esta doble sustitución es necesaria para la actividad de N-glicanasa.

### **Identificación de las sustancias X, Y y Z**

Por tratamiento ácido (0.1 N HCl 2 h 100 °C) de las fracciones I, II y III (Fig. 1 B, perfil de oligosacáridos sensibles a Endo H) y de los glicopéptidos resistentes a Endo H, resistentes a  $\beta$ -eliminación (Fig. 1 C), se produjo la liberación del 90-100 % de los compuestos X, Y y Z pero menos del 10 % de manosa (los patrones obtenidos por cromatografía en papel de las hidrólisis ácidas de la fracción I y de los glicopéptidos resistentes a Endo H, son mostrados en las Fig. 2D y 3D, respectivamente; el patrón de la Fig. 2D debe ser comparado con el de la Fig. 2A y el de la Fig. 3D con el de la Fig. 3B).

Además, al someter a hidrólisis ácida suave (0.01 N HCl 150 min 100 °C) a los compuestos resistentes a Endo H y a  $\beta$ -eliminación que mostraron mayor migración electroforética en la Fig. 1 C, se produjo la liberación de las sustancias X e Y en un 40-50 % sin la liberación de unidades de manosa (Fig. 3E; éste perfil debe compararse con la Fig. 3A).

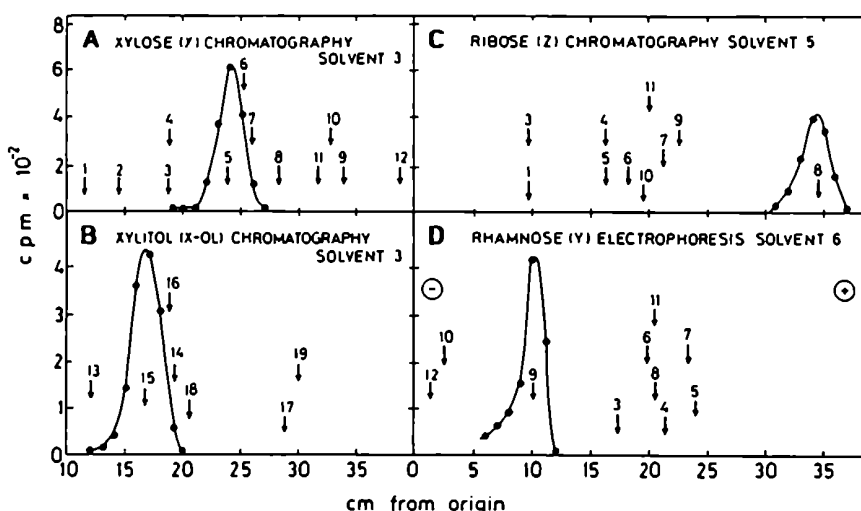
El comportamiento en medio ácido de las sustancias X, Y y Z es típico de las pentofuranosas, hexofuranosas, deoxipentosas y deoxihexosas.

A su vez, las sustancias X, Y y Z por hidrólisis ácida fuerte no mostraron movilidad al someterlas a electroforesis en papel en ácido fórmico, lo cual indicó que no eran aminoazúcares.

Las sustancias X, Y y Z migraron como los marcadores internos de xilosa, ribosa y ramnosa al analizarlos por cromatografía en papel en dos sistemas distintos de solventes (solvente 3 y solvente 5) y en electroforesis en papel en solvente 6, respectivamente. Además, cuando se las redujo con borohidruro de sodio, las sustancias X, Y y Z migraron como los marcadores internos de xilitol, ramnitol y ribitol respectivamente en cromatografía en papel en solvente 3.

Otros marcadores, cuyas migraciones no coincidieron con aquellos de las muestras marcadas en los sistemas ensayados fueron, galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, lixosa, fucosa, 3-O metil glucosa, 2-deoxiglucosa, 2-deoxiribosa, manitol, arabitol, lixositol y fucositol.

Para mayor claridad no son mostradas todas las cromatografías y electroforesis. Como ejemplo se muestra la xilosa y su alditol correspondiente analizados por cromatografía en papel en solvente 3 (Fig. 5 A y B respectivamente), la ribosa corrida en solvente 5 (Fig. 5C) y la ramnosa cromatografiada en solvente 6 (Fig. 5D).



**Fig.5: Identificación de los monosacáridos X, Y y Z.** El compuesto X se sometió a cromatografía en papel en solvente 3 antes y después de una reducción con 0.1 M NaBH<sub>4</sub> (paneles A y B respectivamente), el compuesto Z fue corrido en solvente 5 (panel C) y el compuesto Y sometido a electroforesis en papel en solvente 6 (150 min a 17 V/cm)(panel D). Se utilizaron los siguientes marcadores internos: 1, galactosa; 2, glucosa; 3, manosa; 4, arabinosa; 5, xilosa; 6, lixosa; 7, fucosa; 8, ribosa; 9, ramnosa; 10, 2 deoxiglucosa; 11, 3-O metilglucosa; 12, 2-deoxiribosa; 13, manitol; 14, arabitol; 15, xilitol; 16, lixositol; 17, fucositol; 18, ribitol; 19, ramnitol.

La migración de todos los marcadores empleados puede verse en los paneles de la Fig. 5. Dado que ningún par de los marcadores empleados muestra la misma migración en más de uno de los sistemas de análisis utilizados, y teniendo en cuenta las características de las sustancias X, Y y Z en medio ácido, se puede asegurar la identificación de estos compuestos como xilosa, ramnosa y ribosa respectivamente.

### Degradación con $\alpha$ -manosidasa de los compuestos sensibles a Endo H

Los compuestos de las fracciones I-IV (Fig. 1B) fueron degradados con  $\alpha$ -manosidasa, y los productos de reacción se sometieron a cromatografía en papel en solvente 4.

Los compuestos I y II produjeron manosa y varias sustancias que migraron más lento que el disacárido ManGlcNAc. Esto indica que, como se esperó para *B. culicis*, las muestras no poseían Man<sub>7</sub>GlcNAc, Man<sub>8</sub>GlcNAc ó Man<sub>9</sub>GlcNAc no sustituidos.

Es importante mencionar que la unión entre los residuos de manosa y N-acetilglucosamina en los oligosacáridos posee una configuración  $\beta$  que no es degradada por  $\alpha$ -manosidasa. La aparición del disacárido, por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa, es indicativo de oligosacáridos de tipo de alta manosa no sustituidos.

El tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa de los componentes de la fracción III produjo la liberación de manosa y compuestos que migraron como los marcadores de ManGlcNAc y Glc<sub>1</sub>Man<sub>4</sub>GlcNAc. Al hidrolizar el compuesto que migró como el último marcador, se obtuvo la liberación de unidades de manosa y ramnosa en una proporción respectiva de marca de 3.85. Estos resultados y los mostrados en las Figs. 1B y 6E indican que hay dos sustancias presentes en la fracción III, Man<sub>6</sub>GlcNAc y Rha<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc.

Por tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa de los compuestos de la fracción IV se produjo la liberación de ManGlcNAc. Esto, junto a la migración relativa y la composición de monosacáridos ( Figs. 1B y 2C) indica que la fracción IV está compuesta por Man<sub>3</sub>GlcNAc.

### Tamaño del "núcleo" de los oligosacáridos sensibles a Endo H

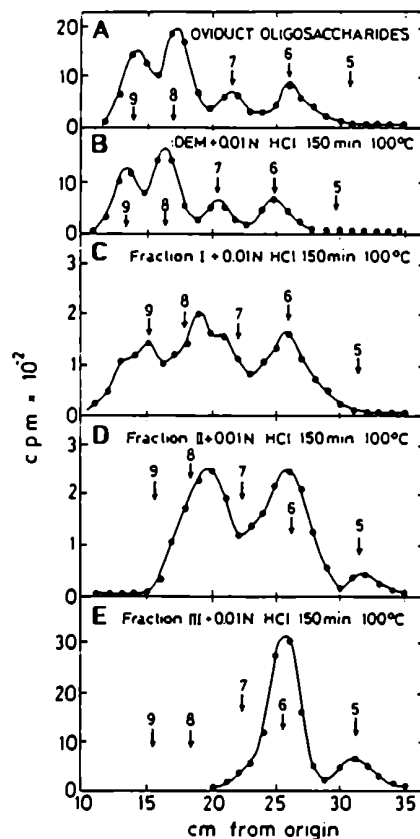
Los compuestos de las fracciones I, II y III (Fig. 1B) se sometieron a hidrólisis ácida suave (0.01 N HCl 150 min 100 °C) seguido de cromatografía en papel.

Como se mencionó arriba, bajo estas condiciones se liberan del oligosacáridos cerca del 40-50 % de las unidades de xilosa, ramnosa y ribosa.

Un experimento control realizado con [<sup>14</sup>C]Man<sub>6,9</sub>GlcNAc proveniente de oviducto de gallina, mostró que el mismo tratamiento no produjo ninguna modificación en el patrón de los compuestos ó la aparición de [<sup>14</sup>C]Man<sub>3</sub>GlcNAc (Fig. 6 A y B).

Los componentes de la fracción I produjeron por hidrólisis ácida suave, compuestos que migraron como aquellos de la fracción II más Man<sub>6</sub>GlcNAc, mientras que los componentes

de la fracción II liberaron  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y muy poca cantidad de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  (Fig. 6 C y D).



**Fig.6: Oligosacáridos sensibles a Endo H sometidos a tratamiento ácido suave.** Panel A, marcadores de oviducto de gallina  $^{14}\text{C}$  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ . Panel B, idem A pero calentado por 150 min a 100 °C en 0.01N HCl. Panel C, D y E, los compuestos de las fracciones I, II y III respectivamente (ver Fig. 1B) fueron tratados con ácido suave como se mencionó arriba. En todos los casos los compuestos fueron sometidos a cromatografía en papel en solvente 2. Se utilizaron los siguientes marcadores: 5,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ ; 6,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ; 7,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ; 8,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ ; 9,  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ .

Los compuestos que migraron como  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  al degradarlos con  $\alpha$ -manosidasa produjeron  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ , lo que confirma su identidad como  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ .

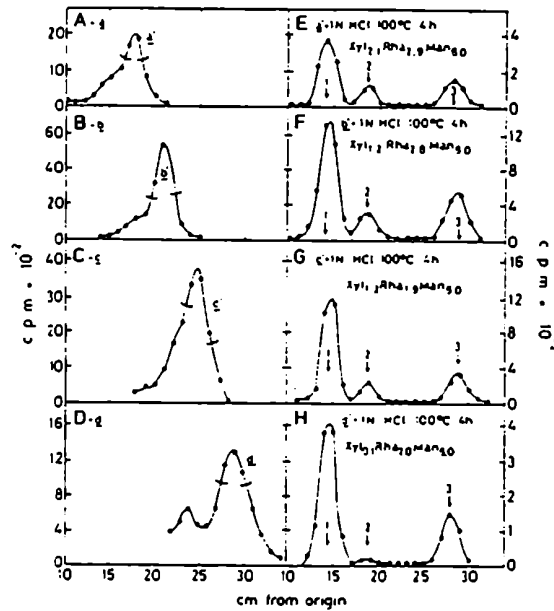
Por otro lado, los componentes de la fracción III produjeron  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  (Fig. 6E) al ser tratados con ácido suave.

Estos resultados indican que todos los componentes de la fracción I y la mayor parte de la II son  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  más distintas cantidades de unidades de ramnosa y xilosa.

Una pequeña proporción de los compuestos de la fracción II posee un núcleo de  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ , mientras que la fracción III está compuesta, como se mencionó arriba, por  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y  $\text{Rha}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ .

**Composición monosacáridica de algunos de los componentes de las fracciones I y II.**

Los componentes en picos u hombros indicados en las fracciones I y II (Fig. 1B) como a, b, c y d se eluyeron y recromatografiaron en el mismo solvente (Fig. 7, A-D) Los compuestos indicados como a', b', c' y d' en la Fig. 7 se sometieron a hidrólisis ácida fuerte seguida de cromatografía en papel en solvente 3 (Fig. 7, E-H).



**Fig.7:Composición monosacáridica de algunos de los oligosacáridos sensibles a Endo H.** Paneles A-D, los compuestos designados a, b, c y d en la Fig. 1B fueron recromatografiados en solvente 2. Paneles E-H, los compuestos designados a', b', c' y d' en los paneles A-D se sometieron a hidrólisis ácida fuerte (1 N HCl 4 h 100 °C) y posterior cromatografía en papel en solvente 3. La proporción relativa de los monosacáridos, es indicada en los paneles, asumiendo que todos tienen la misma radioactividad específica y que todos tienen 6 unidades de manosa. Se utilizaron los siguientes marcadores: 1, manosa, 2, xilosa y 3, ramnosa.

La relación de la marca entre manosa, xilosa y ramnosa, asumiendo que todos los compuestos tienen un núcleo de  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  (ver arriba), es indicado en la Fig. 7, E-H.

Dado que el precursor radioactivo empleado ( $[^{14}\text{C}]$ glucosa) es el mismo monosacárido que el único azúcar no marcado utilizado en el medio de crecimiento, se asume que todas las unidades de monosacáridos en los oligosacáridos derivan de la glucosa y que tienen la misma radioactividad específica.

Se puede concluir que los compuestos analizados (a', b', c' y d') tienen la siguiente composición respectivamente:  $\text{Xyl}_2\text{Rha}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Xyl}_1\text{Rha}_3\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Xyl}_1\text{Rha}_2\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y  $\text{Rha}_2\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ .

La composición concuerda con la migración relativa de los compuestos en relación a los marcadores de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$  y  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$  mostrados en la Fig. 1B.

### *E. schaudinni*

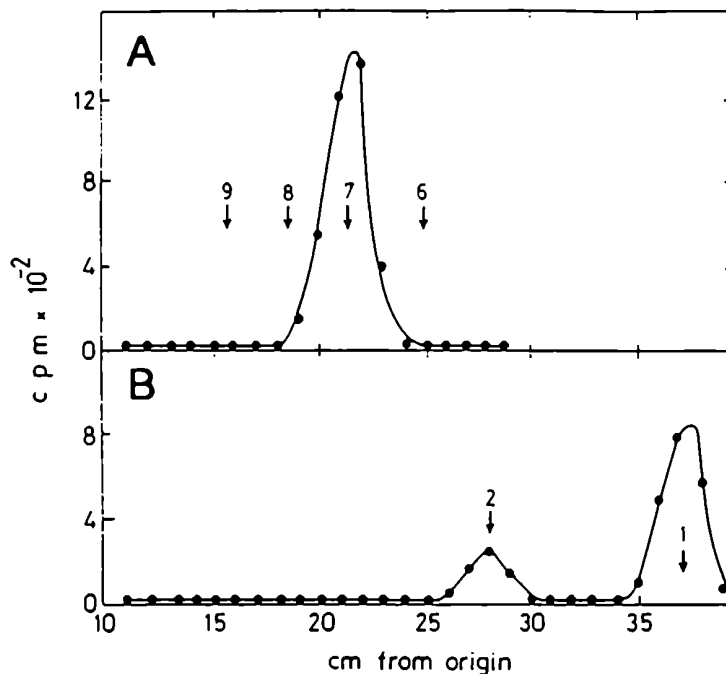
#### **Oligosacáridos transferidos a partir de derivados de dolicol-P-P**

Células de *E. schaudinni* fueron incubadas durante 15 min con  $[^{14}\text{C}]$  glucosa y se aislaron los derivados de dolicol-P-P para posterior hidrólisis ácida suave (0.01 N HCl por 15 min a 100 °C).

Los oligosacáridos así obtenidos se sometieron a cromatografía en papel en solvente 2.

Como se muestra en la Fig. 1A, se obtuvo un solo compuesto que migró como el marcador de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ .

La incubación del oligosacárido con  $\alpha$ -manosidasa de poroto de chanco liberó sustancias que migraron como los marcadores de manosa y el trisacárido  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$  en cromatografía en papel en solvente 4, lo que indicó que no había unidades de glucosa presentes en el compuesto (Fig. 1B).



**Fig. 1- Caracterización de los oligosacáridos unidos a dolicol-P-P** Oligosacáridos de *E. schaudinni* unidos a dolicol-P-P marcados con [ $^{14}\text{C}$ ] se calentaron por 15 min a 100 °C en 0.01 N HCl y se sometieron a cromatografía en papel en solvente 2 (Fig. 1A). Las sustancias marcadas en A fueron tratadas con  $\alpha$ -manosidasa para posterior cromatografía en papel en solvente 4 (Fig. B).

