

Tesis de Posgrado

Glicosilfosfatidilinositoles : su rol en transducción de señales en células de mamífero; estudio de su estructura

Vaena, Silvia Graciela

1999

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

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

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

Cita tipo APA:

Vaena, Silvia Graciela. (1999). Glicosilfosfatidilinositoles : su rol en transducción de señales en células de mamífero; estudio de su estructura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3141_Vaena.pdf

Cita tipo Chicago:

Vaena, Silvia Graciela. "Glicosilfosfatidilinositoles : su rol en transducción de señales en células de mamífero; estudio de su estructura". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3141_Vaena.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Glicosilfosfatidilinositoles.
Su Rol en Transducción de Señales en Células
de Mamífero.
Estudios de su Estructura.**

Autor:

Lic. Silvia Graciela Vaena

Directora de Tesis:

Dra. María del C. Vila

Co-Directora de Tesis:

Dra. Rosa M. de Lederkremer

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 1999 -

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Glycosylphosphatidylinositol:
signaling in mammalian cells and
structural studies.**

Author:

Lic. Silvia Graciela Vaena

Director:

Dra. María del C. Vila

Co-Director:

Dra. Rosa M. de Lederkremer

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 1999 -

A mi madre,
por ser una fuente de estímulo constante.

A Angel,
mi gran amor.

Con mucha emoción, escribo las últimas líneas de mi Tesis para agradecer en este momento a quienes de un modo u otro colaboraron para la realización de este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Vila, como Directora, por transmitirme su curiosidad y su pensamiento crítico. Por haberme abierto las puertas de su laboratorio en el cual he trabajado la mayor parte de mi tiempo durante los últimos años.

A la Dra. Rosa M. de Lederkremer, quien marcó una diferencia en mi camino. Por mostrarme el trabajo desde el lugar de la pasión y por encontrar siempre un momento para escucharme.

A la Dra. Leonor San Martín de Viale, por sus valiosos consejos y por su estímulo.

Al Dr. Carlos P. Lantos, por su gran apoyo para mi formación profesional.

Al Dr. C. E. Gómez-Sánchez por los anticuerpos utilizados en los radioinmunoensayos.

A la Fundación Campomar, por el equipamiento facilitado.

A la Dra. M. Flawiá, por permitirme realizar algunos experimentos en su laboratorio y por el GTP- γ -S.

A la Dra. Elsa Damonte, por facilitarme la proteína A-Sepharosa.

A Carlos, por estar siempre dispuesto a ayudarme, a brindarme una mano cuando más la he necesitado, por enseñarme algunos secretos del trabajo en el laboratorio.

A Claudia, por su ayuda y por compartir las jornadas y los cafés, estableciendo un agradable clima de trabajo.

A Damián, por compartir las "horas extras y los feriados", por su buena disposición para ayudarme a solucionar problemas.

A Silvia Billi, Adriana, Cristina, Marta y a Carmencita, por los gratos momentos compartidos.

A mis compañeros y vecinos del cuarto: Laura, Andrea, Fabián, Nora, Cristina, Pilar, Eduardo, Sandra, Silvina, Rosa, Lorena, Paula, Gaby, María, Gabriel, Adalí, María del Carmen, Evi, Elena y Rubén.

Al grupo de los seminarios: Silvia Moreno, Vanina, Silvia, Elba, Cinthia, Mariela, Cecilia, Eduardo, Mauricio, Anadela, los de antes y los nuevos.

A mis compañeras del tercero: Rosalía, Carola, Laura S., Alicia, María Laura, Carla, Marisa, y Laura.

A Laura Bertello, por proporcionarme los inositolfosfolípidos radioactivos de *T. cruzi* y a Rosalía, por los gráficos de última hora.

A quienes me enseñaron a utilizar el tubo de ensayo y la pipeta: Berta, Mercedes, Ricardo, Claudia y Luis.

Al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme brindado el espacio y el apoyo económico para llevar adelante mi trabajo.

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su aporte para concretar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Universidad de Buenos Aires y a la Fundación Antorchas por el apoyo brindado a los proyectos de investigación.

A mi Familia:

A Angel, mi gran amor, por estar siempre a mi lado durante esta Tesis, ayudándome a encarar el nuevo día con optimismo y a superar los momentos más difíciles, alentándome sin descanso y compartiendo cada una de las etapas en este camino.

A mi Madre, por su apoyo incondicional, por su confianza y por haber pensado en mí siempre primero. Por estar dispuesta en todo momento a conversar largo y tendido.

A mi Hermana, Viviana, con quien compartí momentos únicos, por entenderme y por querer mi bien.

A mi Abuela, por enseñarme a reproducir sus recetas de amor, desde muy pequeña.

A mis tíos, Jorge, Pola, René, Lidia, Alfredo, Isaac y en especial a mi tía Lina por aquellas charlas agradables y por sus consejos.

A mis primos, Pablo, Adriana, Gustavo, Romina, Nacho, Gaby, Adrián y Tomás.

A mi cuñado Daniel.

A mis amigos del alma: Hernán, Mariana, Liz, Maribel, Teresa, Marce, Josi, Vale, Analía y al cuerpo rígido.

Resumen

Los glicosilfosfatidilinositoles (GPIs) son una familia de compuestos que pueden actuar como anclas de proteínas a membranas celulares y también pueden estar libres en estas membranas. Por hidrólisis de GPI con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) se libera inositolfosfoglicano (IPG) que ha sido propuesto como segundo mensajero de insulina y otras hormonas. Resultados del laboratorio mostraron que ACTH es capaz de hidrolizar GPI y que un IPG con estructura conservada purificado de *Trypanosoma cruzi* es capaz de inhibir la acumulación de aldosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de vaca.

El objetivo de este trabajo fue estudiar: a) GPIs presentes en corteza adrenal bovina, b) la participación de estos compuestos en la respuesta de ACTH y c) GPI y sus precursores en *Schizosaccharomyces pombe*, un sistema no estudiado hasta el presente, con el fin de buscar una fuente de GPI para los estudios biológicos.

En este trabajo se mostró la presencia de anclas de GPI en corteza adrenal pues se encontraron compuestos susceptibles a ácido nitroso y se purificó parcialmente una enzima anclada por GPI la fosfatasa alcalina, FAL, cuyo ancla fue utilizada como fuente de IPG y se probó su efecto inhibitorio sobre la respuesta de ACTH.

Con respecto a la participación de GPI en la respuesta de ACTH, se encontró que esta hormona es capaz de activar una PI-PLC, a través de una proteína G inhibible por toxina de pertussis, Gi/o, en células adrenocorticales, lo que muestra que el receptor de ACTH puede acoplarse a más de un tipo de proteína G (Gs, Gi). La activación de PI-PLC por la hormona sugiere la producción de IPG. Se encontró que un IPG purificado de *T. cruzi*, fue capaz de inhibir en células adrenocorticales la producción de aldosterona, corticosterona (en rata) y cortisol (en vaca). ACTH utiliza AMPc como segundo mensajero. Los resultados sugieren que el efecto inhibitorio de IPG estaría mediado por una activación de fosfodiesterasa, enzima que degrada AMPc, y una inhibición de PKA.

Se sabe que IPG es liberado al medio extracelular y luego entra en la célula donde actúa. En concordancia con este hecho hemos visto que:

a) los sobrenadantes de células tratadas con ACTH son capaces de inhibir la respuesta de la hormona y b) el agregado del anticuerpo anti-CRD contra IPG aumenta la acumulación de esteroides mediada por ACTH. Estos resultados muestran que ACTH es capaz de liberar IPG el cual inhibe su respuesta y reafirman la hipótesis de que el IPG participa en la respuesta fisiológica de esta hormona.

Por otro lado, con el objeto de obtener una fuente de GPI para realizar los estudios biológicos, más fácil de trabajar que el trypanosoma, se estudiaron GPI y sus precursores, los inositolfosfolípidos, en *S. pombe*, pues se ha encontrado que en otra levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, estas anclas son abundantes. *S. cerevisiae* es la única levadura cuyos GPIs han sido estudiados hasta el momento por lo cual fue interesante encarar el estudio de otra levadura, *Schizosaccharomyces pombe* de características biológicas diferentes a *S. cerevisiae*.

Se ha visto que los inositolfosfolípidos consisten principalmente en fosfatidilinositol y no contienen alquilglicerol ni ceramida. Se ha obtenido la estructura completa de estos inositolfosfolípidos por estudios en TLC, RPTLC y CGL, a partir de cultivos con o sin incorporaciones de palmítico radioactivo. Se encontró un único ácido graso esterificando la posición 2 de fosfatidilinositol y una mezcla en posición 1. A pesar de que no se incorporó ceramida en inositolfosfoceramidas, se demostró la existencia de [³H]-esfingomielina, esfingofosfolípido característico de mamíferos, conteniendo ceramida radioactiva. Se detectó una banda de proteínas de PM 19.000 aproximadamente que incorpora [³H]-ácido palmítico. Luego de digestión con proteasa e hidrólisis con GPI-PLD se liberaron lípidos marcados que prueban la existencia de anclas en esta fracción.

Por otra parte, se evidenció la presencia de GPIs libres en extractos orgánicos por susceptibilidad a ácido nitroso y PIPLC. Estos compuestos, fueron utilizados como fuentes de IPG y se probó su efecto inhibitorio sobre la acumulación de corticosterona por ACTH.

Palabras claves: glicosilfosfatidilinositol; inositolfosfoglicano; fosfatidilinositol; fosfolipasa C; fosfolipasa D; ACTH; AMPc; corticosterona; aldosterona; *S. pombe*.

Abstract

Glycosylphosphatidylinositols (GPIs) are best known as membrane anchors found on many eukaryote plasma membrane proteins ranging from protozoal to mammalian molecules. The hydrolysis of GPI by phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) releases an inositol phosphoglycan (IPG) which has been proposed to mediate the action of different hormones.

Previous studies from our group demonstrated that ACTH was able to induce hydrolysis of GPI and that the IPG derived from *T. cruzi* inhibited ACTH-mediated accumulation of aldosterone in bovine adrenocortical cells.

In this study we have investigated: a) the presence of GPI in bovine adrenal cortex, b) the involvement of this compound in ACTH signaling c) the presence of GPI and its precursors in *Schizosaccharomyces pombe* in order to obtain a GPI source for biological studies.

Compounds sensitive to nitrous acid treatment were found in adrenal cortex which proved the presence of GPI in this system. An enzyme anchored by GPI, alkaline phosphatase, was partially purified from this tissue and was used as a source for IPG. This IPG was able to inhibit ACTH-mediated steroid accumulation.

It was found that ACTH activates PI-PLC through a pertussis toxin-sensitive G protein, Gi/o, in adrenocortical cells. This indicates that the ACTH receptor can activate different G proteins (Gs, Gi). PI-PLC activation would release IPG.

An IPG of chemically defined structure obtained from *T. cruzi* was shown to inhibit ACTH-stimulated aldosterone and corticosterone production in rat adrenocortical cells as well as cortisol accumulation in bovine adrenocortical cells, suggesting that IPG signaling could be a conserved mechanism in mammalian ACTH action.

cAMP is the second messenger in ACTH response. In agreement, IPG inhibition of ACTH action was found to be a consequence of a phosphodiesterase activation and protein kinase A inhibition.

It is known that IPG is released to the extracellular medium and then re-enters the cell by an energy-dependent mechanism. Accordingly, we found that: a) the supernatants from ACTH-treated cells were able to

inhibit the stimulation of corticosterone production by the hormone; b) the addition of IPG antibodies (anti-CRD) to adrenocortical cells increased ACTH-response. These results demonstrate that ACTH stimulates IPG release which in turn inhibits adrenal steroids production by the hormone.

In order to obtain GPI for signaling experiments from an enriched source different from *Trypanosoma cruzi*, GPI and related lipids from a fission yeast, *S. pombe*, were studied. At present, *S. cerevisiae* is the only yeast where GPI structures have been determined and seem to be abundant. It was interesting to study these compounds from another yeast, *S. pombe*, which differs from *S. cerevisiae* in several biological features.

Inositolphosphoceramide was found to be the main sphingolipid in *S. cerevisiae*. In contrast, diacylglycerol containing inositol phospholipids have been identified as the unique inositolphospholipids (IPLs) in *S. pombe* extracts and the complete structure of these compounds have been determined by TLC, RPTLC and GLC from [³H]-palmitic acid labeled or non-labeled cultures. A unique fatty acid esterified the sn-2 position of IPLs. In contrast, different fatty acids were found in the sn-1 position of these compounds. Sphingomyelin, a sphingophospholipid characteristic of mammalian cells, containing [³H]-palmitic acid-labeled ceramide was detected. A GPI-anchored protein of 19 kDa has been found by [³H]-palmitic acid metabolic labeling. Evidence for free GPIs was shown by nitrous acid release of inositol phospholipids from sugar containing lipids. IPGs obtained from these GPIs by PI-PLC treatment proved to inhibit ACTH action.

Keywords: glycosylphosphatidylinositol; inositolphosphoglycan; phosphatidylinositol; phospholipase C; phospholipase D; ACTH; cAMP; corticosterone; aldosterone; signaling.

Abreviaturas

AChE, acetilcolinesterasa eritrocitaria humana
AMPc, adenosina monofosfato cíclico
ACTH, adrenocorticotrofina
anti-CRD, anticuerpos dirigidos contra IPG
(CDP)-DAG, citidinadifosfato-diacilglicerol
CRH, hormona de liberación de corticotrofina
DAF, factor de aceleración del dcaimiento
Dol-P-Man, dolicol manosa-fosfato
EtN, etanolamina
FAL, fosfatasa alcalina
PI, fosfatidilinositol
GPI, glicosilfosfatidilinositol
GLcNAc, N-acetilglucosamina
GLcNH₂, glucosamina
GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GPI-PLC, fosfolipasa C específica de GPI
GPI-PLD, fosfolipasa D específica de GPI
Gs, proteína G estimuladora
HPN, Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
IPC, inositolfosfoceramida
IPG, inositol fosfoglicano
IG, inositol glicano
LPGs, lipofosfoglicanos
LPPG, lipopéptido fosfoglicano
LPL, lipoproteína lipasa
Man, manosa
MDP, dipeptidasa de membrana
MIPC, manosa-inositol fosfoceramida
M(IP)₂C, manosa-(inositol-P)₂-ceramida
PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
NGF, factor de crecimiento nervioso
P, ácido palmítico
PARP, proteína repetitiva ácida
PE, fosfato de etanolamina (ETN)
PLA₂ fosfolipasa que hidroliza el ácido graso de la posición sn-2
PrP^c, proteína de priones, forma celular
PrP^{sc}, proteínas de priones, forma anormal ("scrapie")
PI, fosfatidilinositol
PIP, fosfatidilinositol fosfato
PIP₂, fosfatidilinositol difosfato
PI-PLC, fosfolipasa C específica de PI
PA, ácido fosfatídico
PtdIns, fosfatidilinositol con diacil- o alquilacilglicerol

RE, retículo endoplásmico
RER, retículo endoplásmico rugoso
VSG, glicoproteína variable de superficie
TFA, ácido trifluoroacético
DHS, dihidroesfingosina
CGL, cromatografía gas-líquido
TLC, cromatografía de adsorción en capa delgada
RPTLC, cromatografía reversa en capa delgada
PAGE-SDS, electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida.

Indice

Capítulo 1. Introducción

	página
1.1 GPIs como anclas de proteínas de membranas.....	2
1.2 GPIs libres.....	3
1.3 Estructura de GPI.....	4
1.3.1 Conservación entre estructuras de GPI.....	4
1.3.2 Heterogeneidad entre estructuras de GPI.....	6
1.3.2.1 Variaciones en el glicano.....	6
1.3.2.2 Variaciones en el lípido.....	8
1.3.2.3 Especulación sobre la causa de la heterogeneidad en la estructura de GPI.....	11
1.4 Biosíntesis de GPI.....	14
1.5 Adición de GPI a proteínas.....	18
1.6 Consecuencias de la deficiencia de GPI.....	18
1.7 Fosfolipasas que hidrolizan GPI.....	19
1.8 Propiedades y Función de GPI en eucariotas superiores.....	22
1.8.1 Movilidad en el plano de la bicapa lipídica.....	22
1.8.2 Localización y topología.....	23
1.8.2.1 Regulación de la localización.....	25
1.8.3 Participación en señales intracelulares.....	25
1.8.3.1 Participación en la respuesta de endócrina.....	25

1.8.3.2 Receptor de IPG.....	28
1.8.3.3 Participación en procesos infecciosos.....	29
1.9 El LPPG: miembro de la familia de los GPIs libres.....	30
1.10 Biosíntesis de esteroides en corteza adrenal. Su regulación por ACTH.....	32
1.11 Anclas de GPI y sus precursores en levaduras.....	36
Objetivos del presente trabajo.....	39

Capítulo 2: Diseño Experimental

- Estudios de GPI en corteza adrenal bovina

2.1 Obtención de homogenatos de corteza adrenal.....	41
2.2 Cromatografía en columna de Octil-Sepharosa.....	41
2.3 Cromatografía en columna de Concanavalina-A-Sepharosa.....	41
2.4 Cromatografía en columna de Q-Sepharosa.....	42
2.5 Cromatografía en columna de Superosa 6.....	42
2.6 Cromatografía en columna de Mono Q.....	42
2.7 Concentración de las muestras proteicas.....	42
2.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones.....	43
2.8.1 Tinción de geles por Coomasie.....	44
2.8.2 Tinción de geles por Plata.....	44
2.8.3 Fluorografía de los geles.....	44

2.9	Inmunoprecipitación.....	45
2.10	Western-blot.....	45
	2.10.1 Procedimiento.....	45
	2.10.2 Soluciones.....	46
	2.10.3 "Western-Blot" de FAL en homogenatos de corteza adrenal.....	46
	2.10.4 "Western-Blot" de proteínas ancladas por GPI de corteza adrenal.....	47
2.11	Determinación de proteínas.....	47
2.12	Determinación de actividad de FAL.....	47
2.13	Separación de FAL libre y anclada con Tritón X-114.....	47
	2.13.1 Partición en Tritón X-114 modificada.....	48
2.14	Desaminación y Reducción con NaBH ₄	48
- Estudios de transducción de señales en células		
2.15	Preparación de células adrenocorticales de rata.....	49
2.16	Preparación de células adrenocorticales de vaca.....	50
2.17	Incubaciones con células dispersas para determinar esteroides...	51
	2.17.1 Drogas Ensayadas y sus concentraciones.....	51
	2.17.2 Aislamiento de LPPG.....	52
	2.17.3 Preparación de IPG de <i>T. cruzi</i>	52
	2.17.4 Sobrenadantes como fuente de IPG.....	52
2.18	Cuantificación de Esteroides.....	53

2.18.1	Protocolo general del RIA de esteroides.....	53
2.18.2	RIA de aldosterona.....	54
2.18.3	RIA de corticosterona.....	55
2.18.4	RIA de cortisol.....	55
2.19	Incubaciones con células adrenocorticales para determinar la liberación de FAL.....	56
2.20	Incubaciones con células dispersas para determinar la liberación de lípidos a partir de ^3H -LPPG.....	56
2.20.1	Preparación del estándar de Ceramida Fosfato.....	57
- Estudios de inositolfosfolípidos y GPI en <i>S pombe</i>		
2.21	Cultivo de levaduras.....	58
2.22	Incorporación de ácido [9,10(n)- ^3H]-palmitico.....	58
2.23	Extracción de proteínas de levaduras.....	59
2.24	Extracción de lípidos de levaduras.....	60
2.25	Desaminación y Reducción con NaBH_4	60
2.26	Cromatografía en Capa Delgada (TLC).....	60
2.26.1	Cromatografía de adsorción.....	61
2.26.2	Cromatografía en fase reversa.....	61
2.26.3	Cuantificación de las muestras radioactivas.....	61
2.27	Cromatografía en resinas de intercambio iónico mixtas.....	61

2.28	Cromatografía Gas-Líquido (CGL).....	62
	2.28.1 Análisis de los derivados metilados de los ácidos grasos. Condición.....	62
	2.28.2 Análisis de los derivados metilados de los ácidos grasos. Condición II.....	62
2.29	Métodos de Revelado.....	63
	2.29.1 Detección por fluorografía para las muestras radioactivas..	63
	2.29.2 Reveladores universales.....	63
2.30	Hidrólisis Enzimáticas.....	64
	2.30.1 Tratamiento con PI-PLC de <i>Bacillus thuringiensis</i>	64
	2.30.2 Tratamiento con PI-PLC de <i>Bacillus cereus</i>	64
	2.30.3 Tratamiento con GPI-PLD.....	64
	2.30.4 Tratamiento con PLA ₂	64
	2.30.5 Tratamiento con Proteasa.....	65
	2.30.6 Tratamiento con esfingomielinasa.....	65
2.31	Hidrólisis químicas y otras reacciones.....	66
	2.31.1 Hidrólisis alcalina en condiciones de saponificación.....	66
	2.31.2 Hidrólisis alcalina fuerte.....	66
	2.31.3 Preparación de derivados metilados de ácidos grasos.....	66
	2.31.4 Metanólisis.....	67
2.32	Hidrogenación catalítica.....	67
2.33	Equipamiento Utilizado.....	68

2.34	Soluciones Centelleadoras.....	69
------	--------------------------------	----

RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 3. Estudios de anclas de GPI en corteza adrenal

3.1	Purificación de Fosfatasa Alcalina anclada por GPI de corteza adrenal bovina.....	71
3.1.1	Purificación de Fosfatasa Alcalina anclada: Protocolo 1.....	72
3.1.2	Purificación de Fosfatasa Alcalina anclada: Protocolo 2.....	76
3.2	Aislamiento de proteínas ancladas por GPI.....	83
3.2.1	“Western Blot” con anticuerpos específicos de GPI.....	83
3.2.2	Separación con Tritón X-114.....	85
3.3	Estudios de la porción lipídica de GPI de corteza adrenal.....	86

Capítulo 4. Rol de los glicosilfosfatidilinositales en sistemas de señales

4.1	Efecto de IPG en preparaciones de células adrenocorticales bovinas.....	91
4.2	Efecto de IPG en preparaciones de células adrenocorticales de rata.....	95
4.3	Tratamiento del IPG con ácido nitroso.....	98
4.4	Activación por ACTH de una fosfolipasa específica de GPI.....	98
4.4.1	Liberación de Fosfatasa Alcalina al medio extracelular por ACTH.....	98

4.4.2 Activación de una GPI-PLC por ACTH.....	102
4.4.3 Evaluación de la liberación de IPG de corteza adrenal por ACTH.....	104
4.4.4 Rol de un inositol glicano en la acción de ACTH.....	108
4.5 Transducción de la señal de GPI.....	110
4.5.1 Evaluación de la participación de una proteína G en la hidrólisis de GPI.....	110
4.5.2 Evaluación de la activación de fosfodiesterasa por IPG.....	113

Capítulo 5.

Estudios de GPIs y sus precursores en <i>S. pombe</i>	123
5.1 Determinación de la estructura de IPLs de <i>S. pombe</i>	124
5.1.1 Esterificación de la posición sn-2 de los [³ H]-IPLs.....	132
5.1.2 Esterificación de la posición 1 de los [³ H]-IPLs.....	134
5.1.3 Identificación de esfingomielina en <i>S. pombe</i>	143
5.2 Incorporación de [³ H]-palmitico en proteínas de <i>S. pombe</i> ancladas por GPI.....	146
5.3 Aislamiento de GPIs libres en células de <i>S. pombe</i> sin incorporación de precursor radioactivo.....	152
5.4 Efecto de IPGs de distintas fuentes en la estimulación, mediada por ACTH, de la producción de corticosterona.....	161
Conclusiones.....	171

Lista de Figuras

Figura 1.	Estructura de la porción conservada o 'core' de los GPIs.....	4
Figura 2.	Estructura esquemática de una proteína anclada por GPI.....	5
Figura 3.	Estructura de las anclas de GPI de proteínas de mamíferos.....	7
Figura 4.	Estructura de los distintos inositol fosfolípidos presentes en GPIs y susceptibilidad a fosfolipasas de GPI tipo C y D.....	9
Figura 5.	Remodelamiento de los ácidos grasos en trypanosomas.....	11
Figura 6.	Esquema de las estructuras de las anclas de GPI y de GPIs libres en los distintos estadios del ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 7.	Biosíntesis de anclas de GPI en <i>T. brucei</i> . A, vía de formación de GPI precursor de anclas de proteínas. B, El GPI transferido en bloque a la VSG por intercambio del péptido señal para GPI C-terminal en el retículo endoplasmático	15
Figura 8.	Estudio de la biosíntesis de GPI mediante el uso de sustratos sintéticos.....	16
Figura 9.	Hidrólisis de GPI por (G)PI-PLC o GPI-PLD y sus productos respectivos.....	20
Figura 10.	Estructura del LPPG de <i>T. cruzi</i>	31
Figura 11.	Esquema de la glándula adrenal.....	32
Figura 12.	Estructura y numeración de los carbonos del núcleo esteroideo de los esteroides secretados por la corteza adrenal.....	33
Figura 13.	Estructura química de algunos de los principales esteroides producidos en la corteza adrenal.....	34
Figura 14.	Perfil de elución de FAL y de proteínas totales en Octil-Sepharosa.....	72
Figura 15.	Perfil de elución de FAL y de proteínas totales en Q-Sepharosa.....	75
Figura 16.	Perfil de elución de FAL y proteínas totales en Concanavalina A-Sepharosa.....	77
Figura 17.	Análisis de las fracciones obtenidas siguiendo el protocolo 2 de purificación de FAL por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante revelado por tinción con Coomasie.....	78
Figura 18.	Análisis de la fase acuosa proveniente de homogenatos de corteza adrenal por "Western Blot" utilizando anticuerpos específicos para las isoenzimas de FAL de intestino y de placenta.....	81
Figura 19.	Hidrólisis de inositol fosfolípidos por PI-	

	PLC.....	83
Figura 20.	Reconocimiento de IPG por anti-CRD.....	83
Figura 21.	Análisis de VSGm (6 µg) por "Western Blot-modificado" utilizando anticuerpos anti-CRD.....	85
Figura 22.	Análisis por TLC de los lípidos liberados de la fase de Tritón X-114 por tratamiento con ácido nitroso y extracción con butanol utilizando el solvente B.....	87
Figura 23.	Análisis de los lípidos hidrolizados metanólisis por TLC utilizando el solvente D.....	88
Figura 24.	Estructura del LPPG y del IPG purificados de <i>T. cruzi</i> . Esquema de las reacciones utilizadas para obtener IPG o IPG tratado con ácido nitroso.....	93
Figura 25.	Efecto de IPG sobre la estimulación de cortisol mediada por ACTH en células adrenocorticales bovinas.....	94
Figura 26.	Efecto de IPG sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	96
Figura 27.	Efecto de IPG sobre la estimulación de aldosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	97
Figura 28.	Efecto de ACTH en la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular de preparaciones de células enriquecidas en fasciculata adrenal de rata.....	99
Figura 29.	Efecto de ACTH en la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular de preparaciones de células enriquecidas en fasciculata adrenal bovina.....	100
Figura 30.	Efecto de ACTH en la hidrólisis de [³ H]-LPPG.....	103
Figura 31.	Efecto de sobrenadantes como fuente de IPG de adrenal en la liberación de corticosterona en células de fasciculata adrenal de rata.....	105
Figura 32.	Efecto de anti-CRD sobre la producción de corticosterona mediada por ACTH.....	107
Figura 33.	Efecto de IG sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	109
Figura 34.	Efecto de GTP-γ-S en la liberación de fosfatasa alcalina.....	111
Figura 35.	Esquema que ilustra el mecanismo de acción postulado para ACTH.....	119
Figura 36.	Análisis de los lípidos de la fase butanólica obtenida a partir del extracto (E) proveniente de la marcación metabólica de cultivos de <i>S. pombe</i>	127
Figura 37.	Análisis de los lípidos liberados por acción de PI-PLC sobre los [³ H]-IPLs <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	129

Figura 38.	Análisis de los [³ H]-ácidos grasos liberados de DAG proveniente de los [³ H]-IPLs de <i>S. pombe</i>	131
Figura 39.	Análisis de los ácidos grasos liberados por acción de PLA ₂ sobre los [³ H]-IPLs <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	133
Figura 40.	Análisis de los lisoglicerolípidos obtenidos en la fase butanol luego del tratamiento de los [³ H]-IPLs con PLA ₂	135
Figura 41.	Análisis de los ácidos grasos provenientes de los [³ H]-lisoglicerolípidos obtenidos en la fase butanol luego del tratamiento de los [³ H]-IPLs con PLA ₂	137
Figura 42.	Análisis de los ácidos grasos liberados de posición sn-2 de IPLs.....	139
Figura 43.	Análisis de los ácidos grasos liberados de posición sn-2 de IPLs.....	140
Figura 44.	Análisis de los ácidos grasos liberados de posición sn-1 de IPLs.....	141
Figura 45.	Evaluación de la presencia de esfingomielina en extractos de <i>S. pombe</i>	144
Figura 46.	Análisis de la liberación de ceramida por hidrólisis de fracciones del extracto cloroformo:metanol:agua de <i>S. pombe</i> .	145
Figura 47.	Análisis de la fase butanol (Bp) y del pellet P' por TLC, solvente A.....	146
Figura 48.	SDS-PAGE y fluorografía del pellet P'.....	148
Figura 49.	Análisis por TLC de los lípidos liberados por acción de GPI-PLD de los productos de proteólisis del pellet (P').....	150
Figura 50.	Análisis de la fase acuosa (Ac) y de la fase butanólica (Bc) del extracto E.....	154
Figura 51.	Análisis de la fase acuosa (Ac) y de la fase butanólica (Bc) del extracto E.....	155
Figura 52.	Análisis de la fase acuosa (Ao) y de las fases butanólicas (Bo, B ₁ y B ₂) del extracto E.....	156
Figura 53.	Tratamiento de GPI con ácido nitroso.....	158
Figura 54.	Análisis por TLC de los lípidos liberados de Ao por tratamiento con ácido nitroso y extracción con butanol.....	159
Figura 55.	Análisis por TLC de los lípidos liberados de Ao por tratamiento con PI-PLC y extracción con butanol.....	160

Lista de Tablas

Tabla I.	Ejemplos de GPIs libres con capacidad de reproducir efectos de hormonas.....	26
Tabla II.	Composición de reactivos de electroforesis.....	43
Tabla III.	Determinación de la relación entre Fosfatasa Alcalina libre y anclada en los picos eluidos de Octil-Sepharosa con Tritón X-114.....	74
Tabla IV.	Cuadro de Purificación: Protocolo 1.....	76
Tabla V.	Cuadro de Purificación: Protocolo 2.....	79
Tabla VI.	Efecto de Toxina de Pertussis sobre la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular de células adrenocorticales de rata.....	112
Tabla VII.	Efecto de MIX sobre el efecto inhibitorio de IPG.....	114
Tabla VIII.	Tratamiento con proteasa del pellet (P') de <i>S. pombe</i>	149
Tabla IX.	Efecto de GPI de <i>S. pombe</i> sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	162
Tabla X.	Efecto de IPG de adrenal de sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	164
Tabla XI.	Determinación de los ácidos grasos presentes en los IPLs de <i>S. pombe</i>	168

Lista de esquemas

Esquema 1.	Protocolo I de Purificación.....	75
Esquema 2.	Protocolo II de Purificación.....	79
Esquema 3.	Extracción y Purificación de inositol fosfolípidos y proteínas ancladas por GPI en <i>S. pombe</i>	125
Esquema 4.	Extracción y Purificación de inositol fosfolípidos y glicosilfosfatidilinositoles en <i>S. pombe</i>	153

INTRODUCCION

Capítulo 1. Introducción

Recientemente se ha descubierto una nueva familia de compuestos, los glicosilfosfatidilinositales (GPIs).

Esta familia estructuralmente heterogénea de moléculas está presente en membranas de células eucariotas de una variedad de sistemas que comprende desde protozoos hasta mamíferos.

Los GPIs pueden existir como anclas de proteínas, es decir, mantener la asociación estable de las proteínas a la membrana, o como moléculas de GPI libres. Las anclas de GPI de proteínas constituyen, por lo tanto una de las alternativas de anclaje de proteínas a membrana.

1.1 GPIs como anclas de proteínas de membranas

Se han descrito más de cien ejemplos de proteínas ancladas a la cara externa de la membrana plasmática mediante GPI con funciones muy variadas como: reconocimiento inmune, regulación del complemento, proteólisis de la matriz extracelular, enzimas hidrolíticas de superficie, receptores de membrana, moléculas de adhesión y antígenos de función desconocida. Ultimamente, también, se han encontrado proteínas ancladas involucradas en biosíntesis de mielina y en patologías causadas por priones.

Se han caracterizado, parcial o completamente, las estructuras de las anclas de algunas de estas proteínas, incluyendo la glicoproteína variable de superficie, VSG, (1) y la proteína repetitiva ácida, PARP, (2) de *T. brucei*; la proteasa de superficie de promastigotes, gp63, de

Leishmania major (3); el antígeno 1G7 (4) y la glicoproteína Tc85 (5) de *T. cruzi*; el antígeno específico de pre-espora de *D. discoideum* (6) y la acetilcolinesterasa del órgano eléctrico de *Torpedo californica* (7). En mamíferos se han determinado las estructuras completas de las anclas de nueve proteínas diferentes: el antígeno Thy-1 de cerebro de rata (8), acetilcolinesterasa eritrocitaria humana (9;10), proteína prion de cerebro de hámster (11), 5'-nucleotidasa de hígado bovino (12), fosfatasa alcalina de placenta humana (13), CD59 urinaria humana (14), la molécula de adhesión de neuronas de músculo esquelético murino (NCAM) (15), CD52 de bazo humano (16) y la dipeptidasa de riñón porcino (17).

El GPI constituye una vía de anclaje especialmente frecuente en eucariotas inferiores como protozoos y levaduras. Sin embargo, los eucariotas superiores también expresan GPI aunque en menor proporción (18-20).

1.2 GPIs libres

Se han estudiado distintos GPIs libres en una variedad de sistemas entre ellos, parásitos trypanosomátidos como Leishmanias, Trypanosomas, Herpetomonas, Leptomonas y Phytomonas (20-23). Algunos de los ejemplos mejor caracterizados son LPGs (lipofosfoglicanos) de *Leishmania* (20;24), que son los principales factores de virulencia de estos parásitos (25) y LPPG (lipopéptido fosfoglicano) de *T. cruzi* (26;27). También son abundantes en otros parásitos protozoarios como *P. falciparum* (28), *Toxoplasma gondii* (29), *Tricomonas* (30) y *Entamoeba* (31).

Se ha encontrado un 'pool' intracelular de GPI en varias células eucariotas superiores, incluyendo linfocitos T y otros tipos celulares de

mamíferos (32-34). Están presentes tanto en el retículo endoplasmático, donde pueden ser precursores de las proteínas ancladas (35;36), o en membrana plasmática, donde podrían servir como fuente de segundos mensajeros utilizables en la transducción de señales de hormonas y factores de crecimiento (37). Si bien, en células de mamíferos, los GPIs libres constituyen una fracción minoritaria respecto de los lípidos totales, en células HeLa y células de linfoma de ratón serían 4 a 5 veces más abundantes que las proteínas ancladas (38).

1.3 Estructura de GPI

1.3.1 Conservación entre estructuras de GPI

Ha resultado muy llamativo el hecho de que todas las estructuras de GPIs estudiadas, tanto libres como de anclas de proteínas, presentan una porción conservada o 'core' que consiste en un inositol fosfolípido unido glicosídicamente a glucosamina no acetilada que, a su vez, se une a un trisacárido lineal compuesto por tres residuos de manosa. La manosa terminal, en el extremo no reductor del glicano, está unida a fosfoetanolamina.

$\text{EtN-PO}_4\text{-6Man}\alpha\text{1-2Man}\alpha\text{1-6Man}\alpha\text{1-4GlcNH}_2\alpha\text{1-6 } myo\text{-inositol-1-PO}_4\text{-lípido}$

Figura 1- Estructura de la porción conservada o 'core' de los GPIs.

Es de señalar la presencia de glucosamina no acetilada en los GPIs (18), pues aunque la glucosamina está presente en todas las cadenas N-glicosídicas de glicoproteínas, en ese caso se encuentra como N-acetilglucosamina.

En el caso de las anclas de proteínas, los GPIs se unen covalentemente al extremo C-terminal quedando las proteínas expuestas hacia el medio extracelular, como se muestra en la Figura 2. La unión es a través de la etanolamina terminal del GPI, la cual está involucrada en una unión amida con el grupo α -carboxilo del residuo aminoacídico C-terminal de la proteína.

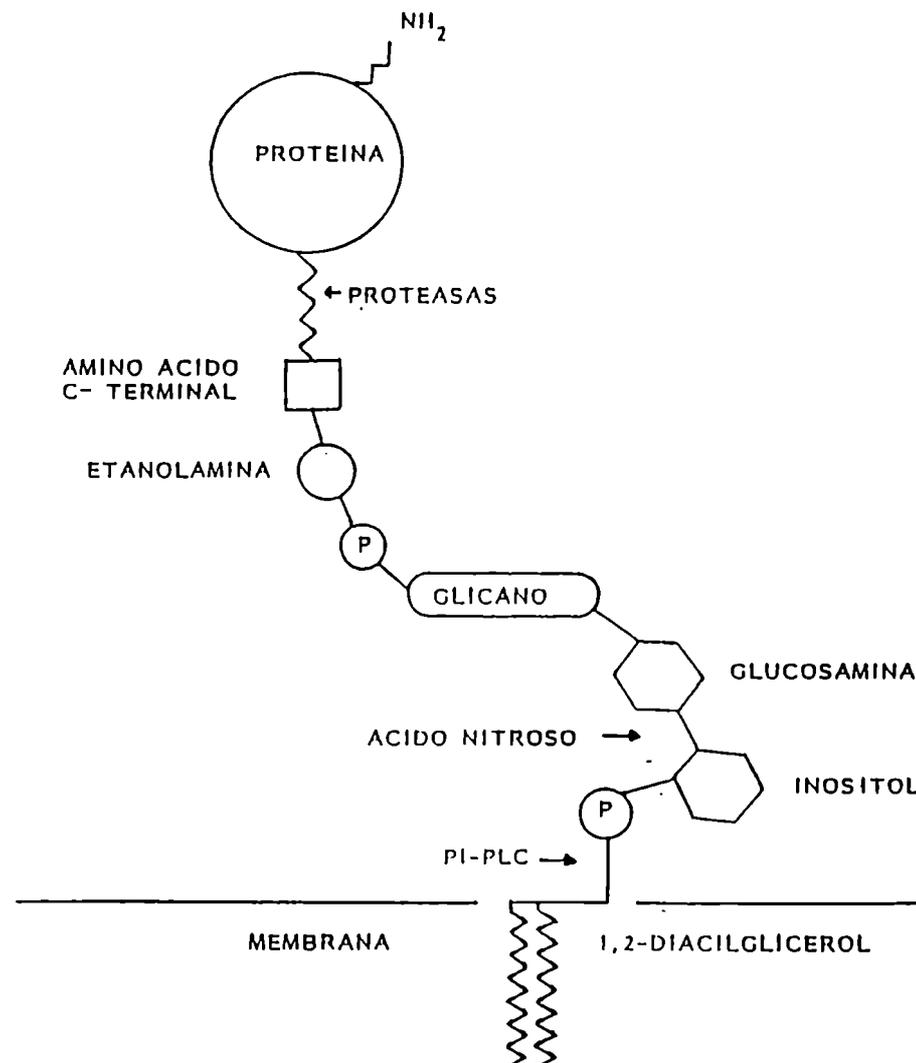


Figura 2. Estructura esquemática de una proteína anclada por GPI.

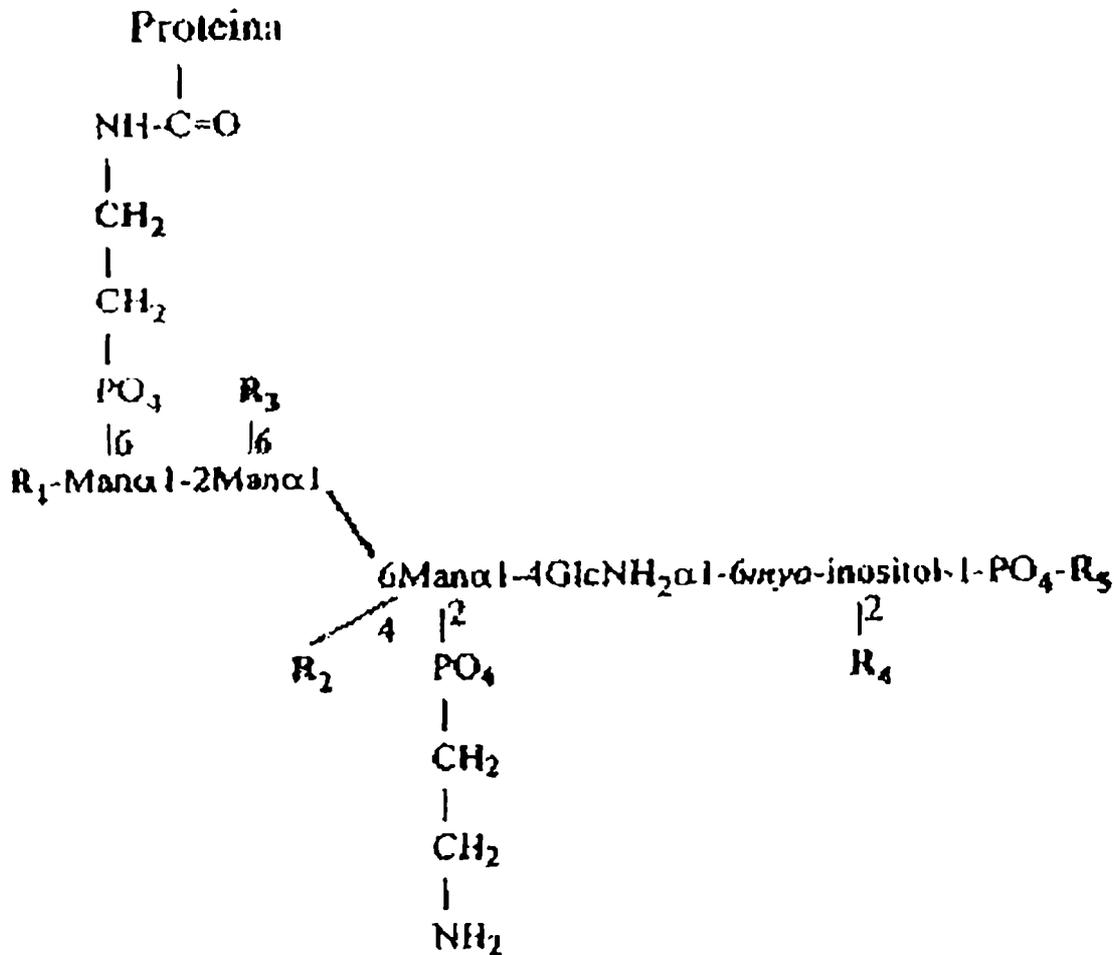
1.3.2 Heterogeneidad entre estructuras de GPI

A la porción conservada o 'core' del GPI que se muestra en la Figura 1, suelen agregarse para completar la molécula unidades que son altamente variables entre especies. Esto hace que la familia de moléculas de GPI sea estructuralmente heterogénea. La heterogeneidad puede basarse tanto en diferencias en las estructura del glicano como del lípido.

1.3.2.1 Variaciones en el glicano

Respecto del glicano pueden agregarse al 'core' mono- u oligosacáridos laterales llamados 'decoraciones' que varían en los distintos GPIs dependiendo de la proteína que anclan y el tejido u organismo en que se expresa (39).

Como puede verse en la Figura 3, las modificaciones pueden incluir 1) la adición de azúcares como: galactosa [VSG] (1), de otras manosas [Thy-1] (8), n-acetilgalactosamina [Thy-1] (40), ácido siálico [anclas de proteínas de priones] (11), [dipeptidasa de riñón porcino] (17) y [PARP de *T. brucei*]; 2) la adición de más etanolamina fosfato [Thy-1] (8), [AChE] (9) y 3) la acilación del inositol [AChE]. En este último caso, un ácido graso está esterificando el hidroxilo en posición 2 del anillo de inositol. Esta modificación puede ocurrir en mamíferos (41), trypanosomas (2) y levaduras (42); en estos dos últimos organismos estaría presente en los GPIs libres solamente (42). La etanolamina fosfato adicional presente en todos los metazoos no se encuentra en los eucariotas inferiores (8-10).



Proteína	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Thy-1 de cerebro de rata	±Manα1-2	GalNAcβ1-4	OII	OII	Alquilacilglicerol
Proteína de prion de cerebro de Hamster	±Man	(±NANA)-(±Hex)-HexNAc	OII	OII	n d.
NCAM de músculo esquelético de ratón	±Manα1-2	±GalNAcβ1-4	n d.	OII	n d.
5'-nucleotidasa de hígado bovino	±Man	±HexNAc	± EtNP	OII	n d.
Acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos	OII	OII	± EtNP	Palmitato	Alquilacilglicerol
Fosfatasa Alcalina de placenta humana	OII	OII	± EtNP	OII	Alquilacilglicerol
CD59 urinaria humana	±Manα1-2	GalNAcβ1-4	OII	n d.	n d.
CD52 humana	±Manα1-2	OII	± EtNP	± Palmitato	Diacilglicerol
Dipeptidasa de riñón humano	±Manα1-2	±GalNAcβ1-3GalNAcβ1-4 ±GalNAcβ1-4	n d.	OII	n d.
Dipeptidasa de riñón porcino	OII	±GalNAcβ1-3GalNAcβ1-4 ±GalNAcβ1-4 ±NANA±GalNAcβ1-4	± EtNP	OII	Alquilacilglicerol

Figura 3 Estructura de las anclas de GPI de proteínas de mamíferos. El 'core' posee un grupo etanolamina fosfato (EtNP) adicional en todas las estructuras conocidas de mamíferos. Estas pueden presentar además otras variaciones (R₁-R₄). ± indica la presencia de un residuo en una población de las anclas de GPI, OII indica la ausencia de modificación; R₅: porción lipídica; n d.: no determinado.

Se sabe muy poco respecto de la posible función de las modificaciones adicionales. En el caso de las galactosas de VSG se cree que podrían estar involucradas en el empaquetamiento de proteínas en la superficie del trypanosoma (43).

1.3.2.2 Variaciones en el lípido

El lípido presente en los GPIs, puede ser muy variable en distintos organismos, habiéndose determinado la presencia de un glicerolípido en ciertas anclas y de un esfingolípido en otras, como se observa en la Figura 4. Las anclas de GPI de proteínas de mamífero presentan mayoritariamente alquil-glicerolípidos (20).

Se han encontrado sn-1-alquil-2-acil gliceroles en acetilcolinesterasa eritrocitaria humana (9), fosfatasa alcalina de placenta humana (13) y otras proteínas de mamífero (20), así como en algunos parásitos como *L. major* (3) y *T. cruzi* (44).

Existen anclas con sn-1,2-diacilgliceroles en VSG de *T. brucei* (45), acetilcolinesterasa de Torpedo (46) y CD52 humana (16) y con sn-1-acil-2-lisogliceroles en PARP de *T. brucei* (2).

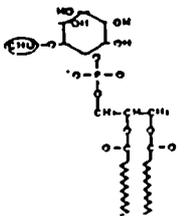
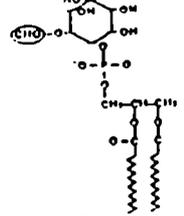
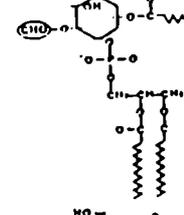
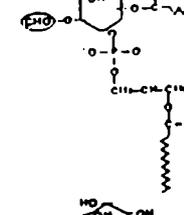
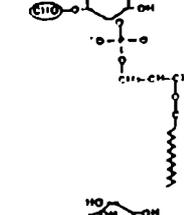
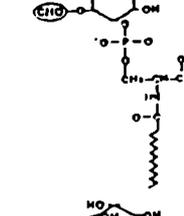
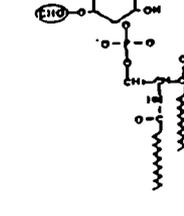
Estructura de PI	Lipido	Acilación del inositol	Ejemplos	PI-PLC bacteriana	GPI-PLC de <i>T. brucei</i>	GPI-PLD de plasma
	Diacyl-glicerol		VSG <i>T. brucei</i> AChE Torpedo	+		
	Alkylacyl-glicerol		PSP <i>L. major</i> AChE bovina			
	Alkylacyl-glicerol		AChE humana DAF humana			
	Liso acil-glicerol		PARP <i>T. brucei</i>			
	Liso alkyl-glicerol		LPG <i>L. major</i>		n.d.	n.d.
	Ceramida (fitoesfingosina)		Proteínas <i>S. cerevisiae</i> PsA <i>D. discoideum</i>			n.d.
	Ceramida (esfinganina)		LPPG <i>T. cruzi</i>	+	n.d.	+

Figura 4. Estructura de los distintos inositol fosfolipidos presentes en GPIs y susceptibilidad a fosfolipasas de GPI tipo C y D.

En cuanto a los esfingolípidos, se ha visto que ciertas anclas de *T. cruzi* (47;48), de *S. cerevisiae* y de *D. discoideum*, presentan ceramidas en la porción lipídica (49).

En distintos GPIs cuyo inositol fosfolípido consiste en PI, se ha informado que la estructura del mismo no coincide con la del PI libre (17;20) que sería el lípido precursor. Este fenómeno se ha descrito también para el caso de las inositol fosfoceramidas (50).

Una posible explicación a esta cuestión surge de la comprensión de la biosíntesis de estas moléculas en *Trypanosoma brucei*. En este sistema se ha visto que una vez formado el GPI, puede sufrir modificaciones conocidas como 'remodelamiento' del lípido, las cuales involucran una serie compleja de reacciones (39). En este parásito, el GPI es sintetizado con ácido esteárico en posición sn-1 y una mezcla de ácidos grasos (18:0, 18:1, 20:4 y 22:6) en posición sn-2 (51) del glicerol, Figura 5. Primero ocurre la remoción del ácido graso de la posición sn-2 que se reemplaza por ácido mirístico. Seguidamente ocurre lo mismo en la posición sn-1. El donante de ácido graso en ambas etapas es miristoil-coA. Estas modificaciones ocurren antes de que el GPI se una a la proteína (52). Para el caso de proteínas de mamífero, no puede asegurarse si ocurre un remodelamiento similar del lípido o si, alternativamente, la célula simplemente selecciona a un tipo minoritario de PI como precursor de los GPIs que luego serán anclas de proteínas (17).

