

CROMATOGRAFÍA DE LOS RESTOS HIDROFÍLICOS DE ALGUNOS DERIVADOS DEL DOLICOL * **

L. F. LELOIR, A. J. PARODI *** y N. H. BEHRENS ***

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"
y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Obligado 2490, Buenos Aires (28), República Argentina

SUMMARY

A procedure for the separation of oligosaccharides by paper chromatography has been improved. With this method the migration of the hydrophilic residue of the compound formed by transfer of glucose from dolichol monophosphate glucose to an endogenous acceptor of liver microsomes was determined. Results showed that the substance behaves like a malto-oligosaccharide of 17-20 glucose residues. This value agrees with that obtained by gel filtration.

It was found that on incubation of liver microsomes with UDP-N-acetyl-glucosamine or GDP-Mannose with dolichol monophosphate compounds are formed which contain oligosaccharides of different size probably joined to dolichol.

La formación de casi todos los polisacáridos se realiza por transferencia de azúcares a partir de nucleótido azúcares. Sin embargo en algunas de estas reacciones se ha observado que ciertos polipre-

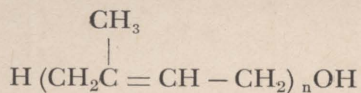
* Expresamos nuestra admiración y afecto por Bernardo A. Houssay cuyo ejemplo y obra perdurarán más allá de su fecunda y valiosa vida. Los que le hemos conocido sabemos que el mejor homenaje a su memoria es seguir trabajando con tenacidad como lo hizo él.

** Este trabajo fue realizado con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y por la Universidad de Buenos Aires.

*** Miembros de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Abreviaturas: UDP-Glc: uridina difosfato glucosa. UDP-Glc-Nac: uridina difosfato N-acetilglucosamina. GDP-Man: guanosina difosfato manosa. Dol-P-Glc: dolicol monofosfato glucosa. Dol-P-Glc-Nac: dolicol monofosfato N-acetilglucosamina. Dol-P-Man: dolicol monofosfato manosa. Dol P: dolicol monofosfato. GEA: aceptor endógeno glucosilado.

noles actúan como intermediarios. Los poliprenoles tienen la fórmula general

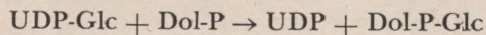


La sustancia que actúa como intermediario en la formación de lipopolisacáridos y de la mureína en bacterias tiene once unidades isopreno ($n = 11$)¹.

En tejidos animales se ha encontrado un poliprenol con un valor de n entre 18 y 24. Una de las dobles ligaduras, la que está vecina al alcohol, está saturada. Este poliprenol se conoce con el nombre de dolicol².

En nuestro laboratorio hemos realizado una serie de estudios que han mostrado que el dolicol tiene un papel importante en ciertas transferencias de azúcares. Inicialmente³ se estudió la glucosilación de un lípido usando UDP-Glc como dador. Lo que se medía era la aparición de radiactividad soluble en solventes orgánicos después de incubar microsomas de hígado con un lípido aceptor y UDP-Glc [¹⁴C] marcado en la glucosa. En condiciones adecuadas se vio que la cantidad de radiactividad soluble en cloroformo-metanol era proporcional a la cantidad de lípido aceptor agregado. Esto permitió medir a este último y desarrollar un procedimiento de purificación. El aceptor purificado resultó ser un ácido y el examen con espectrofotómetro infrarrojo demostró un espectro parecido al del dolicol. La etapa siguiente fue preparar dolicol por el método descrito por Burgos y col.⁴ y luego fosforilarlo químicamente. La sustancia obtenida, el dolicol monofosfato, resultó ser igual al aceptor purificado en lo que se refiere a movilidad en capa fina, estabilidad al ácido y al álcali.

Además el producto glucosilado, es decir el que se produce por transferencia de glucosa del UDP-Glc, resultó ser igual independientemente del sustrato usado, aceptor natural o dolicol fosfato. La reacción mencionada se puede escribir como sigue:



El Dol-P-Glc es lábil al ácido dando como producto glucosa libre en soluciones acuosas y metil glucósido cuando la reacción se hace en cloroformo-metanol. El álcali también descompone al Dol-P-Glc, pero en este caso el producto es 1-6 anhidroglucosa. Este último compuesto ya se sabía que se forma por acción del álcali sobre β -fenil glucósidos. Es probable que en el Dol-P-Glc la glucosa esté unida por un enlace β .

