

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Departamento de Bioquímica

BIOSSÍNTESE DE DOLICOL-FOSFATO- β -MANOSE E MANOPROTEÍNA NA
FORMA LEVEDURA DO FUNGO MUCOR ROUXII

REGINA MARIA GUARAGNA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre

Orientadora:

ELENA AIDA BERNARD

Porto Alegre

1981

ERRATA

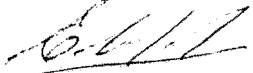
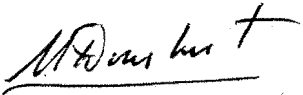

- Pag.1 - Wright et alii e weiner et alii (1965)
- Pag.13 - Li et alii (1978)
- Pag.21 - Villenez e Clark (1969)
- Pag.28 - Gráfico figura 6 representação em escala semi-logarítmica.
- Pag.38 - Eluição da amostra na coluna de DEAE - celulose-acetato com gradiente descontínuo de acetato de amônio em metanol 99%
- Pag.59 - Observando a figura (10) constatou-se que com o aumento da concentração protéica, tem-se maior incorporação de manose C^{14} na fração butanólica e "pellet".
- Pag.108 - Bernard, H. J.; Guaragna, R.; Amaral, B. B. Perry, M.L. S.; Pereira, I. R. G, Ielpi, L; Couso, R. (1982).
- Pag.109 - Bretthauer, R. K; Wu, S. (1975).

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A transcrição do material contido nesta Dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Regina Maria Guaragna

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

| | Conceito | Data |
|--|----------|----------|
|  Prof.ª. Elena Aida Bernard Orientadora | <u>A</u> | 16/12/81 |
|  Prof. Marcelo Alberto Dankert | <u>A</u> | 16/12/81 |
|  Prof.ª. Isolina Ruth Gonçalves Pereira | <u>A</u> | 16/12/81 |

Aos meus pais
Osmar e Gilda
pela minha formação.

A G R A D E C I M E N T O S

À Professora Elena Aida Bernard, por sua orientação, apoio e dedicação que contribuíram para a minha formação científica e êxito neste trabalho.

Ao Professor Marcelo Dankert pelo entusiasmo e persistência no início do meu conhecimento científico.

Ao Professor Tuisikon Dick pela oportunidade concedida para trabalhar neste grupo de pesquisa.

À Professora Susana Passeron e Professor Terenzi, pela doação dos esporos do fungo Mucor rouxii, que permitiu a execução desta pesquisa.

Aos Professores Marcos Luis Santos Perry e Bazilicia Catharina de Souza pela amizade, sugestões e correções deste trabalho.

Ao Professor Hélio Mauro Moreira Maia, pelo auxílio na solução de muitos problemas técnicos no laboratório.

Aos Bolsistas Suellen Beatriz C. de Araújo, Denise Stürmer e Paulo Pereira Branco Jr. pelo auxílio prestado na execução deste trabalho.

Aos Colegas do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelo apoio, estímulo e colaboração.

À Dna. Yolanda Cotta pelo cafezinho.

À Dna. Célia Mendes dos Santos por seu auxílio laboratorial.

À Tânia Maria Carvalho pela datilografia deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS que permitiu a realização deste trabalho.

À CAPES pelas bolsas concedidas e auxílio à pesquisa.

À PROPESP, CNPq e FAPERGS, pelo auxílio à pesquisa.

S U M Á R I O

| | |
|---|----|
| I - Introdução | 1 |
| 1. Lipídio intermediário | 2 |
| 1.1. Classificação | 4 |
| 1.2. Prenil fosfato | 6 |
| 2. Glicoproteínas | 8 |
| 2.1. Ligações peptídeo-carboidrato | 11 |
| 3. Glicosilação de proteínas | 11 |
| 4. <u>Mucor rouxii</u> | 17 |
| 5. Objeto de estudo | 21 |
| II - Material e Métodos | 24 |
| A - Material | 24 |
| B - Métodos | 25 |
| 1. Métodos gerais | 25 |
| 1.1. Cultivo da forma levedura | 25 |
| 1.2. Produção de esporos | 26 |
| 1.3. Curva de crescimento | 27 |
| 1.4. Recolhimento e rompimento das células | 29 |

| | |
|---|----|
| 1.5. Centrifugações | 29 |
| 1.6. Determinação de proteínas | 31 |
| 1.7. Determinação da radioatividade | 31 |
| 1.8. Revelação dos glicídios | 32 |
| 2. Métodos especiais | 33 |
| 2.1. Sistema de incubação | 33 |
| 2.2. Precipitação por ácido-tri-cloro-acético 5% | 34 |
| 2.3. Precipitação com n-butanol saturado com água | 34 |
| 2.4. Cromatografias | 36 |
| 2.4.1. Cromatografia descendente em papel. | 36 |
| 2.4.2. Cromatografia em camada delgada ... | 36 |
| 2.4.3. Coluna cromatográfica de DEAE-celu lose | 37 |
| 2.4.4. Cromatografia em coluna de Sephadex G 25 | 38 |
| 2.5. Eletroforese em papel | 39 |
| 2.6. Purificação de dolicol-fosfato-manose | 39 |
| 2.7. Preparação de ficaprenol | 40 |
| 2.8. Tratamento fenólico | 43 |
| 2.9. Caracterização da configuração α ou β en tre a ose e o fosfato | 44 |
| 2.9.1. Tratamento alcalino | 44 |
| 2.9.2. Hidrólise ácida | 45 |
| 2.9.3. Fosfatase alcalina | 45 |
| 2.10. Tratamento com pronase | 46 |

| | |
|--|----|
| 2.11. Hidrólise ácida suave da fração butanól lica | 47 |
| 2.12. Hidrólises realizadas na fração insolú vel em butanol e água | 48 |
| 2.12.1. Hidrólise ácida total | 48 |
| 2.12.2. Hidrólise ácida parcial | 48 |
| 2.12.3. Hidrólise alcalina redutora for te | 49 |
| 2.12.4. Hidrólise alcalina redutora sua ve | 49 |
| 2.13. Re-incubação do lipídio-fosfato-manose endógeno produzido a 0°C | 50 |
| 2.14. Re-incubação do lipídio-fosfato-manose exógeno | 51 |
| III - Resultados | 52 |
| 1. Determinação das condições ótimas de reação.. | 55 |
| 1.1. Estabilidade do material enzimático | 55 |
| 1.2. Curva de tempo | 55 |
| 1.3. Curva concentração de íon Mg^{+2} e Mn^{+2} .. | 57 |
| 1.4. Curva concentração de proteína | 59 |
| 1.5. Curva concentração de substrato | 62 |
| 1.6. Curva de pH | 62 |
| 1.7. Efeito do íon Ca^{+2} | 65 |
| 1.8. Incubação com outros nucleotídeos açuca res | 66 |
| 2. Análise da fração butanólica | 68 |
| 2.1. Cromatografia descendente em papel | 69 |

| | |
|---|-----|
| 2.2. Coluna de DEAE-celulose-acetato em metanol 99% (70 x 3 mm) | 69 |
| 2.3. Hidrólise ácida suave | 69 |
| 2.4. Coluna de DEAE-celulose-acetato em metanol 99% (30 x 2 cm) | 71 |
| 2.5. Cromatografia em camada delgada | 74 |
| 2.6. Tratamento fenólico | 74 |
| 2.7. Tratamento alcalino | 77 |
| 3. Re-incubação com dolicol-fosfato-manose | 80 |
| 4. Análise do composto insolúvel em butanol e água | 81 |
| 4.1. Tratamento com pronase | 81 |
| 4.2. Hidrólises ácidas | 85 |
| 4.3. Hidrólises alcalinas redutoras | 85 |
| IV - Discussão | 93 |
| V - Resumo e Conclusões | 103 |
| VI - Referências Bibliográficas | 106 |

I - I N T R O D U Ç Ã O .