Marcadores: 1, manosa; 2,  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2$ ; 6,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ; 7,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ; 8,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$  y 9,  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$

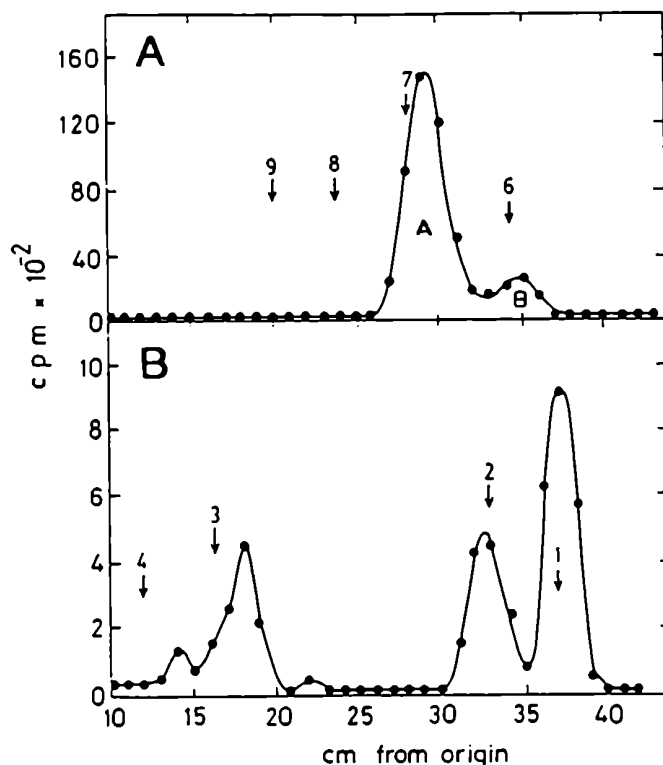
### Patrón de los oligosacáridos sensibles a Endo H

A partir de un cultivo de *E. schaudinni* crecido en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa se extrajeron proteínas totales para posterior degradación con una proteasa inespecífica (Pronasa) y tratamiento con Endo H para obtener los oligosacáridos sensibles a la misma.

Se observaron dos picos en cromatografía en papel en solvente 2.

Como se muestra en la Fig. 2A uno de ellos migró levemente por delante del marcador  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$  (pico A), mientras que el otro migró cerca del marcador  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  (pico B).

El tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa de las sustancias de los picos A y B liberó manosa, el disacárido ManGlcNAc y compuestos que mostraron una migración menor que el disacárido (el perfil obtenido por degradación con  $\alpha$ -manosidasa del pico A está mostrado en la Fig. 2B).



**Fig.2 - Patrón y caracterización de los oligosacáridos sensibles a Endo H.** Los oligosacáridos sensibles a Endo H se sembraron en cromatografía en papel en solvente 2 (Fig.A). Las sustancias del pico A de la Fig. A se trataron con  $\alpha$ -manosidasa para posterior cromatografía en solvente 4 (Fig. B). Marcadores: 1, manosa; 2, Man<sub>1</sub>GlcNAc; 3 Glc<sub>1</sub>Man<sub>4</sub>GlcNAc; 4, Glc<sub>1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc; 6, Man<sub>6</sub>GlcNAc; 7, Man<sub>7</sub>GlcNAc; 8, Man<sub>8</sub>GlcNAc; 9, Man<sub>9</sub>GlcNAc

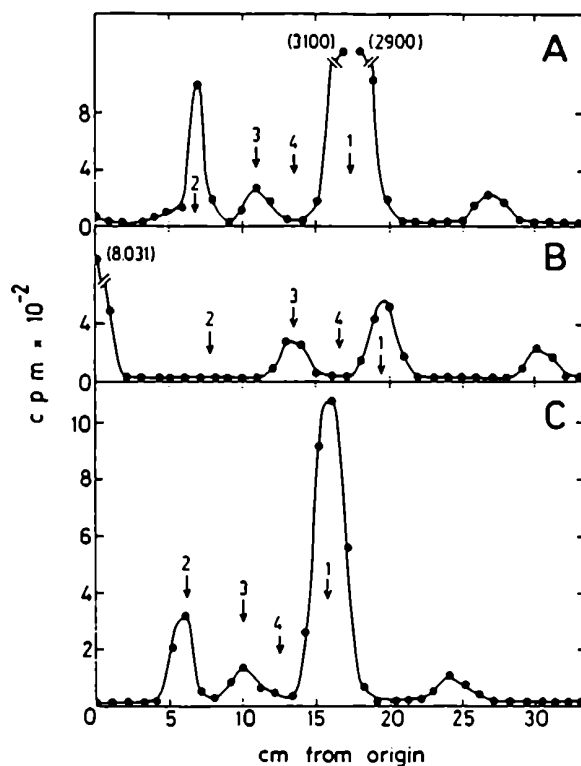
La presencia del disacárido como producto de reacción indica que Man<sub>7</sub>GlcNAc y Man<sub>6</sub>GlcNAc están presentes en las muestras.

Por otro lado, la presencia de sustancias de menor migración como productos de reacción de la  $\alpha$ -manosidasa, indicó la presencia de otros compuestos en las muestras originales.



### Composición monosacáridica de los compuestos sensibles a Endo H

Los oligosacáridos del pico A en la Fig. 2A se sometieron a hidrólisis ácida fuerte (1 N HCl 100 °C 4 h) ó débil (0.1 N HCl 100 °C 2 h) y los productos de degradación se identificaron por cromatografía en papel. Cuatro componentes aparecieron bajo la primera condición, los cuales migraron como glucosamina, galactosa, manosa y como un compuesto no identificado que migró con un  $R_{Man} = 1.6$  (Fig. 3A).



**Fig.3- Componentes monosacáridicos de los oligosacáridos sensibles a Endo H.** Sustancias del pico A de la Fig. 2A fueron tratadas con 1 N HCl por 4 h a 100 °C (Fig. A). Las condiciones experimentales utilizadas en la Fig.B fueron las mismas que en la Fig. A pero el tratamiento fue con 0.1 N HCl por 2 h a 100 °C. Las sustancias del pico B de la Fig. 2A fueron tratadas como en la Fig. A (Fig. C). En todos los casos las muestras se desarrollaron en cromatografía en papel en solvente 3. Marcadores: 1, manosa; 2, glucosamina; 3, galactosa y 4, glucosa.

Bajo hidrólisis débil se obtuvo un patrón diferente, no apareció glucosamina en el cromatograma y se hidrolizó manosa en menor cantidad. Sin embargo, la liberación de galactosa y del compuesto no identificado fue similar bajo las dos condiciones empleadas (Fig. 3B).

Las sustancias del pico B de la Fig. 2A mostraron similar composición monosacarídica que aquellas del pico A: por hidrólisis ácida fuerte se reveló la presencia de glucosamina, galactosa, manosa y residuos de un compuesto de  $R_{Man}=1.6$  (Fig. 3C).

### **Caracterización de la configuración de la galactosa e identificación del compuesto de $R_{Man}=1.6$ .**

La labilidad de los residuos de galactosa y del compuesto de  $R_{Man}=1.6$ , bajo las condiciones de hidrólisis débil es típica de hexo y pentofuranosas.

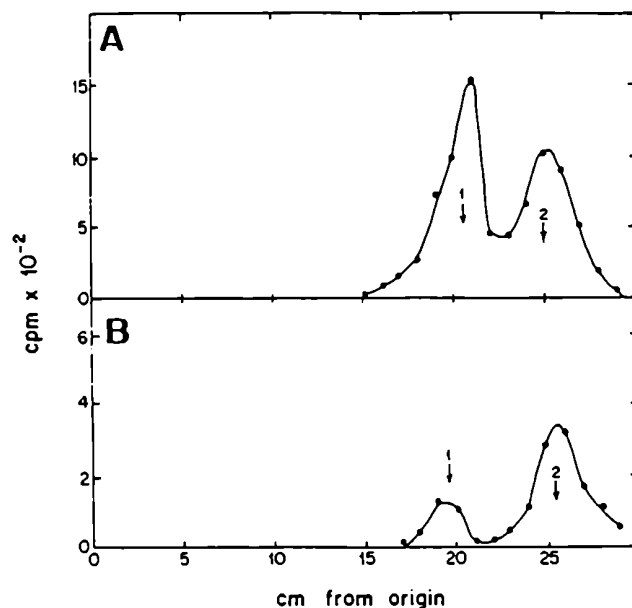
Con el objeto de confirmar la presencia de residuos de galactosa en configuración furanosa, los oligosacáridos sensibles Endo H y los glicopéptidos resistentes a Endo H fueron sometidos a oxidación suave con periodato de sodio. Bajo las condiciones empleadas la unión entre el C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>, que es exocíclica en las galactofuranosas, se rompe mientras que las otras uniones entre dioles son estables.

La reducción con borohidruro de sodio seguida de hidrólisis ácida fuerte debería liberar arabinosa (Mendelzon *et al.*, 1986).

Los residuos de manosa y arabinosa comigran en cromatografía en papel en solvente 3 (ver Fig. 5B).

Los productos obtenidos por el tratamiento con periodato, reducción e hidrólisis ácida fuerte, que migraron como manosa en el solvente 3, fueron eluidos y sometidos a electroforesis en papel en solvente 6.

Bajo estas condiciones se pueden distinguir los picos de manosa y arabinosa (Fig. 4 A-B). Estos resultados confirman la presencia de galactofuranosas en oligosacáridos sensibles a Endo H y en glicopéptidos resistentes a la enzima.



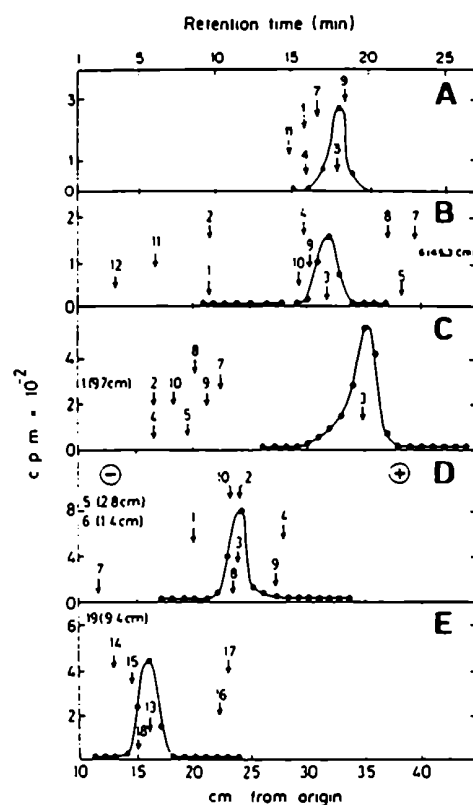
**Fig. 4-Identificación de las unidades de galactofuranosas.** Los oligosacáridos sensibles a Endo H (A) y los glicopéptidos resistentes a Endo H (B) fueron oxidados con periodato de sodio, reducidos con NaBH<sub>4</sub> y tratados con 1 N HCl por 4 h. Las muestras se sometieron a cromatografía en papel en solvente 3. Las sustancias que migraron como el marcador de manosa se eluyeron y se separaron por electroforesis en papel en solvente 6 por 180 min a 25 V cm<sup>-1</sup>. Marcadores: 1, manosa; 2, arabinosa.

La sustancia de  $R_{Man}=1.6$  se identificó como ribosa, la cual migró con el marcador interno de esta pentosa en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H (Fig. 5A), en cromatografía en papel en solventes 3 y 5 (Fig. 5 B-C), y en electroforesis en papel en solvente 6 (Fig. 5D).

Además, cuando se redujo con borohidruro de sodio, migró con el marcador interno de ribitol en cromatografía en papel en solvente 3 ( Fig. 5E).

Se utilizaron otros marcadores, que no coincidieron con el compuesto de  $R_{Man}=1.6$  bajo los sistemas ensayados: galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, lixosa, xilosa, ramnosa, fucosa, 3-O-metilglucosa, 2-deoxiglucosa, 2-deoxiribosa, manitol, arabitol, lixositol y fucositol.

El hecho de que el compuesto de  $R_{Man}=1.6$  comigre con el marcador interno de ribosa en los cuatro sistemas y que además su reducción produzca el alditol correspondiente, asegura su identificación como ribosa, dado que ningún par de los marcadores usados mostraron la misma migración en más de uno de los sistemas empleados.



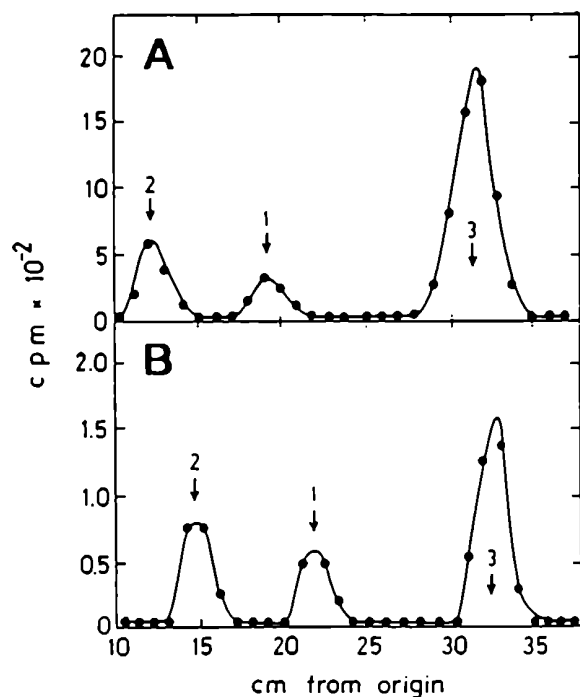
**Fig.5- Identificación de los residuos de ribosa** . La sustancia que migró con un  $R_{Man}=1.6$  en la Fig. 3 A-C se eluyó y sometió a cromatografía líquida de alta presión en una columna Aminex HPX-87H (A), en cromatografía en papel en solvente 3 (B) y en solvente 5 (C) ó en electroforesis en papel en solvente 6 (D) por 180 min a 25 V/cm. La misma sustancia se redujo con borohidruro de sodio y se desarrolló en cromatografía en papel en solvente 3 (Fig. E). Marcadores: 1, manosa; 2, arabinosa; 3, ribosa; 4, xilosa; 5, 2-deoxiglucosa; 6, 2-deoxiribosa; 7, ramnosa; 8, 3-O-metilglucosa; 9, fucosa; 10, lixosa; 11, glucosa; 12, galactosa; 13, ribitol; 14, xilitol; 15, lixositol; 16, fucositol; 17, ramnitol; 18, arabitol; 19, manitol. Los marcadores internos de las muestras radioactivas fueron ribosa y manosa en A-D y ribitol en E.

### Composición monosacáridica de los glicopéptidos resistentes a Endo H

Los glicopéptidos resistentes a Endo H se sometieron a hidrólisis ácida fuerte para posterior cromatografía en papel (Fig. 6A). El cromatograma mostró la presencia de galactosa, manosa y del compuesto que migró con un  $R_{Man}=1.6$ , identificado anteriormente como ribosa.

Este último monosacárido fue el constituyente principal de la muestra. Se obtuvieron los mismos resultados a los descritos anteriormente cuando los glicopéptidos se sometieron a hidrólisis ácida fuerte ó a hidrólisis ácida en condiciones más suaves (0.1 N HCl 100 °C, 2 h), produciéndose la liberación de galactosa y de ribosa en iguales cantidades en ambas condiciones; sin embargo, la liberación de residuos de manosa fue mucho menor en el último tratamiento (no mostrado).

Para determinar que los residuos de galactosa y de ribosa estaban unidos a manosas en los glicopéptidos resistentes a Endo H, éstos se aplicaron a una columna de concanavalina A-Sepharose. El material retenido por la columna y eluido con  $\alpha$ -metilmanosido liberó, bajo tratamiento ácido fuerte, los mismos componentes que en la muestra original (Fig. 6B). El hecho de que la galactosa y la ribosa estén unidas a manosas en los glicopéptidos resistentes a Endo H indicó que aquellos monosacáridos se hallaban en oligosacáridos unidos a asparagina.



**Fig.6- Monosacáridos componentes de los glicopéptidos resistentes a Endo H.**

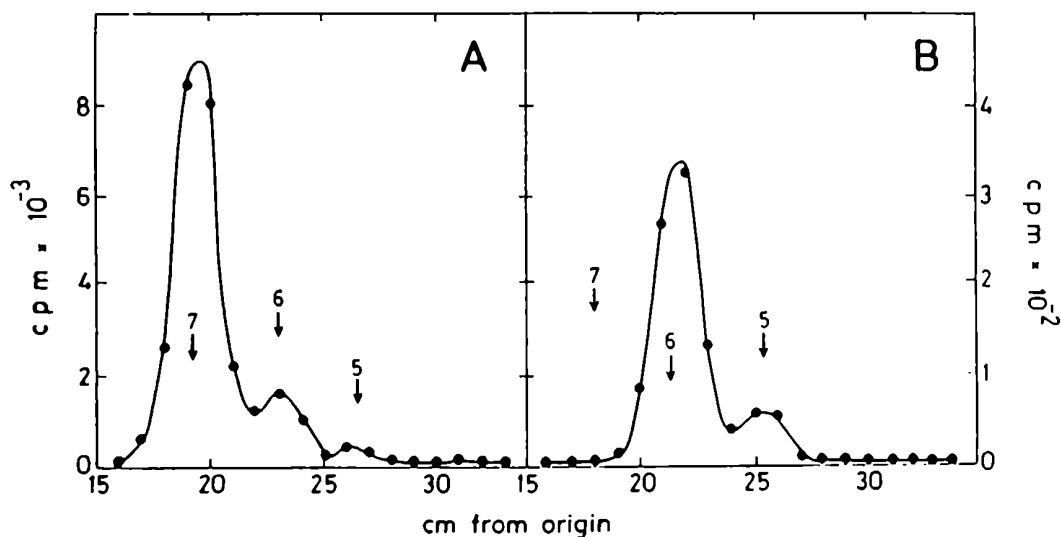
Los glicopéptidos resistentes a Endo H fueron tratados con 1 N HCl a 100 °C por 4 h (A) ó aplicados a una columna de concanavalina A-Sepharose y el material eluido con  $\alpha$ -metilmanosido se trató con ácido como se describió arriba (B). Las muestras se sometieron a cromatografía en papel en solvente 3.