A continuación se estudió la transformación del Dol-P-Glc catalizada por las enzimas contenidas en la fracción microsomal de hígado. Se observó que en la incubación se produce otra sustancia de diferente solubilidad que designamos como GEA (aceptor endógeno glucosilado).

Cuando se agrega cloroformo-metanol-agua en la proporción 3:2:1 a la mezcla de reacción se observa que el Dol-P-Glc queda en la fase inferior, las sustancias solubles en agua pasan a la fase superior y entre las dos fases queda proteína desnaturalizada y el GEA. El GEA es insoluble en solventes empleados comúnmente para disolver lípidos pero se disuelve bien en cloroformo-metanol-agua 1:1:0.3. Aprovechando estas propiedades se pueden analizar las mezclas de reacción. Así se vio que agregando Dol-P-Glc marcado a los microsomas, éste desaparece y la radiactividad aparece en el GEA.

Aún no se ha logrado preparar GEA en cantidades como para analizarlo por los métodos químicos usuales pero siguiendo la sustancia radiactiva se han podido obtener datos sobre su estructura⁵.

Por tratamiento de GEA con ácido clorhídrico en metanol la radiactividad aparece en la fracción acuosa luego de agregar cloroformo y agua para formar una mezcla de proporción cloroformo-metanol-agua 3:2:1. El compuesto correspondiente dio un peso molecular de 3500 daltons cuando se lo corrió en columnas de Sephadex G-50. La acetólisis de dicha sustancia dio lugar a la formación de una serie de compuestos que parecían ser oligosacáridos a juzgar por su comportamiento en cromatografía de papel o de capa fina. Un oligosacárido de ese peso molecular tendría unos 20 residuos de monosacáridos. Por tratamiento con álcali el GEA da un producto de aproximadamente el mismo peso, pero que lleva carga negativa. Dicha carga desaparece después de incubación con fosfatasa purificada, de modo que parece corresponder a un grupo fosfato.

Se pudo obtener más información midiendo el peso molecular del compuesto de inclusión de GEA con deoxicolato. Se sabe que el deoxicolato forma compuestos con ácidos grasos y que el número de moléculas que se unen depende de la longitud de la cadena de los ácidos grasos.

Para el Dol-P-Glc en solución con deoxicolato el peso molecular medido con Sephadex es 11300 mientras que el peso teórico es de 1500 daltons. Se puede concluir que se combina con 24 moléculas de deoxicolato.

Para el GEA el peso molecular obtenido fue de 14300 daltons. La diferencia entre GEA y Dol-P-Glc es de 3000 daltons, que es del mismo orden que la diferencia entre los restos hidrofílicos

de GEA y Dol-P-Glc, o sea entre 3550 y 180 daltons. La última cifra corresponde al peso molecular de la glucosa. Estos datos indicaron que el resto lipídico del GEA y del Dol-P-Glc podría ser el mismo. Esto fue confirmado posteriormente. Se extrajo de hígado de rata una sustancia no radiactiva que por diversos criterios (solubilidad en mezclas de distintas proporciones de cloroformo-metanol-agua, cromatografía en DEAE celulosa y en capa fina, etc.) era indistinguible de GEA radiactivo obtenido "in vitro". Se encontró que por tratamiento ácido o alcalino de la sustancia extraída del hígado se producía Dol-P. Éste se midió por su capacidad de aceptor en la formación de Dol-P-Glc.

Por lo tanto el GEA sería dolicol fosfato oligosacárido. Hay también indicaciones de que la unión entre el dolicol y el oligosacárido podría ser pirofosfato y no fosfato.

Uno de los objetivos de este trabajo fue encontrar un solvente que permitiese separar rápida y eficientemente a oligosacáridos de un tamaño similar al del resto hidrofílico del GEA. Uno de los solventes más comunes para la cromatografía en papel de sacáridos es butanol-piridina-agua 6:4:3⁷. Para separar oligosacáridos éste fue modificado por Pazur y Okada⁸ quienes propusieron una mezcla en las proporciones 9:5:7. Estos solventes son adecuados para separar oligosacáridos compuestos por un número pequeño de monosacáridos, pero no resultaron útiles para nuestros fines. Modificando la proporción de los componentes se pudo medir el tamaño de los restos hidrofílicos de derivados del dolicol sintetizados a partir de nucleótido azúcares distintos al UDP-Glc y de GEA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Oligosacáridos: Los maltoligosacáridos derivados de la amilopectina se obtuvieron por el método de Thoma, Wright y French⁹.