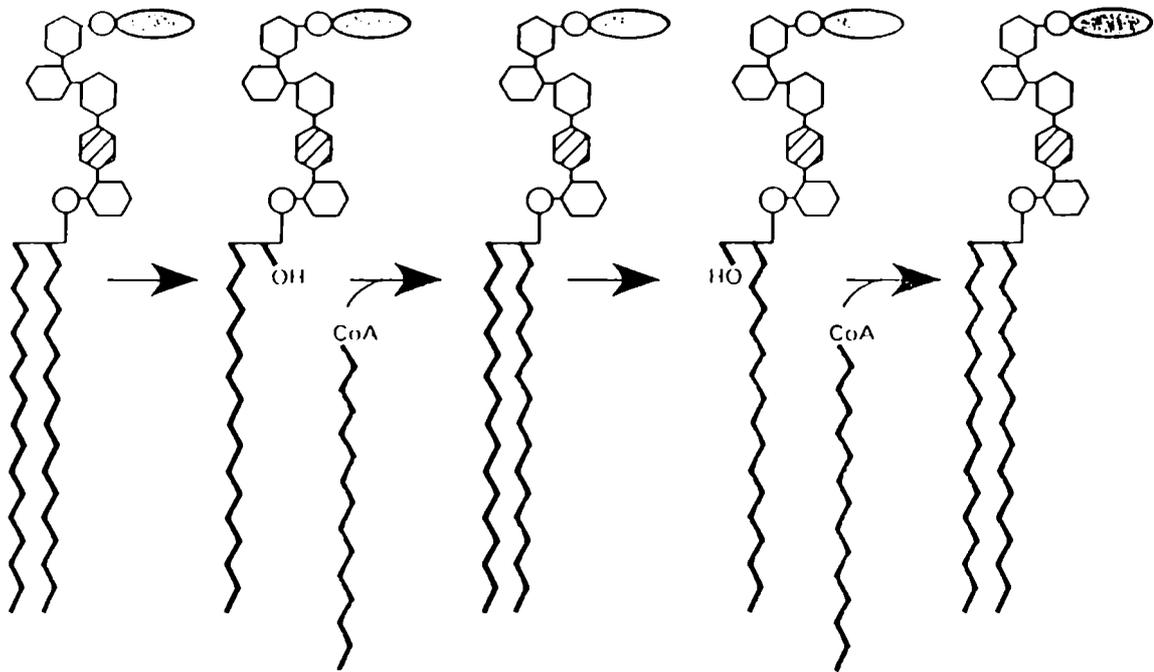


Figura 5. Remodelamiento de los ácidos grasos en trypanosomas.

En resumen, los lípidos de los GPIs pueden diferir en: la naturaleza del esqueleto del lípido (glicerol vs. esfingosina), las uniones de los ácidos grasos al glicerol (éster vs éter), el número y el largo de las cadenas de ácido graso.

1.3.2.3 Especulación sobre la causa de la heterogeneidad en la estructura de GPI

Algunas de las variaciones que presentan las moléculas de GPI parecen ser específicas de especie, pero muchas otras dependen del estadio del desarrollo del organismo. A partir de las primeras

descripciones de estructuras de anclas de GPI, surgió el interrogante con respecto a la causa que determina la existencia de un tipo específico de estructura; esto es, si depende de la especie en que se sintetiza, del estadio del desarrollo en que se encuentra la especie, o bien si es determinada por la proteína que va a llevar la modificación post-traducciona. Las dos primeras hipótesis sugerían que la especificidad de las enzimas de la biosíntesis, presentes en un tejido, definiría el tipo de estructuras de GPI en ese tejido.

Debido a la existencia de pocos informes de estructuras completas de anclas, esta cuestión no ha podido ser totalmente esclarecida aún, aunque en los últimos años han surgido los primeros datos al respecto. Por un lado, los estudios basados en la dipeptidasa de riñón humano y porcino realizados en 1995, representan la primera comparación de las estructuras glicosídicas de las anclas de GPI pertenecientes a una misma proteína en dos especies. Se encontraron estructuras idénticas en relaciones molares muy similares, lo que ha sugerido que las modificaciones laterales de las anclas de GPI no serían específicas de especie sino más bien de un tipo de proteína y/o tejido (17). Por otra parte, los numerosos estudios realizados sobre las estructuras lipídicas de distintos GPIs presentes en *T. cruzi*, ya sea de anclas o de GPIs libres (Figura 6), indican que un mismo organismo puede presentar GPIs con distintas estructuras (53) y que, aún más, puede expresar anclas diferentes en un mismo estadio del desarrollo (54). Estos resultados no sugieren que la biosíntesis de un tipo específico de molécula de GPI este dirigida por la especie o el estadio; en cambio, indican que la señal estaría en la proteína.

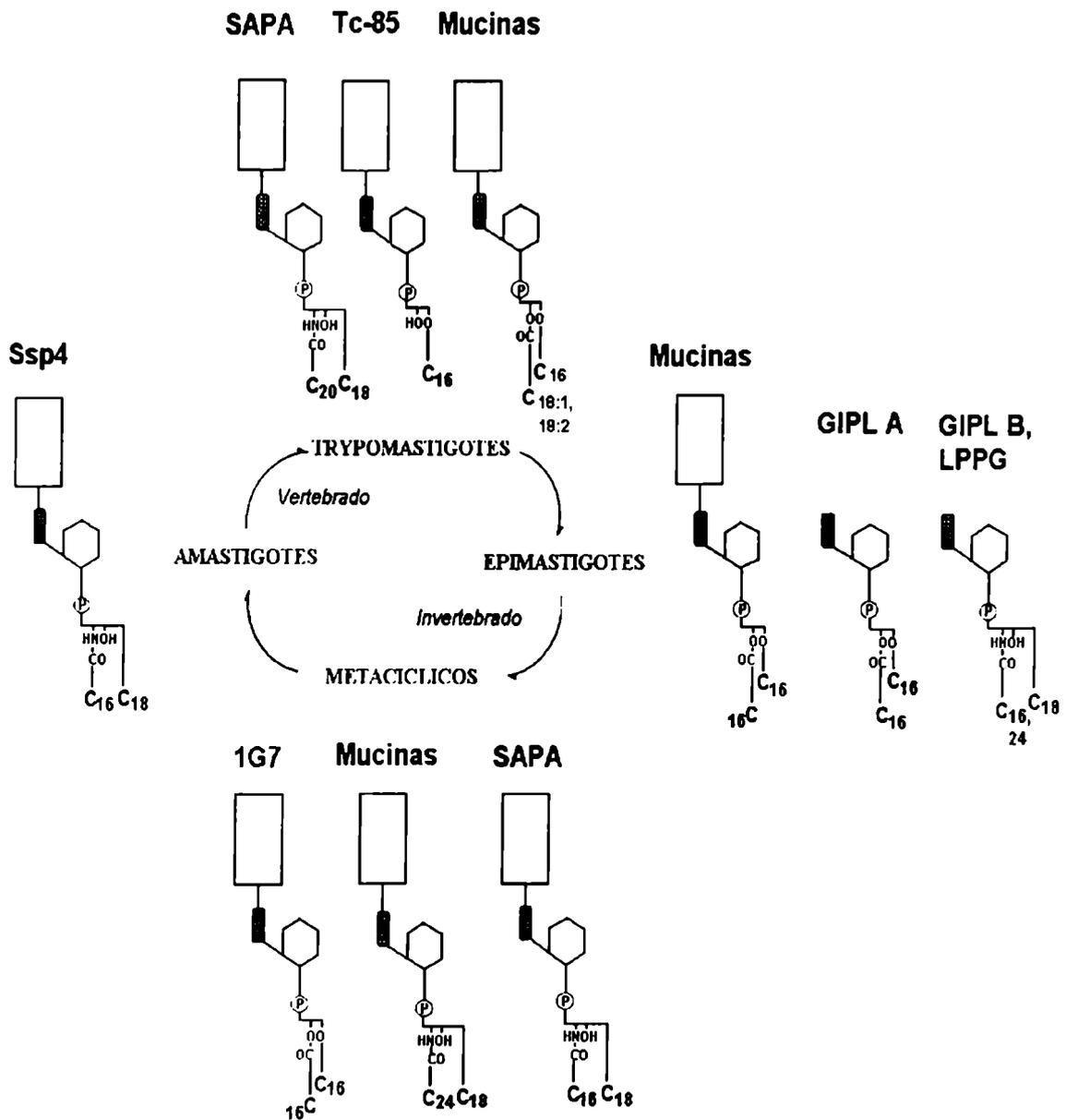


Figura 6. Esquema de las estructuras lipídicas de las anclas de GPI y de GPIs libres (GIPLs) en los distintos estadios del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* (55).

1.4 Biosíntesis de GPI

Los GPIs se sintetizan en el sistema retículo endoplasmático (SRE). La biosíntesis de GPI fue estudiada por primera vez en *T. brucei* (52;56;57), donde la proteína de cubierta de este parásito (VSG), que es anclada por GPI, representa aproximadamente el 10% de la proteína total celular (39;58). Por lo tanto, la biosíntesis de GPI es muy activa y hay gran cantidad de precursores de anclas y GPI maduros en este organismo. Posteriormente fue estudiada también en *T. cruzi* (59), *T. gondii* (60), *P. falciparum* (61), *S. cerevisiae* (42) y en mamíferos (62).

La secuencia de eventos en la síntesis del 'core' del GPI es similar en un amplio espectro de organismos eucariotas estudiados (63).

En todos los casos, el primer paso consiste en la adición de α -GlcNAc desde UDP-GlcNAc a fosfatidilinositol para formar GlcNAc-PI, como se muestra en la Figura 7A. El amino es seguidamente desacilado dando GlcNH₂-PI. Luego se incorporan de a uno tres residuos de α -Man a partir del precursor dolicol-manosa-fosfato (Dol-P-Man), que es también utilizado en la biosíntesis de glicoproteínas, y así se forma Man₃-GlcNH₂-PI. A continuación se transfiere etanolamina fosfato a partir de fosfatidil etanolamina (PE), a la manosa terminal formando el 'core' EtN-P-Man₃-GlcNH₂-PI.

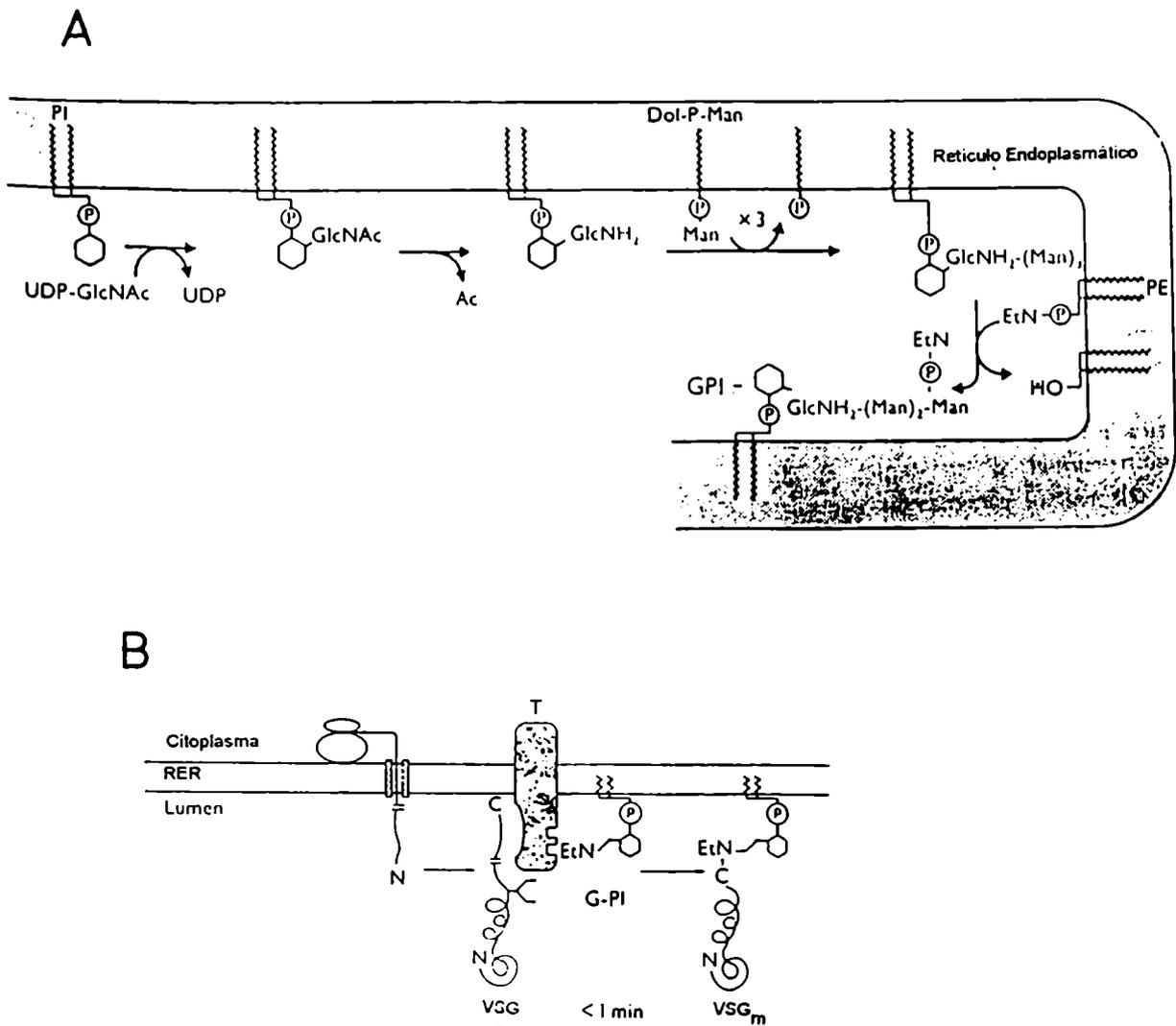


Figura 7. Biosíntesis de anclas de GPI en *T. brucei*. *A*, vía de formación del GPI precursor de anclas de proteínas. *B*, El GPI es transferido por una transamidasa (T) en bloque a la VSG por intercambio del péptido C-terminal, que es la señal para la adición de GPI en el retículo endoplasmático (58).

Existen algunas diferencias en la biosíntesis entre distintos tipos celulares como ser HeLa, *T. brucei* y *L. major* (63), las cuales fueron puestas en evidencia mediante ensayos de biosíntesis en sistemas libres de células de estos organismos utilizando sustratos sintéticos (63), como se observa en la Figura 8.

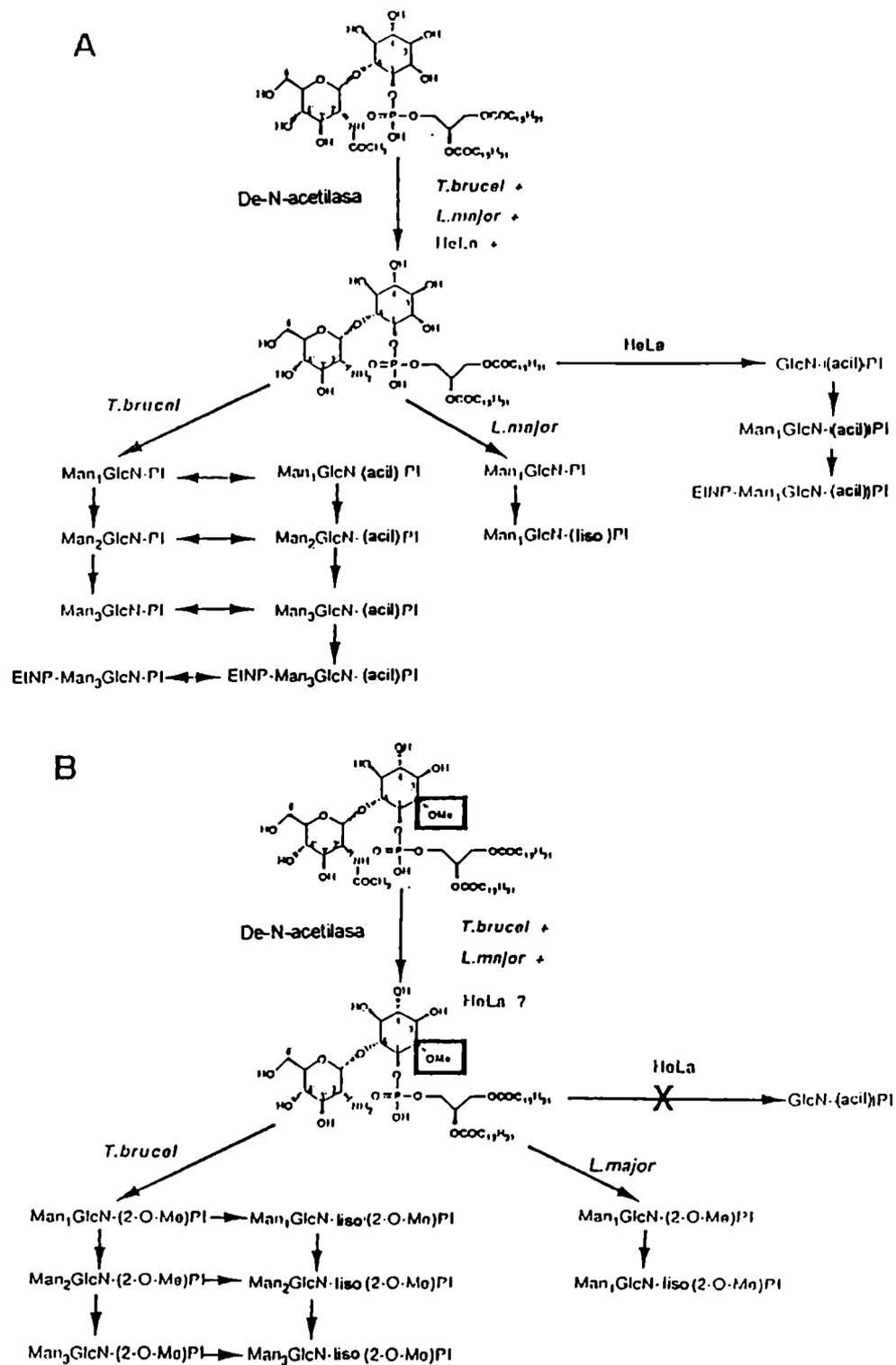


Figura 8. Estudio de la biosíntesis de GPI mediante el uso de sustratos sintéticos.

En *T. brucei* el intermediario GlcN-PI sufre adiciones de manosas y de un grupo acilo en el inositol para dar Man₃GlcN-(acil)PI que es el sustrato para la adición de fosfato de etanolamina (A). En cambio, el intermediario 2-O-metil sustituido en el inositol, GlcN-(2-O-metil)PI, no puede ser acilado y no ocurre la adición de fosfato de etanolamina (B). Además, los intermediarios que contienen entre 1 a 3 manosas pueden ser sustratos de actividad del tipo de PLA₂ y convertirse en las formas liso- correspondientes (B).

En *L. major* en cambio, los intermediarios naturales (A) o 2-O-metilados (B) son procesados en igual manera.

En células HeLa, donde debe ocurrir la acilación en el inositol, seguida de la adición de manosas para que finalmente se adicione de etanolamina fosfato (A), el sustrato sintético no es elongado (B).

Por otro lado, el análisis de la orientación de los intermediarios biosintéticos en microsomas sellados preparados a partir de células de trypanosomas y de mamíferos, permitió dilucidar la topología de la síntesis de precursores de estas anclas. Se encontró que todas las adiciones ocurren en la cara citoplasmática del retículo, inclusive la adición de la manosa a partir de Dol-P-Man. Este último se biosintetiza en el lado citoplasmático del retículo (64) y se transloca al lumen del retículo para que ocurra la manosilación en el proceso de N-glicosilación de proteínas.

Estos resultados implican que el precursor de GPI completa su estructura en la cara citoplásmica del RE y posteriormente se transloca hacia el lumen para su adición en bloque a proteínas.

1.5 Adición de GPI a proteínas

La adición de los GPIs a las proteínas, destinadas a ser ancladas en la membrana celular, ocurre inmediatamente después de su traducción. Estas proteínas tienen dos señales en el producto de traducción primario, como puede verse en la Figura 7B. La primera es la existencia del péptido señal N-terminal que permite que la proteína atraviese la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER). La segunda consiste en un péptido señal C-terminal que es reconocido por una transamidasa que lo hidroliza del lado del lumen del RER (65;66) y lo reemplaza por el GPI (67).

Al igual que el péptido señal amino-terminal, la señal C-terminal no presenta una secuencia consenso entre especies diferentes, aunque presenta características específicas. El residuo aminoacídico al cual se une el ancla de GPI, llamado sitio ω y el aminoácido que está 2 residuos hacia el extremo carboxi-terminal, llamado $\omega+2$, son siempre pequeños, mientras que el $\omega+1$ puede ser un aminoácido más grande. El sitio $\omega+2$ es sucedido por una cadena de 5 a 10 residuos hidrofílicos y luego 15 a 20 residuos hidrofóbicos cercanos o conformando el extremo C-terminal. Este segmento hidrofóbico difiere del típico dominio hidrofóbico transmembrana.

1.6 Consecuencias de la deficiencia de GPI

La falta de anclaje por GPI resultó ser perjudicial en distintos organismos estudiados (68). En el hombre, existe al menos una enfermedad hemolítica llamada Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), causada por la deficiencia de GPI que se produce por mutaciones somáticas a nivel de genes de su biosíntesis, en células madre del linaje

hematopoyético. Los pacientes con HPN sufren hemólisis periódica debido a una sensibilidad aumentada de sus células sanguíneas a la lisis mediada por complemento. Esto se debe a la ausencia de dos proteínas, DAF y la proteína de unión a C8, de la superficie celular de eritrocitos, plaquetas y leucocitos. Ambas proteínas son ancladas por GPI. En condiciones normales, estas proteínas actúan impidiendo la lisis accidental de células propias durante la activación del complemento. Se ha determinado mediante estudios bioquímicos que el defecto que causa la enfermedad es a nivel del primer paso en la biosíntesis del GPI; es decir, la transferencia de NAcGlc al fosfatidilinositol para dar N-acetilglucosaminil-PI. Del mismo modo deleciones dirigidas a la biosíntesis de GPI en modelos murinos han mostrado que esta vía es de vital importancia para el desarrollo fetal y neonatal (69-71). Esta vía de anclaje es fundamental en levaduras (72-75), ya que muchas de las proteínas de la pared celular son inicialmente expresadas como proteínas ancladas por GPI (76) y también parecería estar involucrada en patologías causadas por priones. En este último caso, es necesaria la presencia de la proteína PrP^C en la membrana plasmática, determinada por su ancla de GPI y su reincorporación a la célula, para la conversión de priones normales (PrP^C) a formas patogénicas (PrP^{Sc}). Por último, en el caso de algunos protozoos como el *T. brucei*, cuya superficie celular completa está cubierta por proteínas ancladas por GPI, este tipo de anclaje es esencial para su viabilidad (64).

1.7 Fosfolipasas que hidrolizan GPI

Como ya se mencionó, los GPI representan una alternativa funcional al anclaje transmembrana. Una de las principales características que distingue a las proteínas ancladas por GPI de las

transmembrana es que las mismas pueden ser liberadas de la bicapa lipídica por la acción de hidrolasas específicas o fosfolipasas.

En la Figura 9 se muestra la hidrólisis de un GPI, cuyo lípido es un glicerolípido, por distintos tipos de fosfolipasas, como las de tipo C y D. Por hidrólisis de GPI con fosfolipasa C se genera inositolfosfoglicano (IPG), que posee un fosfato cíclico, y el lípido (por ejemplo, diacilglicerol). En cambio, por hidrólisis con una fosfolipasa de tipo D se formarían, como productos, ácido fosfatídico (PA) y un inositol glicano (IG). En ambos casos se obtiene un producto lipídico y otro soluble en agua.

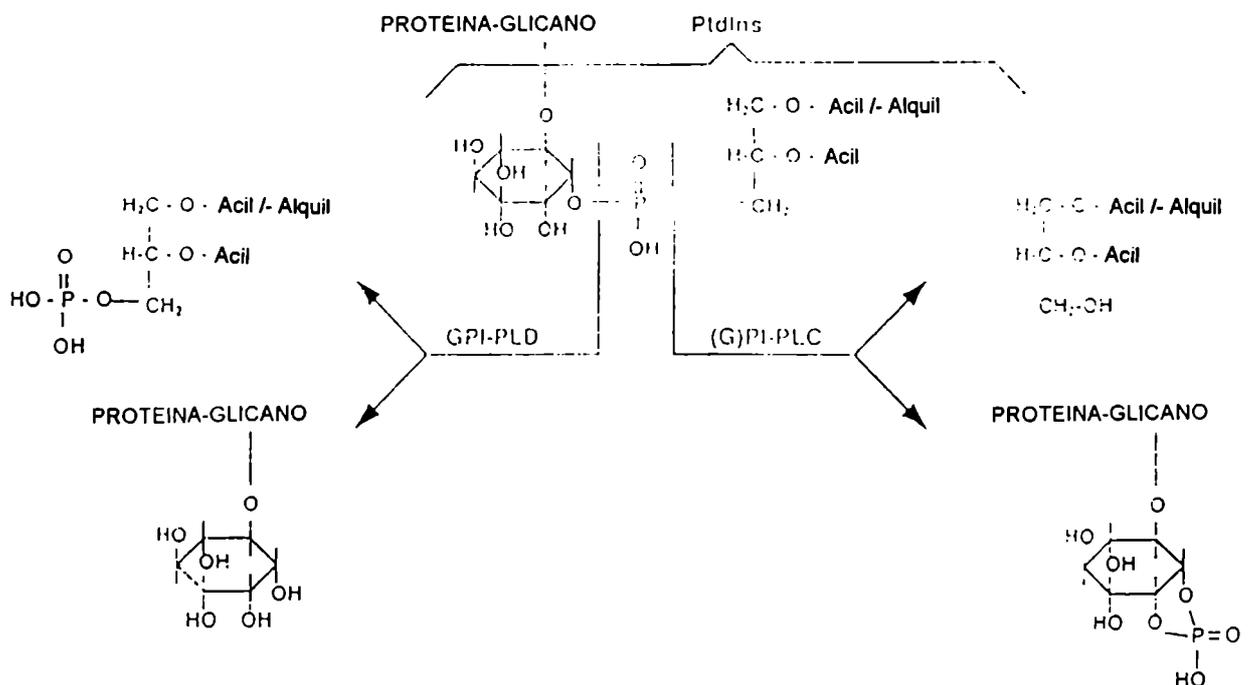


Figura 9. Hidrólisis de GPI por (G)PI-PLC o GPI-PLD y sus respectivos productos. PtdIns: fosfatidilinositol con diacil- o alquilacil-glicerol.

Del mismo modo, estas enzimas hidrolizan GPIs que contienen ceramida; en este caso, los lípidos liberados por (G)PI-PLC o GPI-PLD serían ceramida o ceramida 1-fosfato, respectivamente.

Las fosfolipasas C específicas de fosfatidilinositol (PI-PLC) conocidas y disponibles comercialmente son de origen bacteriano (*Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*) y han resultado una herramienta imprescindible para el descubrimiento y la caracterización de las anclas de GPI (18;77). Más recientemente se ha descubierto la existencia de fosfolipasas de tipo C y D específicas de GPI (GPI-PLC y GPI-PLD).

Como se ha comentado anteriormente, en la estructura de las anclas de GPI puede encontrarse acilado el inositol. Esta modificación le confiere, a las anclas de GPI, resistencia a la hidrólisis por fosfolipasas de tipo C (39;41;78;79) pero no afecta la susceptibilidad a las hidrolasas de tipo D (80), como se ve en la Figura 4.

Se purificaron enzimas del tipo de GPI-PLC de *T. brucei* (81) e hígado de rata (82). En *T. brucei*, la enzima, que ya ha sido clonada (83), sería la responsable de la desaparición de la proteína VSG de la cubierta del trypanosoma para pasar a la forma del parásito presente en el tracto de insecto (84). Durante la desaparición de VSG de la superficie del trypanosoma comienza a expresarse otra proteína anclada en membrana llamada PARP. Ambas proteínas, VSG y PARP coexisten durante un tiempo en la membrana plasmática. PARP es resistente a PI-PLC. Esta susceptibilidad diferencial, de las anclas de GPI de las dos proteínas, podría estar regulando la liberación selectiva de VSG y la retención de PARP durante la transformación celular.

Se ha aislado, clonado y secuenciado una fosfolipasa D específica de GPI (GPI-PLD) de mamíferos (85;86), la cual existe

predominantemente como proteína soluble en plasma (87-89), aunque se ha descrito también una forma asociada a la célula (90). Se ha postulado que la forma soluble podría ser la responsable de liberar FAL anclada de hepatocitos (91) y la forma asociada a la célula estaría involucrada en la liberación de la proteína DAF de células HeLa y del proteoglicano heparan sulfato de células de médula ósea (90). Esta fosfolipasa ha sido bien estudiada (92), la estructura mínima requerida para el reconocimiento del sustrato es glucosamina unida a fosfatidilinositol (93).

1.8 Propiedades y Función de GPI en eucariotas superiores

1.8.1 Movilidad en la bicapa lipídica

Durante los últimos años se ha especulado sobre la función de estos glicolípidos. La primera función asignada desde su descubrimiento fue de tipo estructural, es decir, de anclaje. Entre las hipótesis más aceptadas se encontraba la idea de que las anclas de GPI podrían impartir, a las proteínas que las poseen, un alto grado de movilidad en la bicapa lipídica. Sin embargo esta hipótesis no se ha sostenido experimentalmente al encontrarse que no todas las proteínas ancladas por GPI presentaban alta movilidad lateral; y que, por otra parte, la movilidad de una misma proteína anclada podía ser distinta en diferentes estadios del desarrollo celular (94;95). Además, se ha sugerido que la movilidad lateral de una proteína de membrana (ya sea que se trate de una proteína con un único dominio transmembrana o anclada por GPI) depende en mayor grado de la naturaleza de su ectodominio proteico y

de las interacciones de éste con otros componentes de la membrana que de las propiedades intrínsecas del dominio de inserción en la membrana.

1.8.2 Localización y topología

Varios grupos han investigado la relación entre el GPI y el proceso de transporte intracelular de proteínas. En varios tipos de células polarizadas, las proteínas ancladas por GPI están ubicadas exclusivamente en la membrana apical. Por ejemplo, la proteína Thy-1 es conducida a la membrana axonal en neuronas de hipocampo. La fosfatasa alcalina y la 5'-nucleotidasa finalizan en la membrana apical de hepatocitos.

En las células polarizadas la composición de proteínas y de lípidos en la membrana apical difiere de la composición en la membrana basolateral, diferencia mantenida por las uniones estrechas entre células. La apical tiene una concentración inusualmente elevada de glicolípidos que se cree podrían cumplir un rol protector en la célula (96). Es sabido que existe en estos tipos celulares un transporte selectivo de proteínas hacia una y otra membrana.

Para investigar si el ancla de GPI representaba una señal para el transporte de proteínas a la membrana apical en células polarizadas, se realizaron estudios utilizando la construcción de proteínas de fusión. Brown y col. (97) informaron que las quimeras, que contienen como ectodominios a proteínas que se expresan normalmente en membrana basolateral o proteínas solubles y como dominio de anclaje al GPI, resultan de expresión apical (98-100).

Independientemente, otro grupo, estudiando la cinética de entrega de proteínas de fusión a las membranas apical y basolateral en células epiteliales de riñón, MDCK, vió que la glicoproteína gD-1 de herpes

simplex de expresión basolateral, en su versión recombinante que se expresa como anclada por GPI, se dirigía a la membrana apical.

Por otro lado, varios autores observaron que las proteínas con anclas de GPI permanecían insolubles aún si se las extraía en presencia del detergente Tritón X-100, lo cual condujo a pensar que podrían estar contenidas en estructuras membranosas. Estas estructuras debían formarse en el aparato de Golgi, dado que al bloquear el transporte de proteínas al Golgi, no se observaba la insolubilidad de las proteínas ancladas. Como la biosíntesis de glicosfingolípidos ocurre en el aparato de Golgi, donde estos compuestos están enriquecidos, surgió la idea de que allí podría ocurrir la asociación del GPI con estos compuestos, así como con colesterol y esfingomielina lo cual podría causar el transporte vectorial apical. Posteriormente se demostró que hay, además, otros factores proteicos involucrados en este proceso (96).

Existen microdominios en membrana plasmática llamados 'caveolae', que consisten en pequeñas invaginaciones o vesículas concentradas en la superficie con un diámetro aproximado de 50nm recubiertas citoplasmáticamente con una proteína llamada caveolina. Estas estructuras concentran moléculas pequeñas que luego son internalizadas por un mecanismo llamado potocitosis (101;102). Recientemente, se ha acumulado evidencia que indica que las caveolae concentran algunas moléculas conocidas por su participación en señales, como ciertas quinasas. Actualmente se está estudiando la manera en que estos dominios se comunicarían con la maquinaria de señales intracelulares.

Existen evidencias que sugieren la asociación de dominios específicos de 'caveolae', ricos en esfingolípidos y colesterol llamados "lipid rafts", con la porción hidrofóbica de GPIs (66;103). Esta hipótesis se conoce como hipótesis de dominio. Sin embargo, hasta el presente existe controversia con respecto a si *in vivo* los GPIs se acumulan dentro

de los 'caveolae' o si estos resultados son mas bien un artefacto causado por la metodología de extracción (104).

1.8.2.1 Regulación de la localización

También se ha propuesto, en base a que las anclas de GPI pueden ser hidrolizadas *in situ* por activación de fosfolipasas, que el anclaje por GPI podría regular la concentración de ciertas proteínas en la superficie celular, o su localización en la sangre, fluidos tisulares o medios de cultivos, por liberación de las mismas.

Más tarde, se encontraron evidencias de que en algunos casos las proteínas habían sido liberadas mediante pequeñas vesículas en cuyo caso mantenían completa la estructura de su ancla (105).

Estos hallazgos indican que la hidrólisis por fosfolipasas no sería la única forma por la cual puede liberarse de la membrana una proteína anclada por GPI.

1.8.3 Participación en señales intracelulares

1.8.3.1 Participación en la respuesta endócrina

En los últimos años numerosas evidencias experimentales han asignado otra función al GPI: su participación en sistemas de señales intracelulares en respuesta a distintas hormonas y factores de crecimiento.

Como se ha señalado, la hidrólisis de GPI por una fosfolipasa C libera inositolfosfoglicano (IPG). Todos los IPG estudiados hasta el presente poseen una estructura conservada que consiste en $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}6\text{Man}\alpha 1\text{-}4\text{glcNH}_2\alpha 1\text{-}6\text{myo-inositol-fosfato}$ cíclico.

IPG ha sido propuesto como mediador de la acción de diferentes hormonas y factores de crecimiento como insulina (106-109), interleuquina-2 (110), factor de crecimiento nervioso (111) y hormona estimuladora de tiroides (112) y del factor de crecimiento similar a insulina de tipo I, IGF-1 (113), algunos ejemplos se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Ejemplos de IPGs con capacidad de reproducir efectos de hormonas.

Hormona	Efecto Biológico	Fuente de IPG	Referencia
Insulina	Inhibición de la lipólisis y de la producción de glucosa	Fragmento de inositol glicano de VSG	(107)
	inhibición de glucosa-6-fosfatasa		
	inhibición de fructosa-1,6-bifosfatasa		
	Efecto mitogénico del epitelio de vaso de oído	IPG de embrión de pollo	(114)
	Aumento de la incorporación de aminoácidos en hepatocitos	IPG de hígado de rata	(115)
	Regulación del mRNA PEPCCK y microglobulina	IPG de hígado de rata	(116)
	Regulación de la actividad de caseína quinasa	IPG de hígado de rata	(117)
IL-2	Regulación del metabolismo de glucosa en fibroblastos	IPG de hígado de rata	(118)
	Co-mitógeno para el crecimiento dependiente de IL-2	IPG de células T	(110)
NGF	Efecto mitogénico en ganglios	IPG de embrión de pollo	(111;114)

Insulina es una hormona cuya acción celular ha sido intensamente estudiada; sin embargo, los eventos moleculares involucrados en su respuesta no han sido aún completamente dilucidados (119).

Se ha informado que insulina activa una fosfolipasa C capaz de hidrolizar GPI (120-122). En concordancia con estos resultados se

encontró que, la liberación al medio extracelular de fosfatasa alcalina (FAL), proteína anclada por GPI, es estimulada por insulina (121). Además, esta hormona aumenta la hidrólisis por fosfolipasa C de otra proteína anclada por GPI, la dipeptidasa de membrana (MDP), cuyo ancla ha sido bien estudiada, en células 3T3-L1 (123). Esta proteína aumenta su expresión durante la diferenciación de estas células a adipocitos lo cual ocurre en presencia de insulina.

Si bien son numerosos los estudios que muestran que insulina puede generar IPG a partir de anclas de proteínas, también se ha informado que esta hormona es capaz de generar IPG a partir de GPIs libres (33;110).

El alto grado de conservación entre los GPIs de distintas especies condujo a probar la participación en señales intracelulares de GPIs heterólogos. Se ha encontrado que el IPG derivado del ancla de VSG de *T. brucei* reproduce la acción antilipolítica de insulina en adipocitos, así como la inhibición de glucosa-6-fosfatasa y fructosa 1,6-bifosfatasa en hepatocitos (107) y que asimismo, el IPG del ancla de AChE reproduce algunos efectos de insulina en hepatocitos intactos (124).

Algunas acciones celulares de insulina serían mediadas por un segundo mensajero estructuralmente muy similar a los IPGs (32;108;123;125-127), que se libera de anclas de GPI y, además, inmunológicamente semejante. Por ejemplo, se ha informado que anticuerpos dirigidos contra el IPG, proveniente de VSG de *T. brucei* (anti-CRD), bloquean la estimulación inducida por insulina de la piruvato deshidrogenasa en miocitos BC3H-1 (106) y que el IPG aislado de plasma humano (128) también es reconocido por el anti-CRD.

Se ha encontrado que IPG como insulina activa fosfodiesterasa, inhibe adenilil ciclasa y proteína quinasa A (129-131), es decir, inhibe la respuesta por AMPc (111;132;133).

Por otro lado, Vila y col. informaron que la activación por insulina de la enzima responsable de la síntesis de ácido fosfatídico, glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (GPAT), es mediada por IPG, el cual se produce mediante la activación por la hormona de una PLC a través de Gi (108;109). La activación de la GPAT por IPG fue recientemente confirmada por Muller y col. (134).

Es decir, que muchos de los efectos de insulina sobre el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos parecen estar mediados por IPG.

1.8.3.2 Receptor de IPG

Varias observaciones sugirieron que IPG es liberado al espacio extracelular. Por ejemplo, como ya hemos señalado, se encontró que la adición de IPGs o de PLC a preparaciones de células es capaz de mimificar algunas respuestas de insulina (107;108;124), y que la adición de anticuerpos anti-CRD al medio extracelular inhibe alguna respuesta de la hormona (106). Luego, el IPG entraría a la célula mediante un transporte específico (135;136).

Bandlow y col. han aportado gran parte de las evidencias experimentales que confirman este mecanismo (137). Los estudios se realizaron en adipocitos de rata que expresan dos proteínas ancladas por GPI, la ectoproteína que une AMPc denominada Gce1 y la lipoproteína lipasa o LPL. En particular, Gce1 es una proteína altamente conservada entre levaduras y humanos. Estos autores observaron que dichas proteínas permanecían asociadas a la superficie de los adipocitos aún luego de que su ancla hubiese sido hidrolizada mediante una PI-PLC. Las proteínas se mantienen asociadas a la membrana debido a interacciones entre el IPG todavía unido a la proteína, y un receptor de membrana que reconoce específicamente el epítopo de inositol monofosfato cíclico

terminal que resulta de la acción de GPI-PLC. Se ha sugerido que, el número de sitios de unión para IPG sería variable entre distintos tipos celulares (137).

1.8.3.3 Participación en procesos infecciosos

A partir de resultados muy recientes se ha propuesto que GPI podría tener un rol muy importante en las infecciones por parásitos como trypanosomas y plasmodium (138;139), pues son capaces de regular la expresión génica, de factores como interleuquina 1α , $TNF\alpha$ y NOS inducible, dependiente de factores relacionados con NF-kB, que son algunos de los efectos que normalmente ocurren durante la infección a nivel de los macrófagos (139). Es por ello que el ancla de GPI ha sido propuesto como posible blanco para quimioterapia contra infecciones por protozoos y hongos. A pesar de que el 'core' de estas anclas es conservada entre eucariotas, existen ciertas diferencias estructurales que en algunos casos distinguen a ciertos organismos. Por ejemplo, las proteínas que llevan las secuencias señales para GPI de trypanosomas no son procesadas eficientemente en células de mamífero. Esto se debe a que probablemente la secuencia señal de protozoos no sea compatible con la transamidasa de mamíferos. Por lo tanto una quimioterapia posible consistiría en desarrollar inhibidores específicos de la transamidasa de protozoos.

En el caso de *T. brucei* se está intentando otro abordaje: VSG contiene ácido mirístico en la porción fosfolipídica del GPI, que es incorporado por remodelamiento una vez completada la biosíntesis del GPI como se ha mostrado en la Figura 5. Un análogo del miristato, el ácido 10-propoxi-decanoico, puede ser incorporado en VSG por remodelamiento y es tóxico para los trypanosomas en cultivo. Esto podría tener valor terapéutico en el futuro.

1.9 El LPPG: miembro de la familia de los GPIs libres

El lipopéptido fosfoglicano, LPPG, es el glicolípido mejor estudiado del estadio de epimastigote de *T. cruzi*. Fue aislado por primera vez por Lederkremer y col. en 1976 (140) y dos años más tarde se determinó que su estructura consiste en una glicoinositolfosfoceramida (141) formada por una base nitrogenada de cadena larga, que puede estar esterificada con ácido palmítico (C 16:0) o ácido lignocérico (C 24:0) (142). Es el primer ejemplo de GPI descrito con ceramida como porción lipídica, conteniendo principalmente palmitoilesfinganina, lignoceroilesfinganina y palmitoilesfingosina, predominando las formas con esfinganina o dihidroesfingosina.

Esta molécula puede ser incluida como miembro de la familia de los GPI ya que contiene el 'core' o estructura mínima: $\text{Man}\alpha\text{1-4GlcNH}_2\alpha\text{1-6 myo-inositol-1-PO}_4\text{-lípido}$. La primera evidencia de que la estructura del LPPG era similar a las anclas glicolipídicas de proteínas de membrana, se obtuvo al comprobar que el tratamiento con fosfolipasa C de fosfatidilinositol, de origen bacteriano, exponía un epítopo que presentaba reacción cruzada con el anticuerpo que reconoce la forma soluble de la proteína VSG de *T. brucei* (27). El grupo fosfato 1,2-cíclico, que se forma sobre el anillo del inositol por acción de la enzima, y el amino libre de la glucosamina son los epítopos principales que reconoce este anticuerpo (143). Se identificaron ceramida e IPG como productos de hidrólisis por acción de la PI-PLC.

La estructura completa del glicano del LPPG fue descrita por Lederkremer y col. en 1991 (26), demostrando que existe microheterogeneidad en este compuesto y que el componente mayoritario posee dos residuos galactofuranosídicos terminales. Estos

estudios corroboraron que el LPPG presentaba el "core" de IPG que presentan todos los glicoinositolfosfolípidos que anclan proteínas a membrana (Figura 10).

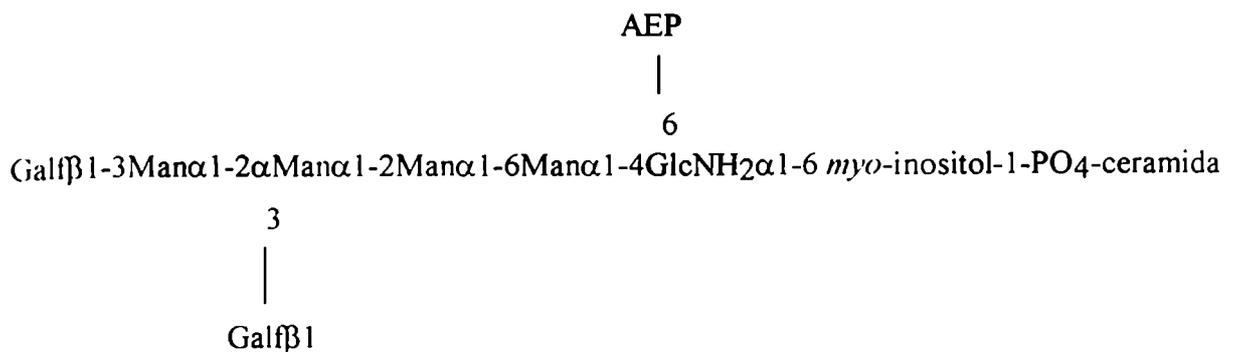


Figura 10. Estructura del LPPG de *T. cruzi*.

En base a un rendimiento promedio en la purificación de LPPG de 100 mg de LPPG por cada 2×10^{12} células (27) y al peso molecular aproximado de 1890 (26;144) se ha estimado que el número de copias de LPPG por parásito es del orden de 10^7 (26). La abundancia de esta molécula en epimastigotes convierte a sus membranas en una fuente atractiva para la realización de estudios de transducción de señales, del mismo modo que lo han sido los GPI de otros eucariotas inferiores.

1.10 Biosíntesis de esteroides en corteza adrenal. Su regulación por ACTH

Las glándulas adrenales de los mamíferos son estructuras pares que se localizan en el polo superior de los riñones; están rodeadas por una cápsula de tejido conectivo y embebidas en tejido adiposo.

Si se secciona la adrenal según un plano longitudinal se advierten, además de la cápsula, dos regiones distintas: una periférica denominada corteza y una central denominada médula, de origen embriológico diferente.

La corteza deriva de tejido mesodérmico y es la fuente de hormonas esteroideas, en tanto que la médula proviene de células neuroectodérmicas de ganglios simpáticos, y es la fuente de hormonas catecolamínicas.

La corteza adrenal esta formada por tres zonas concéntricas denominadas desde la cápsula hacia el interior, zona glomerulosa, zona fasciculata y zona reticularis (Figura 11).

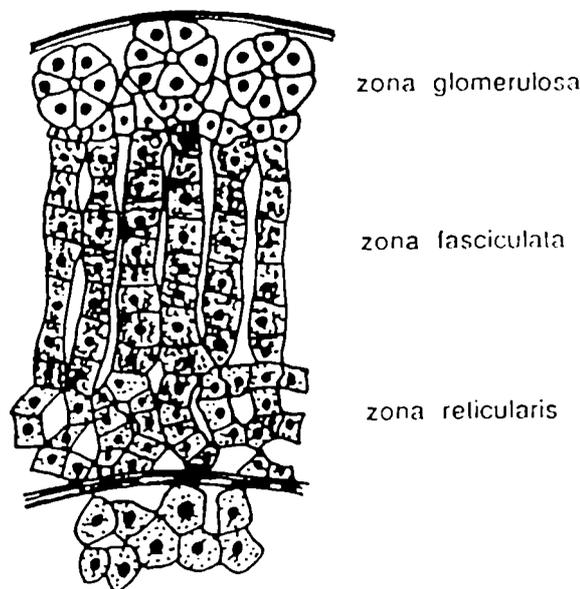


Figura 11. Esquema de la glándula adrenal.

La síntesis de aldosterona, mineralocorticoide de importancia vital para regular el equilibrio salino corporal, ocurre en la zona glomerulosa. Los glucocorticoides: cortisol (que es el glucocorticoide más importante en humano, cerdo, vaca y conejo) y corticosterona (que es el principal glucocorticoide en rata), cuyos efectos sobre el metabolismo de hidratos de carbono y de proteínas, los hacen indispensables para la vida, se sintetizan principalmente en la zona fasciculata. Los esteroides sexuales, andrógenos y estrógenos y sus precursores, los que contribuyen a establecer y mantener los caracteres sexuales secundarios, se sintetizan principalmente en la zona reticularis.

Las hormonas esteroideas son moléculas derivadas del colesterol, con el que comparten la misma estructura básica: 17 átomos de carbono ligados de tal modo que forman una serie de cuatro anillos unidos, que constituyen el núcleo esteroideo (Figura 12). Todas las hormonas esteroideas que se producen en la corteza representan modificaciones químicas de este núcleo esteroideo (Figura 13).

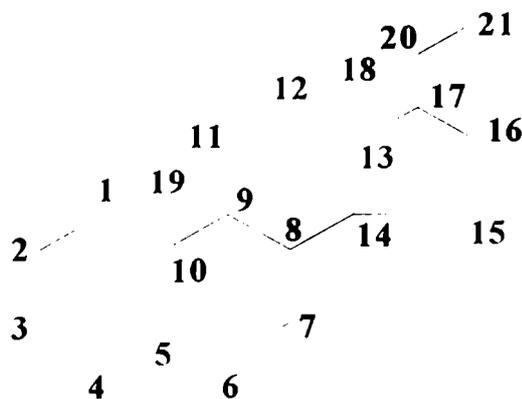
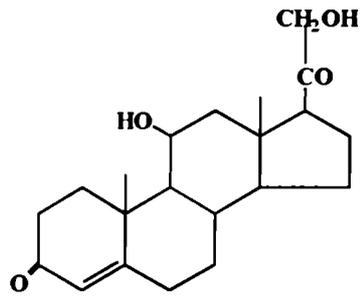
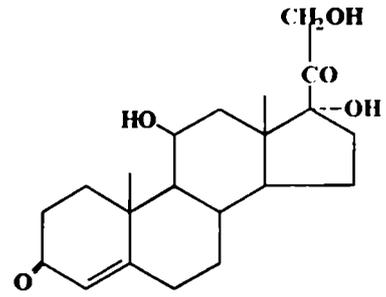


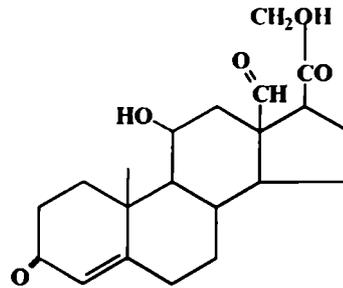
Figura 12. Estructura y numeración de los carbonos del núcleo esteroideo de los esteroides secretados por la corteza adrenal.