I - INTRODUÇÃO

Há muitos anos a elucidação da estrutura bem como biossíntese de glicoproteínas, tem sido centro de pesquisa de muitos bioquímicos que estudam glicídios.

Após a descoberta de nucleotídeos-açúcares, por LE LOIR e colaboradores em 1950, iniciaram-se estudos de glicosil transferases que catalisavam a transferência de resíduos glicídicos a partir do respectivo nucleotídeo para a porção oligossacarídeo de glicoproteínas e para polissacarídeos.

Foi observado que esta transferência em muitos casos não era feita diretamente do nucleotídeo derivado para estes compostos. O glicídio era ligado intermediariamente a um lipídio.

WRIGHT e WEINER, 1965, estudando o antígeno-O de Salmonella typhimurium, verificaram a presença de um lipídio

intermediário envolvido nas reações de síntese da cadeia lipopolissacarídica deste antígeno.

Alguns anos depois foi descoberto em bactéria (ROTHFIELD e ROMEO, 1971; LENNARZ e SCHER, 1972) que o lipídio intermediário era um álcool poli-isoprenóide (undecaprenol) e que o glicídio era ligado por uma ponte fosfato ou pirofosfato.

Ao contrário do nucleotídeo derivado, que é hidrofílico, este composto tem caráter hidrofóbico, e sua síntese é catalisada por enzimas associadas com a membrana celular (LENNARZ, 1975).

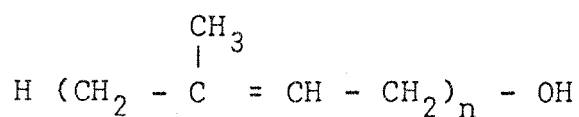
A descoberta de um lipídio intermediário no processo de glicosilação de proteínas e polissacarídeos em bactérias, estimulou estudos similares em células eucarióticas, que permitiram a elucidação do mecanismo de síntese de algumas glicoproteínas (PARODI e LELOIR, 1979).

1. LIPÍDIO INTERMEDIÁRIO

O lipídio envolvido nas reações de glicosilação é um poliprenol pertencente a classe dos terpenos, e apresenta na porção terminal um álcool primário. Sua estrutura e biossíntese foi discutida por BEYTTA e PORTER

(1976), e aqui são mencionadas algumas características gerais.

Apresenta a seguinte fórmula geral:



O número de unidades isoprênicas (n) varia de 17 a 21 para organismos superiores, de 14 a 24 para leveduras, fungos e plantas (PARODI e LELOIR, 1979). Os prenois mais conhecidos aparecem na tabela (I).

TABELA I

Poliprenois de diferentes fontes naturais

| Nome | Fonte natural | n |
|--------------|------------------------|-------|
| Solanesol | Folhas de tabaco | 9 |
| Espadicol | A. <u>maculatum</u> | 10 |
| Castaprenol | Folhas de castanha | 10-13 |
| Ficaprenol | Folhas da borracha | 10-13 |
| Heveaprenol | | |
| Betulaprenol | | |
| Bactoprenol | | |
| Decaprenol | M. <u>tuberculosis</u> | 10 |

| | | |
|--------------|-------------------------|-------|
| Undecaprenol | M. <u>smegmatis</u> | 10 |
| | S. <u>newington</u> | 11 |
| | M. <u>lysodeikticus</u> | 11 |
| | <u>Salmonella</u> | 11 |
| | A. <u>aerogenes</u> | 11 |
| | L. <u>plantarum</u> | 11 |
| | E. <u>coli</u> | 11 |
| | S. <u>aureus</u> | 11 |
| | S. <u>faecalis</u> | 11 |
| Dolicol | A. <u>niger</u> | 19-23 |
| | A. <u>fumigatus</u> | 19-23 |
| | Leveduras | 14-18 |
| | P. <u>cactorum</u> | 14-16 |
| | Invertebrados marinhos | 17-21 |
| | Mamíferos | 17-21 |

1.1. Classificação

Os poli-isoprenos podem ser distinguidos pelo grau de saturação da unidade \mathcal{L} -isoprênica.

A presença ou não de dupla ligação na unidade \mathcal{L} -isoprênica (do grupo alcoólico) permite classificá-los em poliprenóis \mathcal{L} -insaturados (por exemplo undecaprenol) e \mathcal{L} -saturados (tipo dolicólico).

Logo, a diferença entre dolicol (do grego do likos = comprido) e undecaprenol, não se deve so mente ao tamanho da cadeia hidrocarbonada, mas pe la unidade \angle -isoprênica ser saturada.

Nos tecidos, o dolicol pode se encontrar na forma livre (BUTTERWORTH e HEMMING, 1968), ou es terificado por ácidos graxos, e ainda como doli col-fosfato, que é a forma envolvida na glicosi lação de proteínas.

O poliprenol que atua como intermediário na síntese de glicoproteínas em células eucarióti cas, possui a unidade \angle -isoprênica saturada (ti po dolicólico), com 14 a 24 unidades de isopre nos, e o análogo correspondente, encontrado em bactérias é \angle -insaturado e contém 11 unidades de isopreno (undecaprenol).

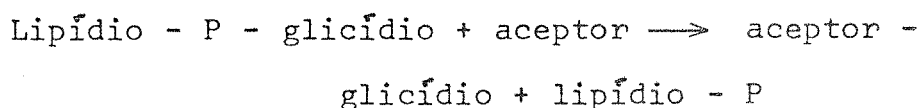
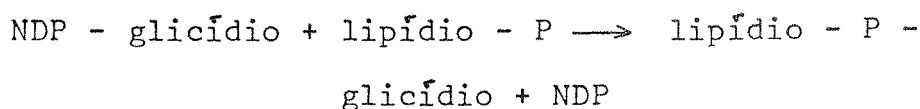
Em plantas, também foi encontrado um compos to com 10-12 unidades isopreno insaturado, cha mado de ficaprenol. Este poli-isopreno foi assim denominado, porque foi purificado pela primeira vez, das folhas da planta Ficus elástica. Sua fun ção fisiológica é desconhecida. (PARODI e LELOIR, 1979).

pla ligação torna o resíduo fosfórico mais lábil a hidrólise ácida suave, redução com H₂ e tratamento fenólico.