Marcadores: 1, manosa; 2, galactosa; 3, ribosa.

### Identificación de los "núcleos" de polimannosa presentes en los oligosacáridos sensibles a Endo H.

Los resultados presentados anteriormente indican que las sustancias del pico A (Fig.2A) son una mezcla de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$  y compuestos que poseen un número menor de unidades de manosa más unidades de ribosa y/o galactosa.

Los oligosacáridos del pico A fueron sometidos a hidrólisis ácida suave (0.02 N HCl, 100 °C por 150 min). Bajo estas condiciones se observó que fueron liberadas todas las unidades de ribosa y galactosa pero menos del 3% de las unidades de manosa. La cromatografía en papel mostró que los compuestos tratados con ácido suave migraron exactamente como los marcadores de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  (Fig.7A). Su posterior tratamiento con  $\alpha$ -manosidasa liberó manosa y  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ , lo que confirma su identificación.



**Fig.7- Caracterización de los núcleos de polimannosa de los oligosacáridos sensibles a Endo H**

Las sustancias del pico A y B de la Fig 2A se trataron con 0.02 N HCl a 100 °C por 150 min y fueron sometidos a cromatografía en papel en solvente 2 (A y B respectivamente).

Marcadores: 5,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ ; 6,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ; 7,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ; 8,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ ; 9,  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ .

Se puede concluir que las sustancias del pico A en la Fig. 2A son una mezcla de  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Rib}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y/o  $\text{Gal}_1\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ , y  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  conteniendo dos unidades de galactosas ó ribosas ó una de cada uno.

Similarmente a los resultados presentados arriba se observó que las sustancias del pico B (Fig. 2A) son una mezcla de  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y de compuestos que poseen un menor número de unidades de manosa más unidades de galactosa y/o ribosa.

Los oligosacáridos del pico B liberaron, luego de tratamiento ácido suave,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$  y  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  (Fig. 7B).

Se puede concluir que las sustancias del pico B son una mezcla de  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Gal}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  y  $\text{Rib}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ .

## DISCUSION

### *B. culicis*

Los oligosacáridos de las glicoproteínas de *B. culicis* presentan dos nuevos residuos de monosacáridos (ramnosa y ribosa), los cuales nunca habían sido descritos en oligosacáridos unidos a asparagina.

Dos líneas de evidencia indican que la ribosa y ramnosa son constituyentes de compuestos unidos a asparagina:

a) los oligosacáridos que contienen ramnosa fueron liberados por Endo H y N-glicanasa, y aquellos que contienen ribosa fueron liberados por la última enzima, y b) una condición de  $\beta$ -eliminación similar a la empleada aquí mostró que no sólo es suficiente para liberar completamente los oligosacáridos unidos a serina/treonina, sino que también libera parte de los compuestos unidos a asparagina (Ogata y Loyd, 1982).

Se puede concluir que los compuestos cargados de la Fig. 1C que contienen ramnosa y ribosa representan oligosacáridos unidos a asparagina.

Es probable que las sustancias neutras mostradas en la Fig. 1C estén todas compuestas por oligosacáridos unidos a asparagina antes de  $\beta$ -eliminación, debido a que su composición monosacáridica (Fig. 3A) es una combinación de los dos picos cargados (Fig. 3, A y B). La baja proporción de ribosa en la Fig. 3 C refleja la menor proporción del pico que menos migra (y que contiene ribosa) cuando es comparado con el más rápido (Fig. 1C).

La presencia de los mismos monosacáridos en el pico de mayor migración (glicopéptidos resistentes a Endo H), (Fig. 3 A), y en los compuestos sensibles a Endo H de la fracción I no resulta sorprendente, ya que la remoción de una sola unidad de manosa (la externa unida en  $\alpha$  1-3) por procesamiento de la  $\alpha$ -manosidasa puede convertir el oligosacárido transferido ( $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ ) en un compuesto resistente a Endo H (Maley *et al.*, 1978).

La ramnosa es un componente de pared celular de plantas y bacterias. Las pectinas son ramnogalacturonanos que tienen en algunas instancias residuos adicionales como arabinosa, galactosa, fucosa, metilfucosa y glucosa, mientras que en procariontes se ha encontrado ramnosa en exopolisacáridos y lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (Fischer y Bennet., 1991; Sutherland, 1985).

La ribosa tan sólo ha sido encontrada en glicoconjugados de procariontes como el lipopolisacárido de mixobacterias (Sutherland y Smith, 1973).



Es importante mencionar que esta es la primera vez en que se describe la presencia de residuos de ribosa en glicoconjugados eucarióticos.

La xilosa, otro de los monosacáridos presentes en glicoproteínas de *B. culicis* no es solamente un constituyente de las hemicelulosas (xiloglucanos) de las plantas, sino también de oligosacáridos unidos a asparagina presentes en plantas, moluscos y artrópodos (Sutherland, 1985; Sutherland y Smith, 1973; Faye y Chrispeels, 1988).

Contrariamente a *B. culicis*, los oligosacáridos unidos a proteínas en las especies arriba mencionadas son resistentes a Endo H (Xyl<sub>1</sub>Fuc<sub>0,1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), los cuales no pertenecen al tipo de alta manosa como los del parásito estudiado.

El estudio de la estructura completa de los compuestos cuya composición es descripta, es difícil de analizar por el hecho de que tanto la ribosa como la ramnosa son nuevos componentes de N-glicoproteínas y en consecuencia no se han descrito glicosidasas específicas para esos residuos.

Además, se encontró que la β-xilosidasa de *Aspergillus niger* no libera unidades de xilosa de compuestos Endo H sensibles.

Por otro lado, la acetólisis, que es un método muy usado para estudios estructurales, no es aplicable aquí porque libera residuos de xilosa, ribosa y ramnosa además de romper las uniones α 1-6 entre las uniones de manosa.

La ausencia de glicosidasas específicas y la imposibilidad de usar acetólisis hace al otro método comúnmente usado, la permetilación, no utilizable para determinar la estructura de este tipo de compuestos nuevos.

#### *E. schaudinni*.

Las células de *E. schaudinni*, como todos los otros tripanosomátidos estudiados hasta ahora, son incapaces de sintetizar oligosacáridos glucosilados unidos a dolicol-P-P (de la Canal y Parodi, 1987). En este caso el compuesto unido al derivado lipídico posee la composición de Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, al igual que otros casos como en *C. fasciculata*, *C. hamosa* y *L. enrietti* (Mendelzon y Parodi, 1986; Parodi *et al.*, 1981; de la Canal y Parodi, 1987). Aunque la estructura de los oligosacáridos no se estudió en detalle, probablemente sea igual a la de los parásitos mencionados anteriormente: Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3 (Man α 1-2 Man α 1-3Man α 1-6)Manβ 1-4 GlcNAcβ 1-4 GlcNAc. Este es el intermediario en la síntesis de Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-dolicol en células de mamíferos, plantas y hongos (Kornfeld y Kornfeld, 1985).

Los oligosacáridos unidos a asparagina en *E. schaudinni* poseen dos particularidades, la presencia de unidades de galactofuranosa y de ribosa.

La presencia de galactofuranosas había sido descrita en varios tripanosomátidos monogenéticos como *C. fasciculata*, *C. hamosa*, *H. samuelpeessoai* y *L. samueli* (Mendelzon *et al.*, 1986; Moraes *et al.*, 1988; González-Clemente *et al.*, 1990). Como se demostró previamente para *T. cruzi* y ahora para *E. schaudinni*, las galactofuranosas también son propias de los oligosacáridos unidos a asparagina en tripanosomátidos digenéticos (Golgher *et al.*, 1993). Estos residuos parecen ser mucho más abundantes en el parásito recientemente estudiado que en *T. cruzi*.

En N-glicoproteínas de *E. schaudinni* se halló la presencia de ribosa como residuo monosacárido. Este compuesto se observó no sólo formando parte de los oligosacáridos sensibles a Endo H, sino también en los glicopéptidos resistentes a dicha enzima, aunque en mayor proporción en estos últimos.

Como se mostró en la primer parte de este capítulo, se encontró el mismo monosacárido tanto en glicoproteínas de un tripanosomátido monogenético, *B. culicis*, como en *E. schaudinni* que es un parásito digenético.

Residuos de ribosa habían sido encontrados tan sólo en glicoconjugados de procariotas como el lipopolisacárido de myxobacterias (Sutherland y Smith, 1973).

Es de esperar que los residuos de galactofuranosa y de ribosa en los oligosacáridos de alta manosa sean altamente inmunogénicos. Esta podría ser una explicación a los repetidos intentos fallidos de crecer *E. schaudinni* en varias especies de mamífero, excepto en perezosos, lo que implicaría que el sistema inmune de estas especies es incapaz de reconocer estos monosacáridos.

Son ampliamente reconocidos los diversos roles que cumplen los oligosacáridos de glicoconjugados (Varki, A., 1993). Sus funciones se extienden desde aquellas puramente estructurales hasta las que son cruciales para el desarrollo y crecimiento como así también la función y supervivencia del organismo.

Por esta razón es importante identificar en primer término la composición de los mismos para luego poder determinar la estructura y posteriormente asignar su función. La descripción de nuevos azúcares presentes en glicoconjugados ejemplifica la enorme diversidad estructural que podría verse reflejada en una diversidad funcional requerida para el desarrollo y diferenciación de los organismos complejos, y para su interacción con otros organismos en el medio ambiente.

## REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (1994) en: *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed. Garland Publishing, Inc. Nueva York & London.
- Bangs, J.D., Doering, T.L., Englund, P.T. & Hart, G.W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17697-17705.
- Bause, E. (1983) *Biochem. J.* **209**, 331-336.
- Berger, E.G., Buddecke, E., Karmelig, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) *Experientia* **38**, 1129-1158.
- Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C. & Hill, R.L. (1981) *Adv. Enzymol.* **52**, 23-175.
- Borst, P. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 701-732.
- Borst, P. (1991) *Trends. Genet.*, **7**, 139-141.
- Bosch, M., Trombetta, S.E., Engstrom, U. & Parodi, A.J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17360-17365.
- Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279-295.
- Cazzulo, J.J. (1992) *FASEB J.*, **6**, 3153-3161.
- Couto, A.S., Katzin, A.M., Colli, W. & de Lederkremer, R. M. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**, 145-154.
- Couto, A.S., Gonçalves, M. F., Colli, W. & de Lederkremer, R. M. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**, 100-108.

- Cross, G. A. (1990) *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **6**, 1-39.
- Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1990) en: *Molecular Cell Biology*. 2th ed. Scientific American books. NY.
- de la Canal, L. & Parodi, A.J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11128-11133.
- de Lederkremer, M.R., Casal, O.L., Alves, M.J.M. & Colli, W. (1980) *FEBS Lett.* **116**, 25-29.
- Engel, J.C. & Parodi, A.J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10105-10110.
- Faye, L. & Chrispeels, M.L. (1988) *Glycoconj. J.* **5**, 245-256.
- Fischer, R.L. & Bennet, A.B. (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 675-703.
- Golgher, D. B., Colli, W., Souto-Padrón, T. & Zingales, B. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**, 249-264.
- González-Clemente, M.C., Ferrero-García, M.A., Bossio, J.C., Bosch, M. & Parodi, A.J. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**, 289-292.
- Gooley, A.A. & Williams, K.L. (1994) *Glycobiology* **4**, 413-417.
- Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 8814-8818.
- Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A., & Hart, G.W (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 9005-9013.
- Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., & Hart, G.W (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2563-2568.
- Hasilik, A. Klein, V., Waheed, A., Strecker, G. & von Figura, K. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7074-7078

- Hoare, C. A. (1972) *The trypanosomes of mammals*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 60-66.
- Holt, G.D., Haltiwanger, R.S., Torres, C.R., & Hart, G.W. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 14847-14850.
- Hubbard, S.C. & Ivatt, R.J. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 555-583.
- Kornfeld, S. & Kornfeld, R. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Lederkremer, G. Z. & Parodi, A. J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **884**, 363-369.
- Maley, F., Tarentino, A.L. & Trimble, R. B. (1978) *Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes* (Walborg, E.F., Jr., ed) pp. 86-103, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Mendelzon, D.H. & Parodi, A.J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2129-2133.
- Mendelzon, D.H., Previato, J.O. & Parodi, A.J. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**, 355-37.
- Moraes, C.T., Bosch, M. & Parodi, A.J. (1988) *Biochemistry* **27**, 1543-1549.
- Ogata, S. & Loyd, K. O. (1982) *Anal. Biochem.* **119**, 351-359.
- Olafson, R.W., Thomas, J.R., Ferguson, M.A.J., Dwek, R.A., Chaudhuri, M. Chang, K.P. & Rademacher, T.W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12240-12247.
- Opperdoes, F. R. (1987) *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 127-151.
- Parodi, A.J. & Cazzulo, J.J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7641-7645.
- Parodi, A. J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.* **559**, 1-37.

- Parodi, A. J., Lederkremer, G. Z. & Mendelzon, D. H. (1983a) *J. Biol. Chem.* **258**, 5589-5595.
- Parodi, A. J., Mendelzon, D. H. & Lederkremer, G. Z. (1983b) *J. Biol. Chem.* **258**, 8260-8265
- Parodi, A.J., Martin Barrientos, J. & Engel, J.C. (1984 a) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **118**, 1-7.
- Parodi, A. J., Mendelzon, D. H., Lederkremer, G. Z. & Martin Barrientos, B. (1984 b) *J. Biol. Chem.* **259**, 6351- 6357.
- Parodi, A. J. & Quesada Allué, L.A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7641-7645.
- Parodi, A. J., Quesada Allué, L.A. & Cazzulo, J.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6201-6205.
- Perry, K. & Agabian, N. (1991) *Experientia*, **47**, 118-128.
- Previato, J.O. , Mendelzon, D. H. & Parodi, A.J. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **18**, 343-357.
- Schachter, H. & Roseman, S. (1980) *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*, (Lennarz, W.H., ed.) pp. 85-160, Plenum Press, Nueva York.
- Schachter, H., Mc Guire, E.J. & Roseman, S. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 5321-5328.
- Sousa, M., Ferrero-Garcia, M.A. & Parodi, A. J. (1992) *Biochemistry* **31**, 97-105.
- Stuart, K. (1991) *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 327-344.
- Sutherland, I.W. (1985) *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 243-270.
- Sutherland, I.W. & Smith, M. L. (1973) *J. Gen. Microbiol.* **74**, 259-266.

- Tabas, I. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6633-6639.
- Trombetta, S. E., Bosch, M. & Parodi, A. J. (1989) *Biochemistry* **28**, 8108-8116.
- Trombetta, S. E., Ganán, S. & Parodi, A.J. (1991) *Glycobiology*, **1**, 155-161.
- Trombetta, S. E. & Parodi, A. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9236-9240.
- Varki, A., (1993) *Glycobiology* **3**, 97-130.
- Varki, A. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **256**, 4150-4152.
- Vickerman, K. (1976) *Biology of the Kinetoplastida* (Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A., eds) **1**, 1-34, Academic Press, Londres.
- Waheed, A., Hasilik, A., Pohlmann, R., & von Figura, K. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4150-4152.
- Wallace, F. C. (1976) *Biology of the Kinetoplastida* (Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A., eds) **2**, 213-240, Academic Press, Londres.
- Walsh, C. Bradley, M. & Nadeau, K. (1991) *Trends. Biochem. Sci.*, **16**, 305-309.
- Zamze, S.E., Ashford, D.A., Wooten, E.W., Rademacher, T.W. & Dwek, R.A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 20244-20261.
- Zamze, S.E., Wooten, E.W., Ashford, D.A., Ferguson, M.A., Dwek, R.A. & Rademacher, T.W. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187**, 657-663.
- Zingales, B. Carniol, C., de Lederkremer, R. M. & Colli, W. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**, 135-144.