CORTICOSTERONA



CORTISOL



ALDOSTERONA

Figura 13. Estructura química de algunos de los principales esteroides producidos en la corteza adrenal.

El hipotálamo controla la secreción de la hormona de liberación de la corticotropina (CRH), que estimula a nivel de la hipófisis, la liberación de la hormona peptídica adrenocorticotrofina (ACTH). Esta hormona afecta la biosíntesis de esteroides en la corteza de la glándula adrenal: regula la producción de glucocorticoides en la zona fasciculata y también de mineralocorticoides en la zona glomerulosa.

Como la mayoría de las hormonas peptídicas, desencadena su respuesta uniéndose a un receptor específico presente en la superficie celular. El complejo ACTH-receptor se acopla a una proteína G estimuladora (Gs), que activa la adenilil-ciclasa, responsable de la síntesis de AMPc. De este modo aumentan los niveles de AMPc intracelular, segundo mensajero de la hormona y se estimula una proteína quinasa A, que fosforila varias proteínas involucradas en la biosíntesis de corticoides.

Como se ha comentado, una de las funciones propuestas para el glicosilfosfatidilinositol es su participación en sistemas de señales intracelulares de distintas hormonas. En células adrenocorticales se informó por primera vez la existencia de GPI y su regulación por factores presentes en el suero en el año 1987 (145). Más tarde, se encontró que ACTH era capaz de activar la hidrólisis de estos compuestos en células de glomerulosa adrenal bovina (146).

1.11 Anclas de GPI y sus precursores en levaduras

Varias proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* están ancladas a la membrana por GPI (147;148). La biosíntesis de proteínas ancladas por GPI en levaduras es similar a la de mamíferos y trypanosomas puesto que: a) la secuencia C-terminal de la proteína necesaria para la adición de GPI es similar, b) La estructura conservada del glicano que une la proteína con el lípido es idéntica a la encontrada en eucariotes superiores, c) las anclas de GPI se adicionan rápidamente a las proteínas mientras aún están en el SRE (42).

Algunas particularidades de los GPIs de levaduras son: a) la presencia en el glicano de 1 o 2 residuos de manosa extras, b) la presencia de ceramida en algunas de las proteínas ancladas por GPI (42;50;149). Estas características han sido encontradas también en GPIs de *T. cruzi*.

S. cerevisiae sintetiza solamente tres tipos de esfingolípidos complejos: inositolfosfoceramida [IPC]; manosa-inositol-P-ceramida [MIPC]; manosa-(inositol-P)₂-ceramida [M(IP)₂C]. Las ceramidas, que se encuentran en la mayoría de las anclas de *Saccharomyces cerevisiae*, son diferentes a la principal ceramida encontrada en las inositolfosfoceramidas de esta levaduras (50).

Los precursores completos de GPI que van a ser incorporados a proteínas están presentes en muy baja cantidad en este organismo; sin embargo, pudieron ser detectados en extractos lipídicos provenientes de una mutante, con un defecto en la biosíntesis de manosa, que incorpora muy eficientemente [³H]-manosa agregada exógenamente (42). En estos estudios, los precursores encontrados contienen únicamente

glicerolípidos, favoreciendo la hipótesis de que la ceramida debe ser incorporada después de la adición del ancla a la proteína. Esta idea fue confirmada marcando las levaduras con [³H]-dihidroesfingosina y viendo que se incorporaba la radioactividad en varias proteínas con GPI, aún cuando la síntesis de proteínas y, por lo tanto, la adición del ancla, era bloqueada por cicloheximida (150).

Se ha visto que el lípido de las proteínas ancladas por GPI de *Saccharomyces cerevisiae* puede modificarse por al menos tres mecanismos diferentes: a) intercambio de diacilglicerol por ceramida en RE, b) modificación del diacilglicerol a una forma más hidrofóbica con un ácido graso de cadena larga en sn-2 en el RE, c) modificación a una ceramida más polar en el Golgi (50).

S. cerevisiae, a diferencia de la mayoría de los eucariotas, se divide por gemación en vez de fisión y sólo un 4% de sus genes tienen intrones. En cambio, la levadura *S. pombe*, se divide por fisión y un 40% de sus genes tienen intrones (151). Estas dos levaduras están poco emparentadas y se cree que la divergencia entre ambas ocurrió al menos hace 1000 millones de años (152).

S. pombe, no puede sintetizar L-*myo*-inositol-1-fosfato y es por lo tanto auxotrófica para inositol (153); mientras *S. cerevisiae*, como otros eucariotas sintetiza inositol-1-P a partir de glucosa-6-fosfato, a través de la enzima inositol-1-fosfato sintasa (154). La composición de glicerofosfolípidos de *S. pombe* es similar a la de *S. cerevisiae* cuando se cultivan en un medio rico en inositol (50µM). Sin embargo, si *S. pombe* se cultiva con baja concentración de inositol (<30µM), decrece la cantidad de fosfatidilinositol.

Las levaduras, como el resto de los eucariotas, sintetiza PI a partir de inositol libre y citidinadifosfato-diacilglicerol (CDP)-DAG; PI es luego fosforilado a PIP y PIP₂.

No existen informes acerca de GPIs en *S. pombe*; aunque hay algunos datos sobre la composición de los distintos fosfolípidos de *S. pombe* y su metabolismo (155;156).

Objetivos del presente trabajo

El objetivo central de este trabajo fue estudiar el rol de glicosilfosfatidilinositol (GPI) como segundo mensajero intracelular en la respuesta de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en corteza adrenal.

Con este fin se encararon los siguientes estudios:

Evaluación de la presencia de anclas de GPI en corteza adrenal bovina y su caracterización.

Efecto de inositolfosfoglicano (IPG), segundo mensajero que se produce por hidrólisis de GPI con fosfolipasa C, sobre la respuesta de ACTH en células adrenocorticales de vaca y de rata. Estudios sobre su mecanismo de acción.

Estos estudios se realizaron utilizando un IPG purificado a partir del LPPG de *T. cruzi* que posee una estructura conservada con los IPGs purificados de mamíferos y otros organismos eucariotas.

Estudios de GPI y sus precursores en *Schizosaccharomyces pombe*. Esta parte del trabajo estuvo orientada a obtener anclas de GPI, de un sistema más fácil de trabajar que el trypanosoma, para realizar estudios biológicos.

Trabajos recientes han mostrado la presencia de cantidades abundantes de GPIs en la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*. Por ello, se encaró el estudio de GPI en otra levadura, *Schizosaccharomyces pombe*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Capítulo 2: Diseño Experimental

- Estudios de GPI en corteza adrenal bovina

2.1 Obtención de homogenatos de corteza adrenal

Se obtuvieron las glándulas adrenales bovinas en un frigorífico local. Las glándulas adrenales se limpiaron de grasa y con un micrótopo se obtuvieron las dos capas más externas de 500 μm que corresponden a corteza adrenal. Las cortezas adrenales obtenidas se homogeneizaron en buffer Tris 50mM (pH: 8) con Ultraturax. Estos homogenatos se extrajeron con butanol y a partir de la fase acuosa se continuó la purificación de la FAL por medio de distintas cromatografías.

2.2 Cromatografía en columna de Octil-Sepharosa

La fase acuosa, obtenida a partir de homogenatos de corteza adrenal bovina, fue sembrada en una columna de 30 x 1.5 cm equilibrada en buffer Tes 10mM (pH:7.8) conteniendo NaCl 90mM, MgCl₂ 1mM y 5% de propanol. La elución se realizó con un gradiente lineal de propanol entre 5 y 70% y se recolectaron fracciones de igual volumen (1ml).

2.3 Cromatografía en columna de Concanavalina-A-Sepharosa

La fase acuosa, obtenida a partir de homogenatos de corteza adrenal bovina, fue sembrada en una columna (5x1 cm) equilibrada con buffer Tris 50mM (pH:7.4), NaCl 0.5 mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM. Después del lavado se realizó la elución con el mismo buffer conteniendo α -metil-glucósido 0.4M y se recolectaron fracciones de igual volumen (1ml).

2.4 Cromatografía en columna de Q-Sepharosa

Las fracciones de Octil-Sepharosa o de concanavalina-A-Sepharosa, con actividad de FAL se dializaron y, luego de concentradas, se sembraron en una columna de 30 x 1,5 cm, equilibrada en buffer Tris 50mM (pH:8), conteniendo Tritón X-100 0.05% y MgCl₂ 1mM. La elución se realizó con un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 300mM y se recolectaron fracciones de igual volumen (1ml).

2.5 Cromatografía en columna de Superosa 6

Se utilizó el aparato de FPLC de la Fundación Campomar. La columna se equilibró y corrió en buffer Tris 50mM (pH:8), conteniendo MgCl₂ 1mM y se recolectaron fracciones de igual volumen (0.5 ml).

2.6 Cromatografía en columna de Mono Q

Se utilizó el aparato de FPLC de la Fundación Campomar. La columna se equilibró con buffer Tris 50mM (pH:7.5), conteniendo Tritón X-100 0.05% MgCl₂ 1mM. La elución se realizó con un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 300mM, recolectando fracciones de igual volumen (1ml).

2.7 Concentración de las muestras proteicas

Las muestras se concentraron por centrifugación en concentradores con corte en PM: 10000.

Para concentrar pequeños volúmenes de soluciones acuosas (hasta 1 ml) se utilizó un evaporador de fracciones rotatorio (Savant) y para volúmenes mayores se utilizó un liofilizador.

2.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Se realizaron electroforesis en mini-geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (157). En general se utilizaron geles 10%. Se sembraron 20 μ l de muestra por calle. Los geles se corrieron a corriente constante: 2mA / calle. Terminada la corrida se midieron los Rf de los estándares preteñidos para proceder a la tinción de las proteínas o a la transferencia de las mismas.

La composición del gel concentrador, separador y buffer de siembra se muestra en la tabla II.

Tabla II

Reactivos	Gel (10%) Separador	Gel Concentrador
Tris-ClH 1.5 M pH:8.8	2.5 ml	-----
Tris-ClH 0.5 M pH:6.8	-----	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
Sol. de acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%	3.3 ml	0.50 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.1 ml	0.05 ml
H ₂ O destilada.	4.0 ml	3.15 ml
--- mezclar suavemente ---		
TEMED	0.003 ml	0.003 ml

Reactivos	Buffer de Siembra (5X)
Tris-ClH 0.5 M pH:6.8	4.0 ml
SDS 10%	4.0 ml
Glicerol	0.5 ml
Azul de Bromofenol 0.1 %	0.5 ml
β -mercaptoetanol	0.1 ml

Las muestras se resuspenden en Buffer de Siembra y se hierven durante 3 minutos.

Buffer de corrida: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 10 % SDS, pH: 8.3.
Estándares de PM pre-teñidos (BioRad).

2.8.1 Tinción de geles por Coomasie

Solución de teñido: Metanol 45% v/v, Acido Acético 10% v/v, Azul de Coomasie R-250 1% p/v.

Solución de desteñido: Metanol 45% v/v, Acido Acético 10% v/v.

2.8.2 Tinción de geles por Plata (158)

Fijación: Metanol 50% v/v, Acido Acético 12% v/v; 0.5 ml Formaldehído 37% v/v, durante 2 horas.

Lavado: Etanol 50% v/v, 3 veces, 20 minutos.

Pretratamiento: Tiosulfato de Sodio 0.2 g/l, 1 minuto.

Lavado: Agua, 3 veces 20 segundos.

Tratamiento: Nitrato de plata 2 g/l; 0.75 ml/l Formaldehído 37%, 20 minutos a 1 hora.

Lavado: Agua, 2 veces, 20 segundos.

Revelado: Carbonato de Sodio 60 g/l, hasta ver bandas.

Lavado: Agua, 2 veces, 20 segundos

Lavado: Metanol 45% v/v, Acido Acético 10% v/v.

2.8.3 Fluorografía de los geles

Para mejorar la sensibilidad de las autorradiografías se utilizó la técnica fluorográfica descrita por Chamberlain (159). El gel se sumergió en una solución de salicilato de sodio 1M durante 1 hora con agitación continua, al cabo de la cual se secaron los geles (Gel Dryer - BioRad) y se realizó la autorradiografía.

2.9 Inmunoprecipitación

Se utilizó una alícuota de la fase acuosa que se obtuvo después de la extracción con butanol de los homogenatos de corteza adrenal. Esta alícuota se trató con el anticuerpo contra FAL de placenta (proporcionado por la Dra. Aline M. da Silva) o de intestino bovino (Sigma) en buffer Tris 50mM (pH:7.5), conteniendo Tritón X-100 0.05% y MgCl₂ 1mM durante toda la noche a 0°C en agitación constante. Luego se agregó proteína A-Sepharosa y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y 90 minutos a 0°C con agitación. Luego de centrifugar y lavar el precipitado 3 veces con buffer, se midió la actividad de FAL en el pellet y en el sobrenadante.

2.10 Western-blot

2.10.1 Procedimiento

Al igual que para la inmunoprecipitación, se utilizó una alícuota de la fase acuosa que se obtuvo después de la extracción con butanol de los homogenatos de corteza adrenal. Una vez finalizada la corrida electroforética se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa (poro: 0,2 µm, Sigma N-8017) previamente humedecida en el Buffer de Transferencia. Se colocó la membrana en contacto directo con el gel, entre hojas humedecidas de papel Whatman 3MM, en un campo eléctrico (12 V) durante 30 minutos. Finalizada la transferencia, se efectuó el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa durante toda la noche y al día siguiente, se realizó la detección inmunológica indirecta.

La membrana se lavó con Buffer de Lavado 5 veces durante 10 minutos y luego se incubó con el primer anticuerpo durante 2 horas a 37°C. Seguidamente la membrana se lavó con Buffer de Lavado 5 veces durante 10 minutos y se incubó con el segundo anticuerpo durante 2 horas a 37°C. Finalmente se lavó la membrana como se indicó

anteriormente y se procedió al revelado utilizando el reactivo quimioluminiscente.

Se mezclaron iguales volúmenes del reactivo 'Enhanced Luminol' y del reactivo oxidante para tener 0,125 ml de solución por cm² de membrana. Se incubó la membrana con el reactivo 1 minuto y luego de eliminar el exceso se colocó la membrana bajo un plástico para exponerla en oscuridad a una película autorradiográfica por un tiempo variable entre 2 minutos y 1 hora. Luego se reveló la película como se describe en la sección 2.29.1.

2.10.2 Soluciones

TBS: Tris 25mM, NaCl 9% p/v pH: 8.

Buffer de Transferencia: Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20% v/v pH: 8,3.

Buffer de Bloqueo: TBS, BSA 3%.

Lavados: TBS, Tween 20 0,05% v/v (TTBS).

Primer anticuerpo: TBS, EDTA 1mM, Nonidet-40 0.05%, BSA 0.25%.

Segundo anticuerpo: TTBS, BSA 0.25%

Reactivo quimioluminiscente (NEN Life Science Products).

2.10.3 "Western-Blot" de FAL en homogenatos de corteza adrenal

Como primer anticuerpo se usó el anticuerpo anti-FAL de placenta, diluído 1:1000 ó el anticuerpo policlonal anti-FAL de intestino bovino (diluído 1:200) de conejo ó suero pre-inmune de conejo como control. Como segundo anticuerpo se utilizó anticuerpo de camero anti-conejo acoplado a peroxidasa y se reveló con un reactivo quimioluminiscente.

2.10.4 “Western-Blot” de proteínas ancladas por GPI de corteza adrenal

Las proteínas tratadas con PI-PLC inmovilizadas en la nitrocelulosa se revelaron usando como primer anticuerpo, anticuerpos policlonales anti-inositolfosfoglicano: anti-CRD comerciales (Oxford Glycosystems). Este "western-blot" ha sido puesto a punto en el laboratorio utilizando una proteína anclada por GPI, proteína variante de superficie (VSG) de *Trypanosoma brucei* comercial (Oxford Glycosystems), como control positivo. Dilución del anticuerpo: 1:20.

2.11 Determinación de proteínas

Se utilizó la absorbancia a 280 nm de la muestra ó el método de Bradford (160) usando albúmina bovina como standard.

2.12 Determinación de actividad de FAL

Las muestras se incubaron en 1ml de buffer carbonato 0.1M (pH:10) conteniendo MgCl₂ 1mM y 2 mg de *p*-nitrofenilfosfato. Para determinar actividad de FAL en fracciones de Tritón X-114, se agregó además 0.2% de Tritón X-100 en los ensayos. Luego de 15 minutos de incubación a 37°C, la reacción se terminó por agregado 2 ml de NaOH 0.1M. El producto, *p*-nitrofenol, formado se cuantificó espectrofotométricamente a 410nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un aumento de absorbancia de 1 bajo las condiciones de ensayo.

2.13 Separación de FAL libre y anclada con Tritón X-114

Alícuotas de los dos picos con actividad de FAL eluidos de la Octil-Sepharosa u otras muestras se resuspendieron en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM pH: 7.4, NaCl 150 mM), se mantuvieron a 0°C y se agregó Tritón

X-114 a partir de una solución precondensada 12%, preparada según se ha descrito (161), para alcanzar una concentración final de 2%. La preparación se incubó a 37°C durante 10 minutos y se centrifugó obteniéndose dos fases: una acuosa (superior) y otra detergente (inferior) enriquecida en proteínas ancladas.

2.13.1 Partición en Tritón X-114 modificada

El homogenato de corteza adrenal bovina se preparó en buffer TBS, se colocó en baño de hielo y se agregó detergente Tritón X-114 hasta una concentración final de 2%. Se incubó la preparación durante 1 hora a 0°C y luego se centrifugó en frío a 8800 x g 10 minutos. El sobrenadante obtenido se incubó a -20°C durante 24 horas. A continuación se centrifugó la preparación en frío, se descartó el precipitado y el sobrenadante se incubó a 37°C durante 10 minutos para la separación de fases. La fase detergente se continuó purificando según describen Ko y col. (162) hasta obtener la fase final de detergente. Se determinó la actividad de FAL en todas las fracciones obtenidas en el procedimiento.

2.14 Desaminación y Reducción con NaBH₄

La fase de Tritón X-114 se extrajo con butanol para eliminar el detergente, se evaporó el solvente y se disolvió en buffer acetato de sodio 50 mM pH 3.9. A continuación se agregó NaNO₂ para alcanzar la concentración final de 0.5M y se incubó la solución 3 horas a temperatura ambiente. Se alcalinizó la solución hasta pH: 9 con una solución de ácido bórico 0.2 M / NaOH 0.1 M (5:9) y se redujo con NaBH₄ durante 1 hora a temperatura ambiente. La reducción se completó con un segundo agregado de NaBH₄ durante 2 horas y el exceso de agente reductor se destruyó por agregado de ácido acético hasta llevar la muestra a pH: 6.

- Estudios de transducción de señales en células

Los ensayos se realizaron incubando las células adrenocorticales de rata o de vaca con los diferentes efectores.

2.15 Preparación de células adrenocorticales de rata

Se utilizaron ratas macho, de 200g de peso aproximado de la cepa Sprague Dawley. Los animales se criaron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a una temperatura constante de 25°C y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; la dieta y el agua de bebida se suministraron *ad-libitum*.

Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron las glándulas adrenales y se les quitó el tejido graso adherido. Este procedimiento se llevó a cabo sobre una caja de Petri conteniendo solución fisiológica fría. Las glándulas se decapsularon, obteniéndose la fracción capsular, enriquecida en zona glomerulosa, y la fracción central, enriquecida en zona fasciculata-reticularis. Cada fracción se procesó por separado.

El tejido se sumergió en 10 ml de medio Ham F12 (Sigma N6760) con CaCl_2 1.8 mM (Ham F12- Ca^{2+}) con el agregado de 0.1 % de colagenasa, 0.03% de DNAsa y 0.5 % de seroalbúmina bovina. Se incubaron las preparaciones en un baño termostatzado a 37 °C, con agitación constante durante 30 minutos o 35 minutos dependiendo de que tejido se trate (fasciculata o glomerulosa, respectivamente). A los 10 y 20 minutos de iniciada la incubación, se disgregó el tejido en forma mecánica. Finalizada la incubación, se filtró la preparación celular a través de una gasa de algodón descartando los restos de tejido no disgregado, que quedaron retenidos en la malla.

El filtrado se centrifugó a 100 g durante 10 minutos. El precipitado de células se lavó con 10 ml de medio de incubación (Ham F12- Ca^{2+} con

el agregado de 0.5 % de seroalbúmina bovina). Se resuspendió suavemente utilizando una pipeta de transferencia y se llevó al volumen deseado con medio de incubación. Se utilizó una alícuota de la preparación celular para el recuento de células viables realizado en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico con un aumento de 400x. La viabilidad de las células se determinó mediante la técnica de exclusión del colorante Azul Tripán (0.1 ml de Azul Tripán en 0.1 ml de suspensión celular). Se consideraron células viables aquellas que no presentaban tinción alguna en interior de sus núcleos.

La suspensión celular se incubó durante 45 minutos a 37°C con agitación, con el fin de que las células se recuperasen del stress producido durante el tratamiento con la colagenasa. Luego, la preparación se centrifugó a 100 g durante 10 minutos; el pellet de células obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de medio de incubación para ser utilizado en los diferentes estudios.

2.16 Preparación de células adrenocorticales de vaca

Se prepararon células a partir de corteza adrenal de vaca. Las adrenales de vaca de animales sacrificados el día del experimento se obtuvieron de un frigorífico local y luego de ser desgrasadas, se cortaron con un micrótopo capas de 500 μm de espesor. La segunda capa se trató con colagenasa como se indica en (146) para obtener una preparación enriquecida en fasciculata. En los casos en que se quiso obtener una preparación enriquecida en células de glomerulosa, se utilizó la primera capa. El procedimiento de obtención de células dispersas fue similar al descrito para la obtención de células de rata, sección 2.15, con algunas diferencias en la composición de los medios y el tiempo de tratamiento con colagenasa (45 minutos para glomerulosa y 40 minutos para fasciculata).

Medio de disgregación: Ham F12-Ca²⁺, 0.15% colagenasa; 0.03% DNAsa; 0.5% BSA.

Medio de incubación: Ham F12-Ca²⁺, 0.2% BSA.

2.17 Incubaciones con células dispersas para determinar esteroides

A continuación se detallan los procedimientos básicos para llevar a cabo las incubaciones con células dispersas, al cabo de las cuales se cuantificaron esteroides.

La preparación se realizó a razón de 40.000 células por tubo durante 60 minutos en un baño termostatzado a 37°C con agitación constante. Cada tratamiento se efectuó por duplicado en tubos de Kahn de polipropileno. Tanto las células como los agentes estimuladores se agregaron a tiempo cero, llevando la preparación a un volumen final de 0.2 ml con medio de incubación.

Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 3000 x g durante 20 minutos. Con esta velocidad de centrifugación se asegura la ruptura de las células y la liberación al medio, de los esteroides de localización intracelular. Los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -20°C hasta su utilización para la determinación de los esteroides por RIA.

2.17.1 Drogas Ensayadas y sus concentraciones

ACTH: De acuerdo a los valores obtenidos de bibliografía (163;164), 10⁻⁹ M de ACTH es la concentración que produce la máxima respuesta en células adrenocorticales. En los experimentos realizados se verificó este dato utilizando distintas concentraciones de ACTH.

MIX: Solución madre: se preparó una solución 3 mM en 20% de DMSO en agua. La concentración utilizada en los experimentos fue 60 µM. Las células se preincubaron en presencia de MIX o medio (como control) durante 15 minutos a 37°C.

anti-CRD: Se utilizó una solución madre del anticuerpo en TBS (Tris 25mM, NaCl 9% p/v pH: 8), EDTA 1mM, Nonidet-40 0.05%, BSA 0.25% comercial. Se preparó un vehículo conteniendo todo excepto el anticuerpo.

2.17.2 Aislamiento de LPPG

El LPPG se purificó como se describe en (27) a partir de células de *T. cruzi* del estadio epimastigote. Los residuos de galactofuranosa del LPPG fueron selectivamente removidos mediante la hidrólisis con TFA 0.02 N durante 2 horas y media a 100°C (165). Las muestras se evaporaron y lavaron con agua hasta neutralidad. El [³H]-LPPG se obtuvo a partir de cultivos de las formas epimastigote de *T. cruzi* cultivadas en presencia de [³H]-ácido palmítico (166).

2.17.3 Preparación de IPG de *T. cruzi*

Una cantidad apropiada de LPPG sin Galf se trató con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* el mismo día del experimento, ver 2.30.1, y se extrajo luego con éter para separar el lípido. Se realizó un blanco de reactivos. Las fases acuosas se evaporaron bajo corriente de nitrógeno, asegurando la eliminación completa de solvente. Las muestras se concentraron en Savant y se resuspendieron en el medio de incubación, para su adición a las células en suspensión.

2.17.4 Sobrenadantes como fuente de IPG

Los sobrenadantes provenientes de incubaciones con células bovinas en los que se estimuló la liberación de FAL por ACTH se utilizaron como fuente de IPG. Una fracción (1/2) del sobrenadante de un ensayo se concentró en Savant y utilizó en ensayos en células de rata.

2.18 Cuantificación de Esteroides

La técnica utilizada para cuantificar los esteroides aldosterona (ALDO), corticosterona (B) y cortisol (F) fue el radioinmunoensayo (RIA) (167-169).

En esta sección se detallan los pasos que se siguieron para cuantificar los esteroides por RIA.

2.18.1 Protocolo general del RIA de esteroides

La reacción se llevó a cabo en tubos de Kahn de polipropileno, por duplicado, en un volumen final de 0.2 ml de buffer borato de sodio 0.1 M, de pH: 8, conteniendo 1 % de la fracción V de seroalbúmina bovina y 0.2 % de inmunoglobulina G. A este buffer se agregaron el anticuerpo específico para el esteroide en cuestión; el esteroide a cuantificar (distintas diluciones de las muestras) y el esteroide radioactivo o marcador, 5000 dpm por ensayo aproximadamente. La cantidad del anticuerpo anti-esteroide a agregar, se predeterminó en base al título del mismo. Se utilizó la concentración de anticuerpo que produjo un 50 % de unión específica.

La determinación cuantitativa se realizó a través de una curva de calibración. La reacción se llevó a cabo como se explicó arriba, excepto que el agregado de las muestras se reemplazó por cantidades crecientes de estándares del esteroide a cuantificar.

La preparación de los estándares para construir la curva de calibración se realizó mediante diferentes diluciones en buffer borato de sodio 0.1 M de pH: 8, conteniendo 5% de etanol, a partir de una solución madre.

El protocolo general consistió en pipetear 10 μ l del estándar o de la muestra incógnita, luego se agregaron el esteroide marcador radioactivo y el anticuerpo específico del esteroide a cuantificar, disueltos en el buffer arriba descrito.

En paralelo se incubó el [^3H]-esteroide marcador en ausencia de anticuerpo y de esteroide radioinerte para cuantificar la unión inespecífica. La reacción transcurrió durante 16 horas a 4°C . Transcurrido ese tiempo, la incubación se interrumpió por el agregado de 0.5 ml de una solución fría de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75% de saturación. Luego se centrifugaron los tubos a 3000 g durante 20 minutos, en centrífuga refrigerada (4°C). Las cuentas totales se calcularon a partir de los tubos preparados de igual forma que para el conteo inespecífico pero sin realizar la centrifugación de los mismos.

Los sobrenadantes obtenidos, que contenían el esteroide no unido al anticuerpo, se volcaron a viales para el conteo de la radioactividad presente en cada muestra. Para ello, los viales se llevaron a 2.5 ml con solución centelleadora A, ver composición en la sección 2.34, y se agitaron vigorosamente para facilitar la extracción del esteroide tritado a la fase orgánica. Finalmente, se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido RackBeta.

A partir del valor de cpm de esteroide libre obtenido en cada ensayo se calculó el valor de cpm de esteroide unido al anticuerpo. Cada uno de los valores individuales de esteroide unido obtenidos, fue convertido a masa de esteroide mediante la curva de calibración realizada. A partir de la masa presente en la alícuota ensayada en el RIA, se calculó la masa de esteroide producida en cada ensayo.

2.18.2 RIA de aldosterona

La curva de calibración abarcó un rango entre 0 y 100 pg. El marcador [1,2- ^3H (n)]-aldosterona tenía una actividad específica: 52 Ci/mmol. Se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de un hibridoma de ratón (167), siendo el título utilizado de 1/3000.

2.18.3 RIA de corticosterona

La curva de calibración abarcó un rango entre 0 y 1000 pg. El marcador [1,2-³H(n)]-corticosterona tenía una actividad específica: 50-60 Ci/mmol. Se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido de suero de oveja (168), siendo el título utilizado de 1/4000.

2.18.4 RIA de cortisol

En el caso particular del RIA de cortisol, la técnica se puso a punto en el laboratorio utilizando anticuerpos específicos. La curva de calibración abarcó un rango entre 0 y 1000 pg. El marcador [1,2-³H(n)]-cortisol tenía una actividad específica: 45 Ci/mmol. Se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido de suero de oveja (169), siendo el título utilizado de 1/100.000.

2.19 Incubaciones con células adrenocorticales para determinar la liberación de FAL

El protocolo de incubación con células dispersas descrito para determinar esteroides se modificó en estos ensayos, en los que se analizó la liberación de FAL o de ceramida al medio extracelular. A continuación se detallan las variantes realizadas a este procedimiento básico.

Se incubaron 200.000 células por tubo, con los agregados que se indican en cada caso, en un volumen final de 0.2 ml de medio de incubación durante 1 a 8 minutos en un baño termostático a 37°C con agitación constante. Cada tratamiento se efectuó por duplicado en tubos de Kahn de polipropileno.

Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 100 x g durante 10 minutos, con esta velocidad de centrifugación se asegura la

integridad de las células. Los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -20°C hasta su utilización para la determinaciones de FAL, ver sección 2.12. Una unidad enzimática equivale a la cantidad de enzima que produce un aumento de absorbancia de 1 por minuto.

2.19.1 Drogas Ensayadas y sus concentraciones

Toxina de Pertussis: Se resuspendió en HamF12 y la concentración utilizada fue $10\ \mu\text{g/ml}$. Las células se preincubaron en presencia de Toxina de Pertussis o de medio (como control) durante 1 hora a 37°C .

GTP- γ -S: Se utilizó en concentración de $10\ \mu\text{M}$. En este caso, se utilizaron preparaciones de membranas adrenocorticales.

Inhibidores de proteasas: PMSF, 1mM ; Leupeptina, $10\ \mu\text{g/ml}$; Aprotinina, $1\ \mu\text{g/ml}$.

2.20 Incubaciones con células dispersas para determinar la liberación de lípidos a partir de $^3\text{H-LPPG}$

Se incubaron células adrenocorticales de rata en Ham F-12/ Ca^{2+} con $12000\ \text{cpm}$ de $^3\text{H-LPPG}$ en presencia o ausencia de ACTH 1nM , a 37°C durante 8 minutos. Se detuvo la incubación agregando $0.5\ \text{ml}$ de éter; luego de agitar y centrifugar, se separó la fase orgánica. Se repitió la extracción dos veces y se juntaron las fases etéreas. Las fases acuosas se extrajeron a continuación con cloroformo:metanol:HCl 12M $10:10:0.1\ \text{v/v}$.

Las fases etéreas fueron analizadas por TLC usando el sistema hexano:isopropanol ($93:7$, v/v). Se rasparon bandas de $1\ \text{cm}$ y, luego de eluir los compuestos de la sílica, se contó la radioactividad. Se evaluó la presencia de ceramida por aparición de un pico de radioactividad que migrara igual que el estándar.

Las fases clorofórmicas se analizaron por TLC en cloroformo:metanol:acético (65:15:5, v/v), utilizando un estándar de ceramida fosfato.

2.20.1 Preparación del estándar de Ceramida Fosfato

Se utilizó esfingomielina comercial -Chicken Egg Yolk- (Sigma S-0756). 1,8 mg se resuspendieron en buffer Tris/HCl 20mM, pH 7.5, conteniendo 0.1M CaCl₂, se disgregaron en baño de sonicación y se hidrolizaron con 100 unidades de fosfolipasa D de *Streptomyces chromofuscus* en presencia de 0,2% de éter durante 2 horas. La incubación se terminó por el agregado de 200 µl de HCl 1N y el producto se extrajo con cloroformo:metanol:HCl (10:10:0,1 v/v).

- Estudios de inositolfosfolípidos y GPI en *S. pombe*

2.21 Cultivo de levaduras

Se trabajó con una cepa pura de *S. pombe* (FRR 2172) provista por la Cátedra de Microbiología Industrial de la Facultad de Ingeniería (U.B.A.).

Se tomaron inóculos a partir de cultivos stock mantenidos en Agar Sabouraud (Merck Química Argentina S.A.) y se suspendieron en 100 ml de medio de cultivo líquido estéril en Erlenmeyers de 250 ml (Medio Sintético Completo, SD), para obtener una concentración inicial de 10^4 células por mililitro. Los medios inoculados se incubaron con agitación rotatoria a 28°C hasta alcanzar el crecimiento exponencial.

Se determinó la densidad óptica a 600 nm de diluciones de la suspensión celular utilizando una cuveta de 1 cm. Se define la unidad, D.O.600 que equivale a $1-2.5 \times 10^7$ células.

2.22 Incorporación de ácido [9,10(n)- ^3H]-palmítico

Las células en crecimiento exponencial en medio sintético completo, se centrifugaron y resuspendieron hasta 1 D.O.600 por ml de medio mínimo, se agregaron 250 μl de [9,10- ^3H] ácido palmítico (54 Ci/mmol; 40-60 $\mu\text{Ci/ml}$) (149). Las incubaciones se mantuvieron a 28°C, en agitación durante 18 horas. Al finalizar la incorporación se verificó la viabilidad celular mediante observación microscópica. La marcación se interrumpió por el agregado de una solución fría de NaF y NaN₃ para alcanzar una concentración final de 10 mM. La preparación celular se centrifugó a 5500 rpm (3000 x g) en centrifuga refrigerada, descartando los sobrenadantes. La preparación precipitada se lavó dos veces agregando la solución fría de NaF y NaN₃ 10 mM final.

2.23 Extracción de proteínas de levaduras

Las células se resuspendieron en una mezcla de cloroformo:metanol (1:1) de forma de tener en la preparación una proporción de cloroformo:metanol:agua 10:10:3 en volúmen y se rompieron vortexeando con bolitas de vidrio. Luego de separar las bolitas de vidrio, las proteínas y restos de la pared celular se sedimentaron a 10000 x g durante 5 minutos. Los lípidos se extrajeron del precipitado de proteínas 2 veces más con cloroformo: metanol: agua (10:10:3, v/v). El precipitado de proteína se secó para su posterior análisis.

En el caso del precipitado proveniente de cultivos radioactivos, se contó la radioactividad presente en una alícuota por resuspensión en la solución centelleadora B, ver sección 2.34.

2.24 Extracción de lípidos de levaduras

Los lípidos se extrajeron con diferentes solventes orgánicos destilados.

El material de vidrio utilizado en estos estudios fue previamente lavados con ácido nítrico 3 M.

Los extractos de solventes orgánicos obtenidos durante la separación de proteínas que se indicó en la sección anterior, se juntaron y llevaron a seco bajo presión reducida. Para estudiar la presencia de GPI en estos extractos se realizaron distintos tipos de hidrólisis, enzimáticas o químicas, y se analizó la naturaleza de los compuestos liberados usando cromatografía en placa (TLC, RPTLC) y cromatografía gaseosa.

En el caso de los extractos provenientes de cultivos radioactivos, se contó la radioactividad presente en una alícuota por resuspensión en la solución centelleadora A, ver sección 2.34.

2.25 Desaminación y Reducción con NaBH₄

Una alícuota de la fracción Ao obtenida luego de extraer con butanol al extracto clorofórmico proveniente del cultivo radioinerte de levaduras se llevó a seco. El residuo se disolvió en buffer acetato de sodio 50 mM pH: 3.9 al que se agregó NaNO₂ para alcanzar la concentración final de 0.5M y se incubó la solución 3 horas a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se alcalinizó la solución hasta pH: 6.5 con una solución de ácido bórico 0.2 M / NaOH 0.1 M (5:9) y se extrajeron con butanol los lípidos liberados por el tratamiento.

2.26 Cromatografía en Capa Delgada (TLC)

2.26.1 Cromatografía de adsorción

En todos los casos se utilizó la técnica ascendente en placas de sílica gel de 60 Å (Merck 0,25 mm) sobre soporte de vidrio o de aluminio (Merck 0,2mm) utilizando los siguientes solventes de desarrollo:

- (A) cloroformo/metanol/agua (10:10:3 v/v);
- (B) cloroformo/metanol/2.5M NH₄OH (15:10:2, v/v);
- (C) cloroformo/metanol (38:3, v/v);
- (D) cloroformo/metanol/2.5M NH₄OH (40:10:1, v/v);
- (E) hexano: acetato de etilo (2:1, v/v);
- (F) hexano: acetato de etilo (4:1, v/v);
- (G) hexano: 2-propanol (92:8, v/v);
- (H) hexano: 2-propanol (93:7, v/v);
- (I) cloroformo:metanol:acético (65:15:5, v/v).

2.26.2 Cromatografía en fase reversa

En todos los casos se utilizaron placas RP-18 F254s (Merck), sobre soporte de aluminio, utilizando los siguientes solventes de desarrollo:

- (FA): acetonitrilo:ácido acético (1:1) para los ácidos grasos metilados (170)
- (FB) cloroformo/metanol/agua (20:40:0.5 v/v).

2.26.3 Cuantificación de las muestras radioactivas

Luego de realizada la fluorografía, se raspó la sílica por comparación de la placa delgada con la placa fotográfica. Los compuestos radioactivos se eluyeron con mezclas de cloroformo:metanol. La radioactividad eluída se determinó mediante el conteo de una alícuota suspendida en la solución centelleadora correspondiente.

2.27 Cromatografía en resinas de intercambio iónico mixtas

Tándem: 1)AG50 X12 (H^+); 2) AG3 X4 (OH^-); 3) QAE(OH^-).

Las muestras se cromatografiaron en una columna que contenía las tres resinas en secuencia, en el orden anteriormente señalado, 100-200 mesh (Bio-Rad). Se eluyó sucesivamente con agua (3 volúmenes) y ácido clorhídrico (2 volúmenes) y se contó la radioactividad en una alícuota.

2.28 Cromatografía Gas-Líquido (CGL)

Se realizó en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890, equipado con un detector de ignición de llama y un integrador Hewlett-Packard 3395, utilizando nitrógeno como gas conductor a 42 Psi; presión de hidrógeno, 20 Psi; presión de aire, 40 Psi.

2.28.1 Análisis de los derivados metilados de los ácidos grasos

Condición I:

Se utilizó una columna capilar HP-Innowax (I) de 0.2 mm x 50 m, con el siguiente programa:

Temperatura inicial, 150°C; Temperatura final, 240°C; gradiente de Temperatura entre 150°C y 240 °C con incrementos de 8 °C por minuto.

Temperatura del inyector: 200 °C.

Temperatura del detector: 250 °C.

Los ácidos grasos se identificaron por los tiempos de retención de sus derivados metilados, en comparación con testigos comerciales de metil ésteres de ácidos grasos comerciales saturados e insaturados (Sigma).

2.28.2 Condición II

Se utilizó una columna capilar HP-Ultra-2 (U) de 0.2 mm x 50 m, con el siguiente programa:

Temperatura inicial, 180°C; Temperatura final, 250°C; gradiente de Temperatura entre 180 y 250 °C con incrementos de 3 °C por minuto.

Temperatura del inyector: 200 °C.

Temperatura del detector: 250 °C.

Los ácidos grasos se identificaron por los tiempos de retención de sus derivados metilados, en comparación con testigos comerciales de metil ésteres de ácidos grasos comerciales saturados e insaturados (Sigma).

2.29 Métodos de Revelado

2.29.1 Detección por fluorografía para las muestras radioactivas

Finalizada la corrida se evaporó el exceso de solvente y se rociaron las placas con EN³HANCE (New England Nuclear), y se expusieron a placas fotográficas (Kodak-X-Omat AR) en la oscuridad, manteniéndolas a -70°C durante 7 a 45 días, dependiendo de la cantidad de muestra radioactiva sembrada. Para el revelado, las placas fotográficas se sumergieron durante 2-3 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, sucesivamente en:

1. Solución de revelador (Metol, 2,2 g; Na₂SO₃ 72 g; hidroquinona, 8,8 g; Na₂CO₃ (anh.) 48 g; en 1 litro de agua destilada)
2. Solución de lavado (ácido acético glacial 2% en agua)
3. Solución de fijador (se utilizó una dilución 1:4 del fijador comercial ultra rápido Romfix, Romek)

2.29.2 Reveladores universales

- Vapores de yodo
- Reactivo de cerio: Los testigos y los compuestos a analizar fueron detectados vaporizando con el revelador Mo/Ce, el cual contiene H₂SO₄ 10%; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,04M; Ce(SO₄)₂ 3 mM. Las placas se calentaron a 200 °C hasta la aparición de manchas de color azul.
- Ninhidrina: Las placas se rociaron con solución de ninhidrina 0,25 % p/v en acetona, conteniendo 0,01% de piridina (171). Las placas se calentaron a 100°C 10 minutos. Los compuestos aminados presentan una coloración púrpura.
- Orcinol-Acido Sulfúrico: Las placas se rociaron con el reactivo de Orcinol que contiene 200 mg de orcinol en 100 ml de H₂SO₄ 75% (v/v) preparado en el día y se calentaron a 100°C 15 minutos. Los glicolípidos presentan una coloración violeta (172).

2.30 Hidrólisis Enzimáticas

2.30.1 Tratamiento con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis*

Las muestras se disolvieron en 50µl de buffer Tris/HCl 50mM, pH 7.4, conteniendo 0.1 % de ácido deoxicólico y se incubaron con 0.35 U de PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* (Oxford GlycoSystems) durante 90 minutos a 37°C. Los lípidos liberados se extrajeron con butanol (4 x 0.5 ml). Se realizó un blanco de reacción en ausencia de enzima.

2.30.2 Tratamiento con PI-PLC de *Bacillus cereus*

Las muestras se disolvieron en 200µl de buffer Tris/HCl 10mM, pH 7.4, conteniendo 144mM NaCl, 0.01 % Tritón X-100 y se incubaron con 0.1 U de PI-PLC de *Bacillus cereus* (Sigma) durante toda la noche a 37°C. Los lípidos liberados se extrajeron con butanol (4 x 0.5 ml). Se realizó un blanco de reacción en ausencia de enzima.

2.30.3 Tratamiento con GPI-PLD

Las muestras se disolvieron en 100µl de buffer Tris/HCl 20mM, pH 7.5, conteniendo 0.1M CaCl₂, 0.008 % Tritón X-100 y se incubaron con 1 U de GPI-PLD comercial (Boehringer Mannheim) durante 1 h a 37°C (173). Los lípidos liberados se extrajeron con CHCl₃:CH₃OH:12M HCl (10:10:0.1, v/v), (4 x 0.5 ml) según informes previos (174) para la extracción de ceramida fosfato. Se realizó un blanco de reacción en ausencia de enzima.

2.30.4 Tratamiento con PLA₂

Las muestras correspondientes a los IPLs, radioactivos o no marcados, purificados de *S. pombe* (150.000 cpm en el caso de las muestras radioactivas), disueltas en cloroformo:metanol, se llevaron a

seco bajo corriente de N₂ y se resuspendieron en buffer Tris/HCl 100mM, pH 7.4 conteniendo 0.1 % de ácido deoxicólico, 0,5 M CaCl₂ en un volumen final de 100 µl. Se agregaron 25 U de fosfolipasa A₂ de veneno de *Crotalus adamanteus* (Sigma), durante 4 horas a 37 °C o ninguna adición para los blancos de reacción. La incubación fue terminada por la adición de ácido acético 0,1 M, y los productos formados en la reacción se extrajeron cuatro veces con butanol saturado en agua. Las fases butánicas combinadas se llevaron a seco bajo corriente de N₂ para su posterior análisis (175).

2.30.5 Tratamiento con Proteasa

La muestra se incubó con proteasa comercial de *Streptomyces griseus* (Sigma P-5147) durante 6 horas a 37°C y luego se extrajeron con butanol los péptidos modificados con lípido.

2.30.6 Tratamiento con esfingomielinasa

Los compuestos marcados con ácido palmítico radioactivo (20 x 10³ cpm) que presentaban movilidad similar a un testigo de esfingomielina, fueron tratados con 1U de esfingomielinasa de *Streptomyces sp.* (Sigma, 21 U/mg, 51 U/mg de proteína) en buffer Tris/HCl 50mM, pH 7.4 en presencia de 0.1 % de ácido deoxicólico. La reacción se dejó proceder por 3 horas a 37°C, bajo agitación vigorosa. Se realizó un blanco de reacción sometiendo a las mismas condiciones una muestra idéntica en ausencia de la enzima. La actividad de la misma se verificó con un testigo de esfingomielina de cerebro bovino. Las mezclas de reacción se extrajeron con cloroformo:metanol (2:1) y se intentó la detección de ceramida por TLC en el solvente H.

2.31 Hidrólisis químicas y otras reacciones

2.31.1 Hidrólisis alcalina en condiciones de saponificación

Las muestras se trataron con NaOH 0,1 M en etanol 90% v/v durante 1 hora a 37°C. La mezcla de reacción se neutralizó con HCl diluído y se llevó a seco. Los lípidos se extrajeron con tolueno o éter etílico tres veces.

2.31.2 Hidrólisis alcalina fuerte

Se realizó en tubos cerrados de Teflón, pre-lavados con butanol-agua. Las muestras se resuspendieron en butanol, se pasaron al tubo de Teflón y se evaporaron bajo atmósfera de N₂. Se agregó 1 ml de NaOH 1 M y se incubó durante 24 horas a 100°C en el tubo cerrado. La mezcla de reacción se neutralizó con HCl 2M y los lípidos se extrajeron con acetato de etilo (166). En estas condiciones se hidroliza ceramida.

2.31.3 Preparación de derivados metilados de ácidos grasos

Las muestras se llevaron a seco y se disolvieron en 0,5-1 ml de tolueno seco. Se agregó un volumen igual de BF₃ 14% en metanol (Merck) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó en tubo cerrado a 80°C durante 45 minutos. Luego de enfriar y agregar agua, se centrifugó y se separó la fase superior. La fase inferior se extrajo con tolueno tres veces y el conjunto estas fases se concentraron con nitrógeno (176).

2.31.4 Metanólisis

Se realizaron en tubo cerrado con 1 ml de solución de HCl 12M/metanol/agua (3:29:4, v/v) durante 18 horas a 70-78 °C (177). Se evaporó el ácido a presión reducida con agregados de agua y metanol. Las muestras hidrolizadas se llevaron a seco bajo presión reducida, se lavaron con agua hasta neutralidad y se extrajeron con acetato de etilo. Se analizaron las bases esfingosínicas o el alquilglicerol en TLC utilizando el solvente C. Los metil ésteres de los ácidos grasos se analizaron en RPTLC con el solvente E.

2.32 Hidrogenación catalítica

Los metil ésteres de los ácidos grasos radioactivos provenientes de cada uno de los compuestos estudiados se sometieron a condiciones de hidrogenación a fin de determinar la existencia de insaturaciones. 1-2 mg del reactivo de Pd sobre carbón activado (Aldrich, contenido de Pd 10%) se agregaron sobre las muestras disueltas en acetato de etilo (0,5ml), en tubos de hemólisis, que se sometieron a una presión de H₂ de 3 atm durante 4-5 h a temperatura ambiente con agitación. En todos los casos, se utilizó una muestra del metil éster del ácido linoleico (C18:2) como control de la reacción.

2.33 Equipamiento Utilizado

- Las determinaciones de radioactividad se realizaron en un contador de centelleo líquido modelo 1214 RackBeta (Wallac).
- Las evaporaciones de solvente se llevaron a cabo a presión reducida en evaporador rotatorio o bajo corriente de nitrógeno, en los casos en que se disponía de pequeños volúmenes (hasta 0.5 ml).
- Las centrifugaciones se realizaron en centrifugas refrigeradas: Sorvall con rotor SS34 o GSA. o sin refrigerar (Presvac); o en microcentrífuga no refrigerada Microfuge 12 (Beckman).
- Se utilizó un evaporador de fracciones rotatorio Speed Vac Concentrator SVC-100 (Savant) y un liofilizador Freeze Mobile 6 (Virtis).
- Las electroforesis en minigeles se realizaron en Mini-Protean II Electroforesis Cell (BioRad) y las transferencias semi-húmedas de Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad).
- Los homogenatos de corteza adrenal se realizaron utilizando un homogeneizador mecánico Ultraturrax.
- Las levaduras se disgregaron mecánicamente utilizando bolitas de vidrio (Sigma G-9268) ó por ultrasonido utilizando un sonicador: 'Microtip Cell Disruptor – Heat Systems – Ultrasonics, Inc. Modelo W-220F.
- Las incubaciones a temperatura controlada fueron realizadas en un baño termostático.
- Para las cromatografías se utilizó un colector automático de fracciones modelo Frac-200 (Pharmacia LKB)
- Se utilizó un hidrogenador PARR Instrument Company, Inc (presión máxima 60 psi, 4 atm).

2.34 Soluciones Centelleadoras

A- Para muestras no acuosas: PPO (2,3-difeniloxazol), 4g; DMPOPOP (1,4-bis[4-metil-5-fenil-2-oxazolil]benceno), 0.1g; tolueno 1l.

B- Para muestras acuosas: PPO, 4g; DMPOPOP 40 mg; Tritón X-100 o Arcopal X-100, 250 ml; tolueno 750 ml.

RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 3. Estudios de anclas de GPI en corteza adrenal

3.1 Purificación de Fosfatasa Alcalina anclada por GPI de corteza adrenal bovina

La presencia de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en corteza adrenal fue informada por primera vez por Igarashi y Chambaz (145), quienes han sugerido que la concentración de estos compuestos esta regulada por la presencia de suero en el medio de incubación, probablemente debido a factores de crecimiento. Más tarde, resultados de nuestro laboratorio mostraron la existencia, en células de glomerulosa adrenal de vaca, de un GPI cuya hidrólisis es estimulada por ACTH (146).