Os poliprenóis, na forma de seus ésteres de fosfato, têm a função de transferir o resíduo glicídico do citoplasma para a membrana da célula, durante a síntese de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ácido teicóico e glicoproteínas. As enzimas envolvidas no processo de transferência estão associadas a membrana, bem como a proteína a ser glicosilada (LENNARZ, 1975).

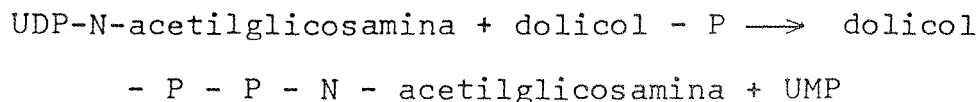
O lipídio intermediário tem como função permitir a síntese de macromoléculas num meio lipofílico (por exemplo, membrana celular), a partir de precursor hidrofílico.

A transferência da ose ou derivado de ose tem a seguinte reação geral:



MOLNAR e colaboradores (1970, 1971) relataram pela primeira vez a produção de lipídio-pir

fosfato-N-acetilglicosamina de acordo com a seguinte reação:



Observa-se que esta reação difere da mencionada anteriormente, pois ocorre a transferência do glicídio-fosfato, formando-se um glicolipídio com ligação pirofosfato.

2. GLICOPROTEÍNAS

Um grande número de proteínas de diversas origens e funções biológicas são conhecidas por conterem carboidratos, ligados covalentemente, e são classificadas como glicoproteínas. Estudos biossintéticos tem indicado que estas proteínas tem em comum não somente carboidratos, mas um sistema enzimático similar que une o glicídio a cadeia peptídica.

É evidente na tabela II que glicoproteínas estão amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo não somente em animais vertebrados e invertebrados, mas também em plantas, organismos unicelulares e virus (KORNFELD e KORNFELD, 1976).

As funções das glicoproteínas são diversas, abrangendo atividades biológicas vitais (tabela II).

TABELA II

Distribuição e função de algumas glicoproteínas

| Fonte | Função | Exemplo |
|--------------------|--|---|
| <u>Vertebrados</u> | | |
| Plasma | Transporte Coagulação Imunoproteção Enzimas | Transferrina Fibrinogênio Protrombina Imunoglobulinas: IgG IgA, IgM Colinesterase, amino oxidase |
| Urina | Hormônio | Gonadotropina coriônica |
| Leite | Transporte Enzima Nutrição | Lactotransferrina Lactose sintetase (proteína A) K-caseína |
| Saliva | Enzima | L-amilase |
| Pituitária | Hormônios | Hormônio-folículo-estimulante, e luteinizante |

| | | |
|----------------------|----------------------------------|--|
| Glândula submaxilar | Lubrificação, Proteção | Glicoproteínas submaxilares |
| Estomago | Enzima | Pepsinogênio e pepsina |
| Pulmão | Anticoagulante | Heparina |
| Pele | Estrutural | Colágeno |
| Retina | Processo sensorial | Pigmento visual |
| Membranas celulares | Receptores, adesão célula-célula | Glicoproteínas de membrana de leucócitos |
| Veneno de cobra | Enzimas | Proteinases |
| <u>Invertebrados</u> | Proteção | Colágeno |
| | Estrutural | |
| | Transporte | Hemocianina |
| | Agregação celular | Glicoproteínas das células de esponja |
| Fungo | Enzimas | Glicose oxidase, lipase, invertase |
| | Estrutural | Glicoproteínas de parede celular de levedura |

| | | |
|----------|--------------|---|
| Bactéria | Enzima | <u>Micrococcus sodonensis</u> nuclease |
| Virus | Desconhecida | Glicoproteína de membra na |

2.1. Ligações peptídico-carboidrato

A ligação covalente entre o glicídio e o aminoácido é a única característica estrutural das glicoproteínas. Esta ligação envolve o C-1 do resíduo do glicídio mais interno e um grupo funcional de um aminoácido da cadeia peptídica. Os tipos de ligações glicopeptídicas podem ser observados na figura 2.

3. GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS

É conhecido que a biossíntese de oligossacarídeos ligados ao resíduo de asparagina de glicoproteínas, é efetuada pela transferência em bloco da porção oligossacarídica ligada ao dolicol-pirofosfato (WAECHTER e LENNARZ, 1976; ROBBINS et alii, 1977; HUNT et

| Ligação | Estrutura | Ocorrência |
|--|-----------|--|
| <p>N-GLICOSÍDICA β-N-acetilglicosa minil-asparagina</p> | | <p>Animais, plantas e microrga nismos</p> |
| <p>O-glicosídica \mathcal{L}-N-acetilgalactosa minil-serina/treoni- na</p> | | <p>Glicopro- teínas de animais superiores</p> |
| <p>\mathcal{L}-manosil.serina/ treonina</p> | | <p>glicopro- teínas de fungos e leveduras</p> |
| <p>β-Galactosil-hidroxiili sina</p> | | <p>colágeno</p> |

Figura 2 - Tipos de ligações glicopeptídicas

alii, 1978). Este oligossacarídeo, ligado a proteína, é processado para, em etapa posterior, receber outros resíduos de ose e formar o oligossacarídeo definitivo, característico de cada glicoproteína. Isto foi demonstrado na biossíntese da proteína G do vírus da esmatite vesicular (KORNFELD et alii, 1978; LI, 1978).

A estrutura do oligossacarídeo unido ao lipídio precursor da glicoproteína, foi elucidada, e contém 3 resíduos de glicose, 9 manoses e 2 N-acetilglicosamina (figura 3).

A formação do lipídio-oligossacarídeo é iniciada com a transferência de N-acetil-glicosamina-1-fosfato para dolicol-fosfato, gerando uma ponte pirofosfato. Nas etapas seguintes são adicionadas outra N-acetilglicosamina, 9 resíduos de manose e 3 resíduos de glicose. A transferência destes glicídios pode ser através dos nucleotídeos derivados, do dolicol fosfato ou outros derivados glicídicos não identificados (HUGHES e BUTTERS, 1981). Isto pode ser observado na figura 3.

O lipídio-oligossacarídeo é o imediato doador da porção glicídica para a proteína nascente no retículo endoplasmático, não somente em mamíferos (STANELONI e LELOIR, 1979), mas também em levedura (PARODI, 1979 ab), insetos (QUESADA-ALLUE e BELOCOPITOW, 1978; BUTTERS e HUGHES, 1980) e plantas (BRETT e LELOIR, 1977; PONT LEZICA et alii, 1978).

Em Saccharomyces cerevisiae é observado outro tipo de glicoproteína, o manano. Nesta levedura existe dois tipos de polissacarídeos unidos a proteína (figura 4). Um deles é composto por pequenos oligossacarídeos ligados aos aminoácidos serina ou treonina da proteína. O outro tipo é composto por uma cadeia interna com duas N-acetilglicosaminas e cerca de 12 manoses; e uma cadeia externa com 100 a 150 manoses. O aminoácido envolvido nesta ligação é provavelmente asparagina.