## **PARTE II**

**Caracterización y purificación parcial de una nueva actividad  
enzimática en *Dictyostelium discoideum***



## RESUMEN

En el presente trabajo se muestra, en membranas de *Dictyostelium discoideum*, la presencia de una actividad enzimática que transfiere N-acetilglucosamina-1-P, a partir de UDP-GlcNAc, a las proteínas en residuos de serina (UDP-GlcNAc: Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa).

Dicha actividad fue parcialmente purificada por cromatografía de afinidad en concanavalina A-Sepharose y por cromatografía de intercambio iónico en una columna de Mono Q.

La enzima mostró una absoluta dependencia de cationes divalentes, siendo el  $Mn^{++}$  más efectivo que el  $Mg^{++}$ . Posee un amplio rango de pH óptimo (6.5-9.0). El  $K_m$  para el UDP-GlcNAc fue de 18  $\mu M$ . En ensayos libres de células se utilizaron como sustratos exógenos apomucina y tiroglobulina nativa ó desnaturalizada, mientras que proteínas como la seroalbúmina bovina y la uteroferrina nativa ó desnaturalizada no mostraron capacidad aceptora para dicha actividad.

A partir de un cultivo de células realizado en presencia de [ $^{32}P$ ]fosfato se aislaron proteínas celulares (solubles y de membrana) y del medio de cultivo. En todas las fracciones se encontró la estructura de GlcNAc-1-P-Ser, sin embargo, la mayor proporción se halló en las proteínas secretadas.

Al someter microsomas a centrifugaciones en gradientes de sacarosa, la actividad apareció en membranas de menor densidad al compararla con la actividad que fosforila oligosacáridos de alta manosa. Esto mostró que la actividad que fosforila residuos de serina en las proteínas (UDP-GlcNAc: Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa) es diferente a la que fosforila oligosacáridos del tipo de alta manosa unidos a las proteínas (UDP-GlcNAc: glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa).

Parte de los resultados presentados en la segunda parte de esta tesis han sido publicados en el siguiente artículo:

-Characterization and partial purification of a novel enzymatic activity UDP-GlcNAc: Ser-protein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*.

Silvana Merello, Armando J. Parodi, and Roberto O. Couso. *J. Biol. Chem.* (1995) **270**, 7281-7287.

## INTRODUCCION

### Generalidades

Durante esta última década aumentó de una forma notoria la comprensión sobre la biosíntesis y estructuras de oligosacáridos unidos a proteínas, en especial en células de mamíferos (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Snider, 1984; Kobata, 1984). Se han descrito una gran cantidad de estructuras relacionadas que permitieron determinar varios principios generales de su biosíntesis (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Snider, 1984; Kobata, 1984).

Además, dado que los métodos analíticos han mejorado, se pudieron encontrar estructuras nuevas, uniones inusuales y azúcares no descritos anteriormente (Matsuura y Jones 1985; Lederkremer y Parodi, 1984; Freeze y Wolgast, 1986; Parkkinen y Finne, 1985).

Es generalmente aceptado que los carbohidratos tienen un gran potencial para codificar información necesaria en funciones biológicas altamente específicas.

Sin embargo, hasta el momento hay pocos casos en los que se demuestra claramente que estas estructuras llevan información altamente específica. Uno de los ejemplos más notables de arreglos de azúcares con una determinada función biológica lo constituye el marcador de las enzimas lisosomales de mamíferos recién sintetizadas que permite su correcta localización en lisosomas. Este proceso se realiza mediante la interacción de los N-oligosacáridos fosforilados de las enzimas lisosomales con el receptor de fosfomanosas (Sly y Fischer, 1982; Hoflack y Kornfeld, 1985).

Una de las formas más usadas para comprender la biosíntesis de moléculas complejas y sus funciones es el análisis de mutantes que posean alteraciones fenotípicas.

Este tipo de análisis ha sido de fundamental importancia para disectar la vía de biosíntesis de N-oligosacáridos de mamíferos usando líneas celulares resistentes a lectinas (Stanley, 1981, 1985; Stanley y Chaney, 1985; Campbell y Stanley, 1984).

Muchas de estas células carecen de algunos residuos de azúcares ó bien de una clase entera de oligosacáridos. Varias de estas mutaciones no son letales al menos bajo las condiciones de laboratorio.

Estas observaciones sugieren que muchas de las funciones cruciales de los glicoconjugados pueden ocurrir a nivel multicelular. Desafortunadamente, cultivos de células clonadas de mamíferos no pueden desarrollarse en la mayoría de los casos en organismos multicelulares. De todas formas, es necesario analizar mutantes de organismos multicelulares que tengan

alterada la síntesis de glicoconjugados. La detección y el análisis de este tipo de mutaciones puede resultar dificultoso dado que pueden ser letales en organismos multicelulares.

Por otro lado, un organismo que tenga estadios multicelulares optativos puede ser una ventaja significativa para utilizarlo como modelo.

El protozario *Dictyostelium discoideum* puede servir como un sistema modelo apropiado para estos estudios dado que presenta dos ventajas con respecto al resto de los otros sistemas utilizados como modelo de investigación.

La primer ventaja es que una población celular genéticamente homogénea puede ser inducida a un desarrollo multicelular sincronizado (Loomis, 1975; 1982).

La segunda ventaja de *D. discoideum* como sistema modelo está dada porque es un organismo haploide. Esto facilita producir e identificar cepas mutantes que tengan alterados algún proceso fisiológico ó de desarrollo, incluyendo la función y biosíntesis de los glicoconjugados.

La mayor parte de la información que se tiene acerca de glicoconjugados de *D. discoideum* está relacionada con glicoproteínas.

### **Características generales de glicosilación de proteínas en *D. discoideum***

Esencialmente, todos los estudios de oligosacáridos de glicoproteínas de *D. discoideum* se refieren a N-glicosilación aunque hay alguna evidencia sobre la presencia de O-glicosilación (Freeze y Wolgast, 1986; Wilhems *et al.*, 1974; Bauer *et al.*, 1971).

En *D. discoideum* los N-oligosacáridos están compuestos por residuos de N-acetilglucosamina, manosa y fucosa. Se han descrito compuestos semejantes a dolicol-P-Man y dolicol-P-Glc y se piensa que actúan como intermediarios e intervienen en la biosíntesis de los N-oligosacáridos (Crean y Rossomando, 1977; Rossler *et al.*, 1978; 1981). La glicosilación de proteínas ocurre de forma cotraduccional por transferencia en bloque en el retículo endoplasmático del oligosacárido  $\text{Glc}_3\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$  a partir de un lípido precursor semejante a dolicol, similar al descrito para la mayor parte de los sistemas eucarióticos (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Snider, 1984).

Luego de la transferencia del oligosacárido a los residuos de asparagina de las proteínas, se produce el procesamiento del mismo por la remoción secuencial de los residuos de glucosa. La glucosidasa I cliva el residuo de glucosa terminal unido  $\alpha(1,2)$ , mientras que la glucosidasa II remueve los dos residuos de glucosa unidos  $\alpha(1,3)$  (Freeze *et al.*, 1983a). Procesamientos posteriores del oligosacárido por remoción de residuos de manosa son

mínimos en células vegetativas. A diferencia de lo encontrado en organismos superiores, no hay evidencia de la presencia de ácido siálico ó de cadenas del tipo complejo multiantenarias. Si bien *D. discoideum* es capaz de sintetizar oligosacáridos unidos N-glicosidicamente a partir de las estructuras típicas como las encontradas en la mayoría de las células eucarióticas, se encontró que muchas de las modificaciones son distintas a aquellas caracterizadas en células de mamíferos. Así, algunos oligosacáridos de *D. discoideum* sufren importantes modificaciones por la adición de fosfatos, sulfatos, metilésteres (Freeze *et al.*, 1980; 1983b; Freeze y Miller, 1980; Gable *et al.*, 1984) y N-acetilglucosaminas ó fucosas periféricas (Henderson, 1984).

Uno de los sistemas de síntesis de glicoproteínas que ha sido bien estudiado bioquímica, genética e inmunoquímicamente es el de las enzimas lisosomales.

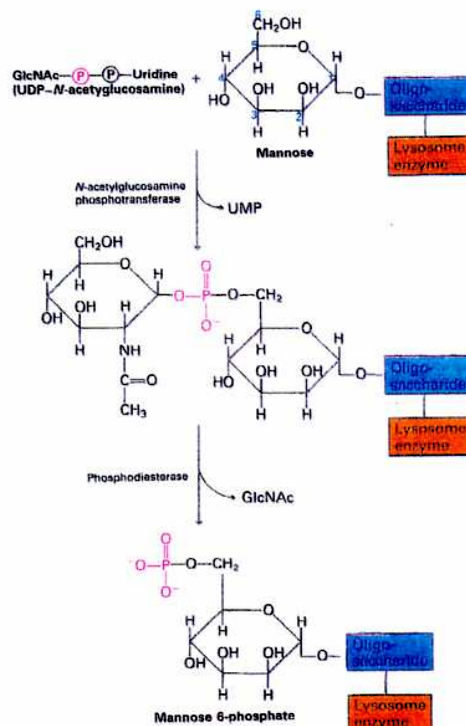
## **Estructura y biosíntesis de las enzimas lisosomales**

### **Características generales en células de mamíferos**

Los lisosomas son organelas ácidas citoplasmáticas que contienen numerosas enzimas hidrolíticas capaces de degradar la mayor parte de las macromoléculas biológicas. Estas organelas están encargadas de la destrucción de agentes infecciosos como las bacterias, de la degradación de hormonas y del transporte de proteínas. Además los lisosomas participan del recambio intracelular de compuestos y en la renovación de tejidos. La importancia del sistema lisosomal está enfatizada por el hecho de que se han descrito alrededor 35 enfermedades humanas relacionadas con el compartimento lisosomal.

Las enzimas lisosomales, junto con las proteínas secretorias y las proteínas de membrana plasmática son sintetizadas en los polisomas unidos a membranas del retículo endoplasmático (RER). Estas proteínas contienen un péptido señal hidrofóbico en el extremo amino terminal que media su transporte vectorial a través de la membrana del RER hacia el lumen de dicha organela (Walter *et al.*, 1985). Las enzimas lisosomales (como la mayoría de las proteínas que van a ser secretadas y las de membrana plasmática) son modificadas cotraduccionalmente por la transferencia de oligosacáridos en la N-glicosilación (Kornfeld y Kornfeld, 1985). En el RER se cliva el péptido señal y comienza el procesamiento del oligosacárido transferido a los residuos de asparagina de las proteínas con la remoción de tres residuos de glucosa y varios de manosa (ver parte I).

Las proteínas, por transporte vesicular, son dirigidas hacia el aparato de Golgi donde sufren las modificaciones post-traduccionales necesarias para alcanzar su correcta ubicación (lisosomas, gránulos secretorios, membrana plasmática, etc.). Si bien en el aparato de Golgi algunos oligosacáridos de las enzimas lisosomales son procesados a unidades del tipo complejo, la mayoría adquieren residuos de fosfomanosa a través de la acción concertada de dos enzimas (von Figura y Hasilik, 1986, Kornfeld, 1986). En primer lugar, la UDP-N-acetilglucosamina:enzima lisosomal N-acetilglucosamina-fosfotransferasa (EC 2.7.8.17) (GlcNAc fosfotransferasa) transfiere N-acetilglucosamina 1-P, a partir del nucleótido-azúcar UDP-GlcNAc, al hidroxilo del C6 de determinados residuos de manosa lo que da lugar a la formación de un intermediario fosfodiéster (Reitman y Kornfeld, 1981)(Fig. 1).



**Fig.1. Síntesis del marcador de manosa 6-P sobre una enzima lisosomal.** La síntesis ocurre en dos pasos. La primera enzima N-acetilglucosamina-fosfotransferasa transfiere GlcNAc-1-P a la posición 6 de uno ó más residuos de manosas de los N-oligosacáridos presentes en las enzimas lisosomales. La segunda enzima, una fosfo-glicosidasa, remueve las unidades de N-acetilglucosamina creando el marcador de Man 6-P. Tomado de Darnell *et al.*, 1990.

Esta enzima posee un sitio de reconocimiento, dependiente de la conformación de la proteína sustrato, que une específicamente la hidrolasa a ser modificada y un sitio catalítico separado para la reacción de fosfotransferasa (Fig.2).

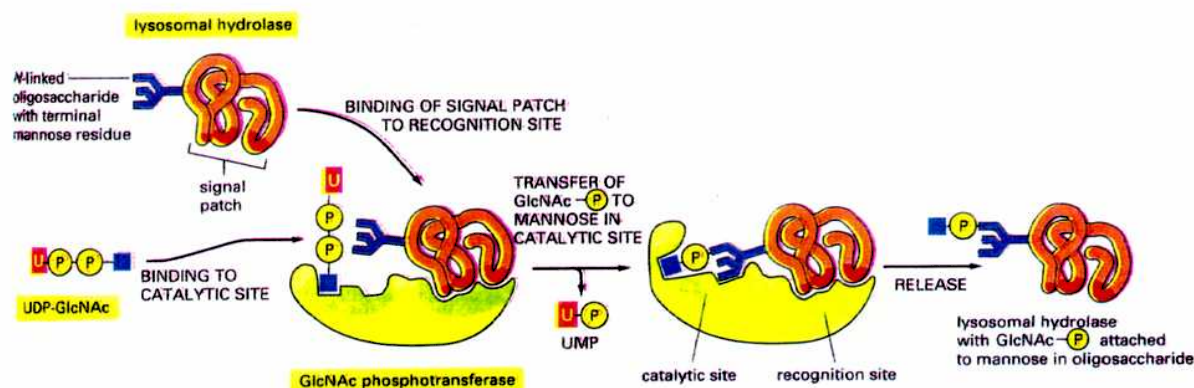
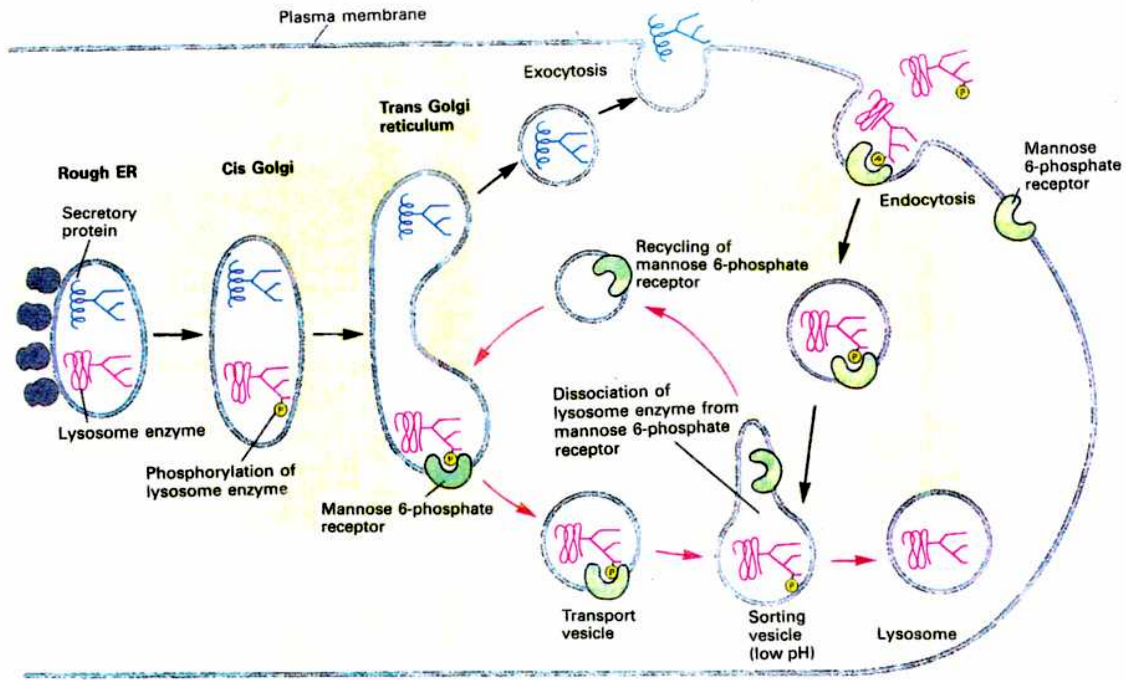


Fig.2. Reconocimiento de hidrolasas lisosomales. Tomado de Alberts *et al.*, 1994.

Posteriormente la segunda enzima, N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.1.4.45) (GlcNAc-fosfodiésterasa) remueve el residuo de N-acetilglucosamina (Varki y Kornfeld, 1980; 1981). Los fosfomonoéster resultantes (marcadores de reconocimiento) se unen con alta afinidad a los receptores para manosa 6-P (MPRs) localizados en el *trans* Golgi (Dahms *et al.*, 1989; Griffiths y Simons, 1986). De esta forma las enzimas lisosomales son segregadas de aquellas que están destinadas a ser secretadas ó dirigidas a membranas. Los complejos ligando-receptor se engloban en vesículas recubiertas de clatrina que se funden con endosomas tardíos. El bajo pH de dichas organelas produce la disociación de las hidrolasas de su receptor (González- Noriega *et al.*, 1980). Los receptores se reciclan hacia el aparato Golgi para unir nuevas moléculas de ligando y las enzimas lisosomales son empaquetadas en los lisosomas (Brown *et al.*, 1986).