Con estos antecedentes resultaba interesante aislar y caracterizar el GPI presente en la corteza de adrenales bovinas. Se ha encontrado en este tejido actividad de fosfatasa alcalina (FAL), que es una enzima anclada por GPI a la membrana plasmática de varios tipos celulares. Se han identificado isoenzimas en plasma humano que se originan en al menos cuatro tejidos: hígado, hueso, placenta e intestino (178). FAL es una de las proteínas más estudiadas para dilucidar el mecanismo de la incorporación de GPI en las proteínas ancladas por este lípido (98;179;180). Sin embargo la estructura del GPI de FAL no había sido determinada al comenzar estos estudios y hasta el presente sólo se conoce la estructura completa del ancla de FAL purificada de placenta (13).

Resultó interesante, para abordar el estudio de GPI en adrenal, purificar FAL anclada. Para ello se tomaron en cuenta las purificaciones de esta enzima a partir de otros tejidos (178;181).

3.1.1 Purificación de FAL anclada

Protocolo 1

Se prepararon homogenatos a partir de corteza de adrenales bovinas. Estos homogenatos se extrajeron con butanol y la fase acuosa resultante se cromatografió en columna de Octil-Sepharosa eluyendo con un gradiente lineal de propanol (5-70%). La actividad de FAL se recuperó en dos picos: uno que no es retenido por la columna (pico I) y otro que eluye con 40% de propanol (pico II), lo que indicaba diferencias en la hidrofobicidad de ambos, Figura 14.

OCTYL-SEPHAROSA

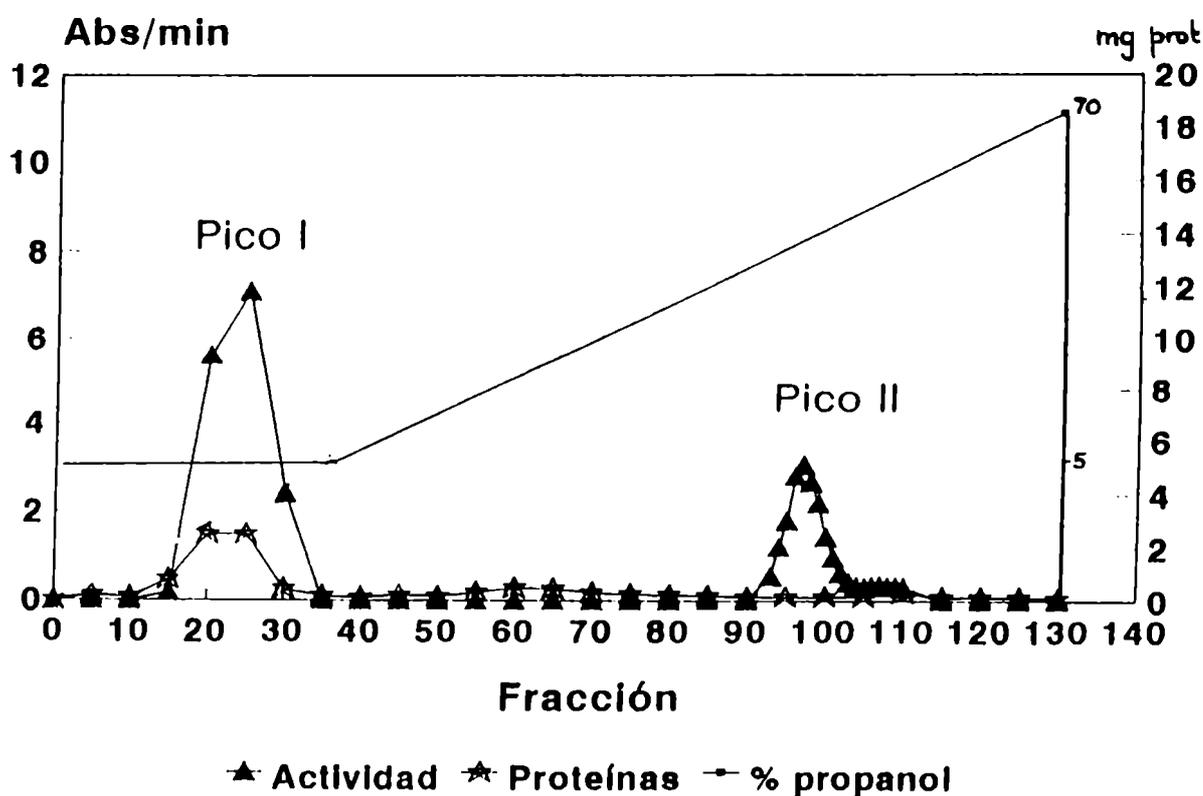


Figura 14. Perfil de elución de FAL y de proteínas totales en Octil-Sepharosa.

Las proteínas ancladas por GPI, como la FAL, están presentes en la membrana celular y pueden ser liberadas al medio por acción de una fosfolipasa C o D. Es decir que estas proteínas pueden hallarse de dos formas: una, anclada a membrana con GPI y otra, libre en la que se ha perdido la porción lipídica (diacilglicerol o ácido fosfatídico según sea hidrolizada por fosfolipasa C o D respectivamente) pero conserva el inositolglicano.

El Tritón X-114 es un detergente no iónico que se utiliza para separar compuestos anfifílicos de aquellos que no lo son. Este detergente forma una única fase a 0°C y luego de 10 minutos de incubación a 37°C se separan dos fases, la fase inferior rica en detergente que es donde se encuentran los compuestos anfifílicos y la fase superior que contiene los compuestos hidrofílicos (161). Se ha visto que las moléculas que poseen un ancla de GPI son retenidas en la fase rica en detergente mientras que, luego del tratamiento de estas moléculas con fosfolipasa C, las mismas pasan a la fase acuosa superior (182).

Para evaluar la presencia de FAL anclada y libre en cada uno de los picos eluidos de la Octil-Sepharosa, una alícuota de los mismos se trató con Tritón X-114 según se indica en métodos. Como puede verse en la Tabla III, se encontró que el pico I que no es retenido por la Octil-Sepharosa estaba muy enriquecido en FAL libre, en cambio, el pico II que era retenido por la columna tenía la mayor proporción de FAL anclada.

Tabla III. Determinación de la relación entre Fosfatasa Alcalina libre y anclada en los picos eluidos de Octil-Sepharosa con Tritón X-114.

Fracción	Actividad detergente/Actividad acuoso
Pico I OCTIL-S	0.09
Pico II OCTIL-S	1.40

Se ha informado (181) que luego de una cromatografía en Octil-Sepharosa de una preparación pura de FAL de mucosa intestinal, se obtuvieron cinco picos: un pico que no es retenido por la columna que corresponde a FAL libre y cuatro picos diferencialmente retenidos. Para FAL de corteza adrenal, se encontró un único pico retenido, que corresponde a un 15% de la actividad que no interactúa con la Octil-Sepharosa y que coeluye con la mayoría de las proteínas de la muestra original.

Aunque se tenía muy poca cantidad de material en el pico II se quiso ver si con un paso más de purificación se lograba la purificación a homogeneidad. Se sembró el pico II en una columna de Q-Sepharosa obteniéndose un pico con actividad de FAL que eluye alrededor de 250mM de NaCl (Figura 15) y presenta 7 bandas en PAGE-SDS por tinción con plata. No se detectaron bandas en tinción con Coomassie dada la escasez del material.

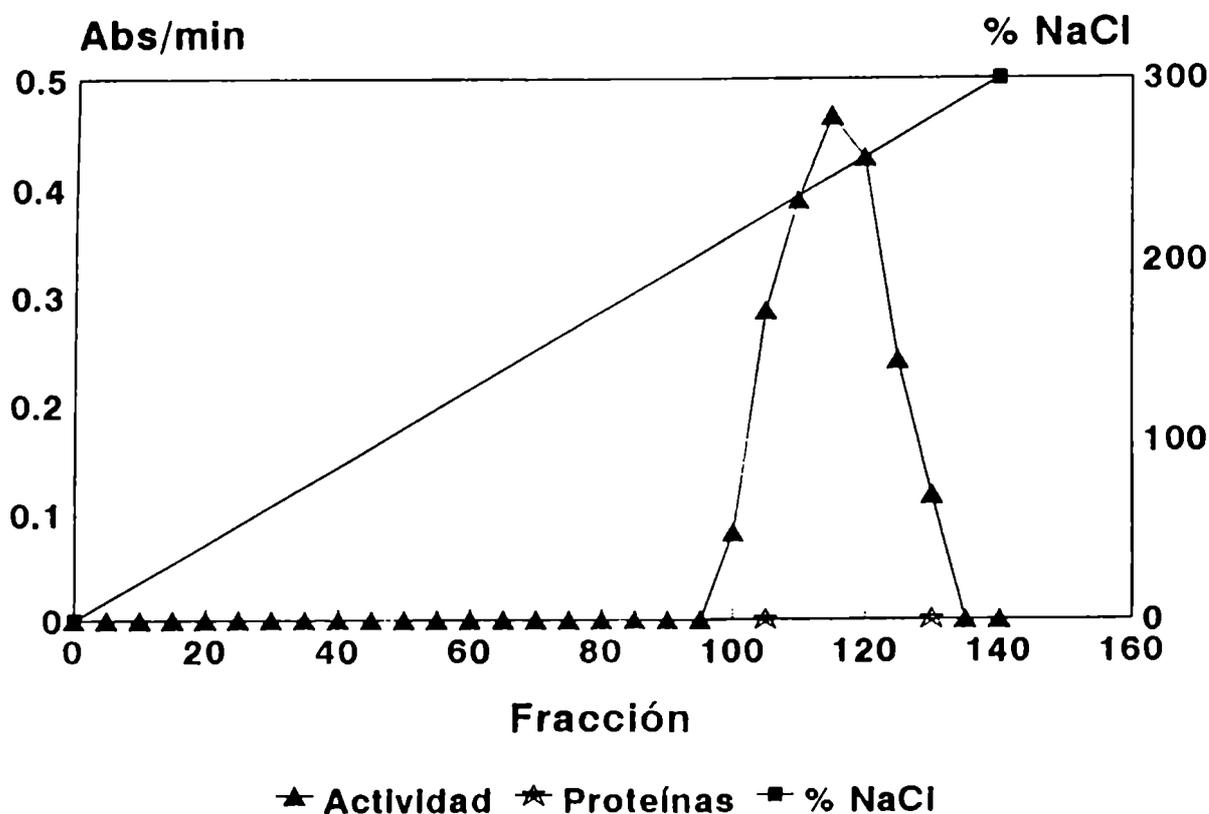


Figura 15. Perfil de elución de FAL y de proteínas totales en Q-Sepharosa.

Como puede verse en el cuadro de purificación I (Esquema 1 y Tabla IV) esta fracción eluída de la Q-Sepharosa tenía muy baja proteína y actividad para seguir la purificación. De acuerdo a estos resultados, la Octil-Sepharosa no resultó un paso conveniente para empezar la purificación.

Esquema 1.

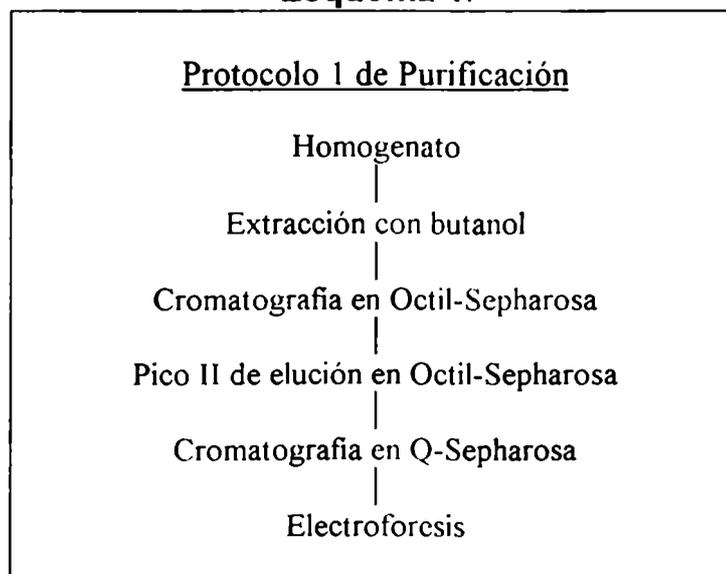


Tabla IV. Cuadro de Purificación: Protocolo 1.

Fracción	Proteína total (mg)	U.tot. (UAbs/min x mg)	Act.Esp. (UAbs/min x mg prot)	Purif.	% Recuperación
Fase acuosa de Extracción con butanol	22.00	170.0	7.7	1	100
Octil-Sep pico I	9.45	109.0	11.5	1.5	64
Octil-Sep pico II	0.45	16.0	32.8	4	9.4
Q-Sep pico II	0.04	7.5	203.0	28	4.4

3.1.2 Purificación de Fosfatasa Alcalina anclada: Protocolo 2

Para diseñar un nuevo esquema de purificación, teniendo en cuenta trabajos anteriores en los que se aísla FAL de otros tejidos (13;178;183;184), se utilizaron columnas de Concanavalina A-Sepharosa y Q-Sepharosa. Se determinaron las capacidades de ambas columnas, y se decidió realizar primero una cromatografía en Concanavalina A-Sepharosa, debido a que la cantidad de muestra que se puede sembrar es bastante mayor. Se eluyó la FAL con α -metil-glucopiranosido 4M indicando la presencia de estructuras N-glicosídicas específicas (185) en la FAL de corteza adrenal bovina (Figura 16). La fracción de FAL que coeluyó con la mayor parte de las proteínas no retenidas por la lectina fue

descartada. Si bien esta fracción era importante, la posibilidad de procesar mayor cantidad de muestra por esta columna hizo que este paso fuera conveniente como primera cromatografía en la purificación. No se eluyó actividad de FAL con α -metil-manopiranosido indicando la ausencia de otros tipos de estructuras N-glicosiladas conocidas (185).

CONCAVALINA-A-SEPHAROSA

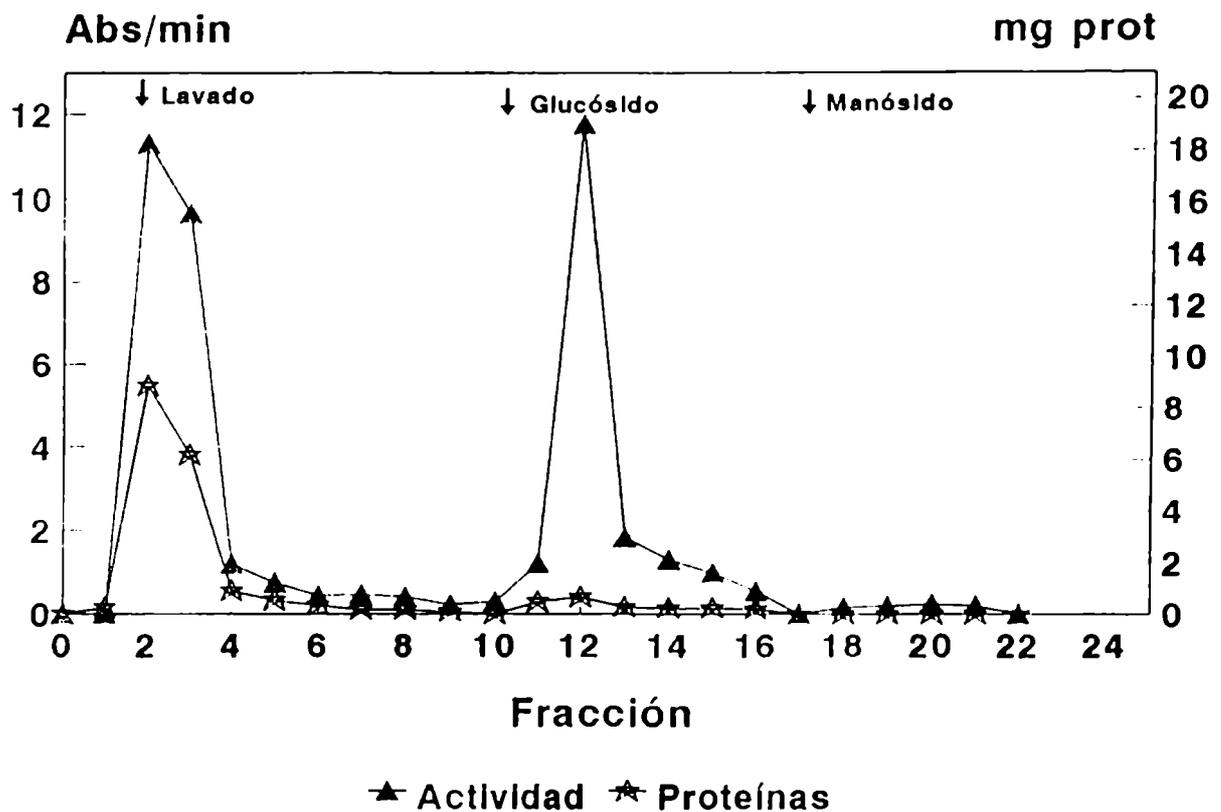


Figura 16. Perfil de elución de FAL y proteínas totales en Concanavalina A-Sepharosa.

El pico eluido con α -metil-glucopiranosido fue sembrado a continuación en una columna de Q-Sepharosa. La actividad de FAL se recuperó eluyendo con una concentración de NaCl de 250mM con un perfil muy similar al que se mostró en la figura 15.

Se analizaron las fracciones de los distintos pasos de purificación sembrando cantidades similares de proteína en electroforesis desnaturizante y revelado con reactivo de Coomasie (Figura 17). La calle 1, correspondiente al homogenato, presenta una tinción intensa y no permite resolver bandas debido a que contiene una gran variedad de proteínas. En cambio, la muestra eluída de la columna de Concanavalina A-Sepharosa (calle 3) permite visualizar bandas resueltas. El pico eluído de la Q-Sepharosa (calle 4) presentó menos bandas que en la calle 3, consistente con la purificación debida al intercambio iónico, que se analiza en el Esquema 2 y la Tabla V.

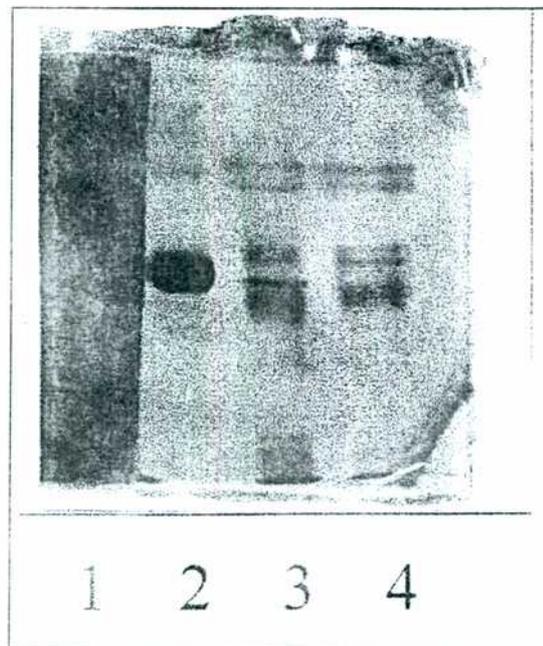
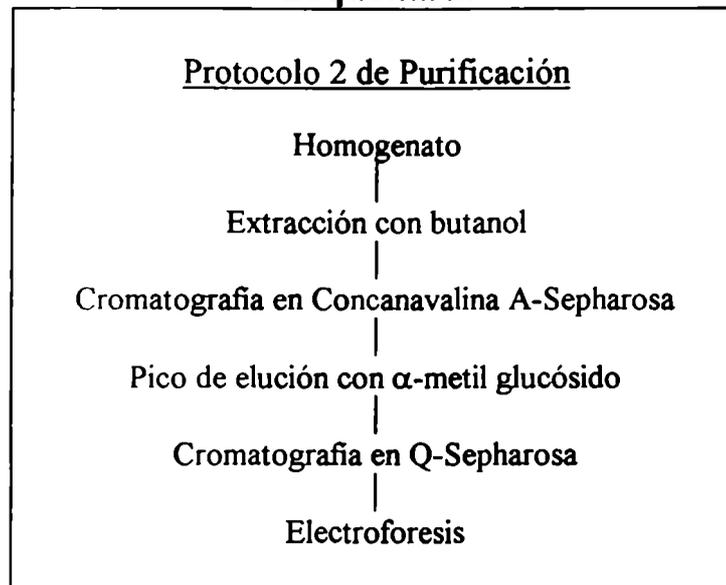


Figura 17. Análisis de las fracciones obtenidas siguiendo el protocolo 2 de purificación de FAL por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante revelado por tinción con Coomasie.

Calle:1, homogenato; 2, estándar de albúmina; 3, pico de FAL eluído de la concanavalina A-Sepharosa; 4, pico de FAL eluído de la Q-Sepharosa.

Esquema 2.**Tabla V.** Cuadro de Purificación: Protocolo 2.

Fracción	Proteína total (mg)	U.tot. (UAbs/min x mg)	Act.Esp. (UAbs/min x mg prot)	Purif.	% Recuperación
Homogenato	623.5	557.0	0.8	1	100
Fase acuosa de extracción con butanol	144.0	307.0	2.1	2.7	55
Concanavalina A-Sepharosa.	4.4	83.0	18.9	23.6	15
Q-Sepharosa	0.26	40.0	153.8	192.3	7.2

El peso molecular de la subunidad de FAL de distintos tejidos oscila entre 60-70 kDa de acuerdo a la bibliografía (179;181;186). Por ello se utilizó, en las corridas electroforéticas, una seroalbúmina bovina

comercial (Sigma) cuyo PM es de 67 kDa como estándar, y se encontraron bandas, que comigraron con dicho estándar, en las fracciones enriquecidas en FAL.

Para evaluar si estas bandas correspondían a FAL, se utilizaron anticuerpos contra la fosfatasa alcalina de intestino y de placenta que son isoenzimas tejido específicas (184), para ver si alguno de ellos presentaba reacción cruzada con la FAL presente en la corteza adrenal bovina.

Primeramente, la fracción acuosa obtenida luego de la extracción butanólica del homogenato (Tabla V) se analizó por inmunoprecipitación con estos anticuerpos utilizando proteína A-Sepharosa. En ambos casos la actividad de FAL quedó en el sobrenadante, es decir que ninguno de estos anticuerpos fue capaz de inmunoprecipitar la FAL de esta preparación.

Por otro lado, las mismas muestras se analizaron por "western blot" utilizando los anticuerpos contra FAL de placenta y de intestino.

Se encontró que los anticuerpos contra FAL de placenta reconocieron una proteína de 67 kDa y no presentaron reacción cruzada con bandas proteicas de otros tamaños, Figura 18. En cambio, los anticuerpos contra FAL de intestino, no reconocieron ninguna proteína del tamaño esperado (67KDa) pero aparecieron bandas de menor peso molecular.

Por lo tanto, el peso molecular de la banda que se obtuvo en "western blot", con los anticuerpos anti-FAL de placenta, coincide con el informado en la bibliografía para las distintas isoenzimas de FAL. Aparentemente, este anticuerpo sólo reconoce FAL desnaturalizada de corteza adrenal bovina, pues no inmunoprecipitó a la enzima nativa.

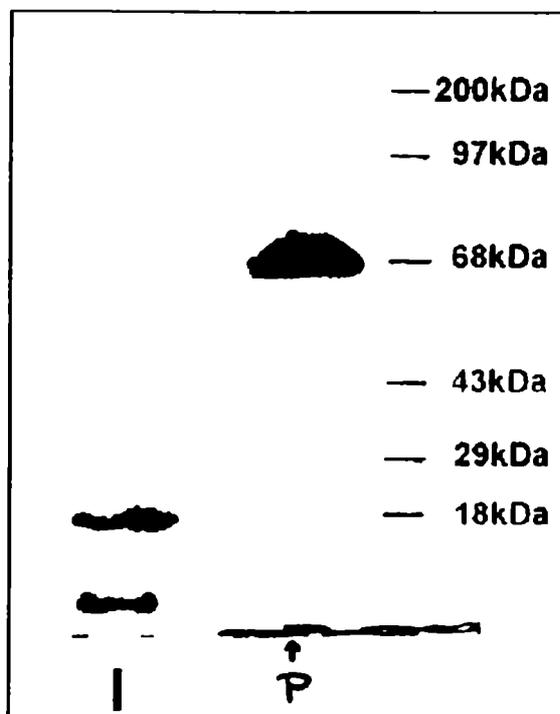


Figura 18. Análisis de la fase acuosa proveniente de homogenatos de corteza adrenal (ver esquema 2) por "Western Blot" utilizando anticuerpos específicos para las isoenzimas de FAL de intestino y de placenta.

Para continuar la purificación de FAL, se compararon los 2 procedimientos alternativos (Tablas IV y V), la fracción eluída de la Q-Sepharosa (Esquema 2) tiene más cantidad de material que el obtenido al final siguiendo el esquema I de purificación. Esta situación permitió seguir purificando la fracción eluída de la Q-Sepharosa (esquema 2) mediante otras cromatografías con el fin de purificar FAL a homogeneidad.

Se continuó la purificación utilizando un equipo de FPLC. Primero se realizó un tamizaje molecular en columna de Superosa-6 y el pico con actividad de FAL se sembró a continuación en una columna de Mono-Q. El pico de FAL se eluyó con 300 mM de NaCl.

Cuando se realizó una electroforesis de esta muestra en PAGE-SDS se encontraron 2 bandas principales por tinción con plata; una de

ellas con PM = 67kDa aproximadamente, que de acuerdo a los resultados obtenidos en el “western blot” sería el PM de FAL de adrenal.

En conclusión, se han evaluado dos esquemas alternativos de purificación de una enzima anclada por GPI, la fosfatasa alcalina, y se ha elegido el más conveniente. Se ha obtenido una fracción de FAL altamente purificada. Para llegar a homogeneidad se requeriría algún paso adicional. La cantidad de muestra obtenida no fue suficiente para estudiar la estructura del ancla de FAL. Por ello, se decidió buscar otras estrategias para purificar GPI de adrenal. De todos modos, la muestra de FAL purificada, se utilizó como fuente de GPI de adrenal (GPI-A) en ensayos de transducción de señales, como se verá en el capítulo 5.4.

3.2 Aislamiento de proteínas ancladas por GPI

3.2.1 “Western Blot” con anticuerpos específicos de IPG

Con el fin de estudiar las proteínas ancladas por GPI en corteza adrenal, se realizó un “western blot” con anticuerpos que reconocen IPG.

Fue necesario tratar las muestras con fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) que es capaz de hidrolizar GPI liberando DAG por un lado y la proteína con inositolfosfoglicano (IPG) por el otro (Figura 19).

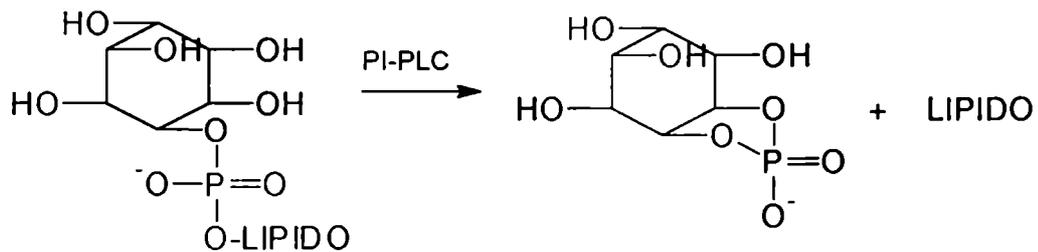


Figura 19. Hidrólisis de inositol fosfolípidos por PI-PLC.

Dado que se comercializan anticuerpos que reconocen IPG, anti-CRD (Figura 20), se puso a punto el “western blot” utilizando estos anticuerpos, con el fin de identificar a las proteínas ancladas.

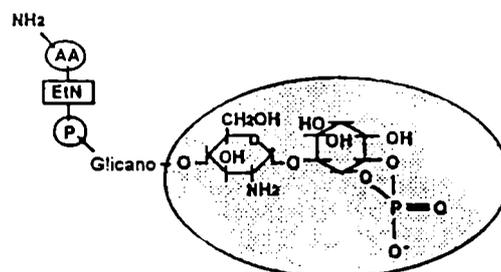


Figura 20. Reconocimiento de IPG por anti-CRD.

Se utilizó, como control positivo del "western blot", la proteína VSG (variant surface glycoprotein) purificada de *Trypanosoma brucei* comercial. La VSGs (forma soluble, con IPG) presentó una única banda que tiene el PM informado para esta proteína (80).

Se trató la muestra (homogenato de adrenal) con una PI-PLC de *Bacillus cereus*, ver sección 2.30.2. En paralelo, se trató con PI-PLC la VSGm (forma de membrana con el glicolípido completo, GPI) como control del tratamiento con fosfolipasa.

Se encontró la banda proveniente de VSGm hidrolizada por PI-PLC pero ninguna banda en la muestra. Esto podía deberse a que el material sembrado no contuviese suficiente cantidad de las proteínas ancladas como para ser detectadas, ya que al revelar la nitrocelulosa con el colorante rojo ponceau aparecían bandas proteicas muy tenues en la calle del homogenato, por lo que se pensó realizar algunas modificaciones:

- i) se aumentó la cantidad de muestra sembrada, por concentración de las mismas y utilizando dispositivos (peines y separadores de mayor espesor) que permiten sembrar mayores volúmenes en los geles;
- ii) teniendo en cuenta un trabajo reciente (80), se realizaron otras variaciones en la técnica del "western-blot". Por un lado, se trataron las proteínas ancladas con PI-PLC después de la transferencia; es decir, que se hidrolizaron las anclas de las proteínas inmovilizadas en el soporte de nitrocelulosa. Por otra parte, antes de realizar los tratamientos con la enzima, se realizó sobre la nitrocelulosa la hidrólisis alcalina de las proteínas inmovilizadas (NaOH 50mM en propanol 20% v/v durante 60 minutos a temperatura ambiente), tratamiento que provoca la desacilación específica del inositol, pues como ya se mencionó, esta acilación impediría la acción de la PI-PLC.

El análisis por "Western Blot" incluyendo todas estas modificaciones nuevamente reveló la presencia del epítopo reconocido

por el anti-CRD de la VSGm (Figura 21) pero no aparecieron bandas en la muestra.

A partir del análisis por este método de cantidades menores de VSGm se ha determinado que este anticuerpo requiere de 1-3 μg de esta proteína para detectar la banda correspondiente. Parece probable que la muestra de adrenal no tuviera bandas de proteínas con cantidad suficiente de anclas de GPI como para ser detectadas por este método.

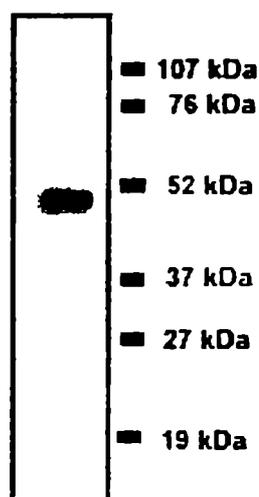


Figura 21. Análisis de VSGm (6 μg) por "Western Blot-modificado" utilizando anticuerpos anti-CRD, ver sección 2.11.

3.2.2 Separación con Tritón X-114

Se quiso aislar el conjunto de glicoinositolfosfolípidos presente en corteza adrenal por otro método.

Los homogenatos de capas de corteza adrenal bovina se extrajeron con Tritón X-114, siguiendo la técnica de partición modificada según se ha informado recientemente (162). Esta técnica permite separar proteínas ancladas por GPI de otras proteínas hidrofóbicas. La modificación consiste en incubar al extracto de Tritón X-114 a -20°C durante 24 horas,

lo cual mejora la partición de las proteínas ancladas a la fase detergente, favoreciendo la agregación de otras proteínas hidrofóbicas. Luego de varias centrifugaciones se obtuvo una fase detergente que contiene, según lo informado, principalmente proteínas ancladas con GPI (sección 2.13.1). Esto se corroboró por determinación de la actividad de FAL en todas las fracciones obtenidas durante la partición encontrando un enriquecimiento de FAL en la fase detergente final.

3.3 Estudios de la porción lipídica de GPI de corteza adrenal

Luego de extraer con butanol el Tritón X-114, la fase acuosa resultante se trató con nitrito de sodio a pH: 3.9. Este tratamiento ha sido utilizado previamente para identificar GPIs de mamíferos (123;187). La glucosamina libre (no acetilada) del ancla reacciona con el ácido nitroso dando anhidromanosa y se libera fosfatidilinositol (o el inositol-fosfolípido que corresponda).

Para investigar la presencia de anclas de GPI, después del tratamiento con ácido nitroso, la muestra se extrajo con butanol y se sembró en una placa de TLC para analizar la presencia de inositolfosfolípidos. Se sembró también igual cantidad de un control sin tratar con ácido nitroso. Como puede verse en la Figura 22, se encontró que en la muestra la cantidad de PI es mayor que en el control, y aparece, además, otra mancha de Rf menor que no está en el control, lo que indicaría la presencia de otros inositol fosfolípidos más polares.



Figura 22. Análisis por TLC de los lípidos liberados de la fase de Tritón X-114 por tratamiento con ácido nitroso y extracción con butanol utilizando el solvente B. Calle 1: muestra sin tratar; calle 2: muestra tratada. Estándar: PI, fosfatidilinositol. Revelado: con reactivo de cerio.

Para estudiar la estructura de los lípidos liberados, el extracto butanólico proveniente del tratamiento con ácido nitroso o del control sin tratar, se hidrolizó por metanólisis, como se detalla en 2.31.4. Con este tratamiento se liberan los ácidos grasos de los glicerolípidos y las ceramidas, los cuales se transesterifican y se obtienen en forma de ésteres metílicos. En el caso de la hidrólisis de ceramida se produce

también esfingosina o dihidroesfingosina. Con este tratamiento no se hidrolizan los grupos alquilos.

Los productos de metanólisis de los lípidos liberados por tratamiento con ácido nitroso o de la muestra control se analizaron por TLC. Como puede verse en la Figura 23, en la calle 2 se incrementaron dos manchas; una que migra a la altura de palmítico metilado y otra mancha de Rf similar al estándar de alquilglicerol. Apareció además, una mancha de movilidad similar a los estándares de palmítico y dihidroesfingosina, que no se resuelven bien en este sistema.



Figura 23. Análisis de los lípidos hidrolizados metanólisis por TLC utilizando el solvente D. Los lípidos liberados de la fase TX-114 por tratamiento con ácido nitroso (calle 2) o control (calle 1) se hidrolizaron por metanólisis y analizaron por TLC revelada con yodo. Estándares de ácido palmítico (P), ácido palmítico metilado (PM), dihidroesfingosina (DHS), esfingosina (S), alquilglicerol (A).

La visualización de compuestos que migran como alquilglicerol, palmítico metilado y palmítico, indican la liberación de alquilglicerolípidos por el tratamiento con ácido nitroso. El palmítico metilado y el palmítico provendrían de alquilacil- o diacil-glicerolípidos, es decir que indican la presencia de fosfatidilinositol en las anclas.

Palmítico es uno de los productos de metanólisis, pues no se esterifica el total del ácido liberado mediante este tratamiento. Dado que los estándares de palmítico y dihidroesfingosina no se resuelven bien en este sistema, la visualización en la muestra de una mancha de movilidad intermedia entre ellos no permite afirmar que coexistan anclas con ceramida. De todos modos, esta hipótesis no parece la más probable si se considera que estas estructuras no parecen estar presentes en mamíferos (123).

La liberación de glicerolípidos mediante HNO_2 indica la existencia de anclas de GPI en corteza adrenal (Figura 22). Estos resultados sugieren la existencia de alquilglicerolípidos entre los glicerolípidos de anclas de adrenal.

En este capítulo se ha mostrado la presencia de compuestos de la familia de los GPIs en corteza adrenal.

Por un lado, se ha encontrado que FAL de corteza adrenal bovina interacciona con Octil-Sepharosa de la cual es eluída con un 40% de propanol y puede ser extraída con el detergente TX-114. Estas propiedades son comunes a las proteínas ancladas por GPI. Además, estos GPIs (luego de tratamiento con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol) fueron utilizados en ensayos biológicos y tuvieron efecto similar a otros IPGs, como se analizará en el capítulo 5.4.

Por otro lado, se han aislado con TX-114 proteínas ancladas con GPI de homogenatos de corteza adrenal. La existencia de anclas de GPI fue confirmada por su susceptibilidad al tratamiento con ácido nitroso. El análisis del lípido liberado de las anclas por este tratamiento, sugiere la existencia de alquilacilgliceroles, que coincide con lo encontrado en varios GPIs de proteínas de mamíferos (17). Sin embargo, la cantidad de anclas presentes en adrenal parece no ser abundante.

Como se desea no sólo caracterizar anclas sino también tener cantidad suficiente para realizar estudios biológicos, se decidió intentar el estudio de GPI en otro sistema que pudiera contener más cantidad de estos compuestos, como se analizará en el capítulo 5.

Capítulo 4. Rol de los glicosilfosfatidilinositoles en sistemas de señales

4.1 Efecto de IPG en preparaciones de células adrenocorticales bovinas

El objetivo de este trabajo no fue sólo caracterizar GPI de corteza adrenal, sino también evaluar la importancia de estos compuestos como segundos mensajeros en este sistema.

Como se ha comentado, la presencia de GPI en corteza adrenal y su regulación por factores presentes en suero, fue informada por primera vez por Igarashi y Chambaz (145). Los resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la hormona adrenocorticotrofina, ACTH, es capaz de hidrolizar GPI en preparaciones de células enriquecidas en glomerulosa adrenal bovina (146).

La corteza adrenal tiene una zona más externa, la glomerulosa, y a continuación la zona fasciculata. Los mineralocorticoides se sintetizan en la glomerulosa, y participan en el mantenimiento del equilibrio hídrico corporal. Los glucocorticoides, en cambio, se sintetizan en la zona fasciculata y afectan el metabolismo de los hidratos de carbono y de las proteínas, lo que los hace indispensables para la vida.

ACTH estimula la biosíntesis de esteroides en la glándula adrenal: regula la producción de glucocorticoides en la zona fasciculata y de mineralocorticoides en la zona glomerulosa de la corteza. La acción de ACTH involucra principalmente la activación de la adenililciclase incrementando el contenido intracelular de AMPc (188-190), que es el segundo mensajero que media la acción de esta hormona peptídica.

Fue informado en nuestro laboratorio que el IPG obtenido del LPPG de *T. cruzi* fue capaz de inhibir la producción de un mineralocorticoide, aldosterona, mediada por ACTH en glomerulosa bovina (191). Este IPG tiene la misma estructura conservada o 'core' (Figura 24) que otros IPGs, excepto por la sustitución de una manosa adicional, un grupo aminoetilfosfónico y dos residuos de galactosa furanósica (Galf). Estas últimas modificaciones no son muy frecuentes en las moléculas de esta familia; por ello, estos residuos se hidrolizaron específicamente (ver sección 2.17.2) para obtener la estructura que se muestra en la Figura 24. Se determinó que la presencia de Galf en el IPG atenuaba su efecto inhibitorio sobre esta respuesta de ACTH. Por ello, se utilizó IPG sin Galf en los estudios posteriores.

Continuando con esta línea de investigación y teniendo en cuenta que el rol fisiológico principal de ACTH consiste en la inducción de la producción de glucocorticoides, se quiso evaluar si el IPG obtenido por tratamiento con PI-PLC del LPPG purificado de *T. cruzi* (ver sección 2.17.3) era capaz de modular también la producción mediada por ACTH del principal glucocorticoide, cortisol, en células de fasciculata adrenal bovina. Primeramente, se verificó que la concentración de ACTH 1 nM, utilizada de rutina en el laboratorio para ver efectos de ACTH, producía una acumulación máxima de cortisol en estas células, que era similar a la encontrada con dosis mayores de hormona (10 y 100 nM).

Se investigó el efecto de dos dosis de IPG, similares a las utilizadas previamente para evaluar los efectos biológicos de este mediador (107;124;191;192), sobre el aumento de la producción de cortisol, mediado por ACTH.

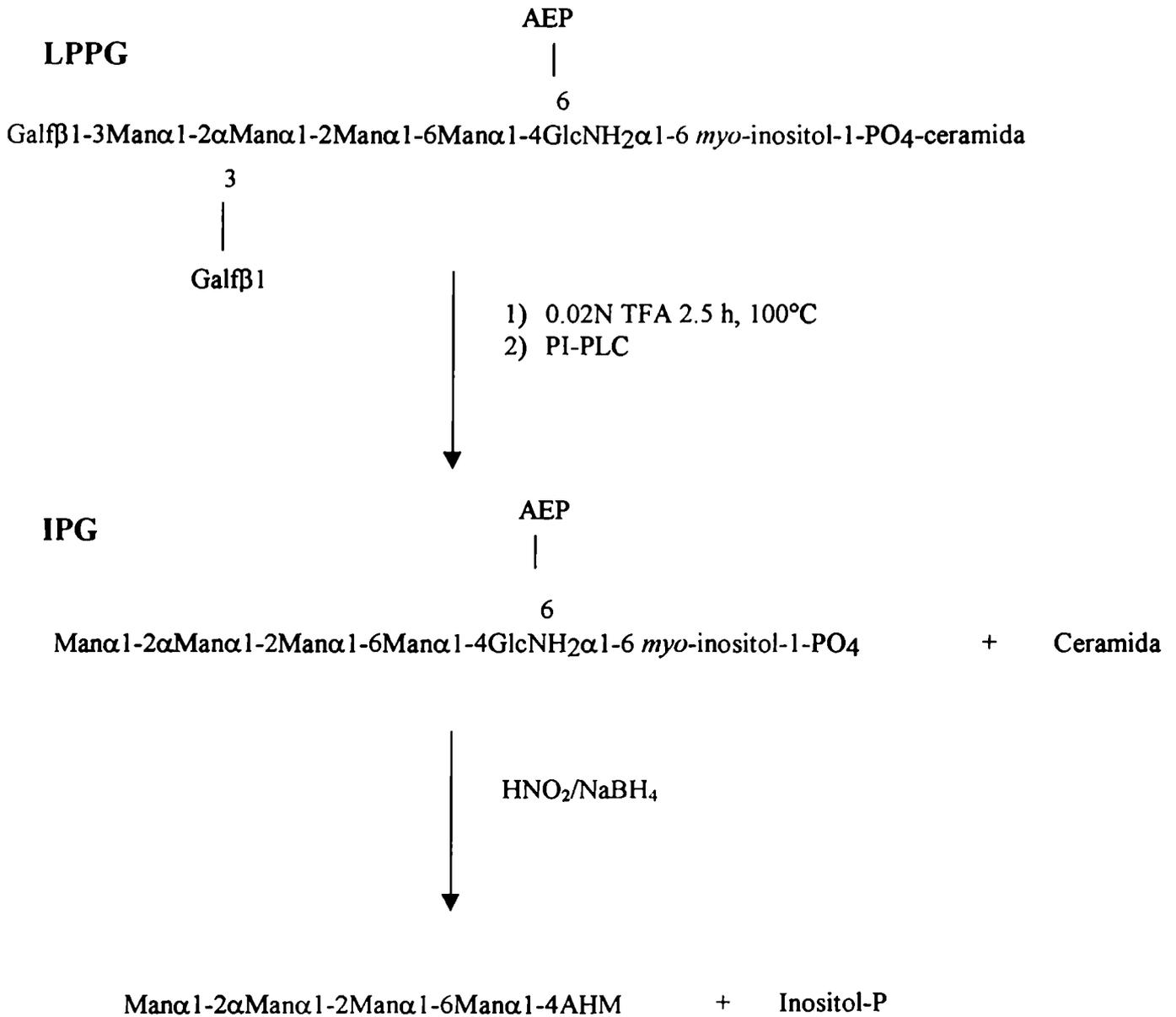


Figura 24. Estructura del LPPG y del IPG purificados de *T. cruzi* (26;27). Esquema de las reacciones utilizadas para obtener IPG o IPG tratado con ácido nitroso. AHM: 2,5 anhidromanitol.

Como puede verse en la Figura 25, IPG es capaz de inhibir significativamente la respuesta de ACTH en las dos dosis ensayadas (10 y 20 μM), mientras que los vehículos no afectan la producción de cortisol ni en las células tratadas con ACTH ni en los controles.

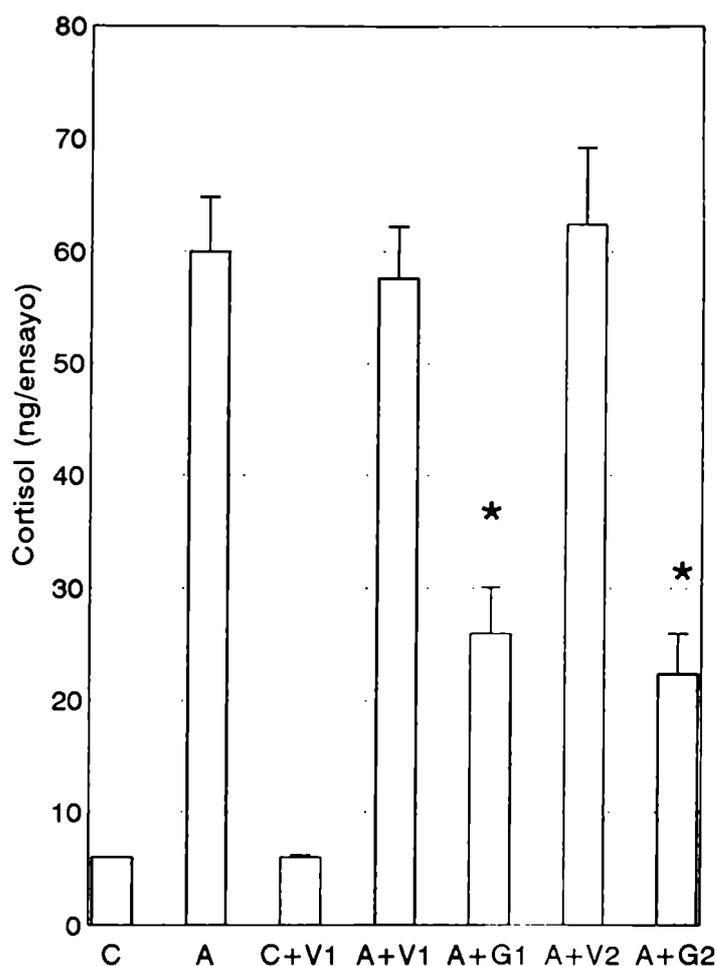


Figura 25. Efecto de IPG sobre la estimulación de cortisol mediada por ACTH en células adrenocorticales bovinas.

Se prepararon células enriquecidas en fasciculata y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control: C) ó en presencia de ACTH 1nM (A); con o sin agregado de IPG (G) o de vehículo (V) en dosis 10 μM (V1, G1) ó 20 μM (V2, G2). Luego de los tratamientos, se cuantificó cortisol por RIA. Los resultados corresponden a la media \pm S.E. de tres experimentos. * Significativamente diferente de ACTH $p \leq 0.05$ (ANOVA).

4.2 Efecto de IPG en preparaciones de células adrenocorticales de rata

Para extender el alcance de nuestros resultados, se decidió estudiar el efecto del IPG purificado de *T. cruzi* sobre la acción de ACTH en otro mamífero, la rata, cuyo principal glucocorticoide es corticosterona en lugar de cortisol.

Para ello, se prepararon células a partir de la fracción central, enriquecida en zona fasciculata-reticularis de adrenales de rata. De un modo similar al comentado para la producción de cortisol en células bovinas, se verificó en estas preparaciones que el efecto de la dosis de ACTH 1 nM, no se mejoraba con dosis más altas de hormona. Se encontró que ACTH fue capaz de estimular significativamente la producción de corticosterona en estas células y que el tratamiento con IPG (20 μ M) inhibió significativamente la acumulación mediada por ACTH del glucocorticoide, Figura 26.

Cabe aclarar que en todos los experimentos analizados el agregado de vehículo de IPG no afectó la producción de esteroides en células controles o tratadas con ACTH, por ello sólo se muestran los valores correspondientes a los tratamiento con vehículo.

Por otro lado, se quiso estudiar el efecto de IPG sobre la producción del principal mineralocorticoide, aldosterona, en corteza adrenal de rata. Se prepararon células a partir de la fracción capsular, enriquecida en zona glomerulosa de adrenales de rata. Se encontró que ACTH estimuló la producción de aldosterona en esta preparación y el tratamiento con IPG (20 μ M) inhibió significativamente la acumulación mediada por ACTH del mineralocorticoide, Figura 27.

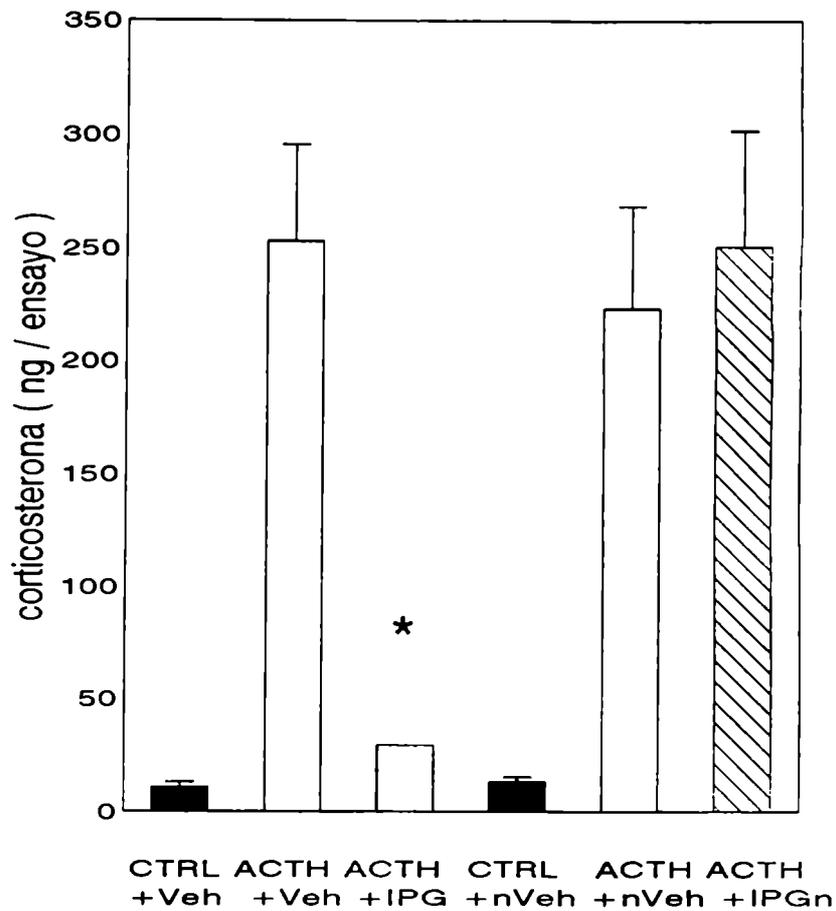


Figura 26. Efecto de IPG sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Se prepararon células enriquecidas en fasciculata y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control: CTRL) ó en presencia de ACTH 1nM; con agregado de 20 μ M de IPG (IPG), IPG tratado con ácido nitroso (nIPG), o sus respectivos vehículos (Veh, nVeh). Luego de los tratamientos, se cuantificó corticosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media \pm S.E. de tres experimentos. * Significativamente diferente de ACTH+Veh $p \leq 0.05$ (ANOVA).