Cromatografía en papel: Teniendo en cuenta los objetivos mencionados anteriormente después de probar diversas mezclas se eligió el solvente butanol-piridina-agua 4:3:4. Los resultados obtenidos con este solvente dependen bastante de la saturación de la cámara y por ello todas las corridas se hicieron por cromatografía descendente colocando una hoja de papel de cada lado de la hoja con la muestra. Las hojas de los costados fueron irrigadas con el mismo solvente. En los bordes del papel hay más evaporación, de modo que las sustancias presentes en dicha zona se retardan. No conviene, por lo tanto, correr las muestras en tiras angostas.

Los demás métodos usados se describen en trabajos anteriores^{3, 5, 6, 10} y en la sección Resultados.

RESULTADOS

Cromatografía de oligosacáridos. El resultado de correr en papel oligosacáridos de la serie de la maltosa con butanol-piridina-agua 4:3:4 aparece en la figura 1. Se puede observar que se se-

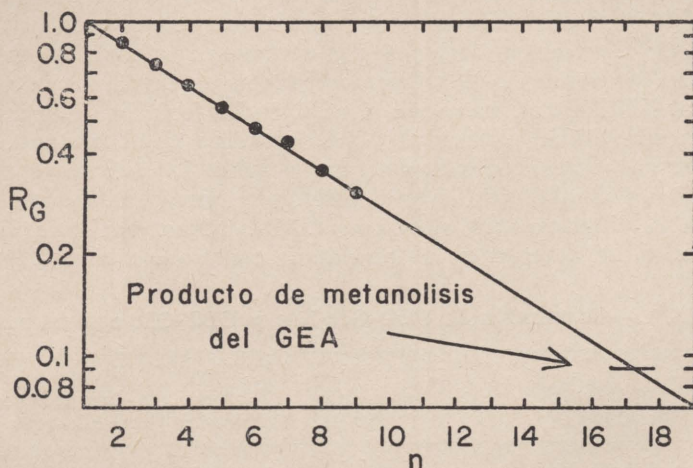


FIG. 1—Cromatografía en papel del producto de metanólisis del GEA. Solvente butanol-piridina-agua 4:3:4. En abscisas se representa el número de unidades de glucosa de los oligosacáridos de maltosa revelados con nitrato de plata y álcali¹¹. El producto de metanólisis se localizó por su radiactividad. En ordenadas se representa el R_G (distancia corrida por los distintos oligosacáridos dividida por la distancia corrida por la glucosa) en escala logarítmica.

paran bien los oligosacáridos de hasta 9 residuos de glucosa. La muestra de malto-oligosacáridos empleada no contenía compuestos con un grado de polimerización mayor, pero por extrapolación se puede reconocer la posición de oligosacáridos aún más grandes.

Cromatografía del residuo hidrofílico del GEA. El residuo hidrofílico obtenido por metanólisis de GEA radiactivo⁵ se corrió en papel con butanol-piridina-agua 4:3:4. En la misma tira se corrieron malto-oligosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida de amilopectina. Luego se localizó la radiactividad y se revelaron los oligosacáridos con el reactivo de plata en álcali¹¹. En diversos experimentos la zona radiactiva correspondió a oligosacáridos de 17-18 unidades de glucosa. Se hicieron experimentos corriendo el producto radiactivo preparado con enzima de hígado de diversos animales. Los resultados mostraron que el oligosacárido radiacti-

vo preparado usando enzimas de conejo, perro o cerdo correspondía a maltoligosacáridos de 20 unidades, mientras que el obtenido con enzima de rata dio 18 unidades. La diferencia es pequeña y el experimento tendrá que ser repetido, pero de todos modos se vio que distintos animales dan sustancias similares.