Los MPRs se reciclan también, a partir del aparato de Golgi ó de los endosomas tardíos, hacia la membrana plasmática (Brown *et al.*, 1986)(Fig. 3).



**Fig.3. Mecanismo de localización de las enzimas lisosomales a los lisosomas.** Durante la biosíntesis, las enzimas lisosomales migran hacia el aparato de Golgi donde uno ó más residuos de manosa son fosforilados. En el *trans* Golgi, los receptores de Man 6-P se asocian al su ligando y por transporte vesicular se fusionan con vesículas ácidas. El bajo pH de este compartimento produce la disociación de la enzima lisosomal del receptor. La enzima lisosomal es enviada a los lisosomas y el receptor es reciclado. Tomado de Darnell *et al.*, 1990.

### Características en *D. discoideum*

Ha sido estudiada en detalle la biosíntesis y la localización de la enzima lisosomal  $\alpha$ -manosidasa de *D. discoideum*. La proteína es sintetizada como un precursor de 120 kDa, es cotraduccionalmente N-glicosilada en 9-10 sitios y eventualmene clivada en dos subunidades maduras de 58 y 60 kDa (Mierendorf *et al.*, 1985; Pannel *et al.*, 1982; Wood y Kaplan, 1985). La mayor parte de los oligosacáridos se hallan modificados por la adición

de sulfatos, fosfatos y fosfometilesteres (Freeze *et al.*, 1980; Gable *et al.*, 1984; Freeze, 1985), y probablemente con residuos periféricos de N-acetilglucosamina. Otra enzima estudiada fue la  $\beta$ -glucosidasa, la cual es sintetizada como un precursor de 105 kDa y clivada a la forma madura de 100 kDa. Esta enzima también se halla modificada por la adición de sulfatos y fosfatos (Freeze *et al.*, 1983b).

El hallazgo de Man 6-P en los N-oligosacáridos de estas enzimas sugirió que las mismas podrían ser llevadas a los lisosomas por el sistema fosfomanosil-receptor al igual que en células de mamíferos.

*D. discoideum* contiene una GlcNAc-1-P transferasa que es capaz de transferir, a partir de UDP-GlcNAc, este grupo a un aceptor exógeno como el  $\alpha$ -metilmanósido al igual que su contraparte de mamíferos (Reitman y Kornfeld, 1981).

Sin embargo, la transferasa de *D. discoideum* no posee el sitio de unión requerido para la interacción específica con las enzimas lisosomales, y no fosforila eficientemente a la mayoría de las enzimas lisosomales de mamíferos. Una excepción la constituye la uteroferrina que es una enzima lisosomal de mamífero capaz de ser fosforilada por la transferasa de este protozooario en forma eficiente (Couso *et al.*, 1986; Lang *et al.*, 1986).

Además *D. discoideum* carece de la actividad de N-acetilglucosaminidasa necesaria para el clivaje del fosfodiéster GlcNAc-1-P-Man (Couso *et al.*, 1985). Varios grupos trataron de identificar un receptor fosfomanosil en *D. discoideum* pero los resultados fueron negativos (Cardelli *et al.*, 1986). En consecuencia, a partir de todos los estudios realizados hasta el momento, se deduce que no existiría el típico sistema de localización dependiente de Man 6-P como el encontrado en células de mamíferos. Una pregunta que permanece sin responder es la función que tendría la Man 6-P en estos organismos. Parte de la respuesta puede encontrarse en el hecho de que los residuos de Man 6-P en *D. discoideum* no se encuentran como tales, sino que existen como una inusual forma de fosfodiéster ácido-estables, metilfosfomanosa, Man 6-P-OCH<sub>3</sub> (Gable *et al.*, 1984). Los diésteres encontrados en células de mamíferos, GlcNAc-P-Man, son extremadamente sensibles al ácido (0.02 N HCl, 100 °C, 20 min), a diferencia de los anteriormente mencionados, Man 6-P-OCH<sub>3</sub>, que requieren condiciones ácidas más drásticas para su hidrólisis (1 N HCl, 100 °C, 4 h) y liberar Man 6-P y metanol (Freeze y Wolgast, 1986). Dado que en las enzimas lisosomales de estos organismos se encuentran en la forma de Man 6-P-OCH<sub>3</sub> y no de Man 6-P el mecanismo de localización de enzimas lisosomales continúa desconocido.



### **Antecedentes y objetivos del presente trabajo**

En trabajos previos se caracterizó la presencia de una UDP-GlcNAc: glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa en membranas de *D. discoideum* (Lang *et al.*, 1986; Sharkey y Kornfeld, 1989).

Esta enzima transfiere GlcNAc-1-P a residuos de manosa de glicoproteínas que contienen oligosacáridos del tipo de alta manosa.

Trabajando con dicha actividad se observó fosforilación de aceptores endógenos al incubar un lisado total de células en presencia de [ $\beta$ - $^{32}$ P]UDP-GlcNAc como único dador marcado. Posteriormente, las proteínas marcadas radioactivamente se sometieron a digestión exhaustiva con una proteasa inespecífica y se aplicaron a una columna de concanavalina A-Sepharose. Se observó que los glicopéptidos marcados radioactivamente no mostraban afinidad por dicha lectina. Esto sugirió que la radioactividad asociada a este material no se hallaba en oligosacáridos de alta manosa.

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar la actividad responsable de dicha fosforilación y determinar si este proceso está mediado por la ya descrita, UDP-GlcNAc: glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, ó si estamos en presencia de una nueva actividad enzimática que, al igual a la anterior, transfiere GlcNAc-P a partir de UDP-GlcNAc.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### **Materiales**

La fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*, el 2-[N-morfolino] etanosulfonato (MES), el fluoruro de fenil metano sulfonilo (PMSF), el trans epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidino) butano (E-64), el  $\alpha$ -metilmanósido, la UDP-hexanolamina-Sepharose, la mucina submaxilar bovina, la sero albúmina bovina, la Man 6-P, GlcNAc-1-P, el UDP-GlcNAc, la N-acetilglucosamina, el ditiotreitól, el ATP, la aglutinina de germen de trigo-Sepharose (WHA), la Ser-P y la Thr-P fueron compradas en Sigma (St. Louis, MO, USA). La *Griffonia simplicifolia* I-Agarose (GSI) fue provista por E.Y.Labs., (San Mateo, CA, USA). La Proteose-Peptone y el Yeast Extract fueron comprados en Difco (Detroit, MI, USA). El UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc (5.25 Ci/mmol), el [<sup>32</sup>P]Pi (9.000 Ci/mmol) y el [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3.000 Ci/mmol) fueron comprados en New England Nuclear (Boston, MA, USA). La concanavalina A-Sepharose, y la columna de Mono Q HR5/5 fueron provistas por Pharmacia (Uppsala, Suecia).

### **Células**

Las células de *Dictyostelium discoideum* AX3 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).

### **Medio de cultivo para *D. discoideum***

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *D. discoideum* fue el MES HL5 compuesto por: Yeast Extract 5 g, Proteose Peptone 10 g, glucosa 10 g, MES 1.3 g por litro de agua deionizada.

Se ajustó el pH a 6.6 con KCl 5 M y se esterilizó por autoclave durante 20 min. El medio MES-HL5 facilita la utilización de [<sup>32</sup>P]Pi para la marcación 'in vivo' de los cultivos.

Las células se cosecharon a una densidad de 10<sup>7</sup> células/ml.

## Preparaciones

### Soluciones utilizadas

Solución reguladora A: Tris-HCl 50 mM pH 8.0.

Solución reguladora B: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, 1mM PMSF, 1  $\mu$ M E 64.

Solución reguladora C :Solución reguladora B más 1% de Tritón X-100

Solución reguladora D: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 1% de Tritón X-100

Solución reguladora E:Tris-HCl 50 mM pH 8.0, 1% de Tritón x 100, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub> , 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 100 mM KCl.

### Preparación de extractos crudos y membranas solubilizadas

Las células se cosecharon por centrifugación a 1.000 x g por 3 min y se lavaron 1 vez con solución A (todos los pasos se realizaron entre 0-4 °C).

Los precipitados de *D. discoideum* de aproximadamente 500 x 10<sup>6</sup> células se resuspendieron en 3 ml de solución reguladora B. La ruptura celular fue por congelamiento y descongelamiento, seguido de homogeneización en Potter (20 pasajes). Los núcleos y las células sanas se removieron por centrifugación a 10.000 rpm 10 min.

El sobrenadante de 10.000 rpm , considerado como extracto crudo, se utilizó como fuente enzimática.

Las membranas solubilizadas se obtuvieron por centrifugación a 100.000 x g durante 60 min del sobrenadante de 10.000 rpm. Posteriormente al precipitado obtenido se lo resuspendió en solución reguladora C y fue resuspendido utilizando un Potter (20 pasajes) y se centrifugó al homogenato a 100.000 x g por 40 min. El sobrenadante obtenido es la fracción de membranas solubilizadas. Para mayor estabilidad se llevó a 10 % de glicerol y se conservó en frío.

### **Medición de la actividad enzimática**

El siguiente método se utilizó para determinar la transferencia de GlcNAc-1-P a proteínas endógenas ó a aceptores exógenos. Se preparó una mezcla madre que contenía los siguientes elementos: 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> (en el ensayo de requerimientos de cationes se agregaron por separado), 1.25 mM ditioneol, 250 mM solución reguladora Tris-HCl pH 7.5, 250 mM de N-acetilglucosamina y 10 mg/ml de sero albúmina bovina . De esta mezcla se tomaron 10 µl a los cuales se les agregó 10 µl de la fuente de enzima a investigar, 2 nmoles UDP-GlcNAc , 100 nmoles de ATP pH 7.0 y 500.000 cpm de [ β-<sup>32</sup>P]UDP-GlcNAc ó 150.000 cpm de UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc. Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia ó ausencia de apomucina (15 mg/ml), uteroferrina (74 µM), tiroglobulina (15 mg/ml), sero albúmina bovina (15 mg/ml) y α-metilmanósido 1 M, según se halla indicado en el texto. El volumen final de las reacciones fue de 50 µl. Las incubaciones se realizaron a 22 °C durante 60 min, a menos que se hallen indicados en el texto distintos tiempos ó temperaturas. Las reacciones se frenaron mediante el agregado de ácido fosfotúngstico (PTA), salvo en aquellas incubaciones en que se utilizó α-metilmanósido como sustrato aceptor. En este último caso, las reacciones se detuvieron con el agregado de 0.5 M de EDTA pH 7.8 para posterior aislamiento del producto por QAE-Sephadex.

### **Preparación de oligopéptidos**

Se preparó una solución de Pronasa a una concentración de 40 mg/ml en solución reguladora Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.

A cada muestra precipitada con PTA ó sometida a delipidificación se le agregó 450 µl de solución reguladora de Pronasa y 50 µl de solución de Pronasa. Se incubó 30 min a 56 °C, se calentó 100 °C 10 min y para descartar todo resto de proteína desnaturalizada se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para posteriores análisis.

### **Aislamiento de glicopéptidos radioactivos por medio de concanavalina A-Sepharose**

El sobrenadante de la digestión con Pronasa se llevó a 1 ml con buffer fosfato salino (PBS), se pasó por una columna de concanavalina A-Sepharose (0.6 ml), se lavó con 3 ml de PBS

(de a 1 ml por vez) y posteriormente se extruyó mecánicamente la lectina de la columna. Se determinó la radioactividad incorporada en el material no retenido por la columna, en los lavados y en la lectina propiamente dicha.

### **Pasos de purificación enzimática**

Se utilizaron columnas de WHA-Sepharose, UDP-hexanolamina-Sepharose, GSI-Agarose y concanavalina A-Sepharose de un ml cada una. Las columnas de WHA-Sepharose, UDP-hexanolamina-Sepharose y GSI-Agarose se equilibraron con solución reguladora D y la de concanavalina A-Sepharose con solución reguladora E.

Se sembró en cada columna 500  $\mu$ l de membranas solubilizadas. Se pasó la muestra por las columnas dos veces.

Las columnas de WHA-Sepharose, UDP-hexanolamina-Sepharose y GSI-Agarose se lavaron con 5 volúmenes de solución D mientras que la columna de concanavalina A-Sepharose con la solución E. La elución de las columnas se realizó tomando fracciones de 0.5 ml con las siguientes soluciones reguladoras:

- 1- WHA-Sepharose: solución D más 100 mM N-acetilglucosamina.
  - 2- UDP-hexanolamina-Sepharose: solución D más 0.5 M de KCl.
  - 3- GSI-Agarose: solución D más 100 mM de melibiosa.
  - 4- concanavalina A-Sepharose: solución E más 0.5 M de  $\alpha$ -metilmanósido. La columna se dejó cerrada 2 h a 0 °C y luego de 1 h a temperatura ambiente se eluyó.
- Se midió la actividad de cada fracción en presencia ó ausencia de apomucina en la forma ya descripta.

#### **-Columna de intercambio iónico Mono Q (FPLC)**

Se equilibró la columna con solución D. Se sembraron 500  $\mu$ l de membranas solubilizadas (en caso de utilizar el material proveniente de concanavalina A-Sepharose se dializó toda la noche a 4 °C). Las condiciones de corrida fueron: flujo 1 ml/min, las fracciones fueron de 1 ml/tubo. Se lavó la columna con 3.5 ml de solución C y se eluyó con 15 ml de un gradiente de 0-0.5 M de KCl. El patrón proteico se determinó por absorbancia a 280 nm.

### **Desnaturalización de tiroglobulina y uteroferrina**

La uteroferrina (10 mg/ml) se desnaturalizó en presencia de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y 8 M urea a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH 7.5 a temperatura ambiente durante toda la noche.

La tiroglobulina (15 mg/ml) se desnaturalizó en presencia de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y 8 M a 37 °C por 4 h, luego se dializó contra Tris-HCl 20 mM pH 7.5 4 °C durante toda la noche.

### **Identificación de glicosilación de proteínas endógenas solubles y unidas a membrana.**

Se llevó a cabo a partir de membranas de *D. discoideum* resuspendidas en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, según el procedimiento descrito por Fujiki *et al.*, 1982.

### **Marcación *in vivo***

Un cultivo de *D. discoideum* de 25 ml en fase exponencial fue marcado con 1 mCi de [<sup>32</sup>P]Pi durante 12 h.

Las células se cosecharon por centrifugación a 1.000 x g por 5 min. El sobrenadante se sometió a precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80 % 2 h 4 °C y se centrifugó a 10.000 rpm 20 min. Se dializó contra solución reguladora Tris-HCl 50 mM pH 8.0 por dos días (proteínas secretadas), fracción 1.

El precipitado de 10.000 rpm se lavó con una solución de fosfato de potasio 170 mM pH 7.0 y se centrifugó 1.000 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió por sonicación en solución reguladora Tris-HCl 50 mM pH 8.0, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min y el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 100.000 x g por 30 min. El sobrenadante de 100.000 x g se precipitó con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80 % 2 h 4 °C, se centrifugó 10.000 rpm por 20 min y se dializó por 16 h a 4 °C contra Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (proteínas solubles), fracción 2.

El precipitado se sometió a extracción de lípidos por tratamiento con cloroformo/ metanol/ agua (3:2:1), 3 veces, cloroformo/ metanol / agua (1:1:0.3), 3 veces, metanol 2 veces, y agua 2 veces (Proteínas de membrana), fracción 3.

Las fracciones 1, 2 y 3 así obtenidas, se sometieron a tratamiento con Pronasa pero las incubaciones fueron hechas durante 16 h.

Posteriormente, cada fracción se aplicó a una columna de QAE-Sephadex, el material que eluyó con Tris 2 mM pH 8.0 se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de concanavalina A-Sepharose, a fin de eliminar la radioactividad asociada a árboles de alta manosa. Las fracciones que no fueron retenidas por la lectina se pasaron por Bio-Gel P2 para posteriores tratamientos.

### **Fraccionamiento subcelular**

Las células se cosecharon por centrifugación  $1.000 \times g$  por 3 min y fueron lavadas 1 vez con una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$  (TKM) más 0.25 M sacarosa. Las células fueron resuspendidas en una concentración de  $2-4 \times 10^8$  cel/ml en la misma solución (todos los procedimientos fueron realizados a 0-4 °C). Las células fueron rotas por medio de un homogeneizador Dounce (20 pasajes) y los núcleos y células sanas se removieron por centrifugación a  $1.000 \times g$  por 5 min. En dos ciclos de homogeneización se obtuvo una ruptura celular de 70-80 %.

El sobrenadante post nuclear se sembró sobre 7 ml de TKM más 0.5 M sacarosa en un tubo que contenía 2.5 ml de TKM más 2,5 M sacarosa y se centrifugó a  $100.000 \times g$  durante 30 min.

