

LECCION JIMENEZ DIAZ

Ex de Mm

Ex autoridades

San Seán

Ante todo quiero agradecer a la Fundación Conchita Rábago de Jimenez Diaz por haberme invitado a dar esta lección. Fué una invitación que me emocionó porque tuve por Jimenez Diaz una gran admiración y desde que le conocí sentí afecto por él. Fué en Santiago de Compostela en la reunión de la Sociedad Europea de Bioquímica donde le conocí por primera vez. Me impresionó profundamente su personalidad, su inteligencia y su interés por la investigación científica. Después de eso le vi unas pocas veces más con lo que creció mi afecto por él.

Es un gran honor dar una conferencia que lleva un nombre tan distinguido y en la que los oradores han sido personas tan destacadas como Ochoa, Cournand, Krebs y Waldenstrom.

El tema de mi charla es la biosíntesis de <sup>gluc</sup>proteínas. Es un campo en que hemos empezado a trabajar hace poco y al cual hemos llegado no por elección premeditada sino por que a ello nos han llevado los experimentos. En realidad estábamos trabajando sobre un tema que empezó hace muchos años y es el del papel de los nucleótido azucares en los tejidos animales.

→ Mi plan es hacer una introducción general sobre la función y estructura de algunas glicoproteínas, luego me referiré al papel general de ciertos poliprenoles y finalmente resumiré los resultados que hemos obtenido en nuestro laboratorio en Buenos Aires.

Las glicoproteínas se encuentran distribuidas en todos los seres y cumplen una función que aunque no conocemos muy bien todavía, creemos que debe ser de gran importancia en las células. Solo difieren de las proteínas comunes en que tienen además algunos

Robrens -  
Carmine  
Hend. Stenstrom  
Pavlov



azúcares unidos a la cadena de aminoácidos. Estos azúcares pueden ser la glucosa, galactosa, manosa, aminoazúcares y ácido neuramínico.

### Función de las glicoproteínas

El papel que juegan la parte de azúcares en glicoproteínas se conoce solo en parte.

En algunos casos no parece muy importante, por ejemplo hay una enzima, la ribonucleasa que se ha obtenido en dos formas, una con residuos de azúcar y otra sin. Ambas tienen la misma actividad enzimática. // Por otra parte las sustancias responsables de la actividad de los grupos sanguíneos en el hombre son glicoproteínas y en ellas la parte de azúcar es la que determina la especificidad. Según cuales son los azúcares que las componen pueden determinar que dichas sustancias tengan especificidad de grupo A o B o cualquiera de los otros.

Otros hechos que se pueden mencionar en este sentido son los resultados de Ashwell y colaboradores. Ellos observaron que algunas glicoproteínas (como el crosonucoide, la fetuina, la macroglobulina, tiroglubulina, etc.) cuando se las inyecta en la sangre de un animal quedan un tiempo en circulación. En cambio cuando se les quita parte de los azúcares por tratamiento con enzimas (en este caso la neuraminidasa) entonces desaparecen rápidamente de la circulación y se fijan en el hígado. En este caso el resto de azúcar determina el comportamiento fisiológico de estas proteínas. Además ciertas glicoproteínas tienen un importante papel en determinar la especificidad de las células de manera que se reconozcan entre sí como iguales o distintas. Así las sustancias que deter-



minan la compatibilidad o incompatibilidad de las células son glicoproteínas. Es decir que estas son responsables de que los injertos prendan o sean rechazados.

Parecería que cada tipo de células tiene una cubierta de glicoproteínas que determinan su identidad y esto determina también una diferencia entre las células normales y las células tumorales. Se está trabajando muy activamente en este campo. Por otra parte hay glicoproteínas como el ácido hialurónico en el cartílago y varias otras que tienen importantes papeles como sustancias estructurales.

### Biosíntesis

El mecanismo por el cual los aminoácidos se <sup>unen</sup> usan entre sí para formar las proteínas se conoce con bastante detalle ~~gracias a los estudios en que se han destacado Ocho y colaboradores.~~

Una vez formada la cadena de aminoácidos pueden ocurrir otros cambios como ser metilación, acetilación, oxidación, fosforilación y adición de residuos de azúcar.

Fig.

diapositiva

108

La figura muestra que hay tres residuos a los cuales se pueden unir azúcares. Estos son la hidroxilisina, la serina o treonina y la asparagina. Se puede observar que la hidroxilisina puede tener glucosa y galactosa. La asparagina puede llevar varios azúcares entre ellos la manosa que no se encuentra en los otros dos tipos.