Residuo hidrofílico del lípido preparado con UDP-Glc-Nac. Se había visto anteriormente que incubando microsomas hepáticos con UDP-Glc-Nac se formaba un compuesto soluble en la fase inferior de la mezcla cloroformo-metanol-agua 3:2:1 y que podría ser Dol-P-Glc-Nac¹⁰. Para ver si también se formaba un compuesto con solubilidad similar al GEA se realizó el experimento preliminar cuyos resultados figuran en la tabla 1. Allí se ve que la radioactividad obtenida en la fracción de cloroformo-metanol-agua 1:1:0.3 es prácticamente nula con UDP-Glc-Nac. Variando la concentración de detergente los resultados casi no cambiaron.

TABLA 1.— Incubación de UDP-Glc-Nac y UDP-Glc con microsomas.

<i>Substrato</i>	<i>Deoxicolato %</i>	<i>cpm fase inferior</i>	<i>cpm extraíble con cloroformo- metanol-agua 1:1:0.3</i>
UDP-Glc-Nac	0.2	1400	30
UDP-Glc-Nac	0.5	4530	109
UDP-Glc	0.2	6170	4220
UDP-Glc	0.5	7170	3630

La mezcla de reacción contenía: "buffer" tris-maleato 0.1 M pH 7.7; 2-mercaptoetanol 0.04 M; EDTA-Mg 10 mM; Cl₂ Mg 10 mM; Dol-P purificado hasta la etapa de DEAE-celulosa (3); 1.2 mg de proteína microsomal y 80.000 cpm de nucleótido-azúcares en un volumen total de 50 μ l. La actividad específica de los sustratos era de 300 C/mol para el UDP-Glc y de 43 C/mol para el UDP-Glc-Nac. La incubación se prolongó por 30 min a 30°C y la reacción se detuvo con el agregado sucesivo de 0.4 ml de metanol, 0.2 ml de agua y 0.6 ml de cloroformo. Se sacaron a las fases superiores y los restos se lavaron 2 veces con 0.5 ml de cloroformo-metanol-Cl₂Mg-4 mM 1:16:16. Se decantaron las capas inferiores y se las contó en un contador de flujo. A los residuos proteicos se los extrajo dos veces con 0.5 ml de cloroformo-metanol-agua 1:1:0.3. Se reunieron a los dos extractos y se los contó.

En un experimento similar la fase inferior obtenida de la incubación con UDP-Glc-Nac se concentró e hidrolizó en agua a pH2, 10 min a 100°C. El producto acuoso se corrió en papel, apareciendo dos picos radiactivos (Tabla 2). Uno de ellos corrió como la acetil glucosamina mientras que el otro tenía un R_G de

TABLA 2.—Cromatografía de papel del residuo acuoso soluble radiactivo obtenido por hidrólisis ácida del lípido de N-acetilglucosamina.

	R_G	R_G (papel Zn)
Pico grande	1.34	1.30
Pico chico	0.85	0.85
Acetil glucosamina	1.36	1.30
Glucosamina	—	0.17

El solvente usado fue butanol-piridina-agua 6:4:3 (7).

0.85. Como existía la posibilidad de que parte de la acetil glucosamina se transformara en glucosamina durante la hidrólisis, la cromatografía se repitió usando papel tratado con SO_4Zn . Se sabía ya que en estas condiciones la glucosamina se retarda mucho¹². Los resultados que aparecen en la tabla 2 demuestran que la radiactividad no corre como glucosamina. Por lo tanto parecería que el pico menor corresponde a un disacárido conteniendo N-acetil glucosamina.

Producto obtenido con GDP-manosa Ya se sabía que partiendo de GDP-Man se obtiene un lípido que parece ser Dol-P-Man¹⁰ pero no se había buscado una sustancia similar al GEA. Esto fue realizado con el experimento que se muestra en la tabla 3. Allí se ve que la adición de Dol-P aumenta la formación de Dol-P-Man y también de algo con solubilidad similar al GEA. La cantidad de este último fue mayor con deoxicolato y una concentración

TABLA 3.—Formación de lípidos con GDP-Man.

Dol-P	Detergente	cpm en fase inferior	cpm extraíble con cloroformo-metanol-agua 1:1:0.3
—	Triton 0.24 %	2340	404
+	Triton 0.24 %	24130	807
+	Deoxicolato 0.5 % *	20190	1604

* Con doble concentración de enzima.