El sobrenadante fue removido y las membranas de la interfase resuspendidas en 1.8 ml de TKM.

Las membranas se depositaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por 2 ml cada uno de TKM conteniendo 1.8, 1.5, 1.3, 1.1 y 0.8 M sacarosa y se centrifugó a  $100.000 \times g$  durante 150 min. Los gradientes fueron fraccionados desde el tope, las fracciones fueron diluidas con igual volúmenes de TKM y centrifugadas a  $100.000 \times g$  por 30 min para concentrar membranas. Los precipitados se resuspendieron en igual volumen de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 1 % de Tritón X-100.

Posteriormente se determinó la actividad en cada fracción.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.*, 1951.

## **Métodos**

### **Hidrólisis ácida fuerte**

Se realizó en 1 N HCl a 100 °C durante 4 h. Posteriormente la muestra se llevó a seco, se resuspendió varias veces en agua y secó para eliminar el HCl remanente.

El material obtenido se analizó por cromatografía.

### **Hidrólisis ácida débil**

Se realizó en presencia de 1 ml de HCl 0.01 N y se calentó 15 min 100 °C. Finalizada la hidrólisis la muestra se llevó a seco y se resuspendió varias veces en agua para eliminar el HCl.

El material obtenido se analizó por cromatografía ó se sometió a otros tratamientos.

### **Hidrólisis básica**

A la muestra se la llevó a 0.4 N de NaOH, se incubó 20 h a temperatura ambiente, se neutralizó con HCl y se desaló con una columna de Bio Gel-P2 de 60 cm de largo por 1 cm de diámetro equilibrada con 2-propanol al 7 %.

La radioactividad siempre se obtuvo en el volumen de exclusión en un pico definido.

El material obtenido se llevó a seco y se analizó por cromatografía ó bien se lo sometió a posteriores tratamientos.

### **Preparación de apomucina**

Se siguió el protocolo propuesto por Hagopian y Eylar, 1968.



### **Delipidificación**

El proceso de delipidificación se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Trombetta *et al.*, 1989.

### **Preparación de [ $\beta$ - $^{32}$ P]UDP-GlcNAc**

Se preparó según fue descrito por Lang y Kornfeld, 1984.

### **Precipitación con ácido fosfotúngstico (PTA)**

Luego de la incubación las muestras se precipitaron con una concentración final de 0.75 % de PTA en 0.37 N de HCl. Se dejaron 5 min en hielo y se centrifugaron 5 min a 5.000 rpm. El sobrenadante se descartó y se volvió a resuspender el precipitado en PTA por sonicación. Este procedimiento se realizó dos veces para lavar del precipitado toda la radioactividad no incorporada.

Los precipitados se resuspendieron por sonicación en 100  $\mu$ l de agua y se cuantificó la radioactividad incorporada en líquido centellador.

### **Determinación del producto por QAE-Sephadex**

Las muestras detenidas por el agregado de 1 ml de EDTA 5 mM pH 7.8 fueron sometidas a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de QAE-Sephadex (1 ml) equilibrada y lavada con Tris 2 mM pH 8.0. Se eluyó en presencia de Tris-HCl 2 mM pH 8.0 más 30 mM de NaCl.

La radioactividad del sustrato dado no incorporado queda retenido por la resina, eluyendo tan sólo el producto final formado (que posee una sólo carga negativa), para posterior cuantificación.

### **Fosfatasa alcalina**

A 100  $\mu$ l de muestra se los llevó a pH 8.0 con Tris-HCl 1M pH 8.0. La reacción fue catalizada por 2  $\mu$ l de fosfatasa alcalina comercial. Se incubó 60 min a 30 °C. La reacción se frenó por el agregando de 2 volúmenes de etanol. Se dejó la muestra 5 min en hielo y se centrifugó 5 min a 5.000 rpm. Se extrajo el sobrenadante, se evaporó y se lo sometió a cromatografía ó a otros tratamientos.

### **Cromatografías en papel**

Todas las cromatografías se realizaron en papel Whatman 1. Los solventes utilizados fueron los siguientes:

(1): acetato de etilo / piridina / acido acético / agua (5:5:1:3)

(2): 95% etanol / acetato de amonio 1 M pH 7.4 (5:2).

### **Determinación de radioactividad**

La determinación de radioactividad en cromatogramas se realizó cortando a los mismos en tiras de 1 cm de ancho. Cada tira fue sumergida en líquido de centelleo [0.5 % 2.5 difeniloxazol, 0.025 % 1.4-bis 2-(4-metil-5-feniloxazol) benceno] en tolueno y la radioactividad contada en contador de centelleo. Las fracciones líquidas se midieron mediante el agregado de 3 volúmenes de líquido de centelleo descrito por Bray, 1960, y contadas con el mismo instrumento que antes.

## RESULTADOS

### **Caracterización y purificación parcial de una nueva actividad enzimática en *D. discoideum***

#### **Caracterización de los productos de reacción**

Un extracto crudo de *D. discoideum* fue incubado en presencia de [ $\beta$ - $^{32}$ P]UDP-GlcNAc ó de UDP- $^{3}$ H]GlcNAc como se describe en Procedimientos Experimentales. La reacción se detuvo mediante el agregado de PTA, el precipitado fue lavado y degradado con una proteasa inespecífica (Pronasa). Los glicopéptidos resultantes se sometieron a una columna de concanavalina A-Sepharose, bajo condiciones en las cuales los oligosacáridos de alta manosa se unen selectivamente a dicha lectina. Se observó que el material radioactivamente marcado con [ $^{32}$  P]Pi no era retenido por esta lectina.

Dichos glicopéptidos, obtenidos en el percolado de la columna de concanavalina A-Sepharose, se sometieron en paralelo a distintos tratamientos, con el objeto de identificar su estructura y composición. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1-Por hidrólisis ácida fuerte (1 N HCl a 100°, 4 h) se produjo la liberación de una sustancia que migró con el marcador de Ser-P, al analizarlo en cromatografía en papel. Este pico resultó ser distinto de Man 6-P (Fig. 1A) como así también de Thr-P (Fig. 1G).

2-El tratamiento básico suave ( $\beta$ -eliminación) de los glicopéptidos ( 0.4 N NaOH por 20 h a temperatura ambiente.), dio como resultado sustancias que migraron como GlcNAc-1-P en cromatografía en papel (Fig. 1B).

3-Toda la marca migró como Pi si los glicopéptidos eran sometidos primero a hidrólisis alcalina y luego a fosfatasa alcalina (Fig. 1C).

4-Se obtuvo el mismo resultado al mostrado en la Fig 1C, si el producto de hidrólisis alcalina (GlcNAC-1-P) era tratado con hidrólisis ácida suave (0.01 N HCl a 100 ° C por 15 min)(no mostrado)

5-Los glicopéptidos tratados primero con fosfatasa alcalina y luego con álcali liberaron sustancias que migraron como GlcNAc-1-P (Fig. 1D).

Esto indicó que el fosfato se halla cubierto.

Para corroborar la existencia de GlcNAc-1-P, se incubó un extracto crudo de *D. discoideum* en presencia de UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc, como único dador marcado (Procedimientos Experimentales).

A los glicopéptidos tritados obtenidos por degradación con Pronasa se los sometió a distintos tratamientos que arrojaron los siguientes resultados:

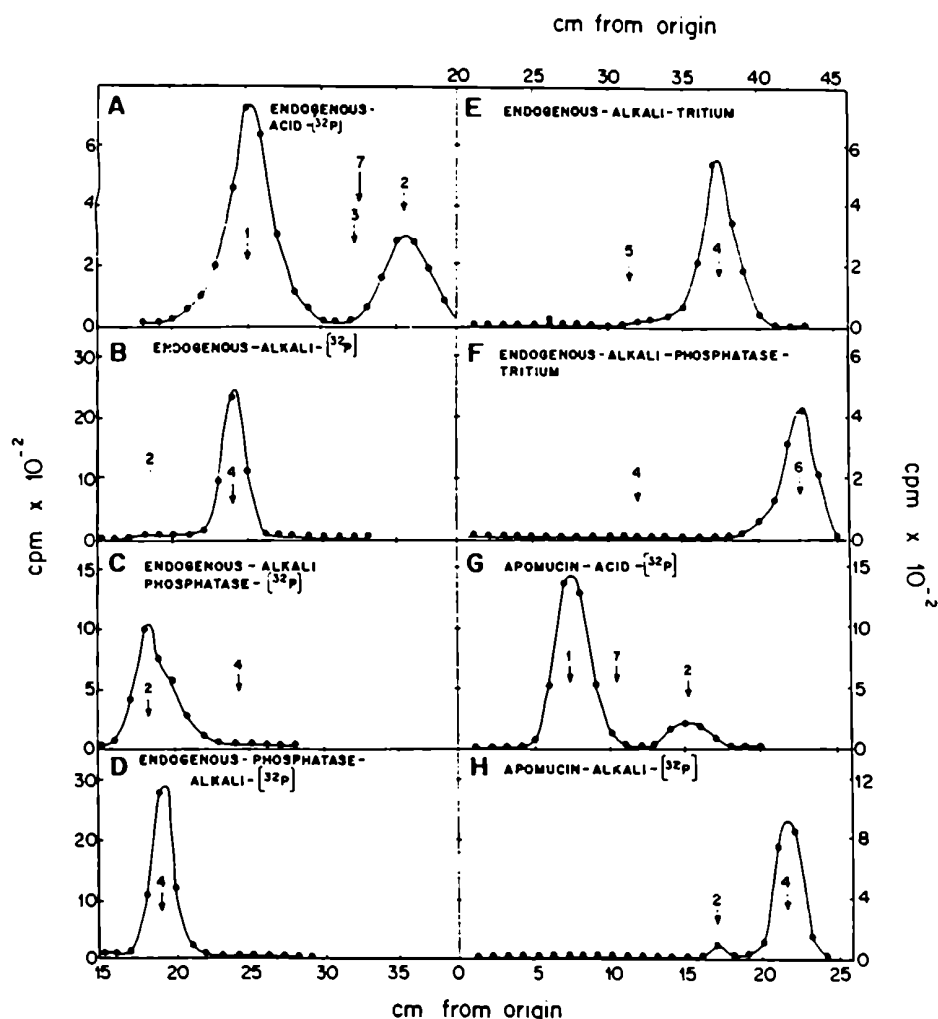
1- Los glicopéptidos tratados con hidrólisis básica liberaron sustancias que migraron como GlcNAc-1-P en cromatografía en papel (Fig. 1E).

2- Cuando los glicopéptidos fueron tratados con álcali y luego con fosfatasa alcalina, los productos resultantes migraron como N-acetilglucosamina en cromatografía en papel (Fig. 1F).

Dado que el tratamiento alcalino liberó GlcNAc-1-P esto sugiere fuertemente que estos grupos deben estar unidos a través de una unión fosfodiéster al OH de residuos de serina en las proteínas, siendo capaz de ser liberados en una reacción de  $\beta$ -eliminación catalizada por álcali.

La estabilidad de la unión aminoácido-fosfato en medio ácido fuerte, descarta la presencia de fosfoaminoácidos sensibles a ácido débil como Lis-P, His-P ó Arg-P.

Además, la labilidad de la unión aminoácido-fosfato bajo condiciones alcalinas suaves excluye la presencia de Tyr-P (Martensen, 1984). La migración del producto de hidrólisis ácida fuerte en cromatografía en papel como Ser-P y no como Thr-P confirma la identidad del aminoácido involucrado.



**Fig.1. Caracterización de los productos de reacción.** Membranas de *D. discoideum* fueron incubadas en presencia de [ $\beta$ -<sup>32</sup>P]UDP-GlcNAc (A-D) ó con UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc (E-F), y las proteínas fueron degradadas con una proteasa. Los glicopéptidos resultantes no retenidos por concanavalina A-Sepharose, se sometieron a hidrólisis ácida fuerte (A) ó a tratamiento básico suave (B, E). Los productos en B y E fueron tratados con fosfatasa alcalina (C y F respectivamente) ó los glicopéptidos fueron tratados primero con fosfatasa alcalina y luego con álcali (D).

En G y H se empleó una preparación enzimática parcialmente purificada, apomucina como aceptor exógeno y [ $\beta$ -<sup>32</sup>P]UDP-GlcNAc como sustrato dador.

Los glicopéptidos se sometieron a hidrólisis ácida fuerte (G) ó hidrólisis básica suave (H).

Se analizó por cromatografía en papel en solvente 1 en A y G y solvente 2 para todas las otras cromatografías. La escala de abscisas en el margen superior corresponde a las Figs. E y F.

Marcadores: 1, Ser-P; 2, Pi; 3, Man 6-P; 4, GlcNAc-1-P; 5, UDP-GlcNAc; 6, N-acetilglucosamina y 7, Thr-P.

### **Purificación parcial de la actividad enzimática y dependencia de aceptores exógenos.**

Toda la *actividad* enzimática se encontró en la fracción particulada, que sedimentó a 100.000 x g en 60 min.

La enzima fue solubilizada con un detergente no iónico y purificada por cromatografía de afinidad a través de una columna de concanavalina A-Sepharose ó a través de una columna de intercambio iónico Mono Q en el sistema de FPLC (Fig. 2 A, B).

La extrema labilidad de la enzima purificada primero por cromatografía de afinidad y luego por columna de Mono Q impidió posteriores pasos de purificación.

Todos los procedimientos clásicos de estabilización de las enzimas (adición de sero albúmina bovina, sacarosa, glicerol, etc) fueron ineficaces. Debido a esto, las preparaciones enzimáticas usadas en los experimentos descritos más adelante fueron hechos con la enzima purificada por cromatografía de afinidad a través de concanavalina A-Sepharose.

La enzima no fue retenida por columnas de aglutinina de germen de trigo-Sepharose, UDP-hexanolamina-Sepharose y *Griffonia simplicifolia* I-Agarose.

Como se muestra en la Fig. 2 A,B la enzima mostró una fuerte dependencia de aceptores exógenos para su actividad luego de los procedimientos de purificación por concanavalina A-Sepharose ó por Mono Q.

La apomucina ó la tiroglobulina, tanto nativa como desnaturalizada en 8 M urea, fueron buenos aceptores, mientras que la uteroferrina no tuvo capacidad aceptora (Fig. 2C).

La sero albúmina bovina y la uteroferrina desnaturalizada al igual que la uteroferrina nativa no mostraron ser sustrato para ésta actividad (no mostrado).

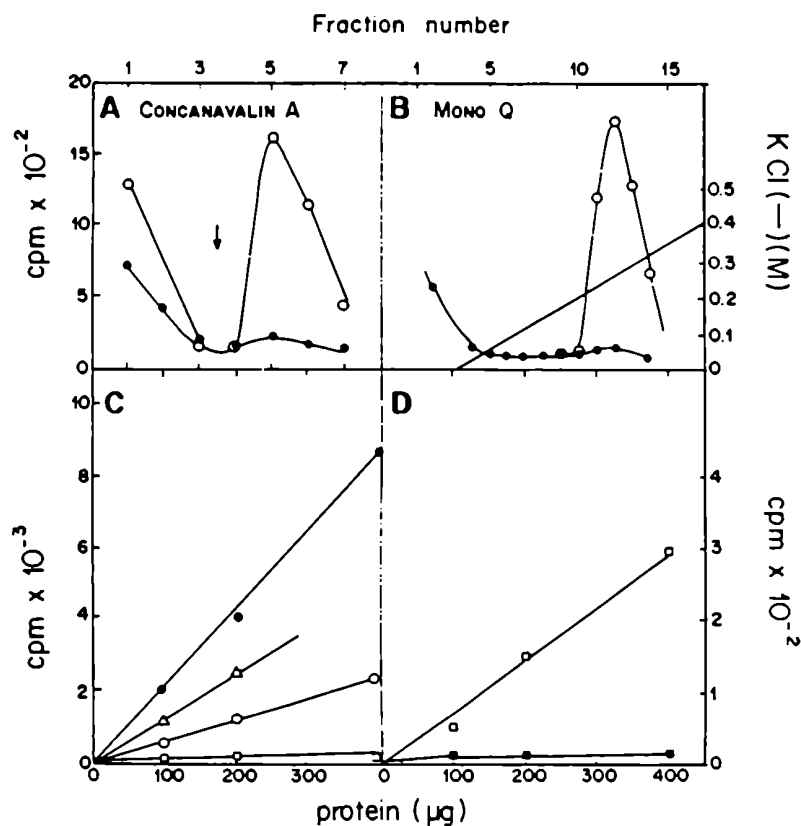
El producto obtenido con apomucina como aceptor exógeno fue el caracterizado.

La apomucina es una mucina de la cual fueron removidos todos los oligosacáridos por métodos químicos. La principal característica de dicha proteína es la alta proporción de residuos de serina y treonina en su secuencia aminoacídica.

Los glicopéptidos, obtenidos por degradación proteolítica a partir de la apomucina fosforilada, se sometieron a hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en papel. Como resultado se obtuvo un pico que migró como el marcador de Ser-P, diferente del marcador Thr-P (Fig. 1G).