Las proteínas de la sangre están en grupos<sup>ese</sup>. Por otra parte la serina o treonina pueden estar unidos a muy diversos azucares. Este grupo incluye las sustancias de los grupos sanguíneos, el ácido hialurónico, el condroitin sulfato y varias otras glicoproteínas. *Dehman mucina*

La biosíntesis de las glicoproteínas tiene lugar como la de todas las proteínas. Es decir que la secuencia de aminoácidos está codificada en el ácido deoxiribonucleico se copia sobre el ácido ribonucleico y se traduce en los ribosomas. Una vez completada la cadena de aminoácidos ocurre la adición de los azucares. Esta reacción es una transferencia a partir de los nucleótido azucares.

LD 661

---

diapositiva

---

La figura muestra la estructura del primer nucleótido azúcar que se identificó hace muchos años. Consiste de una parte de uridina, unida a dos fosfatos y un residuo de glucosa. Este compuesto actúa como dador de glucosa para la formación de sacarosa, glucógeno y otros polisacáridos. Se conocen numerosos compuestos similares a este la parte de azúcar puede ser acetilglucosamina, ácido glucos<sup>urónico</sup>amina, galactosa etc. Por otra parte el nucleósido también puede variar así hay compuestos con adenosina, guanosina, y timidina.

*1er nucleot.*

---

diapositiva

---



La figura muestra una lista de los nucleótido-azúcares. No es una lista al día pero da una idea de cuantos compuestos se conocen.

El UDP-glucosa se descubrió primero como cofactor de la transformación de galactosa, fosfato en glucosa, fosfato. Después <sup>de ~~ver~~ *de vivo*</sup> que actúa como dador de glucosa para formar glucogeno almidones, sacarosa, trehalosa, etc.

El UDP-galactosa interviene que dador de galactosa en diversas reacciones.

El UDP-glucurónico se forma por oxidación del UDP-glucosa. El GDP-manosa, UDP-acetil glucosamine fueron aislados con Cabib, Cardini de la levadura de cerveza.

El GDP-fucosa se forma a partir del GDP-manosa. El ADP-glucosa es importante en la síntesis del almidón. *falta CMP NAM*

73 *colageno*  
*membr. basal glomerulo*

---

diapositivo

---

La transferencia de azúcares al colageno se ha estudiado en bastante detalle - esp por Spiro.

Se han obtenido dos enzimas, una que transfiere galactosa del UDP-galactosa a la hidroxilisina y otra glucosa en posición 1-2 a partir del UDP-glucosa. En ambos casos se requiere ion manganeos. Los aceptores necesarios <sup>/se</sup> pueden obtener con glucon-  
dasas específicas o por hidrolisis acido selectiva. Este es un caso bastante simple.

*high salt no acceptor  
require prot. pept no.*

75 *condroitine*

---

diapositiva

---



Rodén

Un caso algo más complicado es el de la síntesis del condroitin sulfato. Primero se agrega xilosa al residuo de serina, el dador es UDP-xilosa.

Sobre la xilosa se adiciona sucesivamente y con diferentes enzimas, dos galactosas usando como dador al UDP-galactosa. Luego se agrega ácido glucurónico y después acetilgalactosamina. Ya después la adición se hace repetitiva y alternada. Una vez glucurónico, luego acetilgalactosamina y así sucesivamente. En total intervienen seis enzimas específicas. La formación de esta sustancia es un buen ejemplo de como se cree que se forman todas las glicoproteínas; por adición sucesiva de azúcares con enzimas específicas para cada etapa.

82 glycophanes

diapositiva

Vimos recién que para formar condroitin sulfato hacen falta unas seis enzimas. En esta figura se muestra la constitución de otros compuestos similares al condroitin sulfato. En general se les llama proteoglicanos o mucopolisacáridos. El ácido hialurónico está formado por una cadena que contiene alternadamente ácido glucurónico y acetilglucosamina.

Los condroitin 4 y 6 sulfatos difieren entre si por la posición en que se encuentra el sulfato sobre la acetilgalactosamina.

Otros compuestos importantes son el heparán sulfato el Keratan sulfato y el dermatan sulfato - de la piel.

109 mucina

diapositiva

Otro caso similar es el de la mucina submaxilar. Esta glucoproteína es ligeramente diferente en la oveja y en el cerdo.