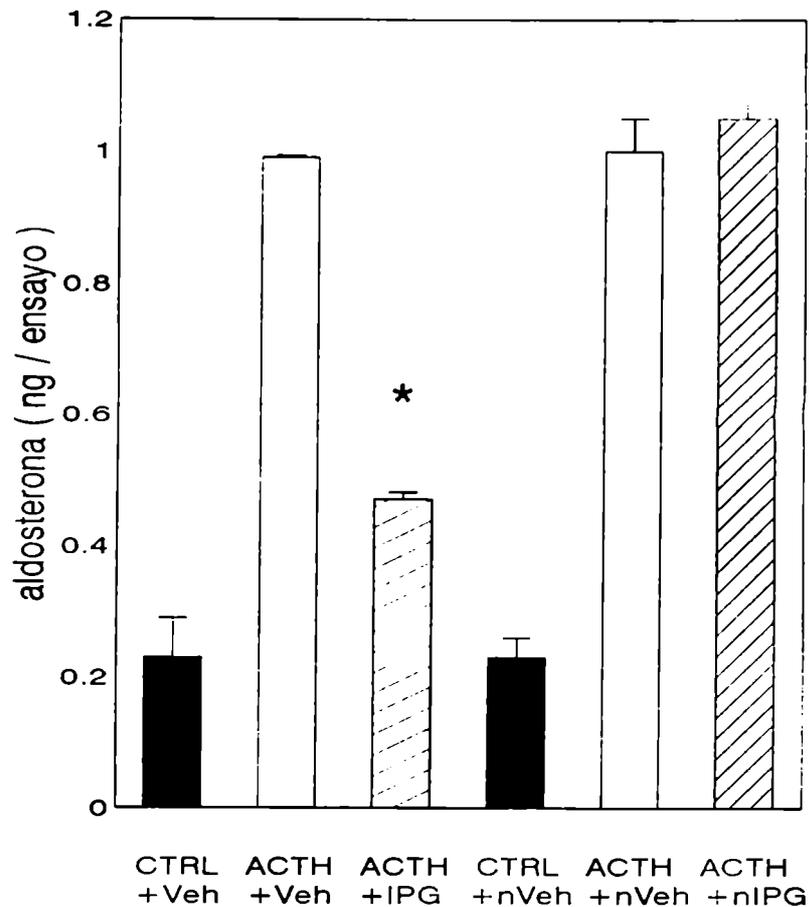


Figura 27. Efecto de IPG sobre la estimulación de aldosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Se prepararon células enriquecidas en glomerulosa y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control: CTRL) ó en presencia de ACTH 1nM; con agregado de 20 μ M de IPG (IPG), IPG tratado con ácido nitroso (nIPG), o sus respectivos vehículos (Veh, nVeh). Luego de los tratamientos, se cuantificó aldosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media \pm S.E. de tres experimentos. * Significativamente diferente de ACTH+Veh $p \leq 0.001$ (ANOVA).

Estos resultados indican que el efecto inhibitorio de un IPG aislado de *T. cruzi* de estructura química definida sobre la acumulación de esteroides mediada por ACTH se conserva en las distintas capas de la corteza adrenal, en diferentes mamíferos y con distintos esteroides.

4.3 Tratamiento del IPG con ácido nitroso

Para demostrar que el IPG era el responsable de la inhibición de la respuesta de ACTH, se trató la muestra correspondiente al IPG purificado de *T. cruzi* con ácido nitroso a pH: 4.

Es sabido que por tratamiento del IPG con ácido nitroso se desamina la glucosamina comprometida en una unión glicosídica (193) y se destruye su actividad biológica (129;194).

La desaminación nitrosa del IPG impidió el efecto inhibitorio del IPG sobre la producción, mediada por ACTH, tanto de corticosterona como de aldosterona en células adrenocorticales de rata, Figura 26 y Figura 27, respectivamente. En cambio, el tratamiento con ácido nitroso del vehículo no afectó la respuesta de ACTH.

Estos resultados confirmaron que IPG es responsable de esta inhibición.

4.4 Activación por ACTH de una fosfolipasa específica de GPI

4.4.1 Liberación de Fosfatasa Alcalina al medio extracelular por ACTH

Se ha visto que un IPG purificado de *T. cruzi* inhibe la acción de ACTH. Para evaluar la importancia fisiológica de este hecho, se estudió

la activación por ACTH de una fosfolipasa capaz de hidrolizar GPI, mediante dos estrategias experimentales.

Primeramente, se estudió el efecto de ACTH sobre la liberación al medio de una proteína anclada por GPI, la fosfatasa alcalina (FAL), en preparaciones enriquecidas en fasciculata de rata y vaca.

Se observó que ACTH aumentó, en forma rápida (entre 1 y 10 minutos), la liberación de la enzima activa al medio extracelular tanto en células adrenocorticales de rata (Figura 28) como en células adrenocorticales de vaca (Figura 29).

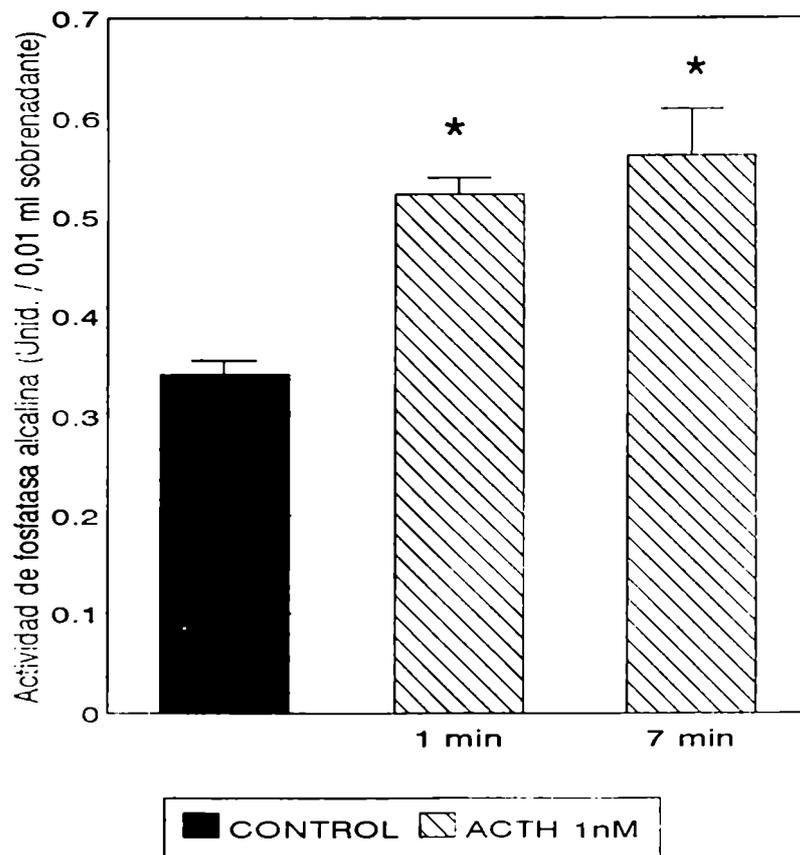


Figura 28. Efecto de ACTH en la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular de preparaciones de células enriquecidas en fasciculata adrenal de rata. Las células se trataron con ACTH 1nM o vehículo (control) por los tiempos indicados. Luego de la incubación, se centrifugaron las suspensiones celulares y se midió fosfatasa alcalina en los sobrenadantes. * Significativamente diferente del control. $p \leq 0.05$ (Prueba de t de Student).

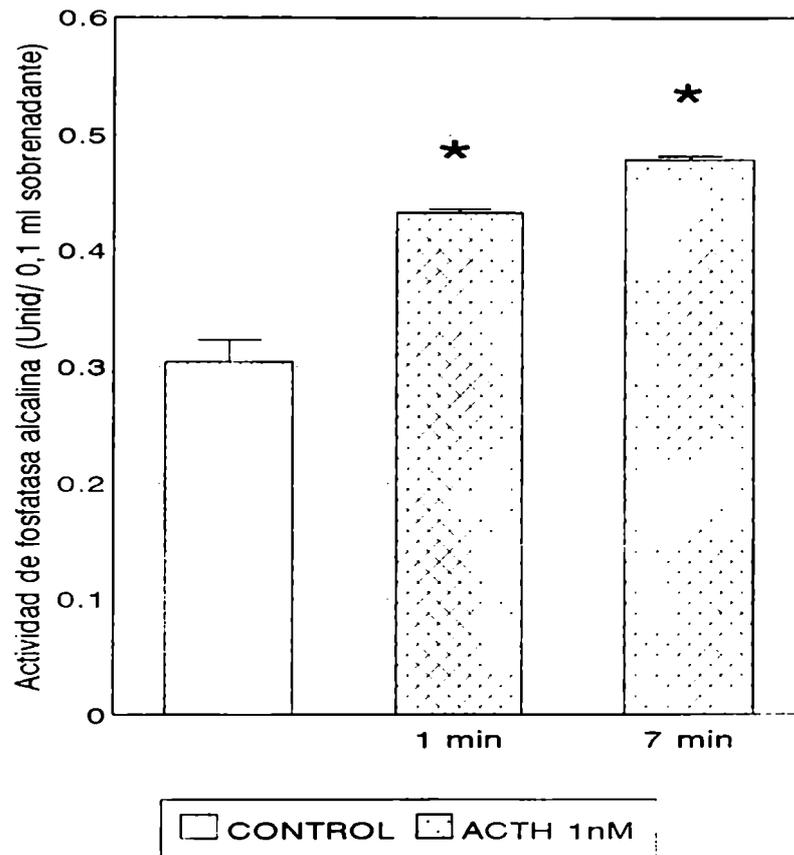


Figura 29. Efecto de ACTH en la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular de preparaciones de células enriquecidas en fasciculata adrenal bovina. Las células se trataron con ACTH 1nM o vehículo (control) por los tiempos indicados. Luego de la incubación, se centrifugaron las suspensiones celulares y se midió fosfatasa alcalina en los sobrenadantes. * Significativamente diferente del control. $p \leq 0.01$ (Prueba de t de Student).

Los aumentos encontrados son significativos, aunque pequeños. Resultados similares se han observado al estudiar la estimulación por insulina y EGF de la liberación de FAL en células Hep-2 (195), pues la enzima liberada por estos factores representó una proporción pequeña de la enzima total presente en la superficie de dicho tipo celular.

Estos resultados sugieren que ACTH podría estimular una GPI-PLC en la corteza adrenal y que ésta podría ser una señal conservada en mamíferos.

La liberación de FAL al medio extracelular ha sido anteriormente considerada indicativa de activación de GPI-PLC (121;195), sin embargo, no se puede descartar activación de otro tipo de hidrolasas. Actualmente, se conocen fosfolipasas específicas de GPI de tipo C (GPI-PLC) o de tipo D (GPI-PLD) capaces de liberar proteínas de la superficie celular (90;120). Además se ha reportado muy recientemente que ciertas proteínas son capaces de ser liberadas de la membrana celular conservando su ancla de GPI y luego se reasocian con otras membranas celulares (105).

Por último, FAL podría liberarse por acción de una proteasa; si este fuera el caso, la proteólisis ocurriría sin bloquear la actividad enzimática. Se ha encontrado que la estimulación de la liberación de FAL por ACTH no fue afectada por una mezcla de inhibidores de proteasas que contiene (PMSF, leupeptina y aprotinina) lo cual no favorece la hipótesis de que FAL se libere por acción de proteasas.

4.4.2 Activación de una GPI-PLC por ACTH

En base a lo expuesto en la sección anterior, fue necesario realizar un experimento que permitiera dilucidar qué hidrolasa era activada por ACTH.

En mamíferos, se han descrito los dos tipos de fosfolipasas de GPI, las GPI-PLC (120-122) y las GPI-PLD (182). Previamente, se ha demostrado que estas enzimas liberan, a partir de LPPG, ceramida (27) o ceramida-fosfato (174) respectivamente.

Para evaluar si ACTH activa a estas enzimas, se investigó la liberación de estos lípidos a partir de una glicoinositolfosfoceramida en células adrenocorticales.

Se incubaron las células con [^3H] LPPG en presencia o ausencia de ACTH durante 8 minutos. Este tiempo se eligió porque previamente, se había analizado la liberación del lípido marcado a partir de LPPG por tratamiento de las células con la hormona durante distintos tiempos, lo que permitió determinar que la liberación máxima de lípidos ocurría luego de 8 minutos de tratamiento, mientras que con tratamientos más cortos (2 minutos) o más largos (15 minutos) la liberación era menor.

Luego de realizada la incubación con [^3H] LPPG, la suspensión celular se extrajo primero con éter para analizar la liberación de [^3H] ceramida y luego con cloroformo:metanol:12M HCl (10:10:0.1 v/v) para estudiar la liberación de [^3H] ceramida 1-fosfato, ya que se ha probado que este lípido no se extrae con éter (174).

Al analizar los extractos etéreos por TLC, se observó que el contenido de ceramida fue mayor en las células tratadas con la hormona, como se muestra en la Figura 30. También se encontró un aumento en la radioactividad que quedó en el origen en los extractos provenientes de las células tratadas con ACTH, estos compuestos más polares no fueron

investigados así como tampoco la existencia de una ceramidasa que pudiera liberar ácidos grasos.

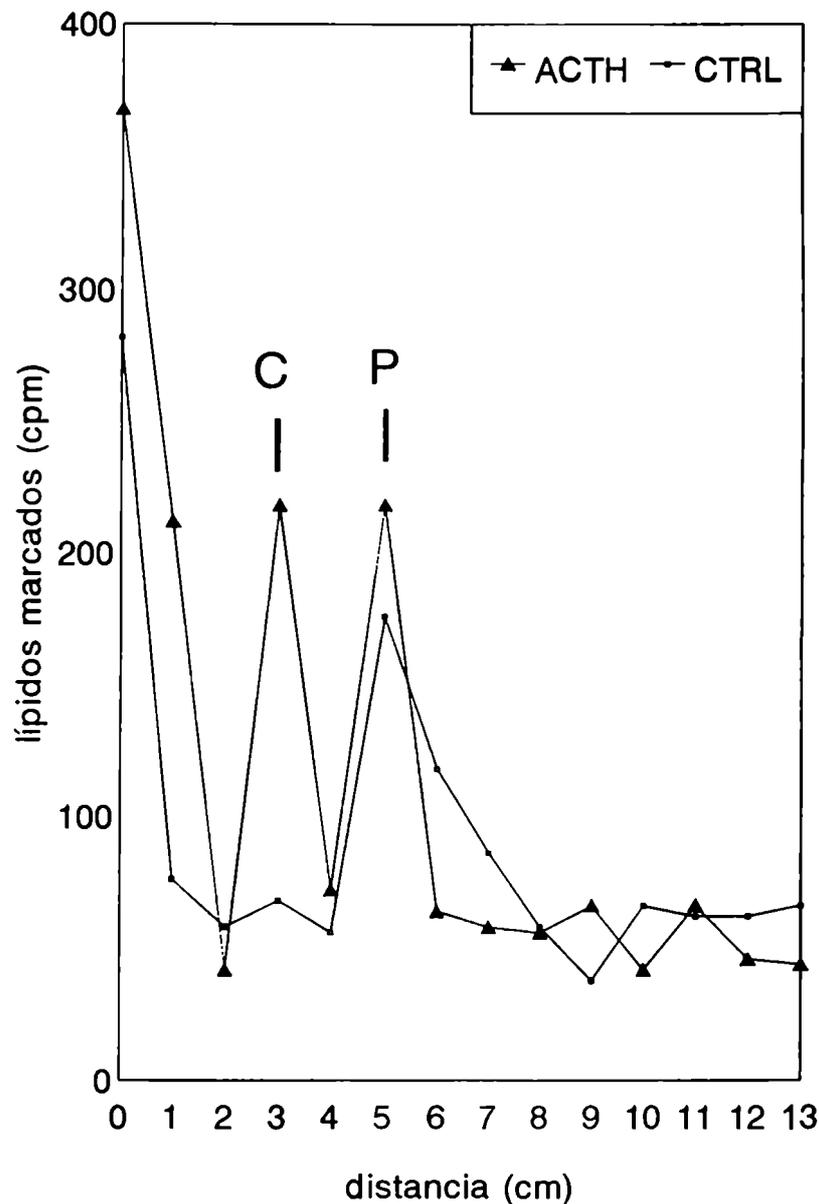


Figura 30. Efecto de ACTH en la hidrólisis de [^3H]-LPPG. Las células se trataron en ausencia (CTRL) o presencia de ACTH 1nM durante 8 minutos. Luego, los lípidos se extrajeron con éter y se analizaron por TLC en hexano:isopropanol (93:7, v/v). Se midió la radiactividad en bandas de 1 cm. Stándares: C, ceramida; P, palmitico.

El aumento de la liberación de ceramida a partir de LPPG por ACTH, prueba que esta hormona activa la hidrólisis de GPI a través de una PLC.

Al analizar los extractos clorofórmicos por TLC utilizando un sistema que permite identificar ceramida 1-fosfato y un estándar preparado a partir de esfingomielina (2.20.1), no se obtuvo ningún pico que comigrara con el estándar ni en los extractos provenientes de los controles ni en los provenientes de los tratados con hormona, por lo que ACTH no parece estimular una fosfolipasa de tipo D.

De acuerdo a estos resultados, ACTH activa una GPI-PLC en corteza adrenal de rata, lo que sugiere la liberación de IPG por la hormona. Esta activación le daría importancia fisiológica a los resultados encontrados con el IPG de *T. cruzi*.

4.4.3 Evaluación de la liberación de IPG de corteza adrenal por ACTH

Se sabe que, en sistemas en los que se activa una fosfolipasa C que hidroliza GPI, el IPG es liberado al medio extracelular y luego es captado por las células por un mecanismo que requiere energía (106;136). Dado que luego de tratar células adrenocorticales de vaca con ACTH por 1 ó 7 minutos, aumentó la liberación de FAL al medio extracelular, se decidió liofilizar estos sobrenadantes y utilizarlos como fuente de IPG. Se estudió el efecto de la adición de sobrenadantes provenientes de células adrenocorticales de vaca controles (SbC) y de células tratadas con ACTH (SbACTH), sobre la estimulación mediada por ACTH de la producción de corticosterona por células de fasciculata de rata.

Se encontró por un lado, que la adición de sobrenadantes produce una disminución de la producción de corticosterona tanto en células controles como en células tratadas por ACTH respecto a células que no

han sido tratadas con sobrenadantes. Esto podría deberse a un aumento de la concentración salina en el medio ya que el agregado de igual cantidad de medio produjo el mismo efecto. Por otro lado, se vió que si se trataban células de fasciculata de rata con ACTH en presencia de SbC ó SbACTH, la adición de este último sobrenadante inhibe significativamente la acumulación de corticosterona respecto a la adición de SbC, Figura 31.

Esto indica la existencia de un inhibidor de la respuesta de ACTH en los SbACTH que podría ser el IPG producido por activación de GPI-PLC.

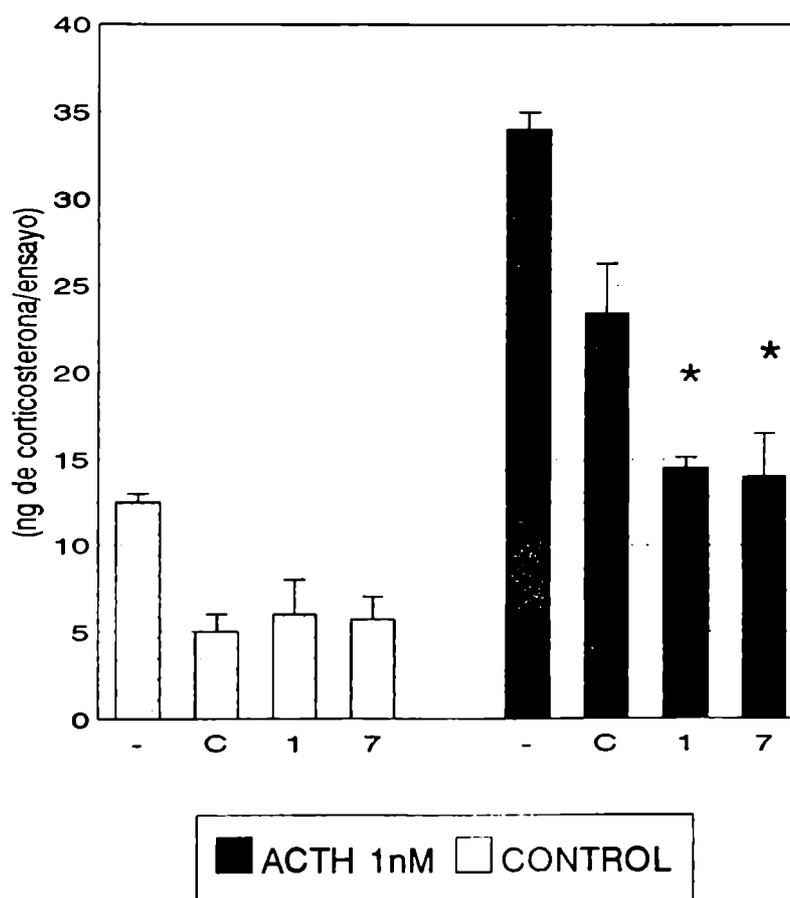


FIGURA 31. Efecto de sobrenadantes como fuente de IPG de adrenal en la liberación de corticosterona en células de fasciculata adrenal de rata. Las células controles o tratadas con ACTH 1nM se incubaron con sobrenadantes obtenidos de vaca en las condiciones de la Figura 24, como fuente de IPG de adrenal. Sobrenadantes: c, control; 1, ACTH 1 min; 7, ACTH 7 min. Luego de la incubación, se centrifugaron las suspensiones de células de rata y se determinó corticosterona por RIA. * Significativamente diferente de la adición del sobrenadante control. $p \leq 0.05$ (Prueba de t de Student).

Para investigar la liberación de IPG por ACTH al medio extracelular se utilizaron anticuerpos anti-CRD, que reconocen IPG. Se ha visto que la adición de estos anticuerpos al medio de incubación de células en cultivo bloquea la activación por insulina de PDH que estaría mediada por IPG (106).

Se incubaron células adrenocorticales con ACTH en ausencia y presencia de anti-CRD ó suero normal de conejo. Se utilizaron dos dosis de ACTH: una máxima (1nM) y otra subóptima (0.1nM); pues si estos anticuerpos causaran una desinhibición, ésta podría ser difícil de visualizar con la dosis de ACTH que causa la estimulación máxima.

Se encontró que el tratamiento con anti-CRD produjo un aumento de la producción de esteroides, mediada por ambas dosis de ACTH (Figura 32), mientras que el suero no inmune no tuvo efecto. Se preparó un vehículo similar al buffer del anticuerpo, el cual, tampoco afectó la producción de esteroides.

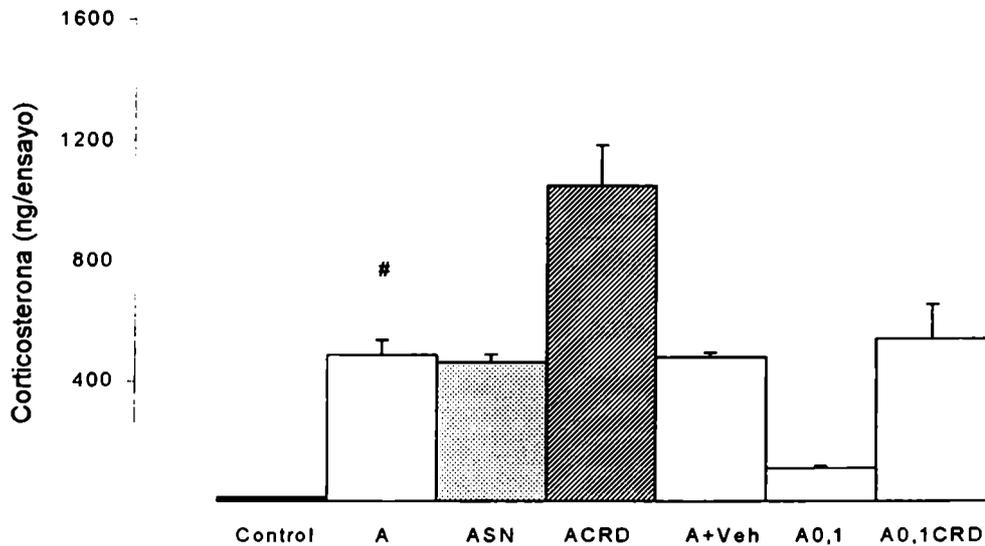


Figura 32. Efecto de anti-CRD sobre la producción de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Se prepararon células enriquecidas en fasciculata y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control: C) ó en presencia de ACTH 1nM (A) o 0,1 nM (A0,1); con agregado de antiCRD (CRD) o vehículo (VCRD) o suero normal de conejo (SN). Luego de los tratamientos, se cuantificó corticosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media \pm S.E. de dos experimentos. # Significativamente diferente del C $p \leq 0.01$; + Significativamente diferente de A $p \leq 0.05$; * Significativamente diferente de A0,1 $p \leq 0.05$ (Prueba t de Student).

Estos resultados prueban que ACTH libera IPG al medio extracelular en células adrenocorticales, capaz de inhibir la producción de esteroides mediada por ACTH.

4.4.4 Rol de inositol glicano en la acción de ACTH.

Se ha descrito una fosfolipasa D de GPI (GPI-PLD) que libera inositolglicano (IG) y se ha propuesto, recientemente, que IG tiene actividad biológica (139;196;197).

Recientemente, el grupo de Tachado y col. probaron que distintos IGs de parásitos son capaces de reproducir algunos efectos que normalmente ocurren durante la infección a nivel de los macrófagos (139).

Otro trabajo ha mostrado que IGs provenientes de GPIs libres de hígado de rata, sensibles al tratamiento con ácido nitroso, son capaces de inhibir una PKA comercial *in vitro* y de estimular la proliferación celular en el ganglio cocleovestibular del embrión de pollo, reproduciendo así efectos de factores de crecimiento (196).

Aún sin activación de GPI-PLD, como en este caso, podría producirse IG por desfosforilación de IPG, sin activación de GPI-PLD.

En base a estos antecedentes, se quiso evaluar el efecto de IG obtenido de *T. cruzi* sobre la acumulación de esteroides mediada por ACTH y compararlo con el efecto de IPG. Se utilizó la dosis que había producido el mayor efecto inhibitorio de IPG (20 μ M). Esta dosis de IG es semejante a la que tuvo efecto en los distintos sistemas anteriormente mencionados (139).

Se encontró que IG es capaz de inhibir la producción de esteroides mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Este efecto siempre fue significativamente menor que el observado con igual dosis de IPG, Figura 33.

Se ha confirmado, además, que el efecto inhibitorio es debido al IG, pues se pierde por tratamiento con ácido nitroso, Figura 33. En ningún

caso la adición de vehículos correspondientes a los distintos glicanos utilizados inhibió esta respuesta.

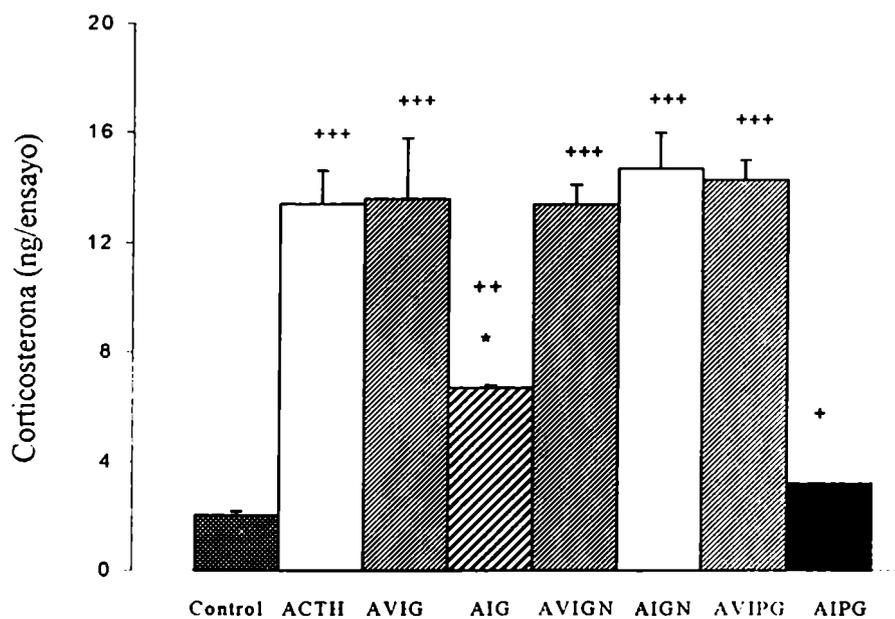


Figura 33. Efecto de IG sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Se prepararon células enriquecidas en fasciculata y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control) ó en presencia de ACTH 1nM sólo ó con el agregado de 20 μ M de IG (AIG), IG tratado con ácido nitroso (AIGN), IPG (AIPG) o sus respectivos vehículos (AVIG, AVIGN, AVIPG). Luego de los tratamientos, se cuantificó corticosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media \pm S.E. de tres experimentos. +++ Significativamente diferente del control $p \leq 0.001$; ++ Significativamente diferente de AVIG $p \leq 0.01$; + Significativamente diferente del AVIPG $p \leq 0.01$; * Significativamente diferente de AIPG $p \leq 0.05$; (ANOVA).

4.5 Transducción de la señal de GPI por ACTH

4.5.1 Evaluación de la participación de una proteína G en la hidrólisis de GPI

Las hormonas y los neurotransmisores regulan una gran variedad de funciones fisiológicas y de condiciones patológicas. En varios casos la señal es transducida al interior de la célula por acoplamiento del receptor a proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G). Por unión de la hormona al receptor se produce su activación y la interacción con la proteína G, disociándose la subunidad α por un lado y el dímero $\beta\gamma$ por otro, lo que finalmente regula a las moléculas efectoras. Existen distintas familias de subunidades α agrupadas en base a homología y función: por ejemplo, α_s estimula adenililciclase produciendo un aumento de la concentración de AMPc intracelular; α_i inhibe adenililciclase y α_q se acopla a fosfolipasa C del subtipo β produciendo un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (198). Se sabe que la toxina de pertussis ADP-ribosila e inhibe a α_i .

Vila y Col. (108) y otros autores (130;199;200) han informado que una proteína G inhibible por toxina de pertussis media la activación por insulina de una fosfolipasa de GPI.

Como se vió ACTH estimula una fosfolipasa C de GPI y provoca la rápida liberación al medio extracelular de FAL, enzima anclada por GPI (sección 4.4.1).

Para investigar la participación de una proteína G en la activación de una GPI-PLC, primero se estudió el efecto de GTP- γ -S, un análogo no hidrolizable de GTP que mantiene la proteína G activada, sobre la liberación de FAL.

Se encontró que GTP- γ -S es capaz de estimular la liberación de esta enzima de preparaciones de membranas adrenocorticales (Figura 34), lo que indicaría que una proteína G media este efecto de ACTH.

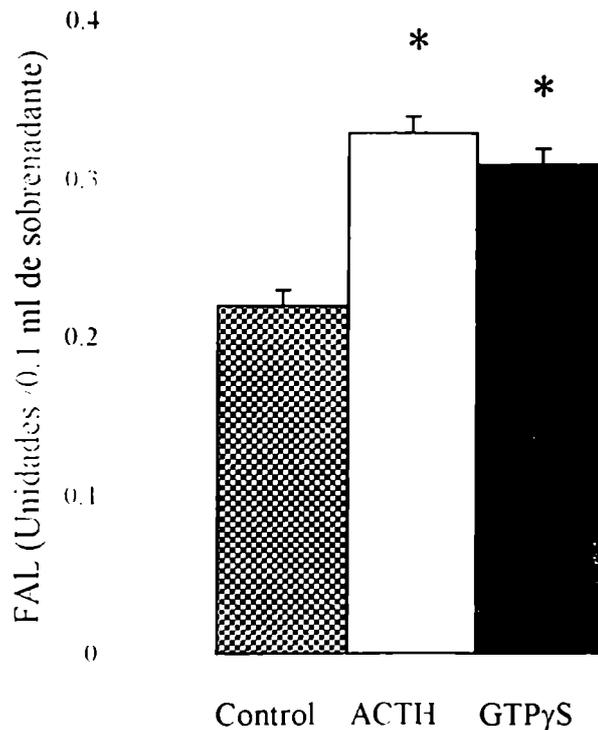


Figura 34. Efecto de GTP- γ -S en la liberación de fosfatasa alcalina.

Las preparaciones de membranas adrenocorticales de rata, se trataron en ausencia (control) o presencia de ACTH 1nM ó GTP- γ -S 10 μ M durante 7 minutos. Luego de la incubación, se centrifugaron las suspensiones celulares y se midió fosfatasa alcalina en los sobrenadantes. * Significativamente diferente del control. $p \leq 0.001$ (ANOVA).

Coincidiendo con estos resultados se ha informado que insulina y GTP- γ -S son capaces de estimular la liberación de FAL de células HEp-2 (195).

La toxina de pertussis produce el desacople del receptor y las proteínas G_i/o por ADP-ribosilación de la subunidad $\alpha_{i/o}$ en un residuo cisteína del dominio conservado carboxi-terminal, por lo que esta toxina es utilizada para investigar si estas proteínas G están involucradas en una respuesta.

Se encontró que por pretratamiento de células adrenocorticales de rata con toxina de pertussis se inhibe la liberación de FAL por ACTH (Tabla VI). El pretratamiento con toxina de pertussis no afectó la liberación de FAL en las células controles.

Tabla VI. Efecto de Toxina de Pertussis sobre la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular de células adrenocorticales de rata.

Pretratamiento	Tratamiento	FAL (unidades/ 0.1ml de sobrenadante)
Vehículo	Ham F-12	0.19 ± 0.01
Vehículo	ACTH	0.31 ± 0.02
Toxina de Pertussis	Ham F-12	0.19 ± 0.01
Toxina de Pertussis	ACTH	0.24 ± 0.01 *

Las células se pretrataron con Toxina de Pertussis ó medio (Vehículo) durante 1 hora y luego se trataron en ausencia (Ham F-12) o presencia de ACTH 1nM durante 7 minutos. Luego de la incubación, se centrifugaron las suspensiones celulares y se midió fosfatasa alcalina en los sobrenadantes. * Significativamente diferente del ACTH pretratado con vehículo. $p \leq 0.001$ (ANOVA).

Esto prueba la participación de una proteína G inhibible por toxina de pertussis en la activación de una fosfolipasa de GPI por ACTH.

Resulta interesante que, de acuerdo a estos resultados, este efecto de ACTH no estaría mediado por la activación de G_s y adenilato ciclasa, que es la vía que media los efectos de la hormona sobre la producción de esteroides, pues de ser así el tratamiento con la toxina de pertussis, que se ha informado que eleva los niveles de AMPc (130), debería aumentar la liberación de FAL por ACTH en lugar de inhibirla.

4.5.2 Evaluación de la activación de fosfodiesterasa por IPG

Como se ha comentado, el AMPc ha sido descrito como mediador intracelular de la acción de un gran número de hormonas, entre ellas, ACTH. La concentración de este mediador en la célula depende de la velocidad de su síntesis mediada por la actividad de adenililciclase y también de la velocidad de su degradación por fosfodiesterasa (PDE). Se conocen varios inhibidores de PDE, entre ellos las metil-xantinas, como 1-metil, 3-isobutilxantina (MIX). Este inhibidor ha sido utilizado como herramienta para evaluar la participación de PDEs en varios sistemas de señales intracelulares (201).

Se informó previamente que IPG activa fosfodiesterasa. En el laboratorio se encontró que IPG produce, en células de glomerulosa bovinas, una disminución significativa de la acumulación de AMPc mediada por ACTH (191).

Para evaluar si el efecto inhibitorio de IPG sobre la respuesta esteroidogénica de ACTH en células adrenocorticales se debe a una activación de fosfodiesterasa se realizaron experimentos con MIX. Se utilizó una concentración de MIX informada previamente (201). Para comprobar que la dosis de MIX utilizada era efectiva, se pretrataron las células adrenocorticales de rata con este inhibidor y luego se agregó una dosis submáxima de ACTH (0.1 nM) que por si sola produce un pequeño aumento de la concentración de esteroide, que se incrementa significativamente por pretratamiento con MIX, lo que prueba la inhibición de PDE y consecuente aumento de la producción de AMPc (Tabla VII). Este efecto de MIX sobre la acumulación de esteroides mediada por dosis submáxima de ACTH fue informado previamente (202).

No se observa un aumento de la concentración de esteroides por pretratamiento con MIX ni en células controles ni en dosis máxima de ACTH.

Tabla VII. Efecto de MIX sobre el efecto inhibitorio de IPG.

Ensayo	Tratamientos	Corticosterona ng / ensayo
1-	Control + Vehículo IPG	14.0 ± 2.5
2-	ACTH + Vehículo IPG	313.0 ± 19.8 +
3-	Control + Vehículo IPG + MIX	12.8 ± 0.7
4-	ACTH + Vehículo IPG + MIX	346.0 ± 40.3 ++
5-	ACTH + IPG	117.0 ± 0.3 ***
6-	ACTH + IPG + MIX	270 ± 19.5 ** #
7-	ACTH subópt.	28.8 ± 0.8
8-	ACTH subópt. + MIX	39.3 ± 0.3 *

Se prepararon células adrenocorticales y se preincubaron en presencia de MIX o medio de incubación durante 15 minutos. Luego se incubaron durante 1 hora en ausencia (control) ó en presencia de ACTH 1nM ó 0.1nM (A subópt.); con agregado de 20 µM de IPG o de vehículo. Luego de los tratamientos, se cuantificó corticosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media ± S.E. de cuatro experimentos. + Significativamente diferente de Control + Vehículo de IPG $p \leq 0.001$; ++ significativamente diferente de Control + Vehículo de IPG + MIX $p \leq 0.001$; *** significativamente diferente de ACTH + Vehículo IPG $p \leq 0.001$; ** significativamente diferente de ACTH + Vehículo IPG + MIX $p \leq 0.001$; # significativamente diferente de ACTH + IPG $p \leq 0.001$; * significativamente diferente de ACTH subópt. $p \leq 0.001$ (ANOVA).

Como puede verse en la Tabla VII, el efecto inhibitorio del IPG sobre la producción de corticosterona mediada por ACTH, disminuye significativamente por pretratamiento con MIX (ensayo 5 vs. 6), aunque no se recupera el valor obtenido con ACTH más vehículo de glicano (ensayo 2). Resultados similares se obtuvieron al medir la producción de aldosterona.

Estos resultados indican que IPG activa PDE en células adrenocorticales, lo cual confirma resultados previos en otros sistemas (129).

El pretratamiento con MIX no parece bloquear totalmente el efecto inhibitorio de IPG, pues no se recupera la acumulación de corticosterona obtenida con ACTH más MIX más vehículo de glicano.

Se ha informado que IPG es capaz de inhibir PKA (131). Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que el pretratamiento de células adrenocorticales con IPG es capaz de bloquear la síntesis de aldosterona mediada por ACTH y por dibutilil-AMPc, lo que sugiere que IPG es capaz de inhibir un paso posterior a la acumulación de AMPc, posiblemente PKA (191).

Tomando estos resultados en conjunto, se infiere que el efecto inhibitorio de IPG es mediado en parte por activación de PDE y en parte por inhibición de PKA.

Discusión

Se ha encontrado que un IPG purificado de *T. cruzi* con estructura químicamente definida es capaz de inhibir el aumento provocado por ACTH en la producción de aldosterona y corticosterona en células adrenocorticales de rata y cortisol en células adrenocorticales de vaca. La dosis inhibitoria encontrada, es similar a la informada previamente con IPGs de distintos sistemas (107) y, también, coincide con la utilizada para(124;191;192) otros segundos mensajeros, agregados exógenamente a células intactas.

La pérdida del efecto inhibitorio por tratamiento del IPG con ácido nitroso prueba que esta molécula es la responsable del efecto.

El IPG de *T. cruzi* utilizado en estos estudios posee la estructura mínima conservada en los IPGs de distintas fuentes, algunos de los cuales se probado que actúan como mediadores intracelulares en

diferentes sistemas. En el año 1992, Plourde y col. (203) probaron que una molécula sintética cuya estructura consiste en glucosaminil-inositol-1,2-fosfato cíclico, llamada 'disacárido mimificador de insulina', es capaz de estimular la lipogénesis en adipocitos de rata; que este efecto es dependiente de la dosis en el rango de concentraciones del orden de micromolar; y que produce un efecto que alcanza el 40% de la acción máxima de insulina, lo cual, según se ha propuesto, podría deberse a la falta de la estructura completa del 'core' de los IPGs. Este es el primer informe acerca de la relación de estructura y función de los IPGs.

Recientemente, Frick y col. evaluaron 1) la reproducción de efectos de insulina por IPGs sintéticos de distinto tamaño, derivados de la estructura del ancla de GPI de la proteína Gce1p de *S. cerevisiae*, que se muestran a continuación:

- IPG-41 HO-SO₂-O-6Man α 1(Man α 1-2)-2Man α 1(6-HSO₃)-6Man α 1-4GlcN β 1-6(D)inositol-1,2-fosfato cíclico
- IPG-37 HO-PO(H)O- 6Man α 1(Man α 1-2)-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN β 1-6(D)inositol-1,2-fosfato cíclico
- IPG-7 HO-PO(H)O-6Man α 1-4GlcN α 1-6(L)inositol-1,2-fosfato cíclico
- IPG-1 HO-PO(H)O- 6Man α 1-4GlcN α 1-6(L)inositol

Los autores demostraron que algunos de estos IPGs son capaces de reproducir efectos de insulina relacionados con el metabolismo de lípidos y de hidratos de carbono en células y tejidos blanco de insulina (192;204;205). Se ha visto que los IPGs que contienen en sus glicanos cuatro manosas unidas al glucosaminil-inositol fosfato cíclico, IPG-41 e IPG-37, (en concentración 20 μ M) estimulan la lipogénesis hasta un 90% de la respuesta máxima de insulina, aunque se requieren diferentes concentraciones de estos compuestos para producir un 50% de activación (EC₅₀ 2.5 +/- 0.9 vs 4.9 +/- 1.7 μ M). Lo mismo ocurre sobre la actividad de glucógeno sintetasa (4.7 +/- 1 vs 9.5 +/- 1.5 μ M) y de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (3.5 +/- 0.8 vs 8.0 +/- 1.1 μ M). El

compuesto 7, que contiene una sólo manosa, fue mucho menos potente (20% de la respuesta máxima de insulina en concentración 100 μ M), mientras que el compuesto 1, que no posee el fosfato cíclico, fue prácticamente inactivo. Este orden relativo entre los IPGs (41 > 37 >> 7 > 1) para reproducir los efectos de insulina antes mencionados también se observó para: (i) la activación del transporte de glucosa y la translocación del transportador (isoforma 4 regulable por insulina) en adipocitos normales y resistentes a insulina, (ii) inhibición de la lipólisis en adipocitos, (iii) estimulación del transporte de glucosa y de la síntesis de glucógeno en diafragmas normales y resistentes a insulina, y (iv) inducción de la fosforilación en tirosina del receptor de insulina y del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) en diafragmas.

Estos resultados demuestran que se requiere la estructura completa del 'core' de IPG, incluyendo la manosa adicional y la unidad de inositol fosfato, para la máxima actividad reproductora de la acción de insulina, con algunas variaciones que podrían deberse al tipo de residuos unidos a la manosa o a los tipos de uniones.

Teniendo en cuenta estos datos, cabe destacar que, el IPG de *T. cruzi* utilizado en este trabajo de Tesis tiene cuatro manosas unidas al glucosaminil-inositol y todos los enlaces glucosídicos presentes en esta estructura coinciden con los conservados en las anclas naturales.

Por otro lado, resultados del laboratorio habían mostrado que la inhibición de IPG sobre la producción de aldosterona estaba acompañada de una disminución de los niveles de AMPc intracelulares. Teniendo esto en cuenta, se investigó si IPG activa PDE, enzima que degrada AMPc.

Utilizando un conocido inhibidor de esta enzima, MIX, se probó que la activación de PDE era necesaria en la respuesta de IPG, aunque parte del efecto inhibitorio se mantuvo en presencia de este inhibidor, lo que sugiere que IPG también podría inhibir un paso posterior a la

producción de AMPc, confirmando los resultados previos (191). El sitio de acción de IPG en este caso podría ser PKA, teniendo en cuenta algunos trabajos donde se encuentra que IPG es capaz de inhibir la actividad de la subunidad catalítica de PKA *in vitro* (131;155). También la activación de PDE por IPG había sido previamente propuesta en otros sistemas (129);(107) (194).

Estos efectos intracelulares de IPG parecen descartar que su inhibición se deba a una disminución de la unión de ACTH a su receptor. Confirmando este hecho, se encontró que el efecto inhibitorio de IPG se mantiene aunque se aumente la concentración de ACTH de 1 nM a 1 mM lo que descarta al menos una competencia entre ACTH e IPG por unión al receptor. Además, es sabido que IPG es liberado al espacio extracelular, se une a receptores de membrana específicos y requiere de energía para entrar en la célula donde ejerce su acción (135-137). Se ha informado, también, que el IPG es capaz de reproducir ciertos eventos intracelulares de la señal de insulina en células que poseen el receptor de la hormona inactivado (205).

Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados IPG sería capaz de inhibir la acumulación de esteroides mediada por ACTH, debido a una disminución de los niveles de AMPc intracelulares por activación de PDE y probablemente también a un bloqueo de PKA, como se propone en el modelo de la Figura 35.

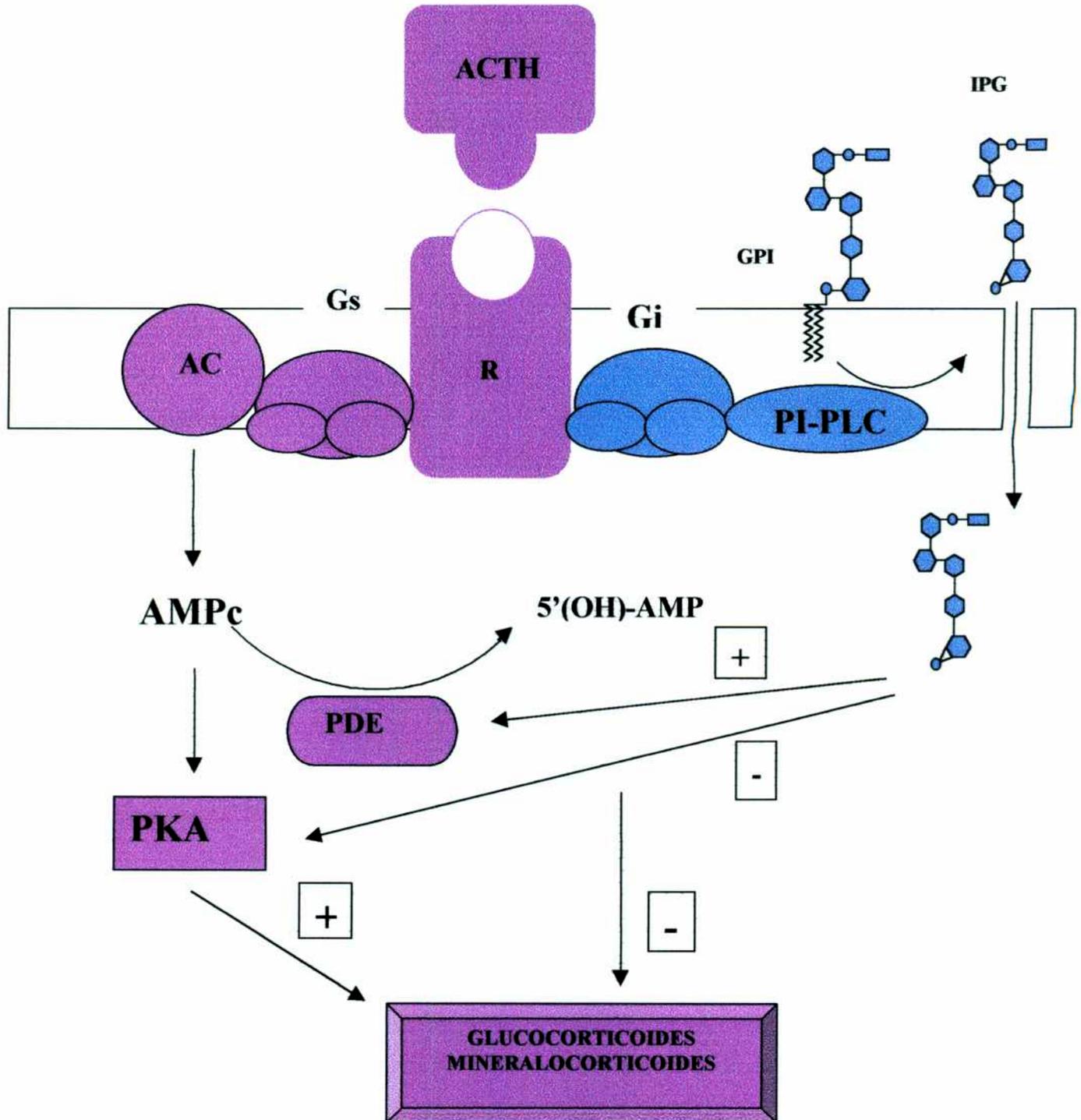


Figura 35. Esquema que ilustra el mecanismo de acción postulado para ACTH. (■) camino conocido; (■) camino postulado.

Se ha demostrado que ACTH aumenta la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular y la liberación de ceramida a partir de un GPI de estructura química definida, LPPG; lo que indica la activación por la hormona de una PLC capaz de hidrolizar GPI.