Dolicol-fosfato-manose é o precursor das manoses unidas diretamente a serina/treonina, enquanto que GDP-manose é o substrato para as glicosilações posteriores destes resíduos (SHARMA et alii, 1974) (figura 4). A síntese da cadeia interna é através de derivados do dolicol-pirofosfato. O polissacarídeo formado é transferido posteriormente para resíduos de asparagina da proteína. A cadeia externa é sintetizada a partir de GDP-manose, utilizando como "primer" o oligossacarídeo ligado a proteína (PARODI, 1978).

Outras leveduras e fungos, também mostraram que dolicol-fosfato-manose é o precursor da manose unida aos resíduos de serina e/ou treonina da proteína.

Isto foi verificado em Hansenula holstii (BRETT HAUER e WU, 1975), Neurospora crassa (GOLD e HAHN, 1976, 1978), e Aspergillus niger (LETOUBLON e GOT, 1974).

4. MUCOR ROUXII

O dimorfismo exibido por numerosas espécies de fungos, é um exemplo elementar de diferenciação morfológica.

O fungo Mucor rouxii, saprófita, é dimórfico, e em condições aeróbicas, cresce na forma alongada, micélio, e em anaerobiose, na forma esférica, levedura (figura 5). Este é um fenômeno que mostra grande capacidade do microrganismo se adaptar em diferentes ambientes, modificando sua constituição celular.

BARTNICKI-GARCIA e NICKERSON (1961-1962 a, b, c, d) encontraram diferenças significantes entre a parede celular da forma filamentosa e levedura. Revelaram diferenças na espessura das paredes celulares e conteúdo de proteínas, purina, pirimidina e manose.

A conversão da forma micélio em levedura está associada a uma quantidade cinco vezes maior de manose.

A parede celular, da forma micélio do Mucor rouxii, contém como matriz, polímeros de mucorano (um poliuronóide), glicoproteínas e glicopeptídeos (BARTNICKI-GARCIA e REYES, 1968; DOW et alii, 1977, 1981).

BARTNICKI-GARCIA, em 1968, chegou a conclusão que a atmosfera de incubação é um determinante primário da

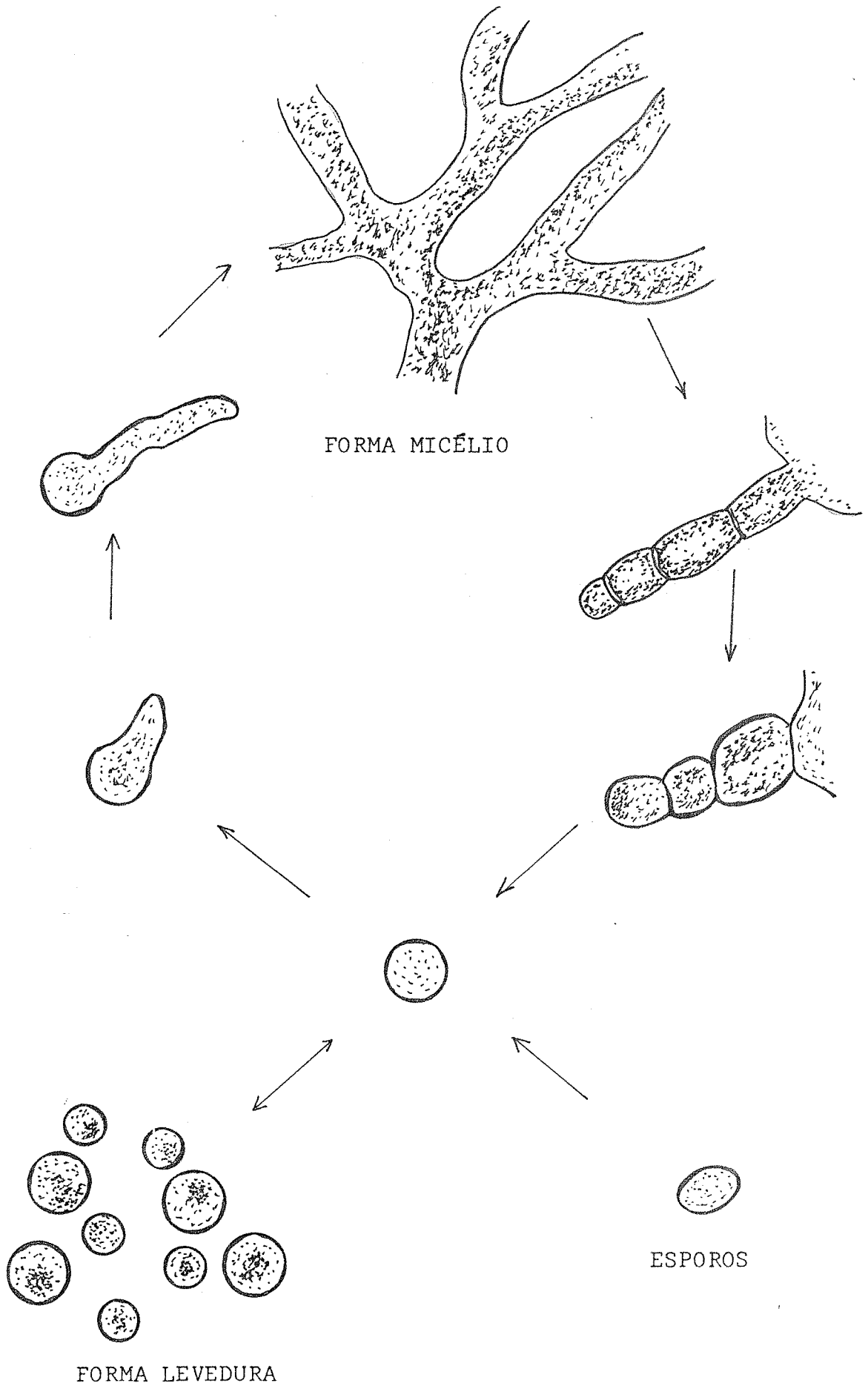


Figura 5 - Esquema das etapas da morfogênese no Mucor rouxii

morfogênese no Mucor, mas não é o fator mais importante. A concentração e o tipo de hexose, no meio, é também um fator do dimorfismo.

Embora a estimulação no desenvolvimento da forma levedura por CO_2 ter sido confirmada, o fato é que células esféricas podem crescer na ausência de CO_2 , porém com altas concentrações de glicose no meio (BARTNICKI-GARCIA, 1968a). Na verdade ausência total do gás é impossível, pois há contínua produção de CO_2 metabólico.

TERENZI e STORCK (1969) obtiveram a forma levedura do Mucor rouxii, em condições aeróbicas, mas na presença de 2-fenil etanol, com hexose presente no meio de cultura numa concentração acima de 2%. Estas células foram caracterizadas por uma ativa fermentação aeróbica.

A forma micélio foi obtida por BARTNICKI-GARCIA (1968 b) em condições aeróbicas com concentrações de glicose abaixo de 0,01%.

Na ausência de glicose, ou quando glicose é trocada por xilose, maltose ou succinato, os esporos não germinam.