Se puede tratar (Roseman) la mucina ovina con neuraminidasa de modo de sacarle el ácido neurámico. La sustancia obtenida se puede usar de aceptor a partir del Citidine-monofosfato - ácido neurámico con una enzima de glándula submaxilar. También se puede quitar el residuo acetilgalactosamina con una



apropiada y volver a colocarlo con otra enzima y UDP-acetilgalactosamina como dador.

También se ha logrado preparar un compuesto similar a la mucina submaxilar porcina por transferencia sucesiva de acetilgalactosamina, galactosa, acetilgalactosamina fucosa y ácido glicolil neuramínico.

110 Group name

diapositiva

Los estudios sobre las sustancias de los grupos sanguíneos realizados por Morgan, Kabat, Watkins <sup>Ginsberg</sup> y otros son de gran interés y representan una serie de trabajos importantísimos.

La figura es una gran simplificación de lo que se sabe. La parte superior representa una parte de la glucoproteína específica. Cuando se le agrega un residuo de fucosa se forma la sustancia H. La enzima que cataliza la transferencia a partir del GDP-fucosa se llama  $\alpha$  fucosil transferasa y la formación de esta enzima depende del gene H. Como se sabe distintos individuos pueden tener el grupo sanguíneo A o el B y esto depende del gene A o del gene B.

Para formar la sustancia del grupo A la sustancia H recibe un residuo de acetilgalactosamina unida  $\beta$  1-3 a la galactosa. En cambio para que se forme la sustancia B es necesario transferir una galactosa (también  $\beta$  1-3). Las transferasas para acetilgalactosamina o galactosa dependen de los genes A o B. Esta es la explicación a nivel molecular de la especificidad de las sustancias de los grupos sanguíneos.

erit - lipide  
etc. prot.

111 Heteroglob

diapositiva


Hasta ahora nos hemos referido a las proteínas que tienen el azúcar ligado en la hidroxilisina como el colágeno y aquellos en que el azúcar está unido a la serina o treonina. Para completar faltan tres proteínas en que la unión del azúcar se hace sobre la asparagina.



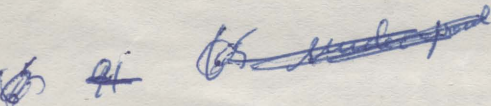
La figura muestra un ejemplo de estas sustancias. La tiroglobulina - Como se ve la asparagina (ASn) lleva unidos dos acetilglucosaminas unidas 1-4 como en la quintina polisacárido que forma la cubierta de los crustaceos. La molécula lleva además varias manosas formando cadenas ramificadas. La estructura es la publicada por Spiro.

Se han hecho estudios de biosíntesis sobre diversas glucoproteínas de este tipo. En general lo que se ha hecho es secar algunos azúcares con enzimas hidrolizantes para obtener un aceptor y luego volverlos a colocar con el nucleótido azúcar correspondiente y una transferencia específica.

Todavía no se conoce bien como se forma la parte interna, en particular como se unen las dos acetilglucosamina vecina a la asparagina. En nuestro laboratorio tenemos una teoría con cierta base experimental a la que me referiré luego.

*Undecaprenol 65*  *diapositiva*  
Voy a salir un poco del tema principal para mencionar el papel de ciertos lípidos en la transferencia de azúcares.

La sustancia que se ve en la figura es el undecaprenol, un poliprenol con once residuos de isopreno y un grupo alcoholico unido a dos fosfatos y a azúcares. Esta sustancia fue descubierta por dos grupos en EEUU: el de Strominger y el de Robbins. Con este último trabajó uno de nuestros colaboradores, M. Dankert y fué él quien nos interesó en el problema.

*91*  Diapositiva

Esta figura muestra el esquema de Robbins y colaboradores para la síntesis de un lipopolisacárido de Salmonella. La Salmonella, una de las bacterias que producen infecciones intestinales, tienen muchos tipos que se pueden diferenciar por los anticuerpos que producen en mamíferos. Los diferentes tipos difieren en la estructura de sus lipopolisacáridos.

*Chilestis  
benzoyl de Noctizuma*



Este es el mecanismo de formación de uno de los tipos. El polisacárido tiene una unidad de galactosa ramnosa manosa repetida muchas veces formando largas cadenas.

El primer paso de la síntesis es una reacción de UDP-galactosa con undecaprenol fosfato.