En cambio, no se encontró activación de GPI-PLD; de todos modos, el IG que se produciría por activación de esta fosfolipasa o por defosforilación de IPG, también inhibe la producción de aldosterona y corticosterona en células adrenocorticales de rata aunque este efecto es menor que el de IPG.

De acuerdo con estos resultados el fosfato presente en la molécula de IPG es importante para su efecto biológico como se encontró anteriormente (107;204) aunque si el fosfato es selectivamente hidrolizado, no se pierde por completo la inhibición.

La activación de GPI-PLC por ACTH está mediada por una proteína G inhibible por toxina de pertussis, que podría ser G_i o G_o . Se ha visto que proteínas G inhibibles por toxina de pertussis también median la activación de GPI-PLC por insulina y de acuerdo a resultados previos podría ser G_i . Es decir, que este efecto de ACTH no estaría mediado por activación de G_s e implicaría el acople del receptor de la hormona a distintas proteínas G.

En concordancia, muy recientemente han aparecido trabajos en la bibliografía describiendo la participación de más de un tipo de proteína G en la respuesta generada a través de distintos receptores como los receptores β -adrenérgicos (β_2 y β_3); dopaminérgicos (D2S); de esfingosina 1-fosfato y de las hormonas TSH y de LH (198;206-210). En varios de estos casos las proteínas G involucradas son G_i y G_s . Se ha encontrado que la respuesta via G_i , tanto del receptor β_2 adrenérgico en células HEK293 como del receptor β_3 adrenérgico en adipocitos, inhibe la

respuesta de estos receptores mediada por Gs, lo cual coincide con los resultados presentados para el receptor de ACTH.

Hasta aquí hemos probado que ACTH activa GPI-PLC lo cual liberaría un IPG de células adrenocorticales, que de acuerdo a lo encontrado con el IPG de *T. cruzi*, inhibiría la acción de la hormona. Esta liberación se confirmó por el agregado de anti-CRD, que reconoce IPG, a células intactas, lo cual aumentó la producción de esteroides por ACTH. Estos resultados muestran la presencia de un IPG endógeno que inhibe *in vivo* la respuesta de la hormona.

Es interesante destacar que dado que las moléculas de IPG tienen una estructura conservada y conocida es posible la síntesis de estas moléculas y podrían ser utilizadas farmacológicamente para inhibir ésta u otras respuestas mediadas por AMPc. Más aún, esta molécula resiste pH entre 2 y 3 lo cual, permitiría su administración por vía oral, por lo cual estos resultados podrían también tener relevancia desde el punto de vista terapéutico, teniendo además en cuenta que la inhibición por IPG de la respuesta mediada por AMPc ha sido informada en distintos trabajos y en otros sistemas (111;132;133).

Se ha visto por ejemplo que IPG, igual que insulina inhibe la actividad de la glucógeno sintetasa estimulada por glucagon (124), cuya señal es mediada por AMPc. Insulina, hormona hipoglucemiante, media sus efectos metabólicos en parte disminuyendo los niveles intracelulares de AMPc, que es el segundo mensajero de varios agentes hiperglucemiantes, entre los cuales se encuentra el glucagon. Es decir, que algunos efectos de insulina pueden ser mimificados por IPG, lo cual haría posible la utilización del IPG como una droga para el tratamiento de una enfermedad de alta incidencia en la población como es la diabetes. En concordancia con este hecho, se ha visto que en ratas en las que se induce diabetes por tratamiento con estreptozotocina, se encuentran

disminuídos tanto el contenido de GPI en hepatocitos como la hidrólisis de estos compuestos por insulina.

Si bien se requiere de más investigaciones para evaluar la factibilidad de IPG como fármaco, este compuesto es potencialmente útil desde el punto de vista terapéutico.

Capítulo 5. Estudios de GPIs y sus precursores en *S. pombe*

Como se ha visto, se utilizaron GPIs purificados de *Trypanosoma cruzi* para evaluar su participación en la señal de ACTH en células de corteza adrenal. Resultó conveniente buscar una nueva fuente para la obtención de estos compuestos que fuera de más fácil manipulación experimental y donde los GPIs pudieran ser abundantes.

Existen informes de bibliografía en los que se ha utilizado el GPI proveniente de la proteína Gce1p de *Saccharomyces cerevisiae* para estudiar su rol en la respuesta de insulina. Varias proteínas de *S. cerevisiae* están ancladas a la membrana por GPI. Hasta el presente, ésta es la única levadura cuyos GPIs han sido estudiados. Los estudios iniciales sobre los componentes lipídicos de las anclas de GPI mostraron la presencia tanto de GPIs con lípidos sensibles al tratamiento alcalino suave (glicerolípidos) como con lípidos resistentes determinados como fitoceramidas (50;149). En la mayoría de las proteínas, el reemplazo del glicerolípidos de su ancla por ceramida ocurre en el Golgi (42;149;150). Sin embargo, en algunas proteínas, como Gas1, esta modificación no ocurre (49); en cambio, su GPI mantiene el glicerolípidos con un ácido graso de cadena larga (C26) en la posición sn-2 (50). Este ácido graso se encuentra normalmente como componente de fitoceramidas (211).

En base a estos antecedentes, se abordó el estudio de GPIs y sus precursores en otra levadura, *Schizosaccharomyces pombe*. Algunos aspectos bioquímicos han establecido cierta similitud de este organismo con mamíferos (155;156).

El interés por el estudio de los inositolfosfolípidos se basa en que estos compuestos constituyen la porción lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Resultó interesante investigar si, esta levadura posee IPC como *S. cerevisiae* o si en cambio, estos compuestos están ausentes como es el caso en mamíferos.

Con el objeto de estudiar los GPI y sus precursores, se marcaron los lípidos por incorporación de ácido [9,10 (n)³H]-palmítico. Las levaduras fueron precultivadas en medio mínimo y en crecimiento exponencial se marcaron metabólicamente con ácido [³H]-palmítico durante 18 horas, como se detalla en la sección 2.22.

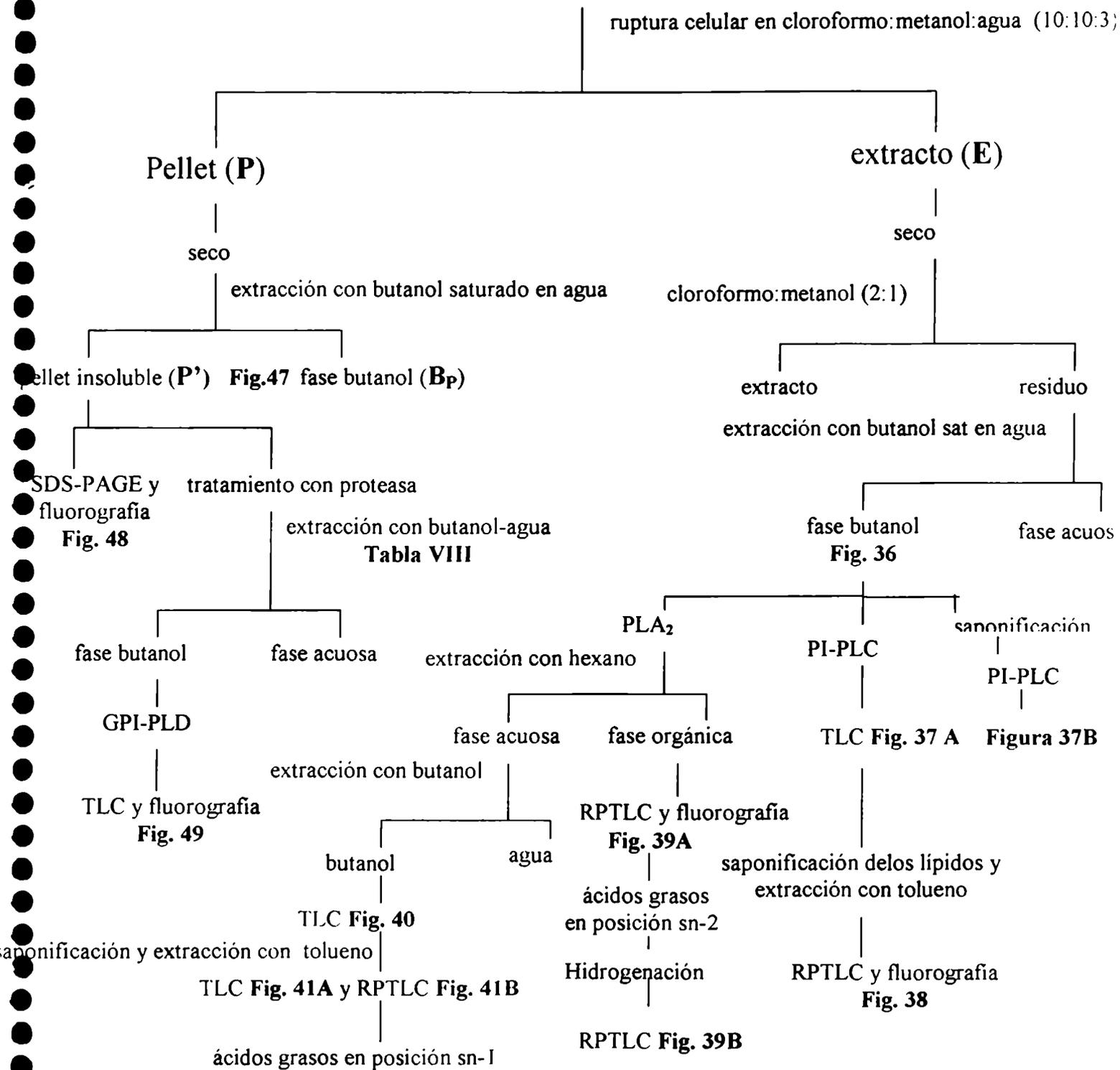
Una de las metodologías más utilizadas para la purificación de GPIs, dado la polaridad de estos lípidos, es su extracción, luego de la ruptura celular, con una mezcla de cloroformo:metanol:H₂O (10:10:3 v/v).

Se obtuvo un pellet insoluble (P) y un extracto clorofórmico (E). Se analizaron los lípidos presentes en este extracto (esquema 3).

5.1 Determinación de la estructura de IPLs de *S. pombe*

Los compuestos menos polares se extrajeron de E con cloroformo:metanol 2:1. El insoluble se suspendió en agua y se extrajo con butanol. La mayor parte de la radioactividad se recuperó en la fase orgánica en una proporción de 90:1. Se analizaron los lípidos presentes en la fase butanólica mediante TLC en sílica gel.

Incorporación de [³H]- ácido palmítico en células de *Schizosaccharomyces pombe* (1x10⁹)



Esquema 3

Extracción y purificación de inositol fosfolípidos y proteínas ancladas por GPI en *Schizosaccharomyces pombe*.

Una alícuota de esta fracción se cromatografió utilizando como solvente de desarrollo cloroformo:metanol:H₂O (10:10:3 v/v), solvente A, Figura 36A. Se observan dos manchas de igual movilidad que una mezcla de [³H]-inositol fosfolípidos de estructura definida purificada de *Trypanosoma cruzi* (53) sembrada como estandar, lo cual sugiere la presencia de este tipo de lípidos en la muestra. Además, se observa una mancha de mayor movilidad, que migra como ácido graso, que podría ser precursor no metabolizado.

La mezcla de [³H]-inositol fosfolípidos purificada de *Trypanosoma cruzi* posee ceramida como componente lipídico mayoritario y glicerolípidos en menor proporción. Estos compuestos no se resuelven con el solvente A, sin embargo, pueden ser resueltos en el solvente B, como se informó previamente (53). Por ello, se cromatografió la muestra, en forma preparativa, utilizando este solvente (Figura 36B).

Como puede verse, se observan bandas a la altura de PI, aunque también aparecen otros componentes minoritarios de menor movilidad.

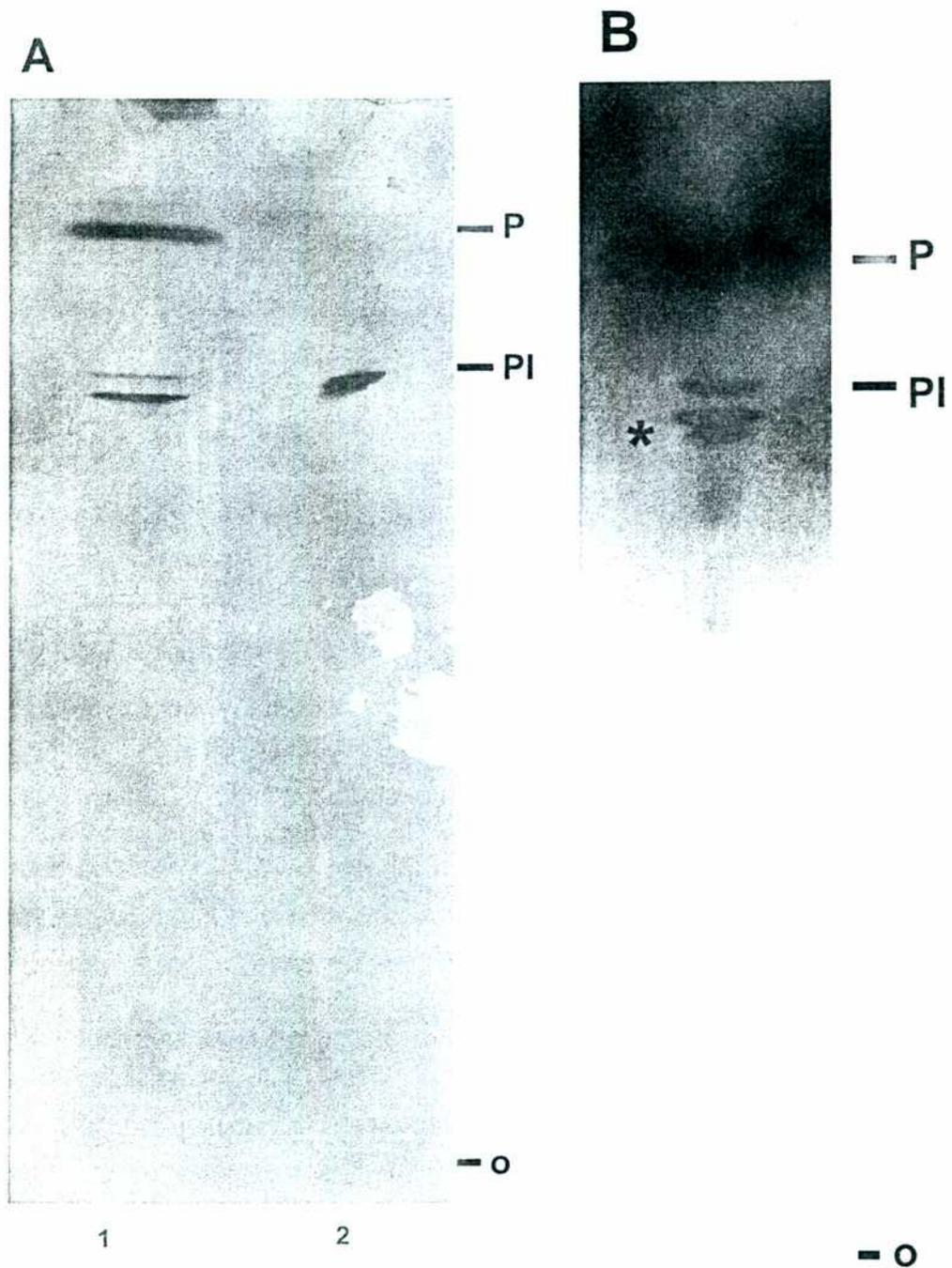


Figura 36. Análisis de los lípidos de la fase butanólica obtenida a partir del extracto (E) proveniente de la marcación metabólica en cultivos de *S. pombe*.

Luego de la marcación, las células de levaduras en cultivo se disgregaron en cloroformo:metanol:agua (10:10:3 v/v). La fracción soluble (E) se evaporó y se extrajo con cloroformo:metanol 2:1, como se muestra en el esquema 3, y el residuo se particionó en butanol-agua. La fase orgánica se analizó por TLC en sílica gel con A) cloroformo:metanol:agua (10:10:3 v/v) como solvente. Calle 1: muestra, calle 2: mezcla radioactiva de inositol fosfolípidos e inositol fosfoceramidas (IPL-IPC*) purificada de *Trypanosoma cruzi*, utilizados como estándares. B) cloroformo:metanol:NH₄OH (15:10:2 v/v) como solvente de desarrollo. Estándares : PI, fosfatidilinositol; P, ácido palmítico.

Dado que, en *Saccharomyces cerevisiae* las inositol fosfoceramidas son muy abundantes (212;213), se pensó que alguno de los compuestos de *S. pombe* que migraron a la altura de PI en las Figuras 38A y 38B podrían corresponder a inositol fosfoceramidas. Como además en el solvente B las inositol fosfoceramidas tienen un R_f levemente menor que los inositol fosfoglicerolípidos, se eluyó de la placa la doble banda de menor movilidad, señalada en la Figura 36B.

Los compuestos eluidos se trataron con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis*, que actúa sobre inositolfosfolípidos independientemente de que el lípido sea ceramida, acil- o alquil-glicerol (27). Se realizaron controles sin tratamiento con enzima.

Se encontró que estos compuestos fueron susceptibles a la acción de PI-PLC (Figura 37). Al analizar los lípidos liberados, por TLC utilizando el solvente C (Figura 37A), se observó una banda más fuerte (I) y otra más tenue (II) con igual movilidad que estándares de diacil- y alquilacil-glicerol, que no se resuelven bien en este sistema, pero no se encontró ceramida como producto de la hidrólisis. Estos resultados indican la presencia de glicerolípidos en los [³H]-IPLs de *Schizosaccharomyces pombe*.

Por otra parte, los [³H]-IPLs se saponificaron y extrajeron con tolueno antes del tratamiento con PI-PLC, seguido del análisis por TLC en las mismas condiciones que en la Figura 37A, (Figura 37B, calle 2). Por saponificación se hidrolizan los grupos acilos; en cambio, los grupos alquilos son resistentes a este tratamiento. Se observó una mancha a la altura de los ácidos grasos y no se detectó ningún compuesto a la altura de alquilglicerol, (Figura 37B). Estos resultados indican que los [³H]-IPLs contienen mayoritariamente diacilglicerol.

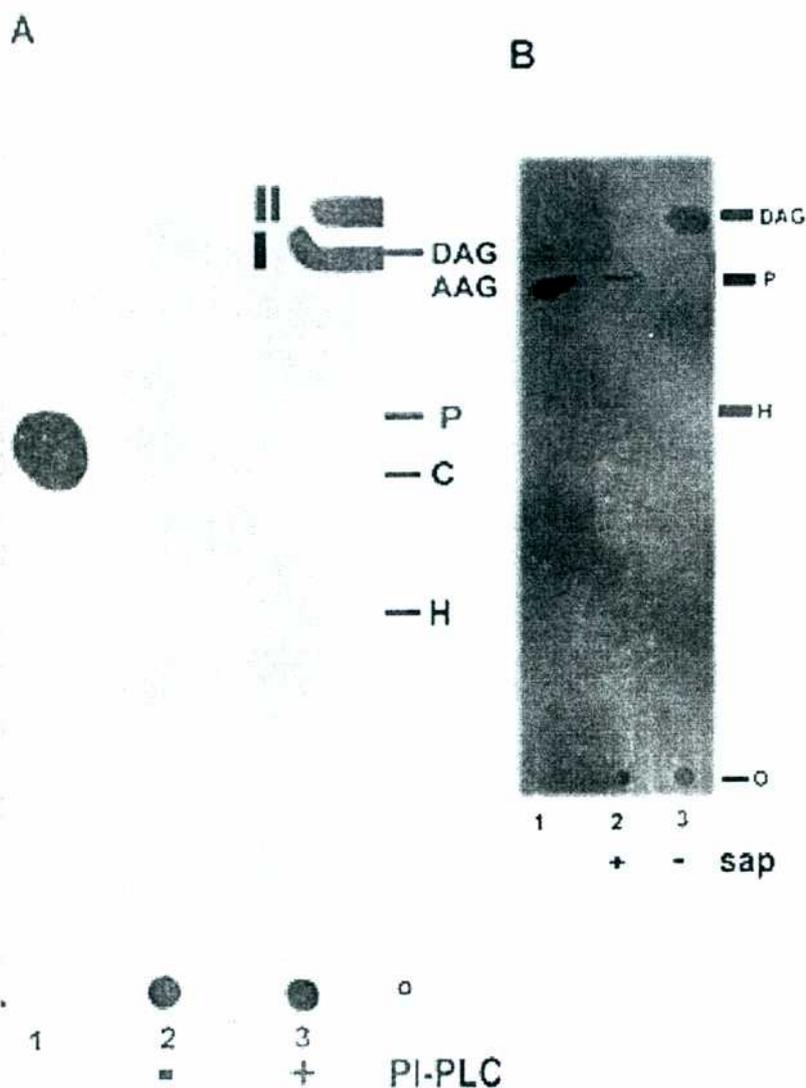


Figura 37. Análisis de los lípidos liberados por acción de PI-PLC sobre los [3 H]-IPLs de *Schizosaccharomyces pombe*.

Los IPLs presentes en la mancha de menor movilidad señalada (*) en la Figura 36B, se eluyeron de la placa y A) se hidrolizaron con PI-PLC de *Bacillus thuringiensis*. Los lípidos liberados por la enzima se extrajeron con butanol y cromatografiaron con cloroformo:metanol (38:3 v/v) como solvente de desarrollo. Calle 1, [3 H]-ácido palmítico; calle 2, [3 H]-IPLs (blanco sin enzima); calle 3, tratamiento con PI-PLC; B) se saponificaron (calle 2) o no (calle 3) antes del tratamiento con la fosfolipasa y luego se trataron como en la parte A) Calle 1, [3 H]-ácido palmítico. sap: saponificación. Estándares: DAG, 1,2-di-O-miristoilglicerol; AAG, 1-O-hexadecil-2-O-palmitoil-glicerol; C, ceramida (lignoceroil-dihidroesfingosina); H, 1-O-hexadecilglicerol; P, ácido palmítico.

Para confirmar la naturaleza de los glicerolípidos presentes en los IPLs, las dos bandas (I y II) de la Figura 37A, producto de hidrólisis con PI-PLC, se eluyeron por separado y se saponificaron, seguido de extracción con tolueno. Los ácidos grasos extraídos con tolueno se metilaron y analizaron en RPTLC (Figura 38A). Las calles 1 y 2 representan los ácidos grasos provenientes de la banda más intensa (I) y más tenue (II) de la Figura 37A, respectivamente. En los dos casos se observó una mancha principal de igual movilidad a los estándares de metil-ésteres de los ácidos grasos de 16:0 y 18:1, que no se diferencian entre sí en este sistema. Se observó además una banda a la altura de los estándares de 14:0 y 16:1 como componentes del glicerolípidos I, calle 1.

Para confirmar la ausencia de alquilglicerol, luego de la saponificación, las fases acuosas obtenidas se juntaron y se extrajeron con butanol para su posterior análisis por TLC en un sistema que distinga entre alquilglicerol y ácidos grasos (Figura 38B). Sólo se observó ácido graso que había quedado luego de la extracción con tolueno. Estos resultados prueban que los [^3H]-IPLs de *Schizosaccharomyces pombe* contienen diacilglicerol, no se encontró alquilacil-glicerol ni ceramida.

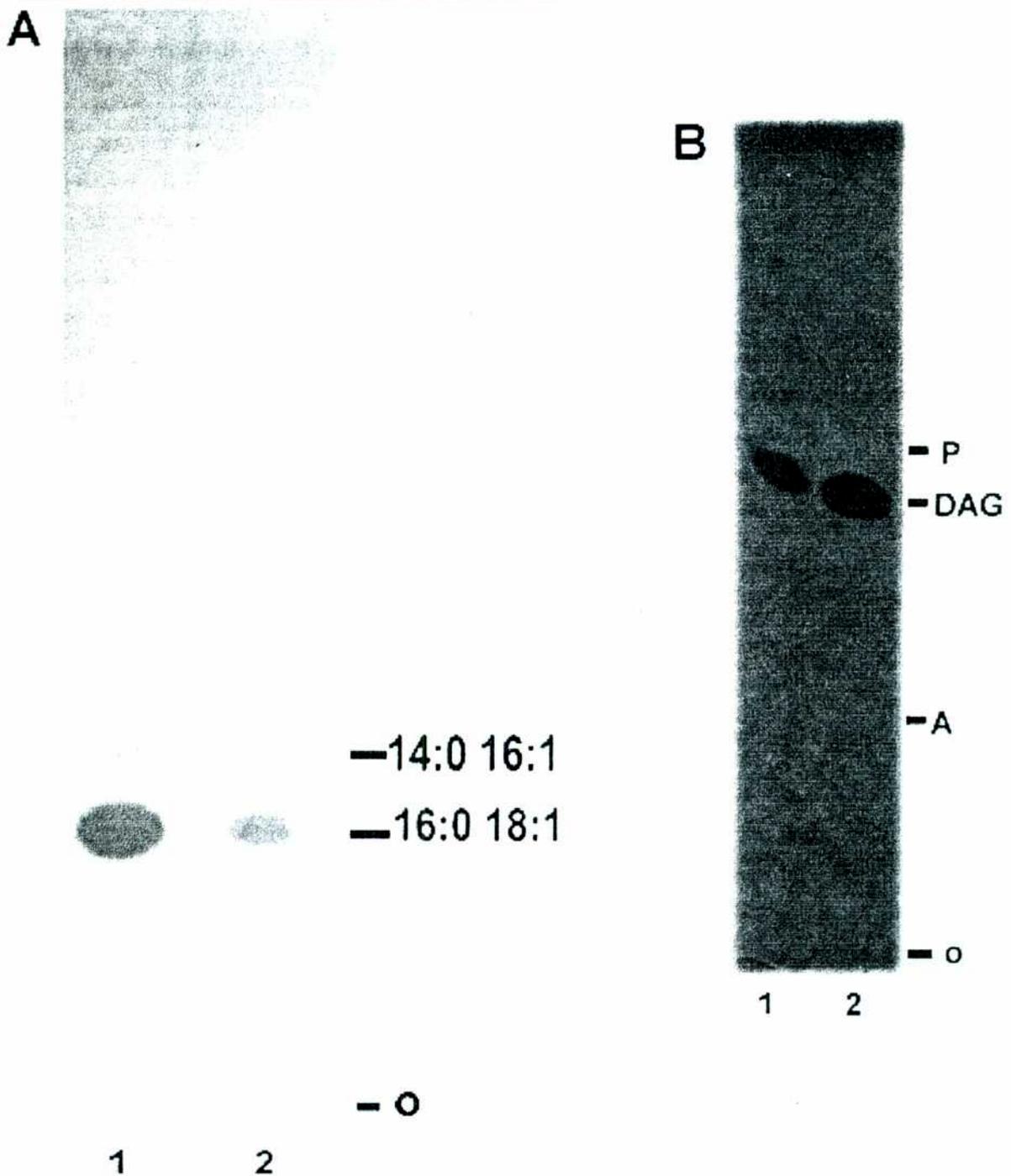


Figura 38. Análisis de los [^3H]-ácidos grasos liberados de DAG proveniente de los [^3H]-IPLs de *S. pombe*.

A) Los lípidos I y II que migraron como DAG en la Figura 37A se saponificaron. Los ácidos grasos liberados se extrajeron con tolueno, se metilaron y analizaron por RPTLC. Calle 1: ácidos grasos saponificados del lípido I; calle 2: ácidos grasos saponificados del lípido II. Solvente de desarrollo, acético:acetonitrilo (1:1 v/v). Estándares: C14:0, C16:1, C16:0, C18:1, metil ésteres de ácido mirístico, ácido palmítoleico, ácido palmítico y ácido oleico, respectivamente. B) Las fases acuosas obtenidas luego de la extracción con tolueno en A) se juntaron y extrajeron con butanol. Los lípidos extraídos se analizaron por TLC en el solvente G (calle 2). Calle 1: [^3H]-ácido palmítico. Estándares: P, ácido palmítico; DAG, diacilglicerol; A, alquilglicerol.

Los componentes minoritarios de menor R_f que PI, (Figura 36B), se eluyeron con el objeto de analizar la susceptibilidad de los mismos a PI-PLC. De ser susceptibles, podría tratarse de otros precursores de GPI más polares, es decir, glicosilados. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los lípidos originales y luego del tratamiento con enzima, indicando que no se trata de compuestos con la estructura general de inositol fosfolípidos.

5.1.1 Esterificación de la posición sn-2 de los [^3H]-IPLs

Con el objeto de estudiar los ácidos grasos presentes en los [^3H]-IPLs, se realizó una hidrólisis con PLA₂. Esta enzima libera el grupo acilo de la posición sn-2 quedando el correspondiente lisoglicerolípido.

Los [^3H]-IPLs purificados por TLC como se describió anteriormente, se incubaron con PLA₂, seguido de una primera extracción con hexano. Los [^3H]-ácidos grasos liberados, se metilaron y luego se analizaron en RPTLC, Figura 39A. Se distinguió una banda principal con R_f coincidente con estándares de 16:0 ó 18:1 y una banda más tenue coincidente con estándares de 14:0 ó 16:1.

Se investigó si la banda principal observada en la Figura 39A correspondía a 16:0, a 18:1 ó a ambos ácidos grasos. Con este propósito, la mitad de la muestra eluída de la Figura 39A a la altura de los estándares de 16:0 y 18:1, correspondiente a los [^3H]-ácidos grasos metilados, se hidrogenó y analizó en RPTLC junto con el resto de la muestra sin hidrogenar (Figura 39B).

De observarse una diferencia en las movilidades de las muestras que fueron o no hidrogenadas, ésta revelaría insaturación indicando la presencia de 18:1 en posición sn-2; mientras que, ninguna diferencia de

movilidad entre las muestras sería lo esperado si el ácido graso que esterificaba la posición sn-2 fuera palmítico.

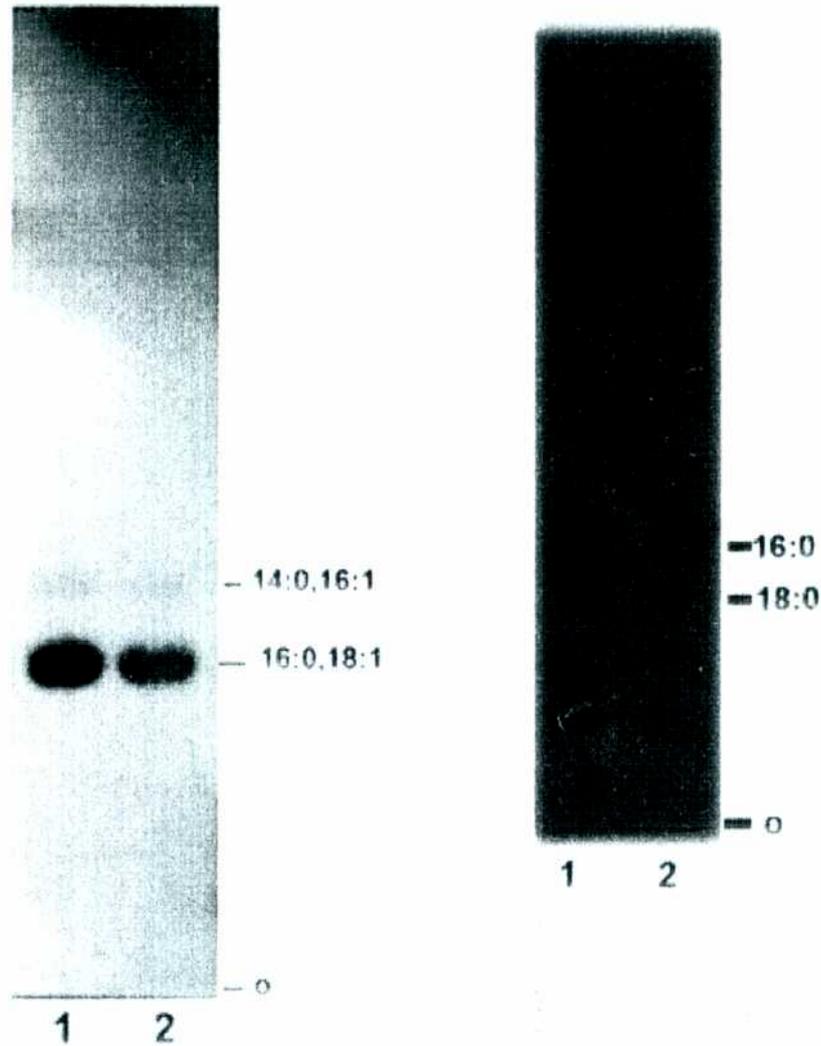


Figura 39. Análisis de los ácidos grasos liberados por acción de PLA₂ sobre los [³H]-IPLs *Schizosaccharomyces pombe*.

Los IPLs presentes en la mancha de menor movilidad señalada (*) en la Figura 36B se eluyeron de la placa y se hidrolizaron con PLA₂, seguido de extracciones sucesivas con hexano. A) Los lípidos extraídos con hexano se metilaron y cromatografiaron en RPTLC, calle 1. Calle 2: [³H]-ácido palmítico. B) Los ácidos grasos metilados que comigraron en la placa de fase reversa mostrada en A) con los estándares C16:0, C18:1, se eluyeron y se sometieron o no a hidrogenación. Los productos se analizaron por RPTLC; solvente de desarrollo: ácido acético:acetonitrilo (1:1 v/v). Calle 1, muestra sin hidrogenar; calle 2, muestra hidrogenada. Estándares: C14:0, C16:1, C16:0, C18:1, metil ésteres de ácidos grasos.

La cromatografía de la muestra hidrogenada (Figura 39B) presenta una mancha principal que comigra con la muestra sin hidrogenar, indicando que el ácido graso mayoritario en posición sn-2 corresponde a palmítico (16:0). Se observa también una mancha menor en la muestra hidrogenada que comigra con el estándar de 18:0, consistente con la incorporación de ácido oleico en posición sn-2 de los [^3H]-IPLs, aunque en mucha menor proporción que ácido palmítico.

Con respecto a la mancha más tenue presente en la Figura 39A, que comigraba con 16:1 y 14:0, no se confirmó su estructura dado que no representó cantidad suficiente para ser sometida a hidrogenación.

Estos resultados confirman la esterificación del oxhidrilo en posición 2 del glicerol y revelan la estructura de los [^3H]-ácidos grasos de la posición sn-2 de los [^3H]-IPLs.

5.1.2 Esterificación de la posición 1 de los [^3H]-IPLs

A continuación, se quiso estudiar la naturaleza y tipo de unión del ácido graso presente en la posición sn-1 de los [^3H]-IPLs.

Se realizó una extracción con butanol de las muestras acuosas obtenidas luego de hidrolizar los [^3H]-IPLs con PLA₂ y se analizaron los extractos en TLC (Figura 40). La calle 5 corresponde al tratamiento con enzima. La calle 4 corresponde al blanco sin enzima. La fluorografía reveló dos manchas a y b, comenzando desde el origen, que aparecen en la fase butanólica luego de la hidrólisis por PLA₂, de R_f menor que los [^3H]-IPLs, lo cual es consistente con la presencia de [^3H]-lisoglicerolípidos en esta muestra. En la muestra tratada apareció también una mancha que migra cercano al frente de la placa que corresponde a [^3H]-ácidos grasos libres de posición sn-2 no extraídos

totalmente por hexano. Sin embargo queda compuesto original luego del tratamiento, lo cual podría deberse a insuficiente tiempo de incubación con la enzima o a la presencia de otros compuestos de movilidad similar a PI. En las calles 2 y 3 se sembró el doble de muestra.

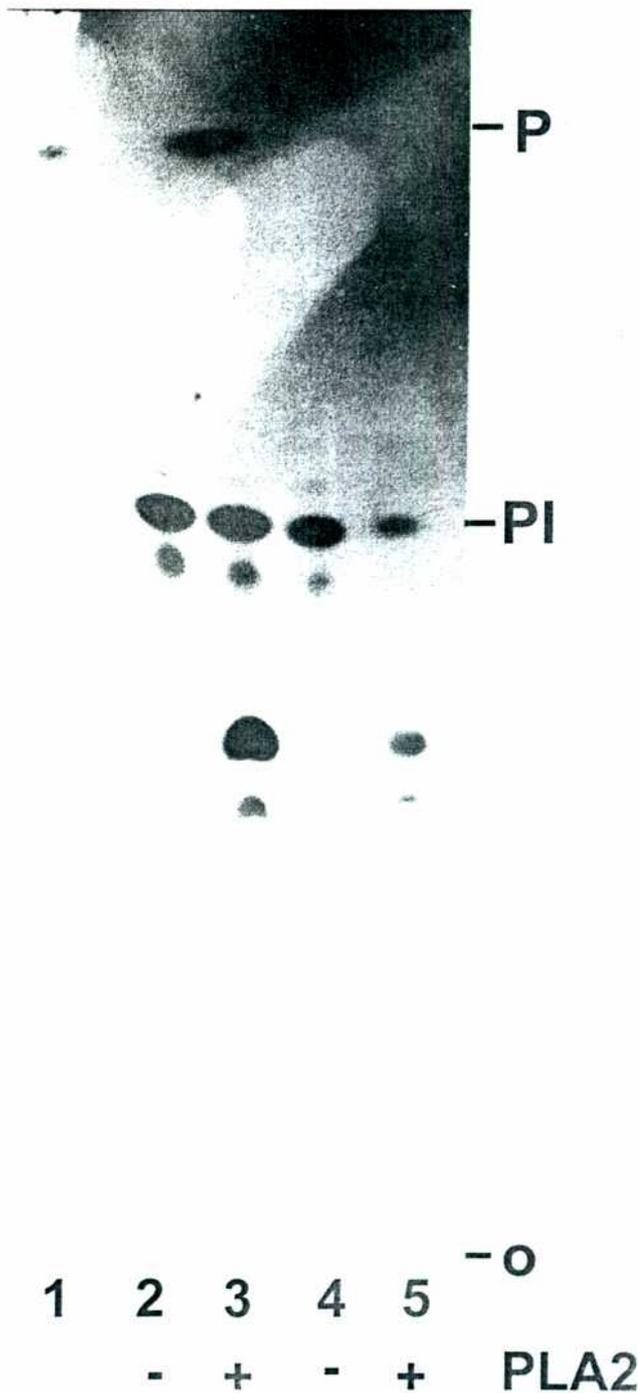


Figura 40. Análisis de los lisoglicerolípidos liberados por acción de PLA₂ sobre los [³H]-IPLs *Schizosaccharomyces pombe*.

Los IPLs presentes en la mancha de menor movilidad señalada (*) en la Figura 36B se eluyeron de la placa y se hidrolizaron con PLA₂, seguido de extracciones sucesivas con: hexano (Figura 39 A y B) y butanol. Los extractos butanólicos provenientes de muestras tratadas con PLA₂ (calle 5) o sin tratar (calle 4) se cromatografiaron en TLC, solvente B, seguido de fluorografía. Calles 2 y 3: doble de muestra sembrada; calle 1: [³H]-ácido palmítico. Estándares: P, ácido palmítico, PI, fosfatidilinositol.

Los [^3H]-lisoglicerolípidos **a** y **b**, (Figura 40), fueron sometidos a saponificación y posterior extracción con tolueno para analizar los ácidos grasos de la posición 1. Una alícuota menor se guardó como control sin saponificar. Con este tratamiento se evaluó además, la existencia de alquilacil-gliceroles en la población de [^3H]-IPLs, ya que, éstos serían resistentes a saponificación. La radioactividad se recuperó totalmente (100 %) en la fase orgánica sugiriendo la ausencia de [^3H]-lisopalquilglicerol en el lípido. Se analizaron los lípidos antes y después de la saponificación por TLC (Figura 41A), en las mismas condiciones de la Figura 40.

Como puede verse, aparecen manchas que comigran con ácidos grasos tanto liberados del lípido **a** como del lípido **b**, calles 3 y 5 respectivamente. Se observa el lípido **b** en la muestra no saponificada (calle 4); sin embargo, la baja cantidad de muestra no permitió visualizar al lípido **a** sin tratar, su presencia se confirmó por elución de la sílica y conteo de la radioactividad.

Las muestras de las calles 3 y 5, que corresponden a los [^3H]-ácidos grasos liberados de posición sn-1 de los [^3H]-lisoglicerolípidos **a** y **b**, fueron eluidas de la sílica para su posterior análisis en RPTLC con el solvente FB (Figura 41B). Puede notarse que el ácido graso de menor movilidad en RPTLC (Figura 41B) es el que proviene del lisoglicerolípidos **b**, que fue el de mayor movilidad en TLC (Figura 40).

A diferencia de lo observado para la posición sn-2 de los [^3H]-IPLs, a juzgar por el análisis en RPTLC (Figura 41B) habría al menos dos ácidos grasos diferentes en posición sn-1, que serían 14:0 y/o 16:1 proveniente del lípido **a** y 16:0 y/o 18:1 proveniente del lípido **b**.

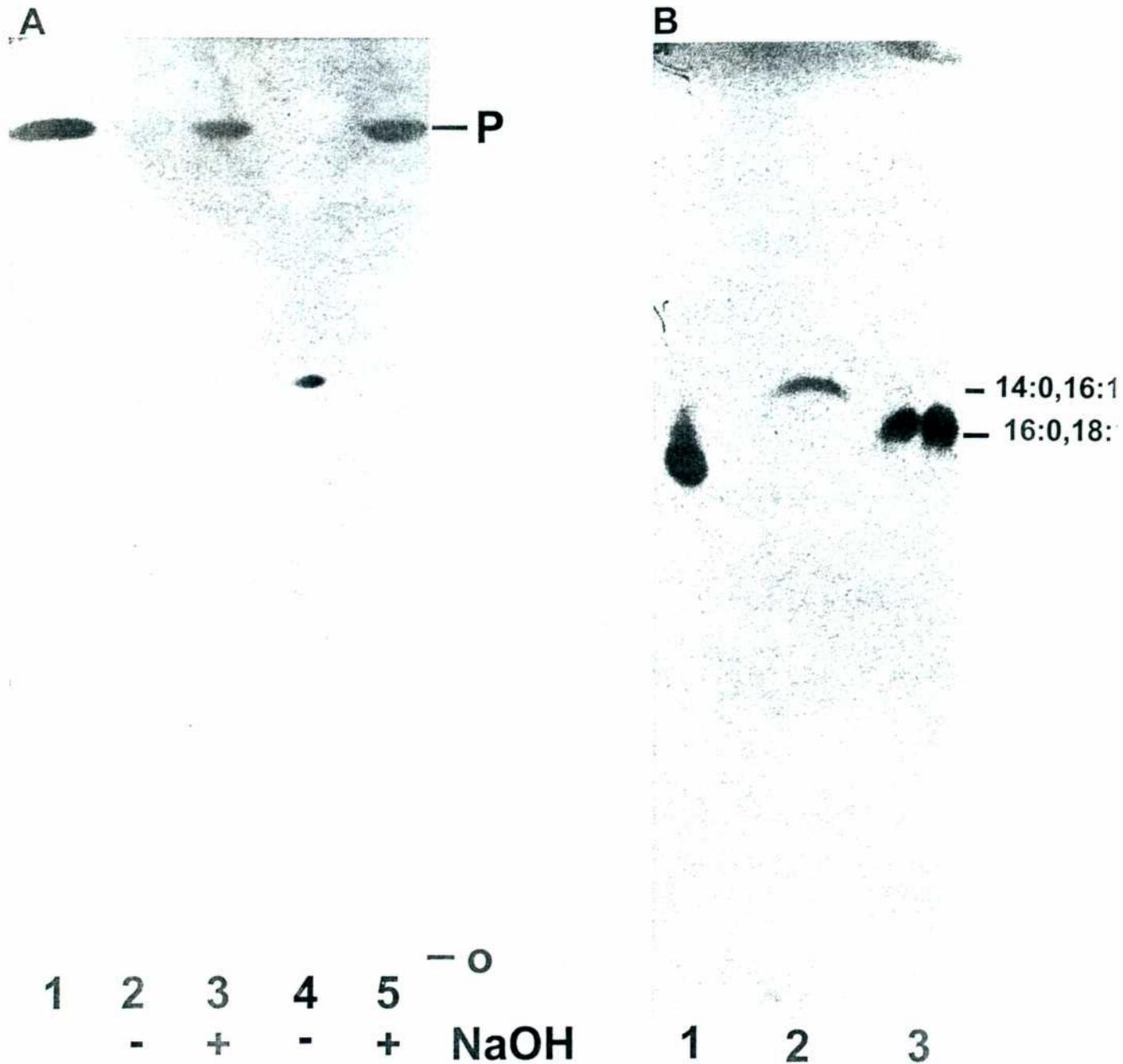


Figura 41. Análisis de los ^3H -lisoglicerolípidos obtenidos en la fase butanol luego del tratamiento de los ^3H -IPLs con PLA_2 .

Los lípidos a y b obtenidos según la Figura 40 se sometieron o no a saponificación seguido de extracción con tolueno. A) Cromatografía en TLC con cloroformo:metanol: NH_4OH (15:10:2 v/v) seguido de fluorografía. Calle 1, ^3H -ácido palmítico; calle 2, lípido a no saponificado; calle 3, lípido a saponificado; calle 4, lípido b no saponificado; calle 5, lípido b saponificado. B) Los ácidos grasos que comigraron con ácido palmítico en A) de las calles 3 y 5 se eluyeron y cromatografiaron en RPTLC, calles 2 y 3 respectivamente utilizando cloroformo:metanol:agua (20:40:0.5 v/v) como solvente de desarrollo. Calle 1: ^3H -ácido palmítico.

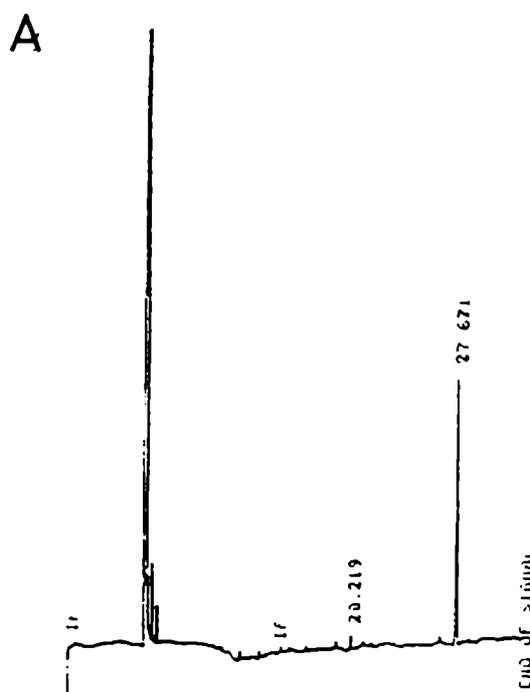
Estos resultados descartan la presencia de alquilacilglicerol en los IPLs, dado que de existir estos compuestos, el lisoglicerolípido obtenido después de la PLA₂ hubiese sido resistente a la saponificación y se habría visualizado en la Figura 41A una mancha a la altura de los lisoalquilglicerolípidos tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas en condiciones de saponificación.

La marcación metabólica es una herramienta útil para seguir el análisis de una muestra a través del desarrollo de distintas metodologías, especialmente cuando se dispone de escasa cantidad de material. Además, permite descartar la presencia de impurezas introducidas en la manipulación del material, lo cual es frecuente en el caso de análisis de lípidos. Sin embargo, el estudio estructural a partir de cultivos no marcados permite aplicar otro tipo de metodologías y confiere, además, relevancia fisiológica a los resultados.

En base a lo expuesto, en paralelo con los cultivos en los que se incorporó ácido [9,10 (n)³H]-palmítico, se realizaron cultivos sin precursores radioactivos, en mayor escala (10⁸ células para las incorporaciones vs. 10¹⁰ células en cultivos sin marcar).

Siguiendo el mismo esquema que con los [³H]-IPLs se han purificado los IPLs no marcados a partir de un primer extracto clorofórmico. Los IPLs fueron susceptibles a hidrólisis por PI-PLC y por PLA₂, como había resultado para los IPLs radioactivos, confirmando que se trata de inositol lípidos que no contienen ceramida.

Los ácidos grasos liberados por PLA₂ de los IPLs no marcados se metilaron y una parte de la muestra se analizó por RPTLC, revelando con iodo una mancha que comigró con los estándares de metil-ésteres de 16:0 y/o 18:1. La otra parte de la muestra se analizó por CGL utilizando dos columnas de diferente polaridad. Los cromatogramas de las muestras y de los estándares se muestran en las Figuras 42 y 43.



B

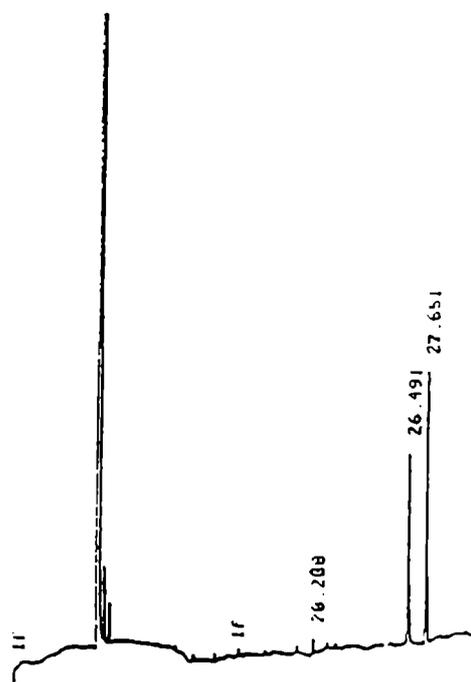


Figura 42. Análisis de los ácidos grasos liberados de posición sn-2 de IPLs.

Los IPLs no radioactivos se trataron con PLA₂ como se describe en la Figura 39 para los [³H]-IPLs, liberándose los ácidos grasos de posición sn-2. Los ácidos grasos se extrajeron con hexano, se metilaron y cromatografiaron en CGL usando la columna capilar: HP-Innowax (I), 0.2 mm x 50 m, T° del programa 150-240 °C a 8°/minutos. Los tiempos de retención mostrados corresponden a los derivados metilados de ácido mirístico (C14:0, 15.859 minutos), ácido palmítico (C16:0, 20.071 minutos), ácido palmitoleico (C16:1, 21.119 minutos), ácido esteárico (C18:0, 26.248 minutos), ácido oleico (C18:1, 27.627 minutos), ácido erúcido (C22:1, 55.125 minutos). A) muestra; B) coinyección de la muestra y estándar C18:0.