Por hidrólisis alcalina suave de los mismos glicopéptidos se produjeron sustancias que migraron como GlcNAc-1-P (Fig. 1H).

Como se comunicó previamente (Lang *et al.*, 1986), la uteroferrina nativa, pero no la desnaturalizada, fue buen aceptor de la enzima UDP-GlcNAc:glucoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, que transfiere GlcNAc-1-P a oligosacáridos de alta manosa (Fig. 2D). Además, la tiroglobulina nativa al igual que la uteroferrina *desnaturalizada* no fueron aceptores para esta última enzima.



**Fig. 2. Purificación parcial de la UDP-GlcNAc :Ser-proteína N- acetilglucosamina-1-fosfotransferasa.** Una preparación soluble fue purificada por cromatografía de afinidad a través de una columna de concanavalina A-Sepharose (A) ó por cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q (B). Se determinó la actividad en presencia (○) ó ausencia de apomucina (●). C: La actividad de UDP-GlcNAc:Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, purificada por cromatografía de afinidad, fue medida en presencia de tiroglobulina desnaturalizada (○) ó nativa (●), apomucina (△) ó uteroferrina nativa (□). D: La enzima UDP-GlcNAc:glucoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, presente en las preparaciones y purificada por cromatografía de afinidad, se midió en presencia de uteroferrina nativa (○) ó desnaturalizada (●).

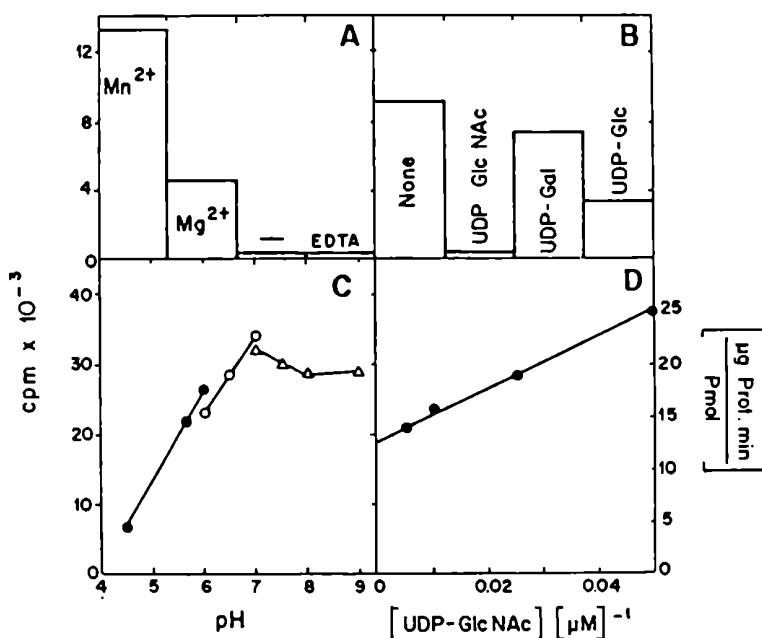
**Algunas propiedades de la enzima parcialmente purificada**

La enzima requirió para su actividad la presencia de cationes bivalentes. El  $Mn^{2+}$  resultó ser más efectivo que el  $Mg^{2+}$  (Fig. 3A).

El UDP-GlcNAc no radioactivo inhibió la incorporación de marca más efectivamente que el UDP-Glc ó UDP-Gal, lo que confirma la identidad del primer nucleótido azúcar como el verdadero dador fisiológico (Fig. 3B).

El valor óptimo de pH fue de un amplio rango entre 6.5-9.0 (Fig. 3C).

La  $K_m$  aparente para el UDP-GlcNAc fue de 18  $\mu M$  aproximadamente (Fig. 3D) y la temperatura óptima fue de 20-22  $^{\circ}C$ .



**Fig.3. Propiedades de la enzima UDP-GlcNAc: Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa.**

A. Requerimientos de metales. Los cationes indicados ó EDTA, se agregaron a la mezcla de incubación a una concentración de 10 mM.

B: Los nucleótido azúcares indicados se agregaron a la mezcla de incubación (100 nmoles).

C: pH óptimo. Se usaron las siguientes soluciones reguladoras: MES (●); HEPES (○) y Tris-HCl (Δ) a una concentración de 50 mM.

D:  $K_m$  de la enzima para el UDP-GlcNAc. Representación de Lineawerer-Burk de los datos cinéticos.

Para ampliación de la información ver Procedimientos Experimentales.



### **Proteínas glicosiladas *in vivo* y en un extracto crudo de células de *D. discoideum***

Células de *D. discoideum* fueron crecidas en presencia de [<sup>32</sup>P]Pi, las proteínas secretadas se recuperaron del medio de cultivo y las células fueron lisadas. Las proteínas celulares se dividieron en las fracciones soluble y particulada.

Las tres fracciones fueron degradadas proteolíticamente y el material obtenido se lo sometió a una columna de QAE-Sephadex.

Con el objeto de seleccionar fosfodiésteres como Ser-P-GlcNAc, se colectó el material que eluyó con 30 mM NaCl y posteriormente se lo aplicó a una columna de concanavalina A-Sepharose, para eliminar toda marca proveniente de oligosacáridos de alta manosa.

El material no retenido por la última columna se sometió a hidrólisis ácida fuerte (Fig. 4 A-C) ó a hidrólisis básica (Fig. 4 E-G) seguido de cromatografía en papel.

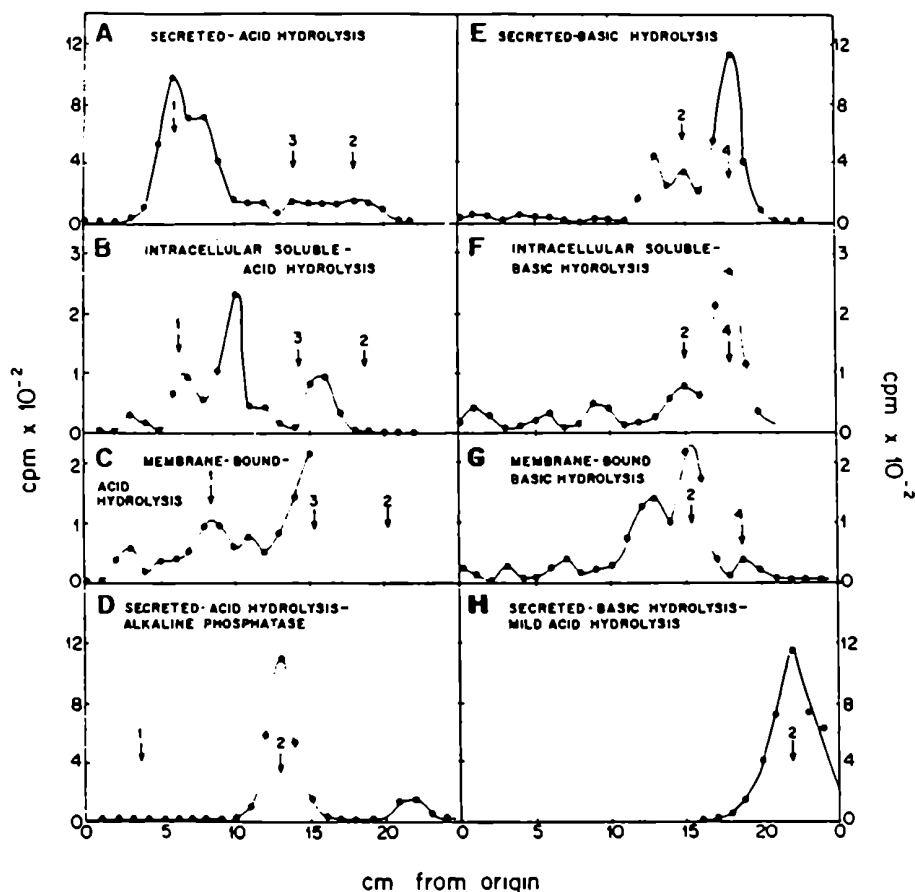
Las tres muestras tratadas con hidrólisis ácida fuerte liberaron un producto que migró como Ser-P. Las mayores cantidades de ésta sustancia se encontraron en la fracción de proteínas secretadas (Fig. 4A).

El material que migró como Ser-P en la Fig. 4A fue degradado a Pi cuando se trató con fosfatasa alcalina (Fig. 4D).

Similarmemente, a partir de los glicopéptidos originados de todas las fracciones se obtuvo, por hidrólisis básica, sustancias que migraron como el marcador de GlcNAc-1-P, pero al igual *que en el caso anterior*, las mayores cantidades fueron obtenidas de aquellos derivados de proteínas secretadas (Fig. 4E).

El material que migró como GlcNAc-1-P en la Fig. 4E se trató con 0.01 N HCl por 15 min a 100 °C, que produjo su degradación hasta Pi (Fig. 4H).

Se puede concluir que la mayor cantidad de proteínas fosforiladas se encontró entre las proteínas secretadas y que tanto las proteínas unidas a membrana como las de la fracción soluble intracelular fueron fosforiladas *in vivo* pero en menor cantidad.



**Fig.4. Fosforilación *in vivo* de proteínas.** Células de *D. discoideum* se crecieron en presencia de [<sup>32</sup>P]Pi, las proteínas secretadas (A, E), las solubles (B, F) y las proteínas de membrana (C, G) fueron degradadas con Pronasa, aplicadas a una columna de QAE-Sephadex y el material que eluyó con 30 mM NaCl sembrado en una columna de concanavalina A-Sepharose. El material no retenido por la columna se sometió a hidrólisis ácida fuerte (A-C) ó hidrólisis básica suave (E-G).

El material que migró como Ser-P en A se trató con fosfatasa alcalina (D)

Las sustancias que migraron como GlcNAc-1-P en E se sometieron a hidrólisis ácida suave (H).

Se analizó por cromatografías en papel en solvente 1 (A-D) y solvente 2 (E-H).

Marcadores: 1, Ser-P; 2, Pi; 3, Man 6-P, 4, GlcNAc-1-P.

Para confirmar que tanto las proteínas solubles como las de membrana reciben residuos de GlcNAc-1-P, se incubó un extracto crudo en presencia de [ $\beta$ -<sup>32</sup>P]UDP-GlcNAc y la mezcla de reacción fue centrifugada a 100.000 x g durante 60 min.

Como se muestra en la Tabla I, la incorporación de radioactividad en residuos de serina fue encontrada en ambas fracciones, tanto en el sobrenadante como en el precipitado. Se encontró un pequeño incremento en la cantidad de marca en las proteínas solubles cuando la mezcla de incubación fue sonicada ó tratada con 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> antes de la centrifugación.

Tratamiento	cpm	
	Sobrenadante	Precipitado
Ninguno	1,253	3,650
Sonicación	1,505	3,180
0.1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,824	2,940

**Tabla I. Fosforilación de proteínas solubles y unidas a membrana.** Un lisado crudo de células fue incubado en presencia de [ $\beta$ -<sup>32</sup>P]UDP-GlcNAc y se determinó la incorporación de radioactividad en residuos de serina en las fracciones del sobrenadante y del precipitado de una centrifugación de 100.000  $\times$  g. Donde se indica las muestras fueron sonicadas ó tratadas con 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> antes de la centrifugación. Para otros detalles ver Procedimientos Experimentales.

Ambos procedimientos son conocidos por liberar proteínas que se hallan débilmente unidas a membranas y en vesículas cerradas (Fujiki *et al.*, 1982).

Los resultados mostrados en la Tabla I confirman, de ésta manera, que tanto la proteínas de membrana como las solubles son fosforiladas.

#### **Distribución subcelular de la UDP-GlcNAc: Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa.**

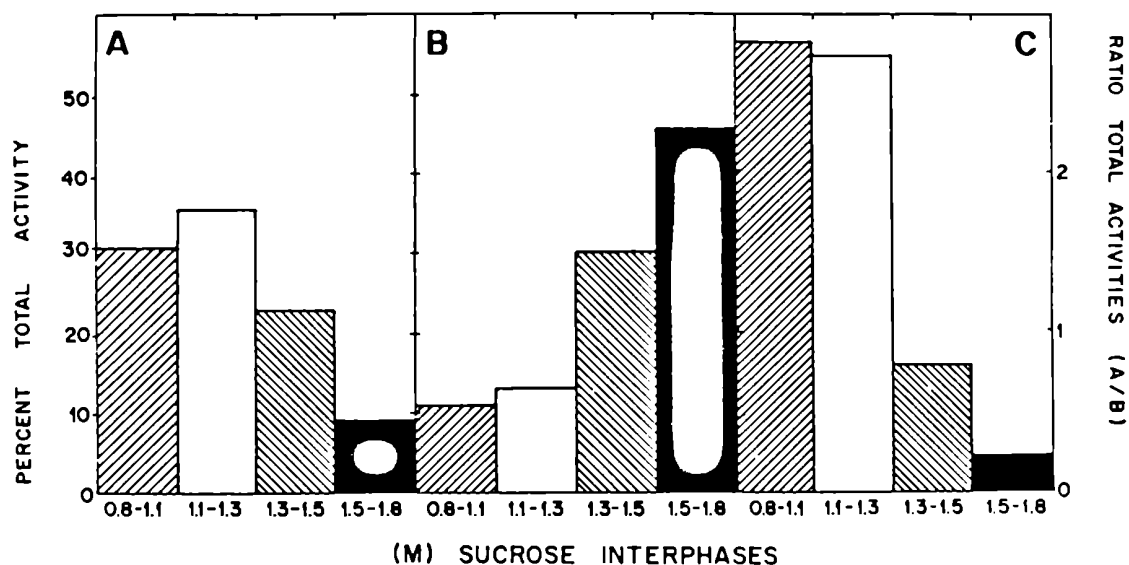
Una fracción de membranas microsomales crudas se sometió a centrifugación de equilibrio de densidad en tubos que contenían colchones de 0.8; 1.1; 1.3; 1.5 y 1.8 M de sacarosa.

Como se muestra en la Fig. 5A la enzima se encontró sedimentada, principalmente, en las interfases de 0.8-1.1 y 1.1-1.3 M de sacarosa.

Su distribución fue diferente a la de la actividad que fosforila oligosacáridos del tipo de alta manosa (UDP-GlcNAc: glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa), que

sedimenta especialmente a densidades mayores, interfases de 1.3-1.5 y 1.5-1.8 M de sacarosa (Fig. 5B).

La relación de ambas actividades totales en las diferentes fracciones mostrará una clara diferencia en la distribución subcelular (Fig. 5C).



**Fig.5. Distribución subcelular de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasas.** Membranas de *D. discoideum* se sometieron a centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa como se indica en Procedimientos Experimentales.

Representación de los porcentajes de actividad total de la UDP-GlcNAc:Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (A) y de la UDP-GlcNAc:glucoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (B) en las interfases de las diferentes molaridades de sacarosa.

En la Fig. C se muestra la relación de las actividades tomando la primera sobre la última enzima.

Esta es la única evidencia que indica que ambas actividades de fosfotransferasas son distintas, dado que ambas mostraron similares curvas de pH óptimo y requerimientos de cationes, similar comportamiento no sólo en todas las columnas de afinidad probadas, sino también en la columna de intercambio iónico Mono Q.

Además, las curvas de inactivación térmica a 28 °C, 32 °C y 37 °C a pH 7.5 y 9.0 fueron similares para ambas enzimas.

El  $K_m$  para el UDP-GlcNAc de la enzima que fosforila manosas fue de aproximadamente  $350 \mu\text{M}$  cuando se utilizó  $\alpha$ -metilmanósido como aceptor.

## DISCUSION

La enzima que transfiere N-acetilglucosamina-1-P a residuos serina en las proteínas, resultó estar unida a membranas livianas, las cuales derivan del compartimiento de Golgi (Mierendorf *et al.*, 1985). Esta localización difiere de la fosfotransferasa que fosforila unidades de manosa.

Aunque la localización de enzimas lisosomales en *D. discoideum* no está mediada por el marcador de Man 6-P, la última enzima se halló unida a membranas más densas, las cuales posiblemente pertenecen al compartimiento intermedio, retículo endoplasmático-Golgi y/o a las cisternas *cis* Golgi al igual que en células de mamíferos (Pelham, 1988). Los resultados obtenidos tanto en incubaciones libre de células como *in vivo*, mostraron que las proteínas solubles y las unidas a membrana son glicosiladas.

Las proteínas secretadas parecen ser las que son principalmente modificadas por la adición de unidades de GlcNAc-1-P a residuos de serina *in vivo*.

Las células de *D. discoideum* secretan eficientemente enzimas lisosomales durante el crecimiento vegetativo en medio axénico (Ashworth, 1972).

La presencia de Ser-P-GlcNAc ha sido descripta hace varios años en una enzima lisosomal, la cistein proteinasa I de éste protozooario (Gustafson *et al.*, 1980a).