El undecaprenol pirofosfato galactosa resultante recibe ramnosa del TDP-Ramnosa. Se forma undecaprenol pirofosfato disacárido. Con Manosa se completa un trisacárido. Este actúa como dador para formar cadenas que contienen la unidad repetitiva galactosa ramnosa manosa repetida hasta 20 veces.

61 *componen*

---

Diapositiva

---

Ahora me voy a referir a resultados de nuestro laboratorio trabajando con los Dres. Behrens, Parodi, Carminatti y Staneloni.

Lo primero que se hizo fue incubar la fracción de microsomas de hígado con UDP-glucosa-marcado y medir la radioactividad en sustancias solubles en solventes orgánicos (metanol-cloroformo-agua). Se ve que hace falta manganeso un detergente y que el agregado de lípidos de hígado actúa como activador. Esto fue un hallazgo importante.

62 *curva*

---

diapositiva

---

Esta figura muestra que hay una proporcionalidad entre la cantidad de extracto lípidico agregado y la formación de radioactividad liposoluble.

Este hecho nos permitió medir cuantitativamente la sustancia y por lo tanto desarrollar un método de purificación.

Ya en casos anteriores habíamos usado métodos similares para el aislamiento del glucosa 16 difosfato y también para el uridina difosfato glucosa.



63 pint

---

diapositiva

---

Aquí se muestra el curso del método de purificación que se desarrolló con Behrens. Se parte de un extracto de hígado de cerdo en cloroformo-metanol 2:1, se saponifica para eliminar los lípidos que contienen ácidos grasos, se pasa por DEAE cellulose (columna de intercambio amónico) en cloroformo-metanol, se eluge con acetato de amonio. Se pasa por capa fina - Se logró una considerable purificación. El compuesto obtenido daba un espectro infrarrojo muy similar al de los poliprenoles. Como era difícil obtener la sustancia pura y en cantidad se atacó el problema desde otro ángulo. La idea fue de preparar el poliprenol correspondiente y fosforilarlo químicamente.

69 poliprenol

---

diapositiva

---

Hace un momento mostré la fórmula del undecaprenol que actúa como intermediario en la formación de polisacáridos en bacterias. El undecaprenol es un representante de una familia de sustancias con la fórmula general que se indica en la figura. Han sido cuidadosamente estudiados por un grupo de Liverpool formado por Morton, Hemming y otros.

Los distintos poliprenoles pueden diferir en el número  $n$  residuos de isopreno. Las dobles ligaduras pueden ser cis o trans y además la doble ligadura vecina al alcohol puede estar saturada.

70 lista poliprenol

---

diapositiva

---

Aquí se muestra la constitución de algunos poliprenoles. El solanesol se aisló de las hojas de tabaco, otros se obtuvieron de hojas, de madera o de un



hongo. Las estructuras son diferentes.

El que nos interesaba es el de tejidos animales el dolicol. Como lo dice su nombre tiene una larga cadena de atomos de carbono - formado por la unión de unos 20 residuos de isopreno. Uno de ellos (el primero) está saturado. Lo que hicimos fue aislar el dolicol de hígado y fosforilarlo químicamente (Cramer tricloroacetoniitrilo). Tuvimos la gran suerte de que el producto obtenido fuera activo en nuestro test como aceptor de glucosa. No solo era activo sino que corría igual en capa fina que el producto natural. Lo mismo ocurría con el producto con glucosa radiactiva. Se concluyó pues que nuestro aceptor lipidico era el monofosfato de dolicol y que este reaccionaba con el UDP para dar DMPG.

*Si otro nucleot.*

---

diapositiva

---

El mismo sistema enzimático se ensayo con otros nucleotidos. Se ve como el UDP-acetilglucosamina y el guanosina difosfato manosa pueden transferir el residuo de azucar al lípido. Actuan tanto el aceptor natural como el DMP sintético. En cambio con UDPgal o UDP acetilgalactosamina no se obtuvo transferencia de azucar.

Estudando la transferencia de manosa Hemming y colaboradores han demostrado definitivamente que el dolicol monofosfato el aceptor de azucares.

Las pruebas que nosotros teníamos eran fuertes pero no definitivas de modo que fue muy conveniente que otro grupo comprobara los resultados y con mejores técnicas.

*68 from GEA*

---

diapositiva

---

Cuando una encuentra una sustancia nueva se pregunta cual es su papel. Esto nos estuvimos preguntando durante algún tiempo hasta que hicimos el experimento que se ven en la figura.