Las mezclas de reacción son similares a las descritas en la tabla 1. Se las procesó de manera similar. La actividad específica del sustrato era de 143 C/mol.

doble de enzima. Por hidrólisis ácida fue posible obtener el residuo hidrofílico del compuesto soluble en cloroformo-metanol-agua 1:1:0.3. Al correr este residuo en cromatografía en papel usando como solvente butanol-piridina-agua 4:3:4 aparecieron: un pico radiactivo con $R_G = 1.10$ y una serie de picos con $R_G = 0.29-0.16$. El primero corresponde a manosa y los restantes picos tienen la movilidad de malto-oligosacáridos de 8-15 residuos.

DISCUSIÓN

Aún no ha sido posible preparar el residuo hidrofílico del GEA en cantidades analizables por métodos corrientes. Los resultados obtenidos por cromatografía en papel y con Sephadex⁵ coinciden bastante bien en lo que respecta al tamaño. La cromatografía en papel sólo da una idea aproximada del peso molecular ya que la velocidad de migración varía según cuales son los monosacáridos constituyentes. De todos modos, 18 residuos de glucosa darían un peso molecular de 2900 daltons, dato que coincide bien con el obtenido con Sephadex que es de 3550⁵.

Los resultados obtenidos usando otros nucleótidoazúcares son de considerable interés. Éstos tendrán que ser elaborados pero parecería que el UDP-Glc-Nac da lípido mono y disacárido. Este último podría ser el precursor del GEA. Luego se puede suponer que se siguen adicionando residuos hasta llegar a unos 8 y entonces se adiciona manosa hasta llegar a unos 16 residuos. Por fin se adicionaría la glucosa proveniente del Dol-P-Glc y se formaría el GEA. El paso siguiente es la transferencia de todo el oligosacárido a una proteína. Este último paso está actualmente ya bien establecido.

RESUMEN

Se ha perfeccionado un método de cromatografía en papel para oligosacáridos. Con dicho método se ha determinado la velocidad de migración del residuo hidrofílico del compuesto formado por transferencia de glucosa del dolicol monofosfato glucosa a un aceptor endógeno de microsomas de hígado. Los resultados muestran que la sustancia se comporta como un maltoligosacárido de 17 a 21 residuos de glucosa. Estos valores coinciden con los obtenidos por filtración por gel.

Se encontró que incubando microsomas de hígado con uridina difosfato N-acetilglucosamina o guanosina difosfato manosa en presencia de dolicol monofosfato se forman compuestos que probablemente contienen oligosacáridos con distintos grados de polimerización unidos a dolicol.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) OSBORN, M. J.: *A. Rev. Biochem.*, 1969, *38*, 501. — 2) DUMPHY, P. J.; KERN, J. D.; PENNOCK, J. F.; WHITTLE, K. J.; FEENEY, J.: *Biochim. biophys. Acta*, 1967, *136*, 136. — 3) BEHRENS, N. H.; LELOIR, L. F.: *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 1970, *66*, 153. — 4) BURGOS, J.; HEMMING, F. W.; PENNOCK, J. F.; MORTON, R. A.: *Biochem. J.*, 1963, *88*, 470. — 5) BEHRENS, N. H.; PARODI, A. J.; LELOIR, L. F.: *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 1971, *68*, 2857. — 6) PARODI, A. J.; BEHRENS, N. H.; LELOIR, L. F.; DANKERT, M.: *Biochim. biophys. Acta* (en prensa). — 7) JEANES, A.; WISE, C. S.; DIMLER, R. J.: *Analyt. Chem.*, 1951, *23*, 415. — 8) PAZUR, J. H.; OKADA, S.: *J. biol. Chem.*, 1966, *241*, 4146. — 9) THOMA, J. A.; WRIGHT, H. B.; FRENCH, D.: *Archs Biochem. Biophys.*, 1959, *85*, 452. — 10) BEHRENS, N. H.; PARODI, A. J.; LELOIR, L. F.; KRISMAN, C. R.: *Archs Biochem. Biophys.*, 1971, *143*, 375. — 11) TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S.: *Nature (Lond.)*, 1950, *166*, 144. — 12) LELOIR, L. F.; CARDINI, C. E.: *Biochim. biophys. Acta*, 1953, *12*, 15.