Altas concentrações de hexose estimulam o desenvolvimento da forma levedura a partir de esporos, mas

não inibem a elongação do micélio, obtido em baixas concentrações.

A transformação da forma levedura para micélio é observada quando a cultura de levedura é exposta ao ar.

Paralelamente a esta conversão ocorre a síntese de citocromo oxidase, indicando que a transformação é acompanhada de adaptação respiratória (HAIDEL e STORCK, 1966).

FRIEDENTHAL e colaboradores (1973) estudaram o efeito do cianeto de potássio (inibidor da atividade respiratória em muitos sistemas) na morfologia do fungo Mucor rouxii, em germinação aeróbica. Determinaram que na concentração de 8mM de KCN germinam somente células esféricas.

Estudos sobre assimilação de CO₂ sugerem que o gás opera através de mecanismos envolvendo sua fixação em metabólitos celulares (BARTNICKI-GARCIA e NICKERSON, 1962 a).

Determinação dos produtos finais da fixação de CO₂, revelaram que dois terços era incorporado em componentes protéicos, como ácido-aspártico, (75%), ácido glutâmico e treonina (BARTNICKI-GARCIA e NICKERSON, 1962 d).

BARTNICKI-GARCIA (1963) sugeriu que dióxido de carbono opera sobre o dimorfismo, aumentando os níveis de ácido aspártico e subsequente indução da síntese de manano, uma glicoproteína.

5. OBJETO DE ESTUDO

O papel de glicolipídio intermediário no processo de glicosilação de polissacarídeos e glicoproteínas tem sido objeto de estudo há muitos anos.

Em 1969 (TANNER, 1969; VILLENEZ et alii, 1969) surgiram os primeiros trabalhos revelando a existência de poli-isoprenóides glicosilados, como glicosiladores na síntese de glicoproteínas ou polissacarídeos. A partir deste momento, inúmeros estudos foram feitos em procariotes, organismos superiores e outros eucariotes. Em levedura, especialmente saccharomyces cerevisiae, tem-se estudado mais intensamente a biossíntese do manano.

Os fungos são modelos simples de célula eucariótica, por isso podem ser úteis no estudo de aspectos gerais da estrutura, função e biossíntese de glicoproteínas. Em alguns fungos, polissacarídeos ligados covalentemente a proteína, são principais constituintes

da parede celular (BARTNICKI-GARCIA, 1968b). Apesar disso, em fungos poucas pesquisas foram desenvolvidas.

LETOUBLON e colaboradores (1973) bem como GOLD e HAHN (1976) estudando Aspergillus niger e Neurospora crassa respectivamente, identificaram um poli-isoprenol-fosfato-manose, como participante na glicosilação de glicoproteínas.

O fungo Mucor rouxii preenche as necessidades de estudo, e além disso por ser dimórfico é um modelo interessante para estudos de diferenciação.

Estudos com a forma micélio do fungo Mucor rouxii foram desenvolvidos em nosso laboratório. Verificou-se que fração particulada deste fungo catalisava a incorporação de glicose, a partir de UDP-glicose [C^{14}] a um composto lipídico, caracterizado como dolicol-fosfato- β -glicose (BERNARD et alii, 1982), e a um composto solúvel em água, identificado como glicogênio. Incubando-se com GDP-manose [C^{14}], constatou-se a transferência do glicídio para dolicol-fosfato, formando dolicol-fosfato- β -manose, e para uma glicoproteína (BERNARD et alii, 1982).

Dando prosseguimento à linha de trabalho deste laboratório e considerando que a diferenciação morfológica frente as diferentes condições do meio de crescimento, é importante para o estudo bioquímico da cé

lula, procurou-se investigar a formação de glicolipídios, polissacarídeos e/ou glicoproteínas, na forma levedura deste fungo.

II - MATERIAL E MÉTODOS.

I I - M A T E R I A L E M É T O D O S

A - M A T E R I A L

1. GDP-manose $[C^{14}(U)]$ - (208-227 Ci.mol⁻¹)
2. UDP-glicose $[C^{14}(U)]$ - (200-309 Ci.mol⁻¹)
3. UDP-ácido glicurônico $[C^{14}(U)]$ - (207 Ci.mol⁻¹)
4. Fosfatase alcalina (Sigma Chemical CO, de Escherichia coli)
5. Pronase (Calbiochem)
6. Tunicamicina (doada pelo Prof. G. F. Wassermann)
7. Areia (Merck)

8. Silica Gel G (Seg. Stahl-Merck)~
9. DEAE-celulose (Serva, type SS p. A)
10. DOWEX 50W x 2 (H+) - 200-400 mesh (Baker Analyzed Reagent)
11. Sephadex G 25 (Pharmacia)

Os compostos radioativos foram preparados no Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", Buenos Aires, Argentina, como relatado por GARCIA e colaboradores (1974) e COUSO e colaboradores (1980).

Todos os demais reagentes e solventes foram de pureza "pró-análise" (p. A.) adquiridos dos laboratórios Merck ou semelhante.

B - MÉTODOS

1. MÉTODOS GERAIS

1.1. Cultivo da forma levedura

O material biológico usado, foi o fungo Mu

cor rouxii, cepa NRRL 1894.

Todos os cultivos foram feitos em meios anaeróbicos contendo 1% de peptona de caseína, 0,3% de extrato de levedura e 3% de glicose, e o pH ajustado para 4,5 com H_2SO_4 (BARTNICKI-GARCIA e NICKERSON, 1962 b).

Os meios eram preparados em frasco Erlenmeyer de 1 ou 2 litros. A solução de glicose era autoclavada separadamente do extrato de levedura e peptona, sendo as duas partes então asepticamente combinadas (BARTNICKI-GARCIA, 1968a).

As autoclavagens eram efetuadas a $121^{\circ}C$, 1 atm, 30 minutos.

Os esporos eram semeados neste meio e mantidos sob atmosfera de CO_2 , a $28^{\circ}C$ (BARTNICKI-GARCIA e NICKERSON, 1962a). O crescimento exponencial iniciava em 24 horas.

1.2. Produção de esporos

Mantinha-se a cultura de esporos em meio sólido. Este meio, agar-tomate, era preparado com suco de tomate comercial 40% e agar 5%, em água

destilada (HAIDE e SORCK, 1966). O suco de tomate era esterilizado separadamente do agar, os quais eram misturados em condições asépticas.

Tubos e placas de petri eram usados para as culturas sólidas

As culturas eram mantidas a 28°C e produziam esporos aerobicamente, num período de 7 dias.

1.3. Curva de crescimento

O crescimento da forma levedura, em meio líquido de cultura, era determinado pela densidade óptica (DAVIS et alii, 1973). A turvação era medida no espectrofotômetro Beckmann, modelo DB-G, a 640 nm. Media-se a densidade óptica com 1 volume de meio para 2 volumes de HCL 0,1N.

Determinava-se então, a curva de crescimento, sendo típica, e que pode ser observada na figura (6).

Observava-se uma fase de "lag" por um período de 24 horas, após uma fase exponencial e por último a fase estacionária.