Figura 43. Análisis de los ácidos grasos liberados de posición sn-2 de IPLs.

Los IPLs no radioactivos se trataron con PLA₂ como se describe en la Figura 39 para los [³H]-IPLs, liberándose los ácidos grasos de posición sn-2. Los ácidos grasos se extrajeron con hexano, se metilaron y cromatografiaron en CGL usando la columna capilar: Ultra 2 (U), 0.2 mm x 50 m, T° del programa 3°/minutos. Los tiempos de retención mostrados corresponden a los derivados metilados de ácido palmítico (C16:0, 19.055 minutos), ácido palmitoleico (C16:1, 13.868 minutos), ácido esteárico (C18:0, 18.987 minutos), ácido oleico (C18:1, 18.411 minutos), ácido erúcico (C22:1, 29.840 minutos). A) muestra; B) coinyección de la muestra y estándar C18:0.

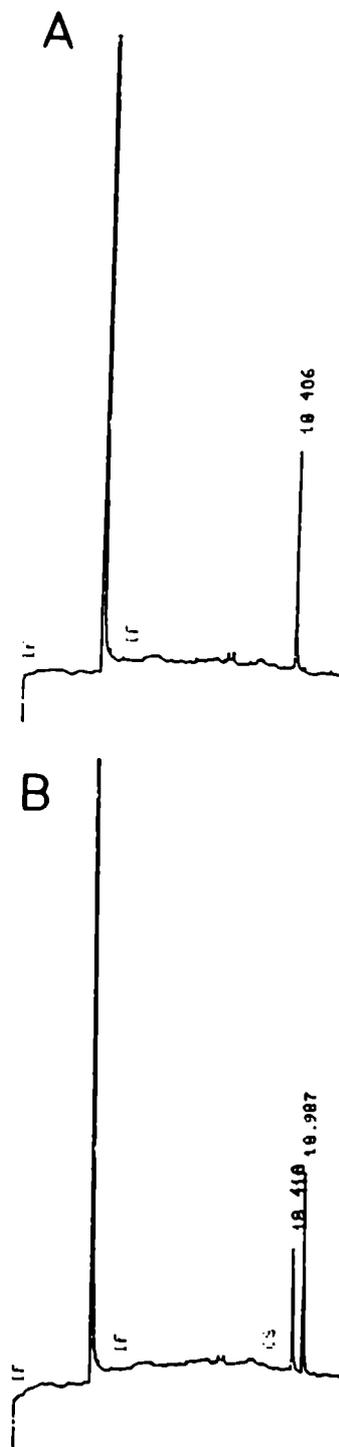
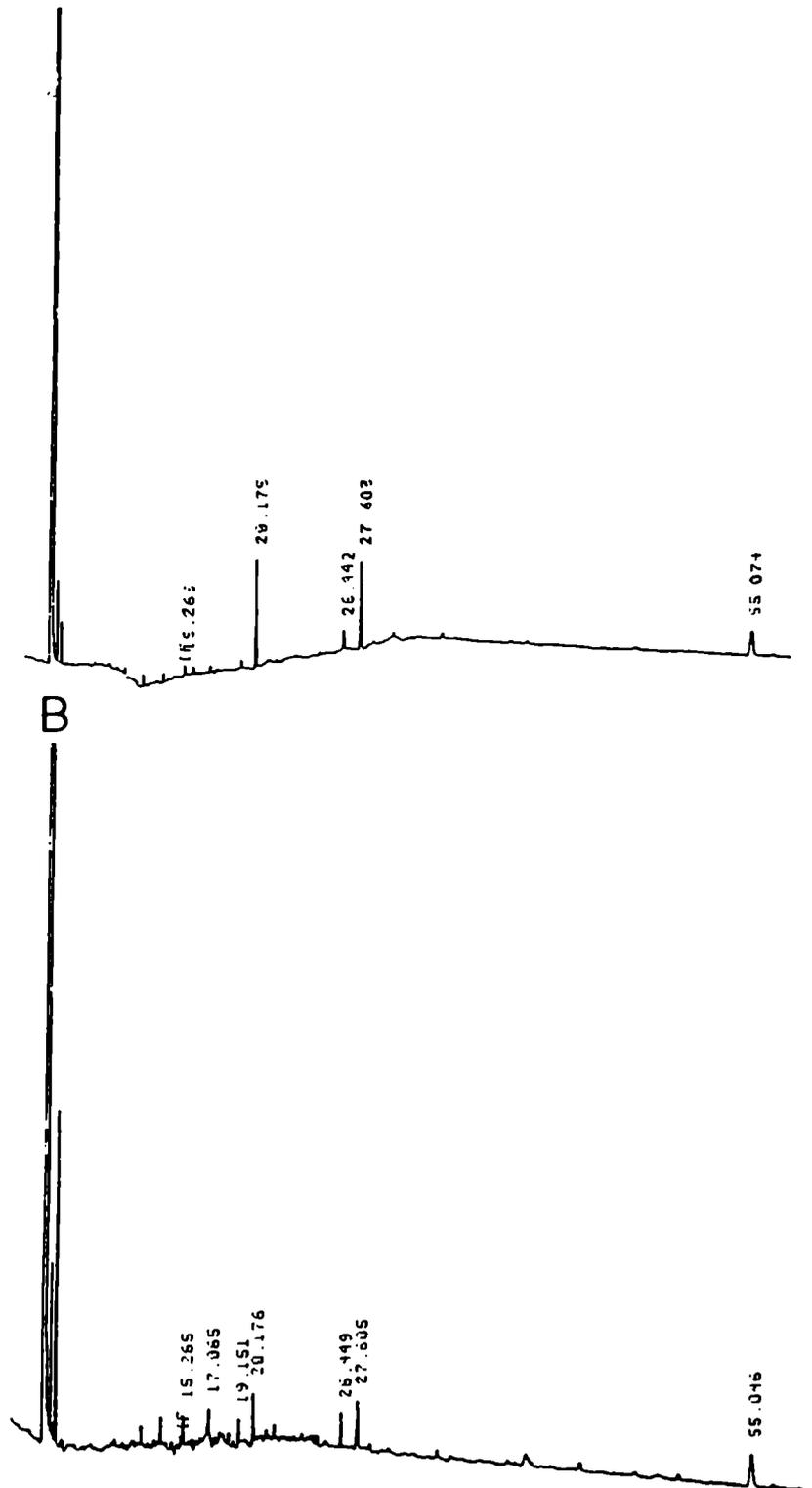


Figura 44. Análisis de los ácidos grasos liberados de posición sn-1 de IPLs.

Los IPLs no radioactivos se trataron con PLA₂ como se describe en la Figura 39 para los [³H]-IPLs, y los ácidos grasos de posición sn-2 se extrajeron con hexano. Los ácidos grasos de la posición sn-1 fueron liberados de los lisoglicerolípidos, extraídos con butanol, por saponificación y extracción con tolueno. Los ácidos grasos se metilaron y cromatografiaron en CGL usando la columna capilar: HP-Innowax (f), 0.2 mm x 50 m, T° del programa 150-240 °C a 8°/minutos. Los tiempos de retención mostrados corresponden a los derivados metilados de ácido mirístico (C14:0, 15.859 minutos), ácido palmítico (C16:0, 20.071 minutos), ácido palmitoleico (C16:1, 21.119 minutos), ácido esteárico (C18:0, 26.248 minutos), ácido oleico (C18:1, 27.627 minutos), ácido erúcico (C22:1, 55.125 minutos). A) lisoglicerolípido b; B) lisoglicerolípido a.



Utilizando la columna 1 y la condición I, los ácidos grasos insaturados eluyen después que los saturados de igual largo de cadena. Se observó un único pico con un tiempo de retención de 27.621 min (Figura 42A). El tiempo de retención coincidió con el estándar de ácido oleico de una mezcla de ácidos grasos insaturados comerciales y fue mayor que el tiempo de retención del estándar de ácido esteárico (t. r. 26.248 min) tanto en cromatografías individuales o cuando fueron co-inyectados (Figura 42B). Estos resultados indican que el único ácido graso en posición sn-2 de los IPLs es el ácido oleico y concuerdan con el resultado del análisis por RPTLC.

Para confirmar la identificación, la muestra se analizó a continuación utilizando la columna 2 y la condición II. Esta columna posee polaridad inversa y los ácidos grasos insaturados eluyen antes que los saturados de igual largo de cadena. La muestra presentó un pico único a los 18,406 min (Figura 43A) coincidente con el estándar de 18:1 de la mezcla de ácidos grasos insaturados que fue eluído antes que el estándar de 18:0 (t. r. 19,055 min), tanto al cromatografiarse por separado o en co-inyección con la muestra (Figura 43B).

Con estos resultados se ha confirmado que el ácido oleico es el único ácido graso en posición sn-2 de los IPLs provenientes de cultivos de *S. pombe* sin incorporación de precursores radioactivos.

El análisis por TLC de los lisoglicerolípidos liberados por PLA₂, mostró dos lisoglicerolípidos a y b además de ácidos grasos, igual que había ocurrido al tratar a los [³H]-IPLs con esta enzima.

Para estudiar los ácidos grasos de la posición sn-1 de los IPLs no marcados, se saponificaron los lisoglicerolípidos a y b liberados por

PLA₂, como se mostró con los [³H]-lisoglicerolípidos, y se analizaron por CGL utilizando la columna 1. Al procesar los ácidos grasos obtenidos a partir del lisoglicerolípido mayoritario (lisoglicerolípido **b**) se observaron 3 picos mayoritarios coincidentes en los tiempos de retención con los estándares de 16:0, 18:1 y 22:1, Figura 44A. Estos resultados coinciden mayormente con los resultados de los lípidos marcados en los que se determinó la presencia de 16:0 y 18:1, aunque aparece el ácido graso de 22:1. Con respecto a los ácidos grasos obtenidos a partir del lisoglicerolípido **a**, se observaron varios picos, muchos de los cuales corresponden a cadenas cortas, Figura 44B.

Se ha encontrado, en contraste con el único pico obtenido para el ácido graso de posición sn-2, más de un ácido graso esterificando la posición sn-1 de los IPLs.

5.1.3 Identificación de esfingomielina en *S. pombe*

Las inositolfosfoceramidas son muy abundantes en *S. cerevisiae* y se marcan por incorporación de [³H]-ácido palmítico en cultivos de esta levadura. Dado que se demostró la ausencia de estos compuestos en *S. pombe*, resultó interesante analizar la presencia de ceramida marcada como componente de otros esfingolípidos en *S. pombe*.

Para ello, se analizaron distintas fracciones obtenidas al analizar la fase butanólica proveniente del extracto E (esquema 3) en la que se demostró la presencia de [³H]-IPLs. Dado que al hidrolizar los IPLs con PI-PLC (ver Figura 37A) se visualizaron, además de los productos,

manchas en el origen resistentes al tratamiento con la enzima que pudieran corresponder a esfingomiéline, se analizaron estas fracciones. También se analizó la banda superior a la señalada (*) en la Figura 36B, ya que IPL y esfingomiéline corren parecido en este sistema.

Todas las calles presentaron compuestos que migraron como el estándar de esfingomiéline (Figura 45), con el solvente FB.

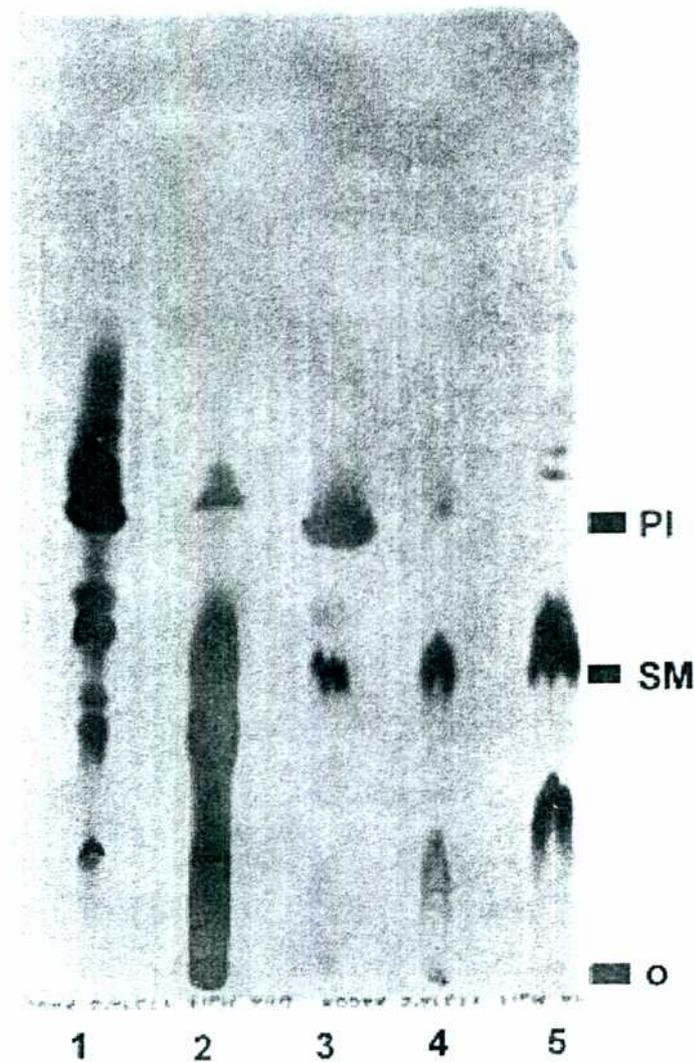


Figura 45. Evaluación de la presencia de esfingomiéline en extractos de *S. pombe*.

Distintas muestras se analizaron para evaluar la presencia de esfingomiéline (SM) por TLC con el solvente FB y fluorografía. Calles 4 y 5, origen de la calle 3, Figura 37A; calle 3, fase butanol del extracto E (esquema 3); calle 2: banda superior a la señalada en la Figura 36B; calle 1: extracto cloroformo:metanol 2:1 de E (esquema 3).

Estas manchas se eluyeron de la placa y se hidrolizaron con esfingomielinasa seguido de análisis por TLC para evaluar la presencia de ceramida y así confirmar su estructura (Figura 46).



Figura 46. Análisis de la liberación de ceramida por hidrólisis de fracciones del extracto cloroformo:metanol:agua de *S. pombe*.

Las muestras que migraron igual que esfingomielina en la figura anterior se trataron (2 y 4) o no (1 y 3) con esfingomielinasa y se analizaron por TLC en el solvente G. Calles 1 y 2, muestra proveniente de la calle 2, figura 45. Calles 3 y 4, se juntaron las muestras provenientes de las calles 3, 4 y 5 de la figura 45. Estándar: C, lignoceroil-dihidroesfingosina.

Se ha determinado la presencia de ceramida como componente de esfingomielina en la fase butanólica proveniente del extracto E (esquema 3), y en fracciones obtenidas en el posterior análisis de la misma, que permitió determinar la presencia de los [^3H]-IPLs.

Estos resultados confirman la existencia de esfingomielina en *S. pombe*.

5.2 Incorporación de [^3H]-palmítico en proteínas de *S. pombe* ancladas por GPI

Para evaluar la presencia de GPI en proteínas de *S. pombe*, el pellet obtenido luego de la extracción con cloroformo:metanol:agua 10:10:3 v/v (esquema 4) se sometió a distintos tratamientos.

Primeramente, se realizó una extracción del pellet con butanol saturado de agua. El conteo de la radioactividad en las fases butanólica (Bp) y del insoluble suspendido en agua (P'), reveló una relación 1:1. Se analizaron ambas fases mediante TLC en cloroformo:metanol:agua 10:10:3 v/v (Figura 47).

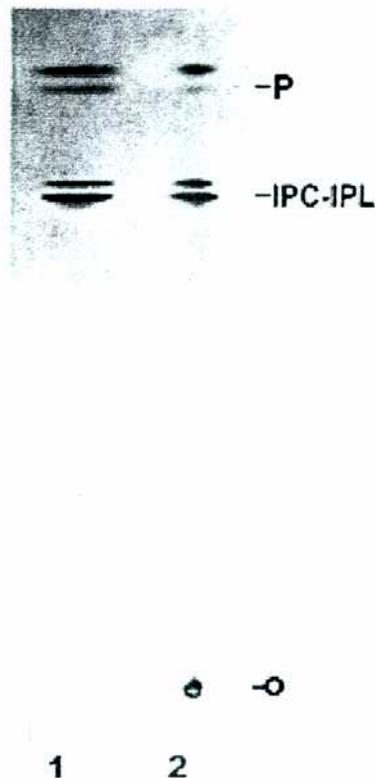


Figura 47. Análisis de la fase butanol Bp, calle 1, y del pellet P', calle 2, (ver esquema 3) por TLC, solvente A. Estándares: P: ácido palmítico; IPC-IPL*: mezcla de inositol fosfolípidos e inositol fosfoceramidas radioactiva (IPL-IPC*) purificada de *Trypanosoma cruzi*, utilizados como estándares.

Dado que los GPIs libres o anclados a proteínas poseen mayor masa y mayor polaridad que los IPLs, era de esperar que los GPI presentasen menor movilidad.

El análisis de la fase B_p mediante TLC en las condiciones de la Figura 36A mostró un patrón de bandas similar al que se vió en dicha figura, al analizar la fase butanólica proveniente del extracto clorofórmico; donde, se ha demostrado la ausencia de GPI.

En cambio, el análisis por TLC de una alícuota de la muestra P' en las mismas condiciones mostró, además, una mancha en el origen. La aparición de esta mancha podría deberse a la presencia de estructuras de GPI, o bien, de proteínas ancladas; por ello, se siguió analizando esta muestra.

La radioactividad presente en P' no se extraía con butanol o tolueno; y no se solubilizaba en agua. Dado que en esta fracción podían estar las proteínas ancladas con GPI presentes en la levadura, una alícuota de la muestra se tomó en buffer de lisis se disgregó utilizando un sonicador y se sembró en un gel desnaturalizante, seguido de fluorografía según (159). Se encontró una banda cuyo PM se estimó en 19 kDa que correspondería a una o varias proteínas modificadas por incorporación de [³H]-ácido palmítico, Figura 48.

Esta banda proteica podía contener una o más proteínas ancladas por GPI. Sin embargo, ésta no era la única modificación que permite la incorporación de un ácido graso a proteínas. Se ha informado que ciertas proteínas están palmitoiladas en residuos cisteína del extremo C-terminal (214-216) o como amidas en el amino terminal (217;218). Se cree que el ácido palmítico unido covalentemente se intercala en estructuras de membrana y que podría, en algunos casos, regular la función de las proteínas modificadas. Este tipo de acilaciones en proteínas es cuantitativamente menos importante en *S. cerevisiae* (149).

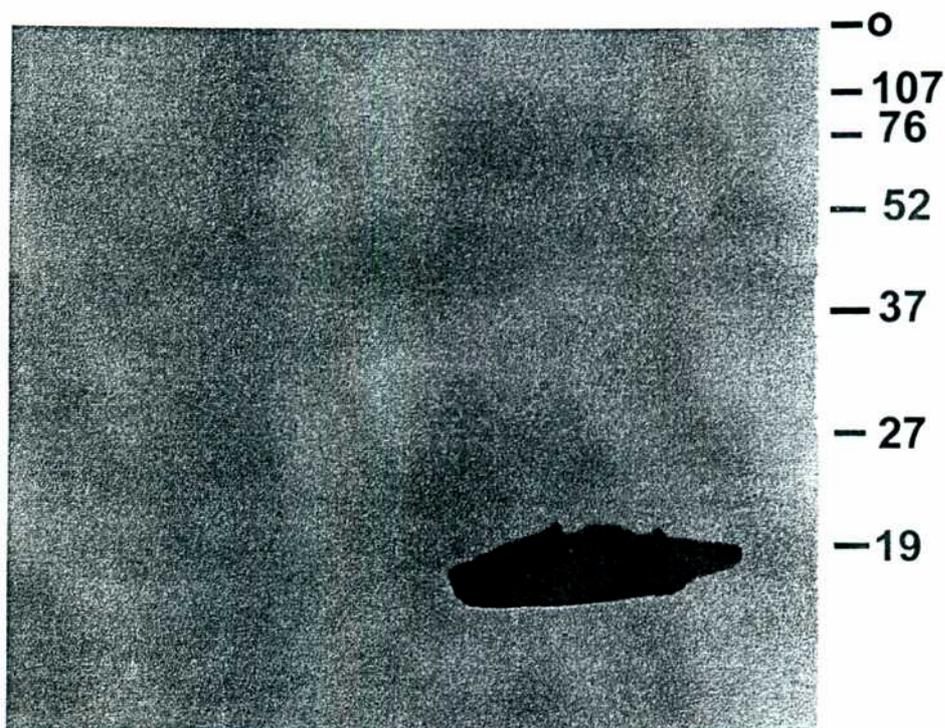


Figura 48. SDS-PAGE y fluorografía del pellet P', ver esquema 3. El pellet se resuspendió en buffer de lisis, se sonicó y se analizó en un gel 10 % que se preparó para fluorografía según Chamberlain y col. (159). La movilidad de los estándares de PM se muestra a la derecha. 0= punto de siembra del gel.

Para determinar el tipo de unión del lípido se trató la muestra P' con proteasa (149) para liberar los péptidos marcados por incorporación de [^3H]-ácido palmítico y de este modo facilitar su aislamiento y purificación.

Luego de la proteólisis, la muestra se extrajo con butanol y se contó la radioactividad en las fases resultantes, ver Tabla VIII.

Tabla VIII. Tratamiento con proteasa del pellet (P').

Digestión con Proteasa	Buffer (cpm)	Fase butanol (cpm)
	1500000	
+	600000	800000

El pellet P', ver esquema 3, fue exhaustivamente extraído con cloroformo:metanol:agua (10:10:3 v/v), butanol y tolueno. La fase acuosa resultante fue sometida al tratamiento con pronasa seguido de partición butanol-agua. Se contó la radioactividad presente en las fases resultantes.

Como puede verse, cerca de un 60% de la radioactividad se recuperó en la fase butanólica. La extracción de péptidos con anclas de GPI con butanol fue previamente informada en *S. cerevisiae* (149), por lo cual esta fase se evaporó y se probó su susceptibilidad a una fosfolipasa de tipo D específica de GPI comercial (GPI-PLD) (173).

La muestra hidrolizada y un blanco sin enzima se extrajo con cloroformo:metanol:HCl 12M 10:10:0.1 v/v, solvente descrito para la extracción de lípido-fosfato (174). El 90% de la marca radioactiva se recuperó en la fase orgánica que se analizó por TLC, Figura 49. Se observaron diferencias en las muestras tratadas o sin tratar con la enzima confirmando la susceptibilidad de la muestra a GPI-PLD.

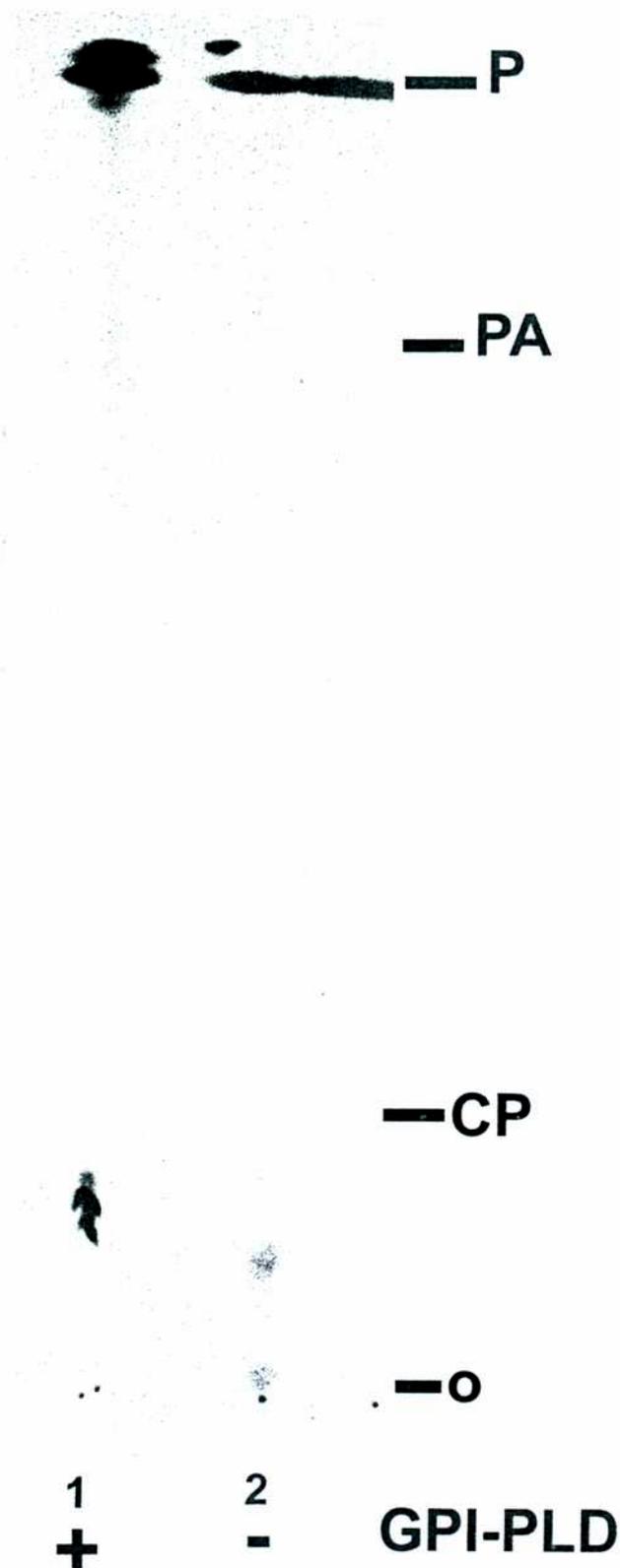


Figura 49. Análisis por TLC de los lípidos liberados por acción de GPI-PLD de los productos de proteólisis del pellet (P').

La fase butanólica obtenida luego de la digestión con proteasa del pellet, se hidrolizó con GPI-PLD comercial seguido de extracción con cloroformo:metanol:HClconc (10:10:0,1 v/v). Los lípidos extraídos se analizaron por TLC en el solvente I y fluorografía. Estándares: CP, ceramida 1-fosfato; PA, ácido fosfatídico; P, ácido palmítico.

La estructura de los lípidos liberados no pudo ser confirmada por la escasa cantidad de material; de todos modos la liberación de lípidos por tratamiento con GPI-PLD confirma la presencia de anclas de GPI como modificación post-traduccionaI de proteínas sintetizadas por *S. pombe*. No se estudiaron otro tipo de modificaciones.

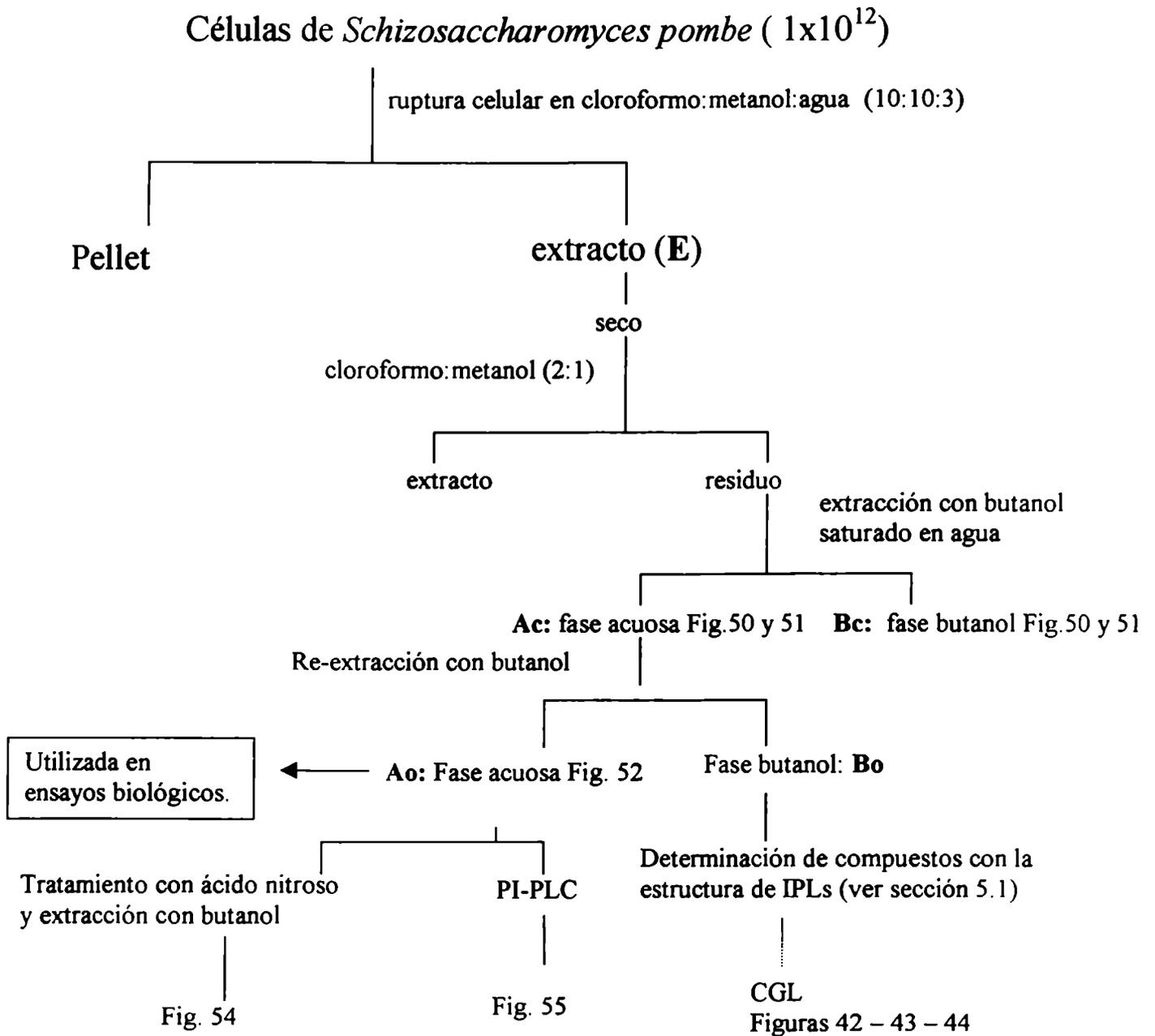
5.3 Aislamiento de GPIs libres en células de *S. pombe* sin incorporación de precursor radioactivo

En otra serie de experimentos se quiso evaluar la presencia de GPIs libres en *S. pombe*. Estos estudios se realizaron a partir de cultivos no radioactivos.

De manera similar a lo descrito para los cultivos marcados metabólicamente, los cultivos en fase exponencial se disgregaron en cloroformo:metanol:agua 10:10:3 v/v, obteniéndose un pellet y un extracto clorofórmico (esquema 4).

El extracto clorofórmico se evaporó y se re-extrajo con cloroformo:metanol 2:1 para eliminar compuestos menos polares (esquema 4). El residuo se particionó en butanol-agua. Una alícuota de cada una de las fases resultantes se analizó por TLC, en cloroformo:metanol:agua (10:10:3 v/v) y se reveló inicialmente con iodo (Figura 50).

Este solvente ha sido utilizado previamente para evidenciar GPIs en levaduras (42).



Esquema 4

Extracción y purificación de inositol fosfolípidos y glicosilfosfatidilinositoles en *Schizosaccharomyces pombe*.



Figura 50. Análisis de la fase acuosa (Ac) y de la fase butanólica (Bc) del extracto E de *S. pombe* (esquema 4). Las fases Ac y Bc se analizaron por TLC en el solvente A revelada con iodo. Calle 1, Bc; calle 2, Ac. Estándar: PI, fosfatidilinositol.

La fase butanólica (Bc, calle 1) muestra compuestos que migran a la altura del estándar de PI, previamente caracterizados como IPLs (sección 5.1) y también lípidos de mayor movilidad.

La fase acuosa (Ac, calle 2) muestra compuestos de igual Rf que los de la fase butanol pero además se revelan con mayor intensidad

compuestos de Rf menor que PI, como era de esperar para derivados de PI glicosilados. La misma placa, fue revelada luego con el reactivo de orcinol (172). La coloración violácea de los compuestos de Rf menor que PI, sugirió que se trata de compuestos altamente glicosilados (Figura 51).



Figura 51. Análisis de la fase acuosa (Ac) y de la fase butanólica (Bc) del extracto E. Las fases Ac y Bc (ver esquema 4) se analizaron por TLC en el solvente A revelada con el reactivo de orcinol. V= coloración violácea. Calle 1, Bc; calle 2, Ac. Estándar: PI, fosfatidilinositol.

La fase acuosa se extrajo luego dos veces más con butanol (B_1 y B_2) para eliminar los restos de PI y se sembraron alícuotas de cada una de las fases resultantes en TLC, revelando con reactivo de cerio, que es universal (Figura 52).

Ao, corresponde a la fase acuosa luego de la extracción exhaustiva con butanol y Bo, a la primera extracción con butanol luego de ser extraída con agua para eliminar algún componente hidrofílico remanente.



Figura 52. Análisis de la fase acuosa (Ao) y de las fases butanólicas (Bo, B₁ y B₂) del extracto E. Se realizaron sucesivas extracciones con butanol de la fase Ao, las cuales se concentraron por separado (100X) y se analizaron por TLC en el solvente A revelada con el reactivo de cerio. Calle 1, Bo; calle 2, B₁; calle 3, B₂; calle 4, Ao. Estándar: PI, fosfatidilinositol.

Por comparación entre las Figura 50 y Figura 52, puede verse que los PIs presentes en la fase acuosa en la Figura 50 son extraídos por completo en butanol, aunque no se extraen los compuestos de menor movilidad.

Se decidió entonces caracterizar los compuestos presentes en Ao que posiblemente corresponderían a GPIs.

Durante los últimos años, distintos criterios han sido utilizados como diagnóstico de la presencia de GPIs en muestras biológicas, entre las que se encuentran:

- 1) Tratamiento con ácido nitroso, que desamina la glucosamina no acetilada comprometida en una unión glucosídica a inositol, ver Figura 53. Este tratamiento químico es altamente específico dado que la glucosamina no acetilada glicosídicamente unida a inositol no es una estructura frecuente y, hasta el presente, sólo se conoce en GPIs.
- 2) Susceptibilidad a PI-PLCs bacterianas.
- 3) Susceptibilidad a GPI-PLD.

Para estudiar la presencia de GPI en Ao, en una primera instancia se trató una alícuota de la muestra con ácido nitroso. Este tratamiento ha sido utilizado como evidencia de anclas de GPI de levaduras (42;149). Para analizar la liberación de lípidos por este tratamiento se extrajo la muestra con butanol. Los lípidos extraídos se analizaron en TLC por revelado con el reactivo cérico, Figura 54. Se observó una mancha a la altura del estándar de PI, indicando la liberación de un inositol lípido por este tratamiento.

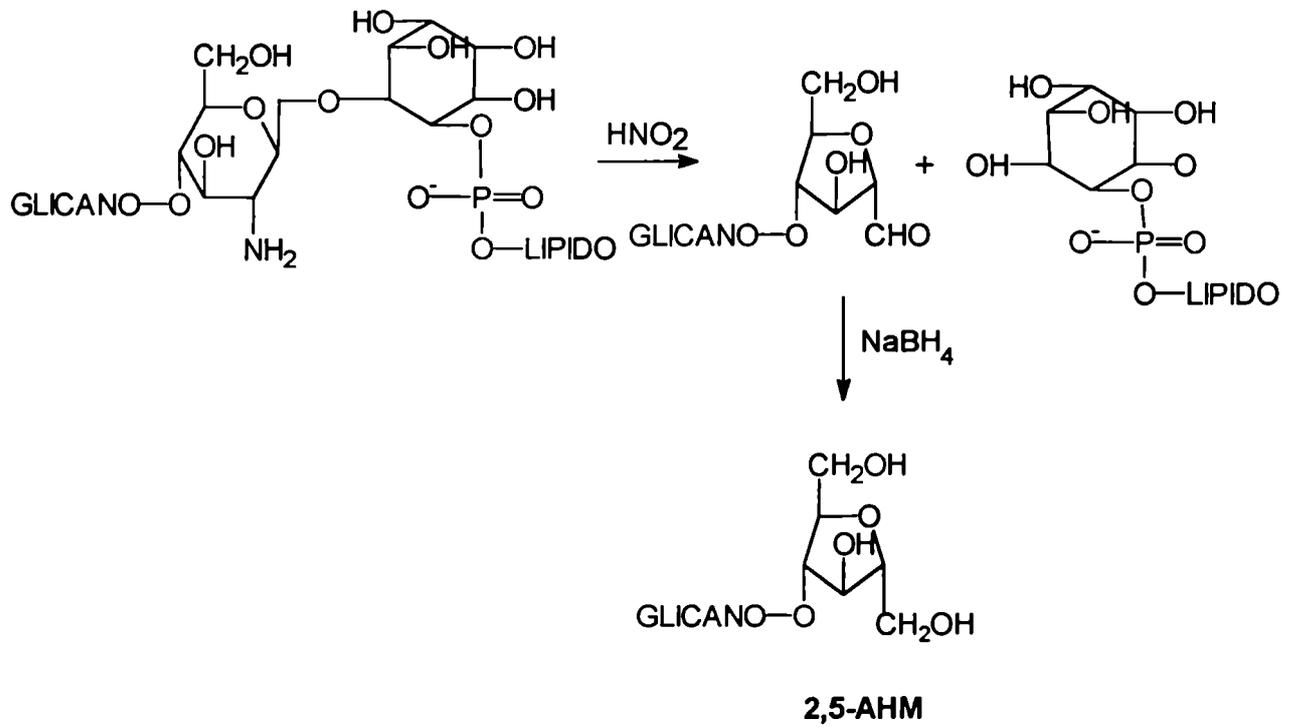


Figura 53. Tratamiento de GPI con ácido nitroso.



Figura 54. Análisis por TLC de los lípidos liberados de Ao por tratamiento con ácido nitroso y extracción con butanol. Calle 1: fase butanólica; calle 2: Ao; calle 3: Bo. Solvente A, revelado con el reactivo de cerio.

Los resultados del tratamiento con ácido nitroso representan la primera evidencia de la existencia de GPI en la fase acuosa (Ao) proveniente del extracto cloroformo:metanol:agua 10:10:3 v/v de las *S. pombe*.

Otra alícuota de Ao se trató o no con PI-PLC de *Bacillus cereus* seguido de extracción con butanol y se analizó por TLC con el solvente H (Figura 55). El revelado con yodo mostró manchas (calle 2) que no están presentes en el extracto butanólico de la muestra no tratada con fosfolipasa (calle 1): la mayor parte de los compuestos extraídos quedaron en el origen, lo que sugiere la presencia de un lípido más polar que diacilglicerol; además apareció una mancha menor a la altura de los

estándares de ceramida y alquilglicerol que no se separan en este sistema.



Figura 55. Análisis por TLC de los lípidos liberados de Ao por tratamiento con PI-PLC y extracción con butanol. Calle 1: muestra sin tratar; calle 2: tratamiento de Ao con PI-PLC de *Bacillus cereus*. Solvente H, revelado con yodo. Estándares: C, ceramida; DAG, diacilglicerol; AAG, alquilacilglicerol, A, alquilglicerol.

La susceptibilidad de al menos parte de los compuestos presentes en Ao al tratamiento con PI-PLC confirma se trata de compuestos del tipo de GPIs.

Considerando los resultados obtenidos que evidencian la presencia de compuestos del tipo de GPI en *S. pombe*, la fase acuosa (esquema 4) de la extracción agua-butanol se utilizó en los ensayos de transducción de señales.

5.4 Efecto de IPGs de distintas fuentes en la estimulación mediada por ACTH de la producción de corticosterona.

Hemos visto que un IPG obtenido a partir de LPPG de *T. cruzi* inhibe la respuesta esteroidogénica de ACTH, resultó interesante estudiar el efecto de preparaciones que contienen IPG provenientes de *S. pombe*, IPG-S (capítulo 5) o corteza adrenal de vaca (capítulo 3) sobre la respuesta de ACTH.

Como fuente de IPG de *S. pombe* se utilizó la fracción de agua (Ao) proveniente del extracto de cloroformo:metanol:agua (10:10:3 v/v), ver esquema 4, que como se ha comentado contiene estructuras del tipo de GPIs libres.

Con este propósito, se prepararon células adrenocorticales de rata y se analizó el efecto de distintas cantidades de IPG-S, obtenido por hidrólisis de GPI-S con PI-PLC, sobre la producción de corticosterona mediada por ACTH (*Tabla IX*). También se estudió si el fragmento de inositol glicano producido por hidrólisis de GPI-S con GPI-PLD, tenía algún efecto en este sistema.

Para realizar estos estudios se estimó aproximadamente la concentración de lípidos en la muestra de GPI-S (Ao, ver sección 5.3) por comparación de las manchas obtenidas al sembrar en una placa de sílica cantidades crecientes de la muestra con las obtenidas a partir de cantidades conocidas de inositol fosfolípidos comerciales luego de revelar con yodo.

Los experimentos se realizaron en paralelo con los correspondientes inositol glicanos (IPG e IG) de *T. cruzi* como control positivo.

Tabla IX. Efecto de GPI de *S. pombe* sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.

Ensayo	Tratamientos	ng de corticosterona / ensayo
1-	Control	2.0 ± 0.1
2-	ACTH	13.4 ± 1.2
3-	ACTH + IPG	3.2 ± 0.2
4-	ACTH + VehIPG-S	11.5 ± 1.5
5-	ACTH + IPG-S1	8.3 ± 0.1 * x
6-	ACTH + IPG-S2	3.9 ± 0.5 *
7-	ACTH + IPG-S4	6.9 ± 1.0 *
8-	ACTH + IPGN	12.3 ± 1.3
9-	ACTH + IG	6.7 ± 0.3
10-	ACTH + VehIG-S	13.6 ± 2.2
11-	ACTH + IG-S1	10.9 ± 1.0 # ∞
12-	ACTH + IG-S2	6.1 ± 0.1 ###
13-	ACTH + IG-S4	9.4 ± 1.0 ##
14-	ACTH + GPI-S	12.9 ± 1.8
15-	ACTH + PI-S	13.5 ± 0.2

Se prepararon células enriquecidas en fasciculata y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control) ó en presencia de ACTH 1nM; con agregado de GPI purificado de *S. pombe* (GPI-S) ó sus derivados: IPG-S, IPG obtenido por hidrólisis de GPI-S con PI-PLC; IPGN, IPG tratado con ácido nitroso; IG-S, IG obtenido por hidrólisis de GPI-S con GPI-PLD; PI-S, fosfatidilinositol purificado de *S. pombe* ó vehículos (VehIPG-S, VehIG-S). Las dosis se nombran como 1, 2 y 4 por su relación de concentración. Luego de los tratamientos, se cuantificó corticosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media ± S.E. de dos experimentos. * Significativamente diferente de VehIPG-S $p \leq 0.001$; #, ##, ### Significativamente diferente de VehIG-S $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente; x Significativamente diferente de IPG $p \leq 0.001$; ∞ Significativamente diferente de IG $p \leq 0.01$ (ANOVA).

Se observó que el IPG-S fue capaz de inhibir la acumulación de corticosterona mediada por ACTH en las tres dosis utilizadas, que guardan una relación de concentración de 1:2:4. El efecto fue máximo

cuando se utilizó la dosis intermedia y algo menor con la dosis máxima. Una disminución del efecto de IPG a dosis altas fue informado previamente (191;203). La inhibición provocada por IPG-S desapareció por tratamiento del mismo con ácido nitroso.

No se observó inhibición si el GPI-S no fue hidrolizado por PI-PLC, sugiriendo que el IPG producto de la hidrólisis es el responsable de la inhibición. El agregado de PI-S, cuya estructura completa se ha presentado en la sección 5.1, tampoco afectó esta respuesta de ACTH.

Cuando se agregó IG-S en las condiciones de ensayo utilizadas para IPG-S, se observó inhibición parcial de la producción de corticosterona por ACTH, en las tres dosis empleadas. Este bloqueo fue menor que el observado con el IPG-S. Lo que concuerda con lo encontrado previamente con el IG de *T. cruzi*.

Como fuente de IPG de corteza adrenal se utilizaron preparaciones de FAL que corresponden a las purificadas a partir de homogenatos de adrenal por Octil-Sepharosa y Q-Sepharosa siguiendo el protocolo 1 de purificación (esquema 1, sección 3.1). Esta fracción fue eluída de la columna de Octil-sepharosa con alrededor de 40% de propanol que es la zona característica del gradiente donde se eluyen las proteínas ancladas y GPI libres (42).

Al incubar las células adrenocorticales con ACTH en presencia de preparaciones de adrenales enriquecidas en FAL que fueron tratadas con PI-PLC para liberar IPG (IPG-A), éstas fueron capaces de inhibir la acumulación de corticosterona producida por ACTH (*Tabla X*).

Tabla X. Efecto de IPG de adrenal sobre la estimulación de corticosterona mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.

Ensayo	Tratamiento	ng de corticosterona/ensayo
1-	Control	0.42 ± 0.02
2-	ACTH	1.66 ± 0.08
3-	ACTH + VehIPG-A	1.68 ± 0.13
4-	ACTH + IPG-A	1.00 ± 0.10 *

Se prepararon células enriquecidas en fasciculata y se incubaron durante 1 hora en ausencia (control) ó en presencia de ACTH 1nM; con agregado de IPG-A ó vehículo (VehIPG-A). Luego de los tratamientos, se cuantificó corticosterona por RIA. Los resultados corresponden a la media ± S.E. de dos experimentos. * Significativamente diferente de VehIPG-A $p \leq 0.01$ (ANOVA).

Estos resultados indicarían que IPGs de fuentes distintas de *Trypanosoma cruzi* son capaces de inhibir la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata.

En particular, el resultado obtenido con IPG-A sugiere que la activación de PI-PLC por ACTH produciría un IPG activo en este sistema.

Discusión

Se han aislado estructuras del tipo de GPI y sus precursores de *S. pombe*.

A partir de los cultivos de *S. pombe* con [³H]-palmítico, se identificaron los [³H]-IPLs como componentes abundantes de la muestra, pero no se han podido detectar otros precursores glicosilados de GPI. En *S. cerevisiae*, los intentos de caracterizar los precursores de GPI mediante incorporación de [³H]-inositol o [³H]-palmítico fracasaron debido a su baja abundancia (42); sin embargo, pudieron ser detectados, por incorporación de [³H]-manosa agregada exógenamente (42), en extractos lipídicos provenientes de células que no biosintetizan manosa. Los autores han propuesto que a diferencia de lo que ocurre en trypanosomas, donde los GPIs libres se sintetizarían en exceso y estarían disponibles para la adición a proteínas, en *S. cerevisiae*, al marcar con [³H]-inositol, no aparecen GPIs libres marcados y en cambio, en pocos minutos, aparece marca sobre las proteínas.

Esta situación coincide con lo encontrado en *S. pombe*, donde se detectaron proteínas que incorporan [³H]-ácido palmítico en GPI, pero no GPIs libres radioactivos.

Se identificó una banda de 19 kDa en el pellet proveniente de los cultivos de *S. pombe* por electroforesis desnaturizante y fluorografía (Figura 48). La hidrólisis con GPI-PLD sólo fue posible luego del tratamiento del pellet con proteasas, lo cual concuerda con la forma de solubilización informada para las anclas de otras levaduras (149). Como se ha informado que esta fosfolipasa reconoce la estructura de manosil-glucosamina unida a fosfatidilinositol (219), la susceptibilidad a esta hidrólisis prueba la existencia de anclas en proteínas de esta levadura.

Si bien la marcación metabólica con [³H]-palmitico no permitió detectar la presencia de GPIs libres, estos compuestos se aislaron de cultivos no marcados. Los compuestos estudiados presentaron dos características que coinciden con lo esperado para GPIs libres: su mayor polaridad en comparación con los IPLs, visualizada en TLC, y su coloración violácea al revelarlos con el reactivo de orcinol. Por otro lado, estos compuestos fueron susceptibles a PI-PLC y al tratamiento con ácido nitroso. En este último caso, un inositolfosfolípido de movilidad similar a fosfatidilinositol, fue específicamente liberado por este tratamiento.

El IPG (IPG-S) obtenido a partir de estos GPIs fue capaz de reproducir el efecto encontrado con el IPG de *T. cruzi* sobre la producción de corticosterona, mediada por ACTH, en células de corteza adrenal y este efecto se perdió por tratamiento de la muestra con ácido nitroso.

Estos resultados prueban la existencia de anclas en esta preparación.

Con respecto a los IPLs presentes en *S. pombe*, se demostró que corresponden a fosfatidilinositol. Se ha mostrado su susceptibilidad a hidrólisis por PI-PLC, que libera diacilglicerol como componente principal. Los estudios de marcación permitieron confirmar la ausencia de inositol fosfoceramidas o inositol lípidos que contengan alquilglicerol.

Las evidencias de la ausencia de alquilacilglicerol en los IPLs surgieron de encontrar que: 1) los productos del tratamiento de IPLs con PIPLC no mostraron la presencia de alquilacilglicerol (Figura 37B), dado que el producto de la reacción con PIPLC fue susceptible a saponificación total; 2) los lisoglicerolípidos **a** y **b** obtenidos luego del tratamiento de los [³H]-IPLs con PLA₂ se saponificaron totalmente (Figura 41). Resultados idénticos se obtuvieron a partir de los IPLs no radioactivos; 3) la fase acuosa remanente, luego de saponificar el

diacilglicerol liberado por PIPLC de los IPLs, se extrajo con butanol y se analizó este extracto por TLC, utilizando un sistema que distinga alquilglicerol Figura 38B (solvente G). Tampoco se detectó alquilglicerol en estas muestras.

Se estudiaron los ácidos grasos liberados de los IPLs por PLA₂. Podría decirse que en posición sn-2 hay un único ácido graso presente, habiéndose encontrado ácido oleico en los IPLs no marcados y ácido palmítico en los [³H]-IPLs; aunque, en este último caso apareció ácido oleico en mucha menor proporción. En base a ésto, el [³H]-ácido palmítico incorporado en los cultivos no parece participar del proceso de elongación y desaturación. Se sabe que esta limitación ocurre en *S. cerevisiae*, donde el agregado externo de [³H]-palmítico no participa del proceso de elongación de los ácidos grasos (149).