Incubando el DMPG con microsomas de hígado y detergente. La técnica consistió en agregar cloroformo metanol agua de modo que se forman dos fases, una inferior de cloroformo, otro superior acuosa y una parte sólida formada por proteína que queda en la interfase.

Se ve que el DMPG disminuye y la radiactividad en la fase acuosa sube lentamente. En la interfase hay una subida y luego bajada del tipo que dan productos intermediarios en una reacción. Creemos primero que el producto radioactivo era una proteína (y lo publicamos) Pero luego pudimos extraerlo del precipitado y estucharlo mejor. Ahora le llamamos GEA (aceptor endogeno glucosilado).

No tengo tiempo de contarles los experimentos que nos llevaron a la conclusión de que la sustancia formada es dolicol difosfato unido a un oligosacárido. El oligosacárido que lleva la glucosa radiactiva se puede liberar con un tratamiento ácido suave o por metanolisis ácida.

99 camp. pyp. → El oligosacárido se puede cromatografiar en papel con un solvente que separa oligosacáridos. En la figura se ve como corre en relación a oligosacáridos de maltosa. Tiene la movilidad (por extrapolación) de un maltooligosacárido de unas 17 unidades de glucosa. El peso molecular medido con sefadex es de 3500 que corresponde a un oligosacárido de 17-20 unidades de hexosa. El producto tratado con anhídrido acético y ácido sulfúrico da una serie de sustancias que se comportan como oligosacáridos de menor peso molecular.

Además tenemos datos que indican que el oligosacárido tiene dos hexosaminas.

102 esquema

---

diapositiva

---

Con los hechos mencionados, otros que no he mencionado y un poco de imaginación se llega a este esquema. El DMPG transfiere la glucosa a un aceptor endogeno que es DPP-oligosacárido de 17-20 unidades dos de las cuales son



probablemente hexosaminas. Finalmente hay otra reacción que no había mencionado. Es la transferencia del oligosacárido del GEA a una proteína endógena.

103 *transf. prot.*

---

diapositiva

---

Se muestra el resultado de incubar GEA (dolicol-difosfato-oligosacárido) marcado con microsomas. El análisis consiste en tratar con cloroformo-metanol-agua de modo que la proteína desnaturalizada y el GEA quedan en la interfase. El GEA se puede luego extraer con cloroformo metanol agua en proporción 1:1:03. Luego se miden las distintas fracciones. Se ve que GEA disminuye y la radioactividad en proteína aumenta.

Se han hecho tratamientos con proteasa para asegurarse de que el oligosacárido está realmente unido a proteína.

112 *UDP Ag*

---

diapositiva

---

Antes de terminar quisiera mencionar algunos resultados más recientes obtenidos con UDP-acetilglucosamina. Incubando a esta con microsomas, extrayendo los lípidos, hidrolizándolos y corriéndolos en papel se ve que se formó acetilglucosamina unido a lípido.

Si al extracto lipídico se lo incuban otra vez con UDP-acetilglucosamina no marcado aparece otra sustancia.

Haciendo a la inversa es decir primero UDP-acetilglucosamina frío y luego marcado no anda tan bien. La sustancia formada se pudo identificar corriendo en papel con varios solventes. Resultó ser acetilquitobiosa (son dos acetilglucosaminas unidas 14).



113 Dufky

---

diapositiva

---

La fórmula de la sustancia parece ser la que aparece en la figura.  
Dolicol pirofosfato acetilquitobiosa.

Lo interesante de esto es que Uds. recordarán que cuando mencioné las glicoproteínas que tienen azúcares unidos a la asparagina dije que muchos de ellos o tal vez todos tienen la quitobiosa unida a la asparagina. Es decir que la quitobiosa forma la parte más interna del oligosacárido unido a asparagina. Parece probable que hemos encontrado al intermediario que interviene en la síntesis de estas glicoproteínas.

Nuestra hipótesis actual es que las glicoproteínas del tipo asparagina - o sea la ovalbumin - varias proteínas de la sangre, la tiroglobulina, etc. se forman no por transferencia directa de azúcares a la proteína, sino que el oligosacárido se sintetiza sobre el dolicol pirofosfato y luego es transferido a la proteína.

Creo que con un poco más de trabajo lo llegaremos a saber.

Ma  
-  
tison