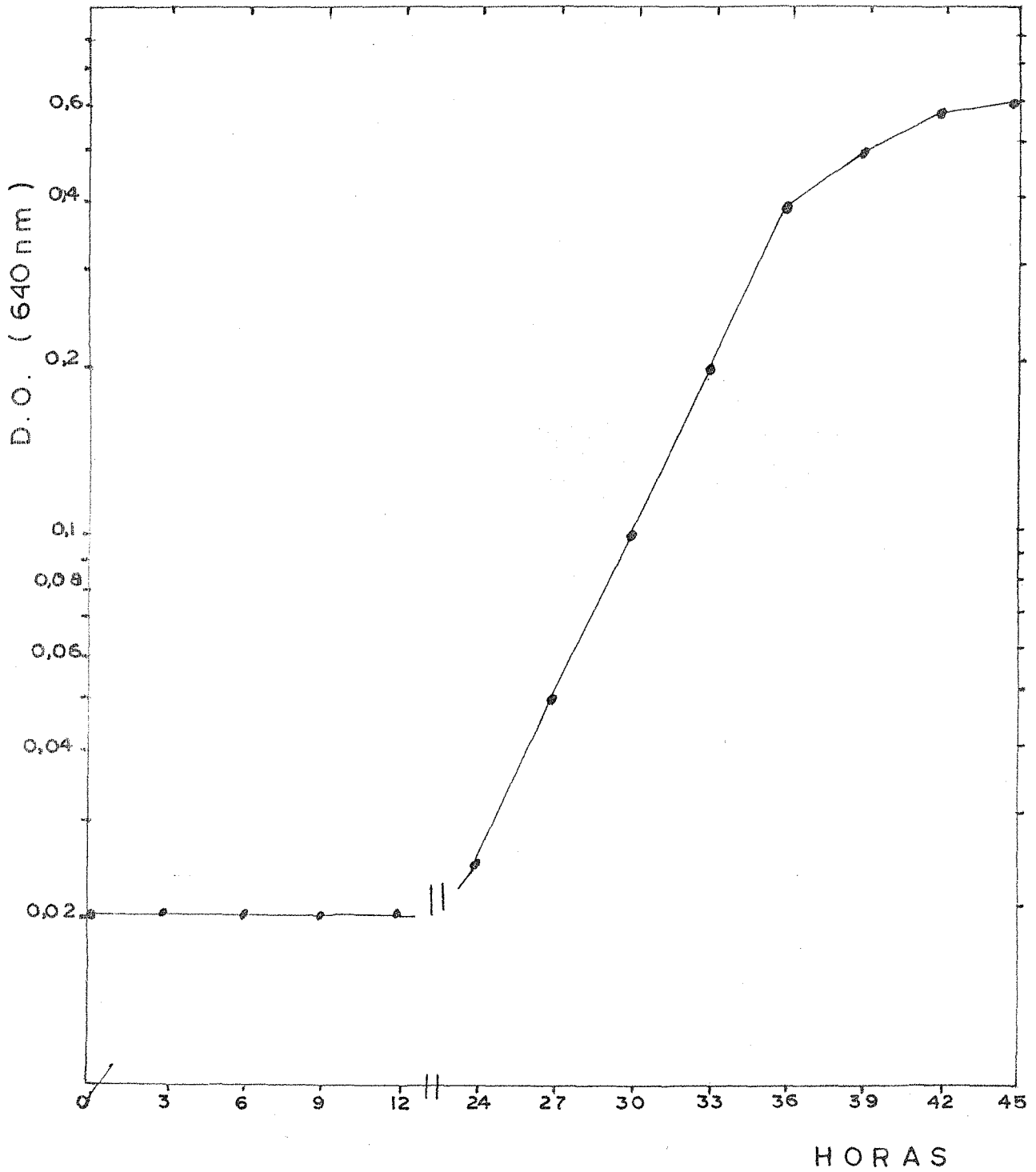


Figura 6 - Curva de crescimento do fungo Mucor rouxii em condições anaeróbicas

As leveduras eram coletadas na fase exponencial. A densidade óptica do crescimento das leveduras, utilizadas nos experimentos, variava entre 0,15 e 0,3.

1.4. Recolhimento e rompimento das células

As células eram recolhidas em filtro de vidro sinterizado, malha G 2, lavadas e rompidas com areia, em gral de porcelana.

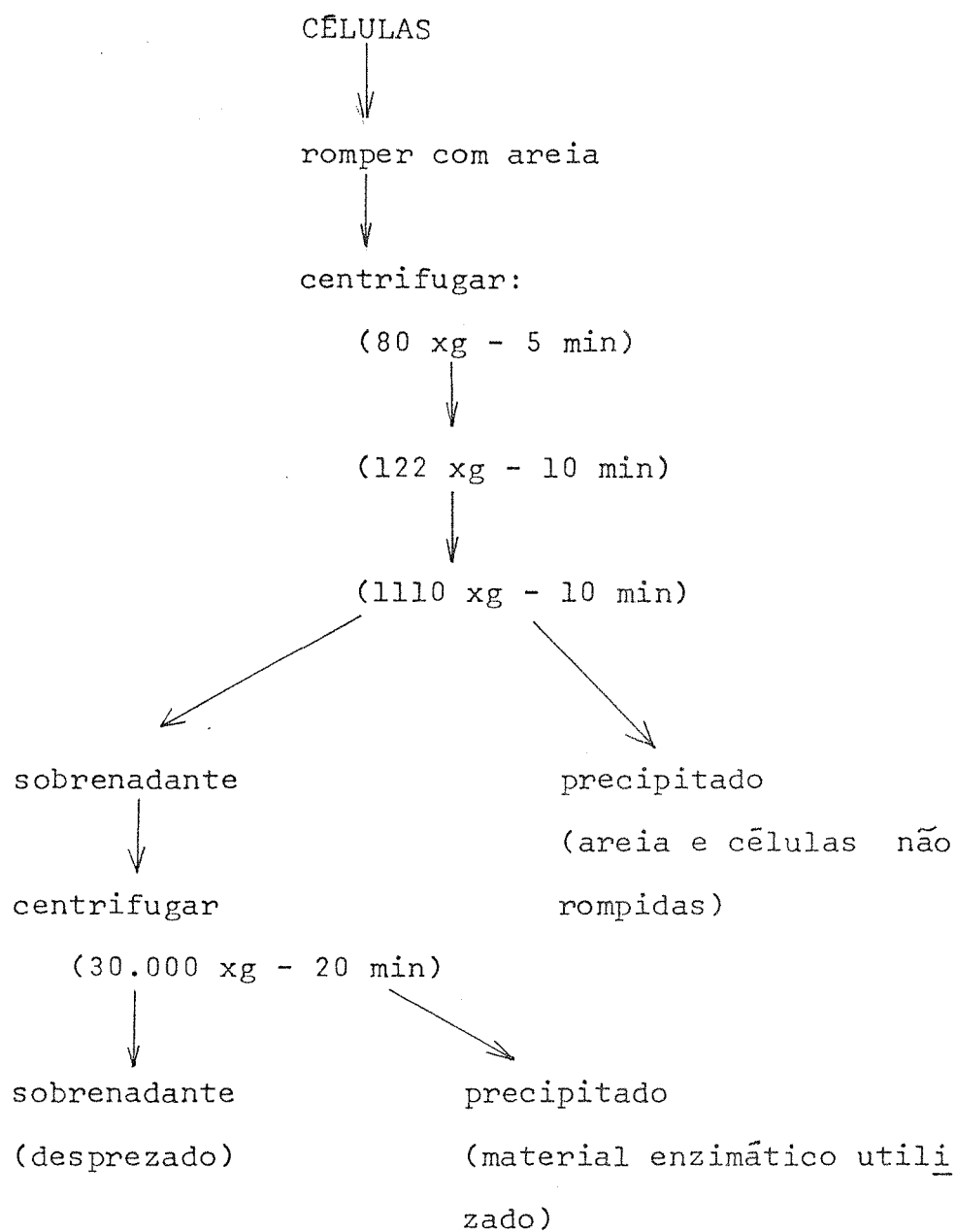
Todas as operações eram feitas a 4°C.