La hidrólisis con PLA₂ liberó un lisoglicerolípido más abundante (b) y otro minoritario más polar (a) (Figura 40). Este último podría formarse por una migración del ácido graso a la posición-2; alternativamente podría contener un ácido graso hidroxilado, como ocurre en *S. cerevisiae* (50).

A diferencia de lo encontrado en la posición 2, se encontró una mezcla de ácidos grasos en la posición sn-1 de los IPLs. Esta consistió, como puede verse en la TablaXI, principalmente en palmítico (16:0) y oleico (18:1), tanto en los [³H]-IPLs como en los IPLs y fue similar en ambos excepto por la aparición del 22:1 en los últimos.

La existencia de un único ácido graso en una de las dos posiciones del PI, fue encontrada en GPIs y sus precursores en otros sistemas. En *T. brucei*, el GPI es inicialmente sintetizado con ácido esteárico en posición sn-1 y una mezcla de ácidos grasos (18:0, 18:1, 20:4 y 22:6) en posición sn-2 (51) del glicerol antes del remodelamiento por ácido mirístico. En *S. cerevisiae*, se identificó el ácido graso C26:0 como único componente en

posición 2 (50). En este organismo, se han identificado ácidos grasos hidroxilados como componentes de GPIs y sus precursores. En el caso de *S. pombe*, la existencia de ácidos grasos hidroxilados podría explicar la aparición de una doble banda de IPL (Figura 36) y la aparición del lisoglicerolípido **a** más polar (Figura 40).

Tabla XI. Determinación de los ácidos grasos presentes en los IPLs de *S. pombe*.

	posición sn-1	posición sn-2
IPLs	14:0 y 16:1 ♦	
	22:1 (*) ♦♦	18:1
	16:0 y 18:1 ♦♦♦	
[³ H]-IPLs	14:0 y/o 16:1 ♦	16:0 ♦♦♦♦♦
	16:0 y/o 18:1 ♦♦	18:1 ♦

Una estimación de las cantidades relativas de los ácidos grasos se indica con ♦.

La determinación de ácido oleico como único componente de la posición sn-2, y de palmítico y oleico, entre otros ácidos grasos, esterificando la posición sn-1 de los IPLs, coinciden con un informe previo de White y col. en el que se estudió el metabolismo de ácido fosfatídico y fosfatidilinositol. En este informe no se determinó la estructura del fosfatidilinositol sino la composición de ácidos grasos en los lípidos totales y en fosfatidilinositol (220); en éste último, la proporción relativa de ácido oleico:ácido palmítico fue aproximadamente de 61:38.

En *S. pombe* no se ha observado la biosíntesis de IPC (que son los esfingolípidos principales de *S. cerevisiae*) y en cambio se encontró esfingomielina. Es de notar que el [³H]-ácido palmítico agregado

exógenamente no se incorporó en [³H]-inositolfosfoceramida, pese a haberse incorporado en la ceramida que forma parte de la estructura de esfingomielina.

Se sabe que, el primer paso en la biosíntesis de IPC en *S. cerevisiae* consiste en la transferencia de inositol fosfato a ceramida (212) catalizada por la fosfatidilinositol:ceramida fosfoinositol transferasa (IPC sintasa). Esta enzima que se localiza en la membrana, es esencial y no se encuentra en mamíferos por lo que ha sido propuesta como blanco contra infecciones producidas por hongos (212). En animales esta reacción no ocurre; en cambio, se transfiere fosfocolina para dar el esfingolípido principal: esfingomielina (221). Teniendo en cuenta estos antecedentes, la síntesis de esfingolípidos en *S. pombe* estaría más emparentada con la síntesis en mamíferos que con la de *S. cerevisiae*.

En concordancia, se ha propuesto que estas levaduras poseen otros aspectos semejantes a mamíferos como el procesamiento de oligosacáridos y la participación de chaperonas en el plegamiento de proteínas en el RE, y sistemas de señales involucrados en respuestas de agonistas (222-224) (155;156).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha encontrado que:

En células adrenocorticales, ACTH estimula una fosfolipasa C que hidroliza GPI a través de una proteína G que se inhibe por toxina de pertussis, es decir, que podría ser Gi. El receptor de ACTH activa la síntesis de esteroides por activación de PKA a través de Gs y GPI-PLC vía Gi. Esto confirma que un único receptor puede regular distintos sistemas efectores por interacción con distintos tipos de proteínas G.

Un IPG de estructura química definida purificado de *Trypanosoma cruzi*, es capaz de inhibir la acumulación de aldosterona y corticosterona en células adrenocorticales de rata y de aldosterona y cortisol en células adrenocorticales de vaca, es decir que inhibe la síntesis del principal mineralocorticoide y glucocorticoide en estos sistemas.

El efecto inhibitorio de IPG sobre la respuesta de ACTH se debe a la activación de fosfodiesterasa, enzima que degrada AMPc, y también la inhibición de un paso posterior a la formación de AMPc, que podría ser la proteína quinasa A.

Se ha visto que ACTH es capaz de liberar IPG al medio extracelular el cual inhibe la acumulación de corticosterona mediada por la hormona y que un IPG proveniente de corteza adrenal bovina tuvo el mismo efecto inhibitorio.

En *S. pombe*, se encontraron proteínas ancladas y también GPIs libres. Estos últimos, fueron capaces de inhibir la respuesta de ACTH en células adrenocorticales. También se encontraron inositolfosfolípidos

pero no inositolfosfoceramidas, que son muy abundantes en otra especie de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, se demostró la síntesis de otro esfingolípido que contiene ceramida, como esfingomiélna, que es característico de mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

Referencias

1. **Ferguson, M.A., S.W. Homans, R.A. Dwek, and T.W. Rademacher.** 1988. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* **239**:753-759.
2. **Field, M.C., A.K. Menon, and G.A. Cross.** 1991. A glycosylphosphatidylinositol protein anchor from procyclic stage *Trypanosoma brucei*: lipid structure and biosynthesis. *EMBO J.* **10**:2731-2739.
3. **Schneider, P., M.A. Ferguson, M.J. McConville, A. Mehlert, S.W. Homans, and C. Bordier.** 1990. Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *J.Biol.Chem.* **265**:16955-16964.
4. **Guther, M.L., M.L. de Almeida, N. Yoshida, and M.A. Ferguson.** 1992. Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. The structure of the glycan core. *J.Biol.Chem.* **267**:6820-6828.
5. **Couto, A.S., R.M. de Lederkremer, W. Colli, and M.J. Alves.** 1993. The glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypomastigote-specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Metabolic-labeling and structural studies. *Eur.J.Biochem.* **217**:597-602.
6. **Haynes, P.A., A.A. Gooley, M.A. Ferguson, J.W. Redmond, and K.L. Williams.** 1993. Post-translational modifications of the *Dictyostelium discoideum* glycoprotein PsA. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchor and composition of O-linked oligosaccharides. *Eur.J.Biochem.* **216**:729-737.
7. **Mehlert, A., L. Varon, I. Silman, S.W. Homans, and M.A. Ferguson.** 1993. Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric-fish, *Torpedo californica*. *Biochem.J.* **296**:473-479.
8. **Homans, S.W., M.A. Ferguson, R.A. Dwek, T.W. Rademacher, R. Anand, and A.F. Williams.** 1988. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature* **333**:269-272.
9. **Roberts, W.L., S. Santikarn, V.N. Reinhold, and T.L. Rosenberry.** 1988. Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by

- fast atom bombardment mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* **263**:18776-18784.
10. **Deeg, M.A., D.R. Humphrey, S.H. Yang, T.R. Ferguson, V.N. Reinhold, and T.L. Rosenberry.** 1992. Glycan components in the glycoinositol phospholipid anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Novel fragments produced by trifluoroacetic acid. *J.Biol.Chem.* **267**:18573-18580.
 11. **Stahl, N., M.A. Baldwin, R. Hecker, K.M. Pan, A.L. Burlingame, and S.B. Prusiner.** 1992. Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* **31**:5043-5053.
 12. **Taguchi, R., N. Hamakawa, M. Harada-Nishida, T. Fukui, K. Nojima, and H. Ikezawa.** 1994. Microheterogeneity in glycosylphosphatidylinositol anchor structures of bovine liver 5'-nucleotidase. *Biochemistry* **33**:1017-1022.
 13. **Redman, C.A., J.E. Thomas-Oates, S. Ogata, Y. Ikehara, and M.A. Ferguson.** 1994. Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. *Biochem.J.* **302**:861-865.
 14. **Nakano, Y., K. Noda, T. Endo, A. Kobata, and M. Tomita.** 1994. Structural study on the glycosyl-phosphatidylinositol anchor and the asparagine-linked sugar chain of a soluble form of CD59 in human urine. *Arch.Biochem.Biophys.* **311**:117-126.
 15. **Mukasa, R., M. Umeda, T. Endo, A. Kobata, and K. Inoue.** 1995. Characterization of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NCAM on mouse skeletal muscle cell line C2C12: the structure of the GPI glycan and release during myogenesis. *Arch.Biochem.Biophys.* **318**:182-190.
 16. **Treumann, A., M.R. Lively, P. Schneider, and M.A. Ferguson.** 1995. Primary structure of CD52. *J.Biol.Chem.* **270**:6088-6099.
 17. **Brewis, I.A., M.A. Ferguson, A. Mehlert, A.J. Turner, and N.M. Hooper.** 1995. Structures of the glycosyl-phosphatidylinositol anchors of porcine and human renal membrane dipeptidase. Comprehensive structural studies on the porcine anchor and interspecies comparison of the glycan core structures. *J.Biol.Chem.* **270**:22946-22956.
 18. **Ferguson, M.A. and A.F. Williams.** 1988. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu.Rev.Biochem.* **57**:285-320:285-320.

19. **Englund, P.T.** 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu.Rev.Biochem.* **62:121-38:121-138.**
20. **McConville, M.J. and M.A. Ferguson.** 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem.J.* **294:305-324.**
21. **Routier, F.H., E.X. da Silveira, R. Wait, C. Jones, J.O. Previato, and L. Mendonca-Previato.** 1995. Chemical characterisation of glycosylinositolphospholipids of *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **69:81-92.**
22. **Redman, C.A., P. Schneider, A. Mehlert, and M.A. Ferguson.** 1995. The glycoinositol-phospholipids of *Phytomonas*. *Biochem.J.* **311:495-503.**
23. **Previato, J.O., L. Mendonca-Previato, C. Jones, R. Wait, and B. Fournet.** 1992. Structural characterization of a novel class of glycoposphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. *J.Biol.Chem.* **267:24279-24286.**
24. **McConville, M.J., L.F. Schnur, C. Jaffe, and P. Schneider.** 1995. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem.J.* **310:807-818.**
25. **Turco, S.J. and A. Descoteaux.** 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu.Rev.Microbiol.* **46:65-94:65-94.**
26. **Lederkremer, R.M., C. Lima, M.I. Ramirez, M.A. Ferguson, S.W. Homans, and J. Thomas-Oates.** 1991. Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *J.Biol.Chem.* **266:23670-23675.**
27. **Lederkremer, R.M., C. Lima, M.I. Ramirez, and O.L. Casal.** 1990. Structural features of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with the glycoposphatidylinositol anchors. *Eur.J.Biochem.* **192:337-345.**
28. **Gerold, P., L. Schofield, M.J. Blackman, A.A. Holder, and R.T. Schwarz.** 1996. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **75:131-143.**
29. **Tomavo, S., R.T. Schwarz, and J.F. Dubremetz.** 1989. Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol.Cell Biol.* **9:4576-4580.**

30. **Singh, B.N., D.H. Beach, D.G. Lindmark, and C.E. Costello.** 1994. Identification of the lipid moiety and further characterization of the novel lipophosphoglycan-like glycoconjugates of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Arch.Biochem.Biophys.* **309**:273-280.
31. **Bhattacharya, A., R. Prasad, and D.L. Sacks.** 1992. Identification and partial characterization of a lipophosphoglycan from a pathogenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **56**:161-168.
32. **Saltiel, A.R., J.A. Fox, P. Sherline, and P. Cuatrecasas.** 1986. Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. *Science* **233**:967-972.
33. **Mato, J.M., K.L. Kelly, A. Abler, and L. Jarett.** 1987. Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. *J.Biol.Chem.* **262**:2131-2137.
34. **Gaulton, G.N., K.L. Kelly, J. Pawlowski, J.M. Mato, and L. Jarett.** 1988. Regulation and function of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol during T lymphocyte activation. *Cell* **53**:963-970.
35. **Conzelmann, A., A. Spiazzi, and C. Bron.** 1987. Glycolipid anchors are attached to Thy-1 glycoprotein rapidly after translation. *Biochem.J.* **246**:605-610.
36. **Ferguson, M.A., M. Duszenko, G.S. Lamont, P. Overath, and G.A. Cross.** 1986. Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N- glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J.Biol.Chem.* **261**:356-362.
37. **Singh, N., L.N. Liang, M.L. Tykocinski, and A.M. Tartakoff.** 1996. A novel class of cell surface glycolipids of mammalian cells. Free glycosyl phosphatidylinositols. *J.Biol.Chem.* **271**:12879-12884.
38. **Puoti, A. and A. Conzelmann.** 1992. Structural characterization of free glycolipids which are potential precursors for glycoposphatidylinositol anchors in mouse thymoma cell lines. *J.Biol.Chem.* **267**:22673-22680.
39. **Stevens, V.L.** 1995. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem.J.* **310**:361-370.
40. **Hirose, S., L. Ravi, S.V. Hazra, and M.E. Medof.** 1991. Assembly and deacetylation of N-acetylglucosaminyl-plasmanylinositol in normal

and affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **88**:3762-3766.

41. **Roberts, W.L., J.J. Myher, A. Kuksis, M.G. Low, and T.L. Rosenberry.** 1988. Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J.Biol.Chem.* **263**:18766-18775.
42. **Sipos, G., A. Puoti, and A. Conzelmann.** 1994. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J.* **13**:2789-2796.
43. **Homans, S.W., C.J. Edge, M.A. Ferguson, R.A. Dwek, and T.W. Rademacher.** 1989. Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochemistry* **28**:2881-2887.
44. **Heise, N., M.L. de Almeida, and M.A. Ferguson.** 1995. Characterization of the lipid moiety of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. *Mol.Biochem.Parasitol.* **70**:71-84.
45. **Ferguson, M.A., M.G. Low, and G.A. Cross.** 1985. Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J.Biol.Chem.* **260**:14547-14555.
46. **Butikofer, P., F.A. Kuypers, C. Shackleton, U. Brodbeck, and S. Stieger.** 1990. Molecular species analysis of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *J.Biol.Chem.* **265**:18983-18987.
47. **Bertello, L.E., N.W. Andrews, and R.M. de Lederkremer.** 1996. Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **79**:143-151.
48. **Serrano, A.A., S. Schenkman, N. Yoshida, A. Mehlert, J.M. Richardson, and M.A. Ferguson.** 1995. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin- like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J.Biol.Chem.* **270**:27244-27253.
49. **Fankhauser, C., S.W. Homans, J.E. Thomas-Oates, M.J. McConville, C. Desponds, A. Conzelmann, and M.A. Ferguson.** 1993.

- Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **268**:26365-26374.
50. **Sipos, G., F. Reggiori, C. Vionnet, and A. Conzelmann.** 1997. Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**:3494-3505.
 51. **Futerman, A.H., M.G. Low, K.E. Ackermann, W.R. Sherman, and I. Silman.** 1985. Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane- anchoring domain of Torpedo acetylcholinesterase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **129**:312-317.
 52. **Masterson, W.J., J. Raper, T.L. Doering, G.W. Hart, and P.T. Englund.** 1990. Fatty acid remodeling: a novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. *Cell* **62**:73-80.
 53. **Bertello, L.E., M.F. Goncalvez, W. Colli, and R.M. de Lederkremer.** 1995. Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Biochem.J.* **310**:255-261.
 54. **Agusti, R., A.S. Couto, O. Campetella, A.C. Frasch, and R.M. de Lederkremer.** 1998. Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trans- sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. *Mol.Biochem.Parasitol.* **97**:123-131.
 55. **Agusti, R., A.S. Couto, O.E. Campetella, A.C. Frasch, and R.M. de Lederkremer.** 1997. The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. *Glycobiology.* **7**:731-735.
 56. **Menon, A.K., R.T. Schwarz, S. Mayor, and G.A. Cross.** 1990. Cell-free synthesis of glycosyl-phosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. Structural characterization of putative biosynthetic intermediates. *J.Biol.Chem.* **265**:9033-9042.
 57. **Guther, M.L. and M.A. Ferguson.** 1995. The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **14**:3080-3093.
 58. **Ferguson, M.A.** 1992. Colworth Medal Lecture. Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors: the tale of a tail. *Biochem.Soc.Trans.* **20**:243-256.
 59. **Heise, N., J. Raper, L.U. Buxbaum, T.M. Peranovich, and M.L. de Almeida.** 1996. Identification of complete precursors for the

- glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J.Biol.Chem.* **271**:16877-16887.
60. **Tomavo, S., J.F. Dubremetz, and R.T. Schwarz.** 1992. Biosynthesis of glycolipid precursors for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in a *Toxoplasma gondii* cell-free system. *J.Biol.Chem.* **267**:21446-21458.
61. **Gerold, P., A. Dieckmann-Schuppert, and R.T. Schwarz.** 1994. Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J.Biol.Chem.* **269**:2597-2606.
62. **Tartakoff, A.M. and N. Singh.** 1992. How to make a glycoinositol phospholipid anchor. *Trends.Biochem.Sci.* **17**:470-473.
63. **Smith, T.K., D.K. Sharma, A. Crossman, A. Dix, J.S. Brimacombe, and M.A. Ferguson.** 1997. Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *EMBO J.* **16**:6667-6675.
64. **Takeda, J. and T. Kinoshita.** 1995. GPI-anchor biosynthesis. *Trends.Biochem.Sci.* **20**:367-371.
65. **Boothroyd, J.C., C.A. Paynter, G.A. Cross, A. Bernards, and P. Borst.** 1981. Variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* are synthesised with cleavable hydrophobic sequences at the carboxy and amino termini. *Nucleic.Acids.Res.* **9**:4735-4743.
66. **Brown, D.A. and J.K. Rose.** 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**:533-544.
67. **Menon, A.K., S. Mayor, M.A. Ferguson, M. Duszenko, and G.A. Cross.** 1988. Candidate glycopospholipid precursor for the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. *J.Biol.Chem.* **263**:1970-1977.
68. **Canivenc-Gansel, E., I. Imhof, F. Reggiori, P. Burda, A. Conzelmann, and A. Benachour.** 1998. GPI anchor biosynthesis in yeast: phosphoethanolamine is attached to the alpha1,4-linked mannose of the complete precursor glycopospholipid. *Glycobiology.* **8**:761-770.
69. **Dunn, D.E., J. Yu, S. Nagarajan, M. Devetten, F.F. Weichold, M.E. Medof, N.S. Young, and J.M. Liu.** 1996. A knock-out model of

paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pig-a(-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI- anchored proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:7938-7943.

70. **Kawagoe, K., D. Kitamura, M. Okabe, I. Taniuchi, M. Ikawa, T. Watanabe, T. Kinoshita, and J. Takeda.** 1996. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **87**:3600-3606.
71. **Tarutani, M., S. Itami, M. Okabe, M. Ikawa, T. Tezuka, K. Yoshikawa, T. Kinoshita, and J. Takeda.** 1997. Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**:7400-7405.
72. **Hamburger, D., M. Egerton, and H. Riezman.** 1995. Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins. *J.Cell Biol.* **129**:629-639.
73. **Leidich, S.D., D.A. Drapp, and P. Orlean.** 1994. A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J.Biol.Chem.* **269**:10193-10196.
74. **Schonbachler, M., A. Horvath, J. Fassler, and H. Riezman.** 1995. The yeast spt14 gene is homologous to the human PIG-A gene and is required for GPI anchor synthesis. *EMBO J.* **14**:1637-1645.
75. **Vossen, J.H., A.F. Ram, and F.M. Klis.** 1995. Identification of SPT14/CWH6 as the yeast homologue of hPIG-A, a gene involved in the biosynthesis of GPI anchors. *Biochim.Biophys.Acta* **1243**:549-551.
76. **Van der Vaart, J.M., B.R. te, J.W. Chapman, H.Y. Toschka, F.M. Klis, and C.T. Verrips.** 1997. Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:615-620.
77. **Low, M.G. and A.R. Saltiel.** 1988. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* **239**:268-275.
78. **Ferguson, M.A.** 1992. Site of palmitoylation of a phospholipase C-resistant glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem.J.* **284**:297-300.
79. **Roberts, W.L., B.H. Kim, and T.L. Rosenberry.** 1987. Differences in the glycolipid membrane anchors of bovine and human

- erythrocyte acetylcholinesterases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**:7817-7821.
80. **Guther, M.L., M.L. de Almeida, T.L. Rosenberry, and M.A. Ferguson.** 1994. The detection of phospholipase-resistant and -sensitive glycosyl- phosphatidylinositol membrane anchors by western blotting. *Anal.Biochem.* **219**:249-255.
 81. **Fox, J.A., M. Duszenko, M.A. Ferguson, M.G. Low, and G.A. Cross.** 1986. Purification and characterization of a novel glycan- phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma brucei*. *J Biol.Chem.* **261**:15767-15771.
 82. **Fox, J.A., N.M. Soliz, and A.R. Saltiel.** 1987. Purification of a phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase C from liver plasma membranes: a possible target of insulin action. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**:2663-2667.
 83. **Carrington, M., R. Bulow, H. Reinke, and P. Overath.** 1989. Sequence and expression of the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Trypanosoma brucei*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **33**:289-296.
 84. **Bulow, R. and P. Overath.** 1985. Synthesis of a hydrolase for the membrane-form variant surface glycoprotein is repressed during transformation of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* **187**:105-110.
 85. **LeBoeuf, R.C., M. Caldwell, Y. Guo, C. Metz, M.A. Davitz, L.K. Olson, and M.A. Deeg.** 1998. Mouse glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D (Gpld1) characterization. *Mamm.Genome* **9**:710-714.
 86. **Metz, C.N., P. Thomas, and M.A. Davitz.** 1992. Immunolocalization of a glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in mast cells found in normal tissue and neurofibromatosis lesions. *Am.J.Pathol.* **140**:1275-1281.
 87. **Davitz, M.A., J. Hom, and S. Schenkman.** 1989. Purification of a glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D from human plasma. *J.Biol.Chem.* **264**:13760-13764.
 88. **Huang, K.S., S. Li, W.J. Fung, J.D. Hulmes, L. Reik, Y.C. Pan, and M.G. Low.** 1990. Purification and characterization of glycosyl-phosphatidylinositol- specific phospholipase D. *J.Biol.Chem.* **265**:17738-17745.
 89. **Scallion, B.J., W.J. Fung, T.C. Tsang, S. Li, H. Kado-Fong, K.S. Huang, and J.P. Kochan.** 1991. Primary structure and functional

- activity of a phosphatidylinositol- glycan-specific phospholipase D. *Science* **252**:446-448.
90. **Metz, C.N., G. Brunner, N.H. Choi-Muira, H. Nguyen, J. Gabilove, I.W. Caras, N. Altszuler, D.B. Rifkin, E.L. Wilson, and M.A. Davitz.** 1994. Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI- specific phospholipase D. *EMBO J.* **13**:1741-1751.
 91. **Solter, P.F. and W.E. Hoffmann.** 1995. Canine corticosteroid-induced alkaline phosphatase in serum was solubilized by phospholipase activity in vivo. *Am.J.Physiol.* **269**:G278-G286
 92. **Hari, T., H. Kunze, E. Bohn, U. Brodbeck, and P. Butikofer.** 1996. Subcellular distribution of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in rat liver. *Biochem.J.* **320**:315-319.
 93. **Deeg, M.A. and M.A. Davitz.** 1995. Glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D: a tool for glycosylphosphatidylinositol structural analysis. *Methods Enzymol.* **250**:630-40 :630-640.
 94. **Phelps, B.M., P. Primakoff, D.E. Koppel, M.G. Low, and D.G. Myles.** 1988. Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* **240**:1780-1782.
 95. **Edidin, M. and I. Stroynowski.** 1991. Differences between the lateral organization of conventional and inositol phospholipid-anchored membrane proteins. A further definition of micrometer scale membrane domains. *J.Cell Biol.* **112**:1143-1150.
 96. **Zurzolo, C., W. van't Hof, G. van Meer, and E. Rodriguez-Boulan.** 1994. VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *EMBO J.* **13**:42-53.
 97. **Arreaza, G. and D.A. Brown.** 1995. Sorting and intracellular trafficking of a glycosylphosphatidylinositol- anchored protein and two hybrid transmembrane proteins with the same ectodomain in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **270**:23641-23647.
 98. **Brown, D.A., B. Crise, and J.K. Rose.** 1989. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* **245**:1499-1501.
 99. **Lisanti, M.P., I.W. Caras, M.A. Davitz, and E. Rodriguez-Boulan.** 1989. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J.Cell Biol.* **109**:2145-2156.

100. **Lisanti, M.P., I.W. Caras, and E. Rodriguez-Boulan.** 1991. Fusion proteins containing a minimal GPI-attachment signal are apically expressed in transfected MDCK cells. *J. Cell Sci.* **99**:637-640.
101. **Anderson, R.G., B.A. Kamen, K.G. Rothberg, and S.W. Lacey.** 1992. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**:410-411.
102. **Anderson, R.G.** 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:10909-10913.
103. **Hoessli, D.C. and P.J. Robinson.** 1998. GPI-anchors and cell membranes: a special relationship. *Trends. Cell Biol.* **8**:87-89.
104. **Mayor, S., S. Sabharanjak, and F.R. Maxfield.** 1998. Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J.* **17**:4626-4638.
105. **Kooyman, D.L., G.W. Byrne, S. McClellan, D. Nielsen, M. Tone, H. Waldmann, T.M. Coffman, K.R. McCurry, J.L. Platt, and J.S. Logan.** 1995. In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* **269**:89-92.
106. **Romero, G., G. Gamez, L.C. Huang, K. Lilley, and L. Luttrell.** 1990. Anti-inositolglycan antibodies selectively block some of the actions of insulin in intact BC3H1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:1476-1480.
107. **Misek, D.E. and A.R. Saltiel.** 1992. An inositol phosphate glycan derived from a *Trypanosoma brucei* glycosyl- phosphatidylinositol mimics some of the metabolic actions of insulin. *J. Biol. Chem.* **267**:16266-16273.
108. **Vila, M.C., G. Milligan, M.L. Standaert, and R.V. Farese.** 1990. Insulin activates glycerol-3-phosphate acyltransferase (de novo phosphatidic acid synthesis) through a phospholipid-derived mediator. Apparent involvement of Gi alpha and activation of a phospholipase C. *Biochemistry* **29**:8735-8740.
109. **Vila, M.C. and R.V. Farese.** 1991. Insulin rapidly increases glycerol-3-phosphate-acyltransferase activity in rat adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**:366-368.
110. **Merida, I., J.C. Pratt, and G.N. Gaulton.** 1990. Regulation of interleukin 2-dependent growth responses by glycosylphosphatidylinositol molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:9421-9425.

-
111. **Represa, J., M.A. Avila, C. Miner, F. Giraldez, G. Romero, R. Clemente, J.M. Mato, and I. Varela-Nieto.** 1991. Glycosyl-phosphatidylinositol/inositol phosphoglycan: a signaling system for the low-affinity nerve growth factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:8016-8019.
112. **Martiny, L., F. Antonicelli, B. Thuilliez, B. Lambert, C. Jacquemin, and B. Haye.** 1990. Control by thyrotropin of the production by thyroid cells of an inositol phosphate-glycan. *Cell Signal.* **2**:21-27.
113. **Leon, Y., E. Vazquez, C. Sanz, J.A. Vega, J.M. Mato, F. Giraldez, J. Represa, and I. Varela-Nieto.** 1995. Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression. *Endocrinology* **136**:3494-3503.
114. **Varela-Nieto, I., J. Represa, M.A. Avila, C. Miner, J.M. Mato, and F. Giraldez.** 1991. Inositol phospho-oligosaccharide stimulates cell proliferation in the early developing inner ear. *Dev.Biol.* **143**:432-435.
115. **Varela, I., M. Avila, J.M. Mato, and L. Hue.** 1990. Insulin-induced phospho-oligosaccharide stimulates amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *Biochem.J.* **267**:541-544.
116. **Alvarez, L., M.A. Avila, J.M. Mato, J.G. Castano, and I. Varela-Nieto.** 1991. Insulin-like effects of inositol phosphate-glycan on messenger RNA expression in rat hepatocytes. *Mol.Endocrinol.* **5**:1062-1068.
117. **Aleman, S., J. Puerta, A. Guadano, and J.M. Mato.** 1990. Modulation of casein kinase II activity by the polar head group of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol. *J.Biol.Chem.* **265**:4849-4852.
118. **Bruni, P., E. Meacci, M. Avila, V. Vasta, M. Farnararo, J.M. Mato, and I. Varela.** 1990. A phospho-oligosaccharide can reproduce the stimulatory effect of insulin on glycolytic flux in human fibroblasts [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Apr 30;168(2):886]. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **166**:765-771.
119. **Saltiel, A.R.** 1994. The paradoxical regulation of protein phosphorylation in insulin action. *FASEB J.* **8**:1034-1040.
120. **Muller, G., E.A. Dearey, A. Korndorfer, and W. Bandlow.** 1994. Stimulation of a glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase by insulin and the sulfonylurea, glimepiride, in rat

- adipocytes depends on increased glucose transport. *J. Cell Biol.* **126**:1267-1276.
121. **Romero, G., L. Luttrell, A. Rogol, K. Zeller, E. Hewlett, and J. Larner.** 1988. Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: potential precursors of insulin mediators. *Science* **240**:509-511.
 122. **Suzuki, S., Y. Taneda, S. Hirai, Y. Satoh, and T. Toyota.** 1993. Insulin stimulates hydrolysis of plasmalogen inositol-glycan and phosphatidylinositol-glycan in rat adipocytes. Insulin-induced generation of inositol glycan, alkylacylglycerol, and diacylglycerol. *Diabetes* **42**:988-994.
 123. **Movahedi, S. and N.M. Hooper.** 1997. Insulin stimulates the release of the glycosyl phosphatidylinositol- anchored membrane dipeptidase from 3T3-L1 adipocytes through the action of a phospholipase C. *Biochem.J.* **326**:531-537.
 124. **Deeg, M.A., E.P. Brass, and T.L. Rosenberry.** 1993. Inositol glycan phosphate derived from human erythrocyte acetylcholinesterase glycolipid anchor and inositol cyclic 1,2- phosphate antagonize glucagon activation of glycogen phosphorylase. *Diabetes* **42**:1318-1323.
 125. **Mato, J.M.** 1989. Insulin mediators revisited. *Cell Signal.* **1**:143-146.
 126. **Kilgour, E.** 1993. A role for inositol-glycan mediators and G-proteins in insulin action. *Cell Signal.* **5**:97-105.
 127. **Romero, G. and J. Larner.** 1993. Insulin mediators and the mechanism of insulin action. *Adv.Pharmacol.* **24:21-50**:21-50.
 128. **Galasko, G.T., Y. Bao, S.J. Broomfield, N.M. Hooper, A.J. Turner, and J. Larner.** 1995. Circulating factors and insulin resistance. I. A novel myoinositol 1,2- cyclic phosphate phosphoglycan insulin antagonist from human plasma is elevated in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **80**:2419-2429.
 129. **Saltiel, A.R.** 1987. Insulin generates an enzyme modulator from hepatic plasma membranes: regulation of adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase, pyruvate dehydrogenase, and adenylate cyclase. *Endocrinology* **120**:967-972.
 130. **Martiny, L., K. Dib, B. Haye, C. Correze, C. Jacquemin, and B. Lambert.** 1991. The effect of glycosyl inositol-phosphate on cAMP production in isolated rat fat-cells is transduced by a pertussis toxin sensitive G- protein. *FEBS Lett.* **286**:105-109.

131. **Villalba, M., K.L. Kelly, and J.M. Mato.** 1988. Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochim.Biophys.Acta* **968**:69-76.
132. **Alvarez, J.F., M.A. Cabello, J.E. Feliu, and J.M. Mato.** 1987. A phospho-oligosaccharide mimics insulin action on glycogen phosphorylase and pyruvate kinase activities in isolated rat hepatocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **147**:765-771.
133. **Aleman, S., J.M. Mato, and P. Stralfors.** 1987. Phospho-dephospho-control by insulin is mimicked by a phospho- oligosaccharide in adipocytes. *Nature* **330**:77-79.
134. **Muller, G., S. Wied, A. Crecelius, A. Kessler, and J. Eckel.** 1997. Phosphoinositolglycan-peptides from yeast potently induce metabolic insulin actions in isolated rat adipocytes, cardiomyocytes, and diaphragms. *Endocrinology* **138**:3459-3475.
135. **Saltiel, A.R. and L.R. Sorbara-Cazan.** 1987. Inositol glycan mimics the action of insulin on glucose utilization in rat adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **149**:1084-1092.
136. **Alvarez, J.F., J.A. Sanchez-Arias, A. Guadano, F. Estevez, I. Varela, J.E. Feliu, and J.M. Mato.** 1991. Transport in isolated rat hepatocytes of the phospho-oligosaccharide that mimics insulin action. Effects of adrenalectomy and glucocorticoid treatment. *Biochem.J.* **274**:369-374.
137. **Muller, G., E.M. Wetekam, C. Jung, and W. Bandlow.** 1994. Membrane association of lipoprotein lipase and a cAMP-binding ectoprotein in rat adipocytes. *Biochemistry* **33**:12149-12159.
138. **Schofield, L., S. Novakovic, P. Gerold, R.T. Schwarz, M.J. McConville, and S.D. Tachado.** 1996. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J.Immunol.* **156**:1886-1896.
139. **Tachado, S.D., P. Gerold, R. Schwarz, S. Novakovic, M. McConville, and L. Schofield.** 1997. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**:4022-4027.

140. **Lederkremer, R.M., M.J. Alves, G.C. Fonseca, and W. Colli.** 1976. A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochim.Biophys.Acta* **444**:85-96.
141. **Lederkremer, R.M., O.L. Casal, C.T. Tanaka, and W. Colli.** 1978. Ceramide and inositol content of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **85**:1268-1274.
142. **Lederkremer, R.M., C.T. Tanaka, M.J. Alves, and W. Colli.** 1977. Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Amide and ester-linked fatty acids. *Eur.J.Biochem.* **74**:263-267.
143. **Zamze, S.E., M.A. Ferguson, R. Collins, R.A. Dwek, and T.W. Rademacher.** 1988. Characterization of the cross-reacting determinant (CRD) of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Eur.J.Biochem.* **176**:527-534.
144. **Previato, J.O., P.A. Gorin, M. Mazurek, M.T. Xavier, B. Fournet, J.M. Wieruszkes, and L. Mendonca-Previato.** 1990. Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J.Biol.Chem.* **265**:2518-2526.
145. **Igarashi, Y. and E.M. Chambaz.** 1987. A novel inositol glycopospholipid (IGPL) and the serum dependence of its metabolism in bovine adrenocortical cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **145**:249-256.
146. **Cozza, E.N., M.C. Vila, C.E. Gomez-Sanchez, and R.V. Farese.** 1988. ACTH stimulates turnover of the phosphatidylinositol-glycan. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **157**:585-589.
147. **Conzelmann, A., H. Riezman, C. Desponds, and C. Bron.** 1988. A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* **7**:2233-2240.
148. **Muller, G. and W. Bandlow.** 1991. A cAMP-binding ectoprotein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **30**:10181-10190.
149. **Conzelmann, A., A. Puoti, R.L. Lester, and C. Desponds.** 1992. Two different types of lipid moieties are present in glycoposphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**:457-466.

150. **Reggiori, F., E. Canivenc-Gansel, and A. Conzelmann.** 1997. Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**:3506-3518.
151. **Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S.G. Oliver.** 1996. Life with 6000 genes [see comments]. *Science* **274**:546, 563-546, 567.
152. **Henry, S.A. and J.L. Patton-Vogt .** 1998. Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.* **61:133-79**:133-179.
153. **Fernandez, S., M.J. Homann, S.A. Henry, and G.M. Carman.** 1986. Metabolism of the phospholipid precursor inositol and its relationship to growth and viability in the natural auxotroph *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* **166**:779-786.
154. **Majumder, A.L., M.D. Johnson, and S.A. Henry.** 1997. 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase. *Biochim.Biophys.Acta* **1348**:245-256.
155. **Stuart, J.A., P.J. Hughes, C.J. Kirk, J. Davey, and R.H. Michell.** 1995. The involvement of inositol lipids and phosphates in signalling in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem.Soc.Trans.* **23**:223S
156. **Fernandez, F., M. Jannatipour, U. Hellman, L.A. Rokeach, and A.J. Parodi.** 1996. A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP-- Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability. *EMBO J* **15**:705-713.
157. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
158. **Morrissey J.H.** 1981. *Anal.Biochem.* **117**:307-310.
159. **Chamberlain, J.P.** 1979. Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal.Biochem.* **98**:132-135.
160. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
161. **Bordier, C.** 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J.Biol.Chem.* **256**:1604-1607.

-
162. **Ko, Y.G. and G.A.J. Thompson.** 1995. Purification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by modified triton X-114 partitioning and preparative gel electrophoresis. *Anal.Biochem.* **224**:166-172.
163. **Tait J.F., Tait S.A.S, and Gould R.P.** 1972. *J of Endocrinology* 55:XXXI. Purification of rat adrenal zona glomerulosa cells by unit gravity sedimentation.
164. **Williams B.C., McDougall J.G, Hyatt P.J, Bell J.B.G, Tait S.A.S, and Tait J.F.** 1974. *J of Endocrinology* 81:109P. Purification of dispersed rat adrenal cells by column filtration.
165. **Lederkremer, R.M., O.L. Casal, M.J. Alves, and W. Colli.** 1980. Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Modification and tritium labeling. *FEBS Lett.* **116**:25-29.
166. **Lederkremer, R.M., C.E. Lima, M.I. Ramirez, M.F. Goncalvez, and W. Colli.** 1993. Hexadecylpalmitoylglycerol or ceramide is linked to similar glycoposphoinositol anchor-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Eur.J.Biochem.* **218**:929-936.
167. **Gomez-Sanchez, C.E., M.F. Foecking, M.W. Ferris, M.R. Chavarri, L. Uribe, and E.P. Gomez-Sanchez.** 1987. The production of monoclonal antibodies against aldosterone. *Steroids* **49**:581-587.
168. **Gomez-Sanchez, C., B.A. Murry, D.C. Kem, and N.M. Kaplan.** 1975. A direct radioimmunoassay of corticosterone in rat serum. *Endocrinology* **96**:796-798.
169. **Gomez-Sanchez, C., L. Milewich, and O.B. Holland.** 1977. Radioiodinated derivatives for steroid radioimmunoassay. Application to the radioimmunoassay of cortisol. *J.Lab.Clin.Med.* **89**:902-909.
170. **Mayor, S., A.K. Menon, and G.A. Cross.** 1990. Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. II. Lipid structures of phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J.Biol.Chem.* **265**:6174-6181.
171. **Toennis, W.E.** 1951. *Anal.Biochem.* **23**:823
172. **Svennerholm L.** 1956. *J.Neurochem.* 1:42
173. **Reymond, C.D., C. Beghdadi-Rais, M. Roggero, E.A. Duarte, C. Desponds, M. Bernard, D. Groux, H. Matile, C. Bron, and G. Corradin.** 1995. Anchoring of an immunogenic Plasmodium

- falciparum circumsporozoite protein on the surface of *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.* **270**:12941-12947.
174. **Lederkremer, R.M., C. Lima, and Vila M.C.** 1996. Ceramide 1-phosphate is released from a glycoinositolphosphoceramide of *Trypanosoma cruzi* by rat blood plasma. *Mol.Biochem.Parasitol.* **79**:219-223.
175. **McConville, M.J., T.A. Collidge, M.A. Ferguson, and P. Schneider.** 1993. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *J.Biol.Chem.* **268**:15595-15604.
176. **Manku, M.S.** 1983. A comparison of GLC and HPLC methods for determining fatty acid composition of evening primrose and soybean oil. *J.Chromatogr.Sci* **21**:367-369.
177. **Weiss, S.B.** 1958. The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and D-1,2-diglyceride. *J.Biol.Chem.* **231**:53-64.
178. **Miki, A., Y. Tanaka, S. Ogata, and Y. Ikehara.** 1986. Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme. *Eur.J.Biochem.* **160**:41-48.
179. **Kodukula, K., R. Micanovic, L. Gerber, M. Tamburrini, L. Brink, and S. Udenfriend.** 1991. Biosynthesis of phosphatidylinositol glycan-anchored membrane proteins. Design of a simple protein substrate to characterize the enzyme that cleaves the COOH-terminal signal peptide. *J.Biol.Chem.* **266**:4464-4470.
180. **Lowe, M.E.** 1992. Site-specific mutations in the COOH-terminus of placental alkaline phosphatase: a single amino acid change converts a phosphatidylinositol- glycan-anchored protein to a secreted protein. *J.Cell Biol.* **116**:799-807.
181. **Bublitz, R., J. Armesto, E. Hoffmann-Blume, M. Schulze, H. Rhode, A. Horn, S. Aulwurm, E. Hannappel, and W. Fischer.** 1993. Heterogeneity of glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase of calf intestine. *Eur.J.Biochem.* **217**:199-207.
182. **Low, M.G. and A.R. Prasad.** 1988. A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell- surface proteins is abundant in plasma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**:980-984.
183. **Walter, E.I., W.D. Ratnoff, K.E. Long, J.W. Kazura, and M.E. Medof.** 1992. Effect of glycoinositolphospholipid anchor lipid groups on

- functional properties of decay-accelerating factor protein in cells. *J.Biol.Chem.* **267**:1245-1252.
184. **Ogata, S., Y. Hayashi, N. Takami, and Y. Ikehara.** 1988. Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase. *J.Biol.Chem.* **263**:10489-10494.
185. **Narasimhan, S., J.R. Wilson, E. Martin, and H. Schachter.** 1979. A structural basis for four distinct elution profiles on concanavalin A-Sepharose affinity chromatography of glycopeptides. *Can.J Biochem.* **57**:83-96.
186. **Costa, M.H., P.L. Ho, A.M. da Silva, G.R. Baptista, L.C. Leite, J. Cabrera-Crespo, K.M. Venturini, M. Katz, C. Liberman, and A.R. da Silva.** 1993. Purification of basic fibroblast growth factor and alkaline phosphatase from human placenta. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **17**:155-165.
187. **Puoti, A. and A. Conzelmann.** 1993. Characterization of abnormal free glycoposphatidylinositols accumulating in mutant lymphoma cells of classes B, E, F, and H. *J.Biol.Chem.* **268**:7215-7224.
188. **Haynes R.C., Kority S.B., and Peron F.G.** 1959. *J.Biol.Chem.* 234, 1421. Influence of Adenosine 3', 5'-monophosphate on Corticoid Production by Rat Adrenal Glands.
189. **Shima S, Kawashima Y, and Hirai M.** 1978. *Endocrinology* 103, 1361. Studies on cyclic nucleotides in the adrenal gland. VIII. Effects of angiotensin on adenosine 3', 5'-monophosphate and steroidogenesis in the adrenal cortex.
190. **Tait J.F., Tait S.A.S, Bell J.B.G, Hyatt P.J, and Williams B.C.** 1980. *J of Endocrinology* 87, 11. Further studies on the stimulation of rat adrenal capsular cells: Four types of response.
191. **Vila, M.C., E.N. Cozza, C. Lima, M.I. Ramirez, and R.M. de Lederkremer.** 1995. An inositol phosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* inhibits ACTH action in calf adrenocortical cells. *Cell Signal.* **7**:331-339.
192. **Frick, W., A. Bauer, J. Bauer, S. Wied, and G. Muller.** 1998. Insulin-mimetic signalling of synthetic phosphoinositolglycans in isolated rat adipocytes. *Biochem.J* **336**:163-181.
193. **Williams, J. M.** Deamination of carbohydrate amines and related compounds. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 31, 9-79. 1975.
194. **Macaulay, S.L. and R.G. Larkins.** 1990. Isolation of insulin-sensitive phosphatidylinositol-glycan from rat adipocytes. Its impaired

- breakdown in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem.J.* **271**:427-435.
195. **Roberts, J.M., P. Kenton, and P.M. Johnson.** 1990. Growth factor-induced release of a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)- linked protein from the HEP-2 human carcinoma cell line. *FEBS Lett.* **267**:213-216.
196. **Jones, D.R., M.A. Avila, C. Sanz, and I. Varela-Nieto.** 1997. Glycosyl-phosphatidylinositol-phospholipase type D: a possible candidate for the generation of second messengers. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **233**:432-437.
197. **Jones, D.R. and I. Varela-Nieto.** 1998. The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int.J Biochem.Cell Biol.* **30**:313-326.
198. **Ghahremani, M.H., P. Cheng, P.M. Lembo, and P.R. Albert.** 1999. Distinct roles for Galphai2, Galphai3, and Gbeta gamma in modulation of forskolin- or Gs-mediated cAMP accumulation and calcium mobilization by dopamine D2S receptors. *J Biol.Chem.* **274**:9238-9245.
199. **Luttrell, L.M., E.L. Hewlett, G. Romero, and A.D. Rogol.** 1988. Pertussis toxin treatment attenuates some effects of insulin in BC3H-1 murine myocytes. *J.Biol.Chem.* **263** :6134-6141.
200. **Uehara, T., S. Hoshino, M. Ui, Y. Tokumitsu, and Y. Nomura.** 1994. Possible involvement of phosphatidylinositol-specific phospholipase C related to pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts: negative regulation of protein kinase C. *Biochim.Biophys.Acta* **1224**:302-310.
201. **Phamantu, N.T., G. Fagnen, F. Godard, J. Bocquet, and P.J. Bonnamy.** 1999. Sodium chlorate induces undersulfation of cellular proteoglycans and increases in FSH-stimulated estradiol production in immature rat Sertoli cells. *J Androl.* **20**:241-250.
202. **Peytremann, A., W.E. Nicholson, G.W. Liddle, J.G. Hardman, and E.W. Sutherland.** 1973. Effects of methylxanthines on adenosine 3',5'-monophosphate and corticosterone in the rat adrenal. *Endocrinology* **92**:525-530.
203. **Plourde, R.** 1992. Synthesis and Characterization of an Insulin-Mimetic Disaccharide. *J.Org.Chem.* **57**:2606-2610.

-
204. **Frick, W., A. Bauer, J. Bauer, S. Wied, and G. Muller.** 1998. Structure-activity relationship of synthetic phosphoinositolglycans mimicking metabolic insulin action. *Biochemistry* **37**:13421-13436.
205. **Kessler, A., G. Muller, S. Wied, A. Crecelius, and J. Eckel.** 1998. Signalling pathways of an insulin-mimetic phosphoinositolglycan-peptide in muscle and adipose tissue. *Biochem.J* **330**:277-286.
206. **Soeder, K.J., S.K. Snedden, W. Cao, R.G. Della, K.W. Daniel, L.M. Luttrell, and S. Collins.** 1999. The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J Biol.Chem.* **274**:12017-12022.
207. **Gonda, K., H. Okamoto, N. Takuwa, Y. Yatomi, H. Okazaki, T. Sakurai, S. Kimura, R. Sillard, K. Harii, and Y. Takuwa.** 1999. The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem.J* **337**:67-75.
208. **Daaka, Y., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz.** 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**:88-91.
209. **Herrlich, A., B. Kuhn, R. Grosse, A. Schmid, G. Schultz, and T. Gudermann.** 1996. Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J Biol.Chem.* **271**:16764-16772.
210. **Laugwitz, K.L., A. Allgeier, S. Offermanns, K. Spicher, J. Van Sande, J.E. Dumont, and G. Schultz.** 1996. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* **93**:116-120.
211. **Lester, R.L. and R.C. Dickson.** 1993. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv.Lipid Res.* **26**:253-74:253-274.
212. **Dickson, R.C. and R.L. Lester.** 1999. Yeast sphingolipids. *Biochim.Biophys.Acta* **1426**:347-357.
213. **Smith, S.W. and R.L. Lester.** 1974. Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J Biol.Chem.* **249**:3395-3405.
214. **Roos, M., V. Soskic, S. Poznanovic, and J. Godovac-Zimmermann.** 1998. Post-translational modifications of endothelin receptor B

- from bovine lungs analyzed by mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* **273**:924-931.
215. **Wang, Y.X., N.L. Catlett, and L.S. Weisman.** 1998. Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J.Cell Biol.* **140**:1063-1074.
216. **Couve, A., V. Protopopov, and J.E. Gerst.** 1995. Yeast synaptobrevin homologs are modified posttranslationally by the addition of palmitate. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* **92**:5987-5991.
217. **Losonczi, J.A. and J.H. Prestegard.** 1998. Nuclear magnetic resonance characterization of the myristoylated, N- terminal fragment of ADP-ribosylation factor 1 in a magnetically oriented membrane array. *Biochemistry* **37**:706-716.
218. **Thelen, M., A. Rosen, A.C. Nairn, and A. Aderem.** 1990. Tumor necrosis factor alpha modifies agonist-dependent responses in human neutrophils by inducing the synthesis and myristoylation of a specific protein kinase C substrate. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* **87**:5603-5607.
219. **Metz, C.N., G. Brunner, N.H. Choi-Muira, H. Nguyen, J. Gabilove, I.W. Caras, N. Altszuler, D.B. Rifkin, E.L. Wilson, and M.A. Davitz.** 1994. Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI- specific phospholipase D. *EMBO J* **13**:1741-1751.
220. **White, G.L. and J.N. Hawthorne.** 1970. Phosphatidic acid and phosphatidylinositol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem.J* **117**:203-213.
221. **Dickson, R.C.** 1998. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:27-48:27-48.
222. **Gemmill, T.R. and R.B. Trimble.** 1999. *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal0-2Man1-3 O-linked oligosaccharides. *Glycobiology.* **9**:507-515.
223. **Gemmill, T.R. and R.B. Trimble.** 1996. *Schizosaccharomyces pombe* produces novel pyruvate-containing N-linked oligosaccharides. *J Biol.Chem.* **271**:25945-25949.
224. **Ziegler, F.D., T.R. Gemmill, and R.B. Trimble.** 1994. Glycoprotein synthesis in yeast. Early events in N-linked oligosaccharide processing in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol.Chem.* **269**:12527-12535.