Esto indica que la presencia de los residuos de N-acetilglucosamina unidos a fosfato en la enzima modificada es permanente y no transitoria como en las enzimas lisosomales de mamíferos.

Una pregunta que permanece sin respuesta es si la UDP-GlcNAc:Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa fosforila todos los residuos de serina libres ó si, alternativamente, reconoce características especiales en la proteína aceptora.

Por un lado, se encontró que proteínas como la uteroferrina (muy buen sustrato para la UDP-GlcNAc:glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa) (Lang *et al.*, 1986), uteroferrina desnaturalizada, ó seroalbúmina bovina son totalmente no efectivas como aceptoras, lo que permitiría indicar la presencia de características especiales en la proteína aceptora.

Por el otro, hay evidencias comunicadas previamente que permitirían sugerir la falta de especificidad de ésta enzima: se comunicó que la cistein proteinasa I de *D. discoideum* contiene 0,7  $\mu$ moles de fosfato por mg de proteína y que todo el fosfato halla se modificado

como Ser-P-GlcNAc (Gustafson *et al.*, 1979). Además, conociendo la secuencia aminoacídica y el peso molecular (36.000 daltons) de la cistein proteínasa I (Williams *et al.*, 1985), calculamos que dicha proteína debería poseer 25 residuos de Ser-P-GlcNAc por molécula. Dado que la enzima contiene 25 residuos de serina se puede concluir que todas las unidades de serina están modificadas. Dado que en la cistein proteínasa I las unidades de serina están distribuidas a lo largo de toda la molécula y los aminoácidos vecinos a ellas no poseen, a simple vista, características especiales, se concluiría que la enzima fosforilante no reconoce determinantes específicos en la proteína aceptora.

Otro aspecto que en principio avalaría lo mencionado anteriormente, en el sentido que la enzima fosforilante no requeriría reconocer un determinante específico en la proteína aceptora, es que dicha enzima es capaz de fosforilar proteínas extrañas a *D. discoideum* como apomucina y tiroglobulina nativa y desnaturalizada. El hecho de que la tiroglobulina desnaturalizada sea mejor aceptor que la especie nativa puede deberse a que probablemente haya diferencia en las unidades de serina expuestas. Esto último permitiría descartar cualquier requerimiento conformacional de la proteína para su fosforilación.

La especificidad de la UDP-GlcNAc:Ser-proteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa con respecto a la proteína aceptora merece estudios posteriores, dado que las evidencias contradictorias no nos permiten decidir claramente si la enzima reconoce ó no características especiales en la proteína aceptora.

Es notorio que desde hace varios años se está tratando de identificar secuencias características especiales para la O-glicosilación. Sin embargo, y a diferencia a lo encontrado para la N-glicosilación no hay, hasta el momento, alguna secuencia consenso determinada para la O-glicosilación en general.

Varios autores muestran a partir de proteínas O-glicosiladas, con sitios de glicosilación conocidos, que una simple secuencia no es suficiente para predecir O-glicosilación (Wilson *et al.*, 1991; Elhammer *et al.*, 1993).

Dos observaciones son relevantes para éstos estudios. Primero, es clara la existencia de varias O-glicosiltransferasas que son responsables de la adición de diferentes azúcares a grupos hidroxilos libres de residuos de serina ó treonina en las proteínas (Gooley y Williams., 1994). Esta es una diferencia fundamental a la situación presentada para la N-glicosilación donde una sólo transferasa es necesaria para toda la N-glicosilación. Esta enzima es responsable de la transferencia en bloque de un oligosacárido preformado al grupo amida de una asparagina. Tan sólo recientemente, se comunicó otra forma de N-glicosilación, el dominio orientado hacia el citosol de la subunidad  $\alpha$  de la bomba de sodio

contiene un sólo residuo de N-acetilglucosamina unido a asparagina (Pedemonte y Kaplan, 1992).

Segundo, hasta hace muy poco tiempo ha sido difícil de determinar aquellos residuos de serina ó treonina que se hallaban realmente modificados por la O-glicosilación. En consecuencia, muchas asignaciones en la literatura no han sido bien establecidas ó aún contenían errores (por ejemplo, glicoforina A; Pisano *et al.*, 1993).

De aquí que en un futuro se deberá determinar cuales son los requerimientos para la especificidad de la enzima recientemente estudiada que no se puede observar y analizar de forma trivial.

Además a la ya mencionada cistein proteinasa I, un hecho que sugiere la existencia de al menos otra proteína lisosomal que contiene residuos de Ser-P-GlcNAc es que péptidos obtenidos por digestión con papaina de la cistein proteinasa I (que poseían una alta concentración de Ser-P-GlcNAc) inhibieron completamente la inmunoprecipitación de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de *D. discoideum* por un antisuero preparado contra la última enzima (Gustafson *et al.*, 1980b).

La presencia de estas unidades representa otra modificación de las enzimas lisosomales de *D. discoideum* además de las ya conocidas como metilfosfato manosa (Freeze *et al.*, 1983b; Gable *et al.*, 1984) y sulfato manosa en oligosacáridos del tipo de alta manosa (Freeze y Wolgast, 1986).

Por otro lado, hay indicios que sugieren que una enzima no lisosomal, la glicoproteína de contacto A de membrana plasmática de *D. discoideum* también podría contener residuos de Ser-P-GlcNAc. Se comunicó que esta glicoproteína contiene Ser-P y no Thr-P (Schmidt y Loomis, 1982). El procedimiento empleado para el aislamiento de los fosfoaminoácidos (hidrólisis de glicoproteínas en 6 M HCl a 110 °C por 1 h) liberaría los residuos de GlcNAc si ellos hubieran estado presentes como Ser-P-GlcNAc.

Además, la glicoproteína poseía oligosacáridos de alta manosa sulfatados y era reconocida por aglutinina de germen de trigo, lectina que une N-acetilglucosamina. Mediante el agregado de tunicamicina al medio de cultivo se produjo la inhibición de la aparición de los oligosacáridos sulfatados, pero no la capacidad de unir a la lectina (Yoshida *et al.*, 1984). Esto nos permite especular que los residuos de GlcNAc estaban unidos a la serina a través de puentes fosfodiéster.

La presencia de un azúcar unido a un aminoácido a través de un puente fosfodiéster no es privativa de *D. discoideum*, ya que se ha encontrado recientemente una fosfatasa ácida secretada altamente fosforilada (más del 60 % de las serinas modificadas) en un



tripanosomátido, *Leishmania mexicana*. En este caso la modificación de las serinas se realiza mediante la adición de Man  $\alpha$ 1-P (Ilg *et al.*, 1994).

La función de los residuos de Ser-P-azúcar es desconocida pero se especula que ellos podrían conferir resistencia a la proteólisis al igual que se sugiere para la O-glicosilación en general.

Este aspecto está considerado en el trabajo realizado en *L. mexicana* (Ilg *et al.*, 1994) en el que determinan la presencia de Ser-P-Man y remarcan la imposibilidad de identificar qué dominios de la fosfatasa ácida secretada de *L. mexicana* están O-glicosilados debido a la resistencia de la proteína a la proteólisis.

Finalmente, podemos decir que este nuevo tipo de O-glicosilación, que consiste en la adición de un azúcar-P a residuos de serina/treonina en las proteínas, no es una característica particular de protozoarios ya que en 1986 Balsamo y colaboradores, describieron la transferencia de GalNAc-1-P a residuos de serina ó treonina en aceptores endógenos de homogenatos de retina neural de embrión de pollo.

La transferencia a dichos aceptores se realizó en presencia de  $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP-GalNAc}$  y de  $\text{UDP-}[^3\text{H}]\text{GalNAc}$  como únicos dadores marcados. El tratamiento con  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa de los productos obtenidos marcados con  $[^3\text{H}]$  ó bien con  $[^{32}\text{P}]$  produjo la liberación de los residuos  $[^3\text{H}]\text{GalNAc}$  y la exposición de los grupos marcados con  $[^{32}\text{P}]$ . Estos datos sugieren que el azúcar fosfato es transferido de forma intacta, resultando en una unión fosfodiéster terminal. La resistencia de los productos macromoleculares a la digestión con endoglicosidasa F y su sensibilidad a la hidrólisis bajo tratamiento básico suave indicarían que el azúcar está unido a través de una unión fosfodiéster a la proteína via un residuo Ser/Thr. Posteriormente se encontró que la N-cadherina, glicoproteína de superficie, presente en retina de embrión de pollo está formando un complejo con la N-acetilgalactosaminilfosfotransferasa (enzima que transfiere GalNAc-1-P a residuos de serina ó treonina) y es modificada por ésta enzima mediante la transferencia de una N-acetilgalactosamina terminal unida via una unión fosfodiéster (Balsamo y Lilien, 1990)

Este tipo de O-glicosilación podría ser más frecuente de lo esperado. La extrema labilidad de la unión del carbono anomérico del monosacárido a un grupo hidroxilo libre de residuos de Ser ó Thr de las proteínas por medio de un puente fosfodiéster podría explicar los pocos casos hallados, ya que al someter las proteínas a hidrólisis ácidas más fuertes que 0.01 N HCl a 100 °C por 15 min, se produciría la liberación del monosacárido quedando los residuos como Ser-P. Además existe un antecedente de que la unidad monosacáridica puede ser liberada en más de un 50 % al someter a las proteínas a una electroforesis en geles de

poliacrilamida dependiendo del buffer utilizado (Balsamo *et al.*, 1986). Tanto en uno como en el otro caso se obtendría como producto final un residuo de Ser-P que es el mismo que daría una kinasa que usase ATP como sustrato.

## REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (1994) en: *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed. Garland Publishing, Inc. Nueva York & London.

Ashworth, J.M. (1972) *Biochem. J.* **126**, 601-608.

Balsamo, J. & Lilien, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2923-2928.

Balsamo, J., Pratt, R. S. & Lilien, J. (1986) *Biochemistry* **25**, 5402-5407.

Bauer, R., Rath, M. & Risse, H.J. (1971) *Eur. J. Biochem.* **21**, 179-190.

Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279-285.

Brown, W.J. Goodhouse, J. & Farquar, M.G. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 1235- 1247.

Campbell, C. & Stanley, P (1984) *J. Biol. Chem.* **261**, 13370-13378.

Cardelli, J.A., Golumbeski, G.S. & Dimond, R.L. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 135-141.

Couso, R.O., Lang, L. & Kornfeld, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6326-6331.

Couso, R.O., Lang, L., Tang, J. & Kornfeld, S. (1985) en: *Glycoconjugates Proceedings of the VIIIth Intl Symposium*, Vol. 1, Houston, Texas, pp. 197.

Crean, E.V. & Rossomando, E.F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **498**, 439-441.

Dahms, N.M., Lobel, P. & Kornfeld, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12115-12118.

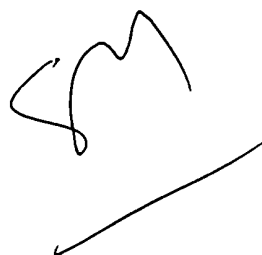
Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1990) en: *Molecular Cell Biology*. 2th ed. Scientific American books. NY.

- Elharmer, A.P., Poorman, R.A., Brown, E., Maggiora, L.L., Hoogerheide, J.G. & Kezdy, F.J. (1993) *J. Biol. Chem* **268**, 10029-10038.
- Freeze, H. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 690-693.
- Freeze, H. & Miller, A. L. (1980) *Mol. Cell Biochem.* **35**, 17-27.
- Freeze, H., Miller, A. L. & Kaplan, A. (1980) *J. Biol. Chem* **255**, 11081-11084.
- Freeze, H. H. & Wolgast, D. (1986) *J. Biol. Chem* **261**, 127-134.
- Freeze, H., Yeh, R., Miller, A. L. & Kornfeld, S. (1983a) *J. Biol. Chem* **258**, 14880-14884.
- Freeze, H., Yeh, R., Miller, A. L. & Kornfeld, S. (1983b) *J. Biol. Chem* **258**, 14874-14879.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. Fowler, S., & Lazarow, P.B. 1982 *J. Cell Biol.* **93**, 97-102.
- Gable, C.A., Costello, C.E., Reinold, V.N., Kurtz, L. & Kornfeld, S. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13762-13769.
- González-Noriega, A., Grubb, J. H., Talkad, V. & Sly, W.S. (1980) *J. Cell Biol.* **85**, 839-852.
- Gooley, A. A. & Williams, K.L. (1994) *Glycobiology* **4**, 413-417.
- Griffiths, G. & Simons, K. (1986) *Science* **234**, 438-443.
- Gustafson, G. L. & Milner, L.A. (1980a) *J. Biol. Chem* **255**, 7208-7210.
- Gustafson, G.L. & Milner, L.A. (1980b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 1439-1444.
- Gustafson, G.L. & Thon, L.A. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 667-673.
- Hagopian, A. & Eylar, E.H. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 422-433.

- Henderson, E. J. (1984) *The Biology of Glycoproteins*. Plenum Press, NY., 371-443.
- Hoflack, B. & Kornfeld, S. (1985) *J. Biol. Chem* **260**, 12008-12014.
- Ilg, T., Overath, P., Ferguson, M. A., Rutherford, T., Campbell, D.G. & Mc Conville, M.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24073-24081.
- Kobata, A. (1984) en: The carbohydrates of glycoproteins (Ginsburg, V., Robbins, P.W. eds.). *Biology of Carbohydrates 2*, 88-155, John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Kornfeld, S. (1986) *J. Clin. Invest.* **77**, 1-6.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* (1985) **54**, 631-664.
- Lang, L., Couso, R.O. & Kornfeld, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6320-6325.
- Lang, L. & Kornfeld, S. (1984) *Anal. Biochem.* **140**, 264-269.
- Lederkremer, G. Z. & Parodi, A.J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12514-12518.
- Loomis, W.F. : *Dictyostelium discoideum*: A developmental System. Academic. Press, NY, 1975.
- Loomis, W.F.: The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic. Press, NY, 1982.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A., Farr, A.L. & Randall, R.L. (1951) *J. Biol. Chem* **193**, 265-275.
- Martensen, T. S. (1984) *Methods Enzymol.* **107**, 3-23.
- Matsuura, F. & Jones, M.Z. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15239-15245.
- Mierendorf, R.C., Cardelli, J.A. & Diamond, R.L. (1985) *J. Cell Biol.* **100**, 1777-1787.

- Pannel, R., Wood, L. & Kaplan, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9861-9865.
- Parkkinen, J. & Finne, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10971-10975.
- Pedemonte, C.H. & Kaplan, J.H. (1992) *Biochemistry* **31**, 10465-10470.
- Pelham, H. R. (1988) *EMBO J.* **7**, 913-918.
- Pisano, A., Redmond, J. W., Williams, K.L. & Gooley, A (1993) *Glycobiology* **3**, 429-435.
- Reitman, M.L. & Kornfeld, S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11977-11980.
- Rosler, H., Peuckert, W., Risse, H.J. & Eibl, H. (1978) *Mol. Cell Biochem.* **24**, 65-72.
- Rosler, H., Schneider-Seedbach, E., Malati, T. & Risse, H. J. (1981) *Mol. Cell Biochem.* **34**, 65-72.
- Schmidt, J.A. & Loomis, W.F. (1982) *Dev. Biol.* **91**, 296-304.
- Sharkey, D.J. & Kornfeld, R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10411-10419.
- Sly, W.S. & Fischer, H.D. (1982) *J. Cell Biochem.* **18**, 67-85.
- Snider, M.D. (1984) en: Biosynthesis of the glycoproteins: formation of the N-linked oligosaccharides (Ginsburg V, Robbins P.W. eds.). *Biology of Carbohydrates* **2**, 164-193, John Wiley and Sons, Inc., NY.
- Stanley, P. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**, 923-929.
- Stanley, P. (1981) *Mol. Cell Biol.* **1**, 687-696.
- Stanley, P. & Chaney, W. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**, 1204-1211.

- Trombetta, S., Bosch, M. & Parodi, A.J (1989) *Biochemistry* **28**, 8108-8116.
- Varki, A. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 8389- 8401.
- Varki, A. & Kornfeld, S. (1981) *J. Biol. Chem* **256**, 9937-9943.
- von Figura, K. & Hasilik, A. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 167-193.
- Walter, P., Gilmore, R. & Blobel, G. (1985) *Cell* **38**, 5-8.
- Wilhems, O.H., Luderitz, O., Westphal, O. & Gerisch, G. ( 1974) *Eur. J. Biochem.* **48**, 89-101.
- Williams, J. G. North, M.J. & Mahbubani, H. (1985) *EMBO J.* **4**, 999-1006.
- Wilson, I. B., Gavel, Y & von Heijne, G. (1991) *Biochem. J.* **275**, 529- 534.
- Wood, L. & Kaplan, A. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 2073-2069.
- Yoshida, M., Stadler, J. Bertholdt, G. & Gerisch, G. (1984) *EMBO J.* **3**, 2663-2670.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'A. Parodi', with a long horizontal line underneath.A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'G.M.', with a long horizontal line underneath.