Controlava-se a forma levedura e o rompimento da célula, em um microscópio óptico, modelo ausJena, binocular (PK 10x), lente 40/0,65.

1.5. Centrifugações

As células rompidas eram resuspensas em EDTA 10mM - Tris-HCl, 70mM, pH 7,5 e centrifugadas em centrífuga refrigerada Sorvall superspeed RC2-B.

O esquema seguido obedecia as seguintes etapas:



O precipitado de 30.000 xg era ressuscitado em EDTA 10mM - Tris-HCl 70mM, pH 7,5, em pequeno volume e ajustado a uma concentração protéica de aproximadamente 20mg/ml.

1.6. Determinação de proteínas

A concentração das proteínas era medida de acordo LOWRY e colaboradores (1951), usando soro albumina bovina como padrão.

1.7. Determinação da radioatividade

As determinações quantitativas da radioatividade eram medidas pelo aparelho Beckman LS-100 -Liquid Scintillation System.

Os extratos butanólicos eram transferidos para pedaços (2x1 cm) de papel Whatman nº 1 e secos antes de contados no líquido de cintilação.

As eletroforeses, cromatografias em papel eram cortadas em segmentos de 1 cm de comprimento, e contadas no líquido de cintilação.

As cromatografias em camada delgada eram raspadas de cm/cm e após contadas no líquido de cintilação.

A solução de cintilação tinha a seguinte composição: P₀P₀P, 50 mg; P₀, 4g; tolueno 1 litro.

1.8. Revelação dos glicídios

Os padrões de glicídios e polialcoois usados nas cromatografias e eletroforeses em papel eram revelados com reagente nitrato de prata (TREVELYAN et alii, 1950).

O processo de revelação consistia das seguintes etapas:

1a. etapa - Imersão do papel em nitrato de prata saturado 1:200 em acetona, seguida de secagem à temperatura ambiente.

2a. etapa - Imersão do papel em solução metanólica de NaOH 0,5 M.

3a. etapa - Imersão do papel em tio-sulfato de sódio 2,5%.

4a. etapa - Lavagem do papel em água destilada, seguida de secagem.

2. MÉTODOS ESPECIAIS

2.1. Sistema de incubação

O sistema básico de incubação continha a seguinte mistura:

| | Concentração |
|-----------------------------------|--|
| Material enzimático | 800-1200 μg de proteí <u>na</u> |
| GDP-manose [C^{14} (U)] | 270-370 pmol (60.000-120.000 cpm) |
| Tris - HCl pH 7,5 | 75mM |
| MgCl ₂ | 15 mM |
| Volume total | 100 μl |

Temperatura: 30°C

Tempo: 20 minutos

A reação era finalizada ou pela adição de 0,5 ml de ácido tri-cloro-acético 5%, quando se tratava de determinar incorporação total, ou pela adição de 0,2 ml de n-butanol saturado com água, quando se desejava obter fração lipossolúvel (GARCIA et alii, 1974).

2.2. Precipitação por ácido tri-cloro-acético 5%

Incorporação total era determinada pela filtração da mistura de reação, inativada com ácido tri-cloro-acético 5%, através de Whatman-glass filter paper 2,5 cm GF/A.

Os resíduos eram lavados 3 vezes com TCA 2,5% e 3 vezes com água destilada. Secava-se o papel em estufa a 100⁰C e contava-se a radioatividade (GARCIA et alii, 1974).

2.3. Precipitação com n-butanol saturado com água

A incorporação da ose radioativa, a partir de GDP-manose [$C^{14}(U)$] em material solúvel em butanol, foi determinada por extração da mistura de incubação, por 3 vezes com 0,2 ml de n-butanol saturado com água (GARCIA et alii, 1974).

Os extratos butanólicos combinados foram lavados 3 vezes com 0,2 ml de água destilada, e numa alíquota era contada a radioatividade.

O material insolúvel neste sistema era lavado 3 vezes com água destilada, para a retirada do nucleotídeo derivado radioativo que não rea

giu, e extraído 3 vezes com a mistura clorofórmio: metanol: água (1:2:0,3). Os extratos eram reunidos e contava-se uma alíquota. O sedimento ("pellet") que restava no final, também era contado.

Esquematizando:

precipitado 30.000 xg incubado com GDP-manose-
[C¹⁴(U)]



3 extrações com butanol saturado com água

Extração de glicolipídio não polar



3 lavagens com água



3 extrações com clorofórmio: metanol: água (1:2:0,3)

Extração de glicolipídio polar



"Pellet"

Glicoproteínas e polissacarídeos insolúveis

2.4. Cromatografias

2.4.1. Cromatografia descendente em papel

Foram feitas em papel Whatman nº 1 nos seguintes eluentes:

Solvente A: n-butanol: piridina: água
(6:4:3)

Solvente B: n-butanol: piridina: água
(4:3:4)

Solvente C: n-butanol: etanol: água
(10:1:2)

2.4.2. Cromatografia em camada delgada

Foram preparadas sobre placas de vidro, com sílica gel G (tipo 60), 0,25mm de espessura, sem indicador de fluorescência, correu-se no seguinte sistema de solvente:

Solvente D: clorofórmio: metanol: água
(60:20:2) (BEHRENS et alii, 1971a).

2.4.3. Coluna cromatográfica de DEAE-celulose

Preparação de DEAE-celulose-acetato: Lavava-se a resina de DEAE-celulose várias vezes com água, a fim de retirar impurezas e partículas pequenas. Tratava-se com HCl 1N, e decantava-se por 1 hora. Passado este tempo lavava-se com água destilada até que o papel indicador determinasse pH neutro, e reação negativa para cloretos, com nitrato de prata. Tratava-se a resina com NaOH 1N, durante 1 hora. Lavava-se com água destilada até pH neutro. Retirava-se a água com álcool etílico e depois acetona e levava-se para um dessecador a vácuo por 24 horas. Resuspendia-se em ácido acético glacial, para a obtenção da forma acetato, e depois em metanol 99%.

Foram preparadas dois tamanhos de coluna:

1a. DEAE-celulose-acetato, usada para determinar a presença, ou não, de carga do composto lipossolúvel. Preparada em coluna de vidro de 70 x 3mm. A amostra aplicada na coluna de DEAE-celulose-acetato em metanol 99%, era eluída inicialmente 3 vezes com 0,5 ml de metanol 99%

e posteriormente, 3 vezes com 0,5 ml de acetato de amônio 0,4M em metanol 99%.

2a. DEAE-celulose-acetato, usada para identificar ligação fosfato ou pirofosfato na molécula do produto de incubação e para purificação (DANKERT et alii, 1966). Foi montada em coluna de vidro (30 x 2 cm) com torneira de teflon. A amostra, aplicada na coluna, era eluída com 20 ml de metanol 99% e depois com 12 ml de acetato de amônio em metanol 99%, em concentrações de 0,1M, 0,2M, 0,4M e 1M (GARCIA et alii, 1974).

2.4.4. Cromatografia em coluna de Sephadex G 25

Foi preparada uma coluna de Sephadex G 25 (1 x 50 cm) e equilibrada com Tris-HCl 0,5M, pH 7,0, quando se aplicava o material digerido por pronase. Equilibrava-se com Tris-HCl 0,5M, pH 7,0 com 0,1% de dodecil-sulfato de sódio quando se aplicava a proteína suspensa no mesmo tampão, exceto com concentração de 1% de dodecil-sulfato de sódio. Suspendia-se a proteína neste sistema aquecendo-se a 50°C por 3 horas.

A coluna foi previamente calibrada com "Blue dextran" e CoCl_2 para indicar o volume de exclusão e inclusão, respectivamente (GOLD e HAHN, 1976).

2.5. Eletroforese em papel

A eletroforese em papel foi feita com papel Whatman nº 1 (GARCIA et alii, 1974). A amperagem aplicada variou de 6 a 7 mA/cm. Foram utilizados os seguintes tampões:

Sistema E: 1,2M acetato de piridina pH 6,5

Sistema F: ácido fórmico 5% (ROMERO et alii, 1979)

2.6. Purificação de dolicol-fosfato-manose

O material radioativo eluído na concentração de 0,2M de acetato de amônio, da coluna de DEAE-celulose-acetato em metanol 99%, era reunido e evaporado.

O resíduo era dissolvido em clorofórmio-metanol-água (3:2:1), centrifugado, e a fase supe

rior desprezada. A fase inferior era lavada 3 vezes com a mistura: clorofórmio-metanol-cloreto de magnésio 4mM (3:48:47), para retirada dos sais. Evaporava-se e redissolvia-se em clorofórmio-metanol (2:1).

2.7. Preparação de ficaprenol

Preparou-se pelo método de STONE e colaboradores (1967).

Pesou-se 500 gramas de folhas da planta Ficus elástica, previamente desnervadas. As folhas foram partidas e extraída com acetona.

A mistura resultante acrescentou-se éter etílico e se deixou extraíndo com agitação ocasional durante 2-3 horas. Logo filtrou-se por tela e o precipitado se tratou com éter de petróleo (PE 30-65).

Os extratos orgânicos, sofreram uma partição com água, logo a fase orgânica lavou-se com água, até que esta fase ficasse incolor (4-6 vezes).

A fase orgânica lavada, secou-se com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se, levou-se a seco,

pesou-se e se suspendeu em éter etílico a 2% em éter de petróleo (PE 30-65). Neste estado se conserva em congelador a -20°C .

Este material se separou por cromatografia em coluna de alumina.

A alumina foi resuspendida em éter etílico a 2% em éter de petróleo (PE 30-65). A amostra foi eluída sucessivamente com os seguintes solventes:

2% éter etílico em éter de petróleo (PE 30-65)
(v/v)

10% éter etílico em éter de petróleo (PE 30-65)
(v/v)

50% éter etílico em éter de petróleo (PE 30-65)
(v/v)

75% éter etílico em éter de petróleo (PE 30-65)
(v/v)

100% éter etílico

A eluição da coluna se seguiu por chromatografia em camada delgada, no solvente: éter isopropílico: éter de petróleo (30-65) 1:4 v/v.

O ficaprenol eluiu-se com solvente que con tinha 10% de éter etílico em éter de petróleo (PE 30-65). Obteve-se 3 frações:

- a. ficaprenol mais contaminantes de maior Rf
- b. ficaprenol puro
- c. ficaprenol mais contaminantes de menor Rf

Os tubos que tinham ficaprenol e contaminantes se purificaram por cromatografia em camada delgada, em bandas, com o solvente éter isopropílico: éter de petróleo (1:4), usando como revelador fluoresceína. Para sua eluição se utilizou éter etílico. A partir de 500 gramos de folhas se obteve 0,2 gramos de prenol.

Fosforilação química do ficaprenol - Usou-se como agente fosforilante o fosfato de ditrietilamina (PDTEA).

Dissolveu-se 2 gramos de H_3PO_4 99% em 100 ml de acetonitrilo destilado e se adicionou 41,3 gramos de trietilamina. Deixou-se durante a noite em dessecador a temperatura ambiente para cristalizar. Os cristais são secos e parte deles se usa para preparar a solução fosforilante (0,1M PDTEA em acetonitrilo).

Fosforilação - A 10 μ moles de ficaprenol dissolvidos em 3ml de benzeno se adiciona 0,2 ml de tricloroacetoneitrilo (CCl_3CN), deixa-se em repouso por 15 minutos em dessecador e logo se adiciona com agitação, 15 ml da solução fosforilante (1,5 mmoles de PDTEA), gota a gota. Após 2 horas se repete a operação. Deixa-se durante a noite, e no dia seguinte se leva a seco a pressão reduzida em evaporador rotatório.

O resíduo é resuspendido numa mistura de 1 ml de MgCl_2 4mM, 1,6 ml de metanol e 2,4 ml de cloroformio, com o objetivo de se obter 2 fases. Descartou-se a fase superior e a fase inferior se lavou 10 a 15 vezes com a mistura de cloroformio: metanol: MgCl_2 4mM (3:48:47). Finalmente a fase inferior se secou e se suspendeu em 0,6 ml de cloroformio: metanol (2:1).

2.8. Tratamento fenólico

Este tratamento foi realizado com a amostra lipossolúvel, purificada em coluna de DEAE-celulose-acetato em metanol 99%.

Amostra secada em atmosfera de nitrogênio, era acrescida de fenol 50%, aquecida a 68-70⁰C,

por 2 horas. Ao final do tempo a amostra era resfriada e centrifugada. Formavam-se 2 fases: fase fenólica (inferior) e fase aquosa (superior). A fase fenólica era lavada 3 vezes com água, estas eram reunidas, e lavadas com éter etílico (GARCIA et alii, 1974).

A fase fenólica era evaporada com nitrogênio, lavada com éter etílico, repetidas vezes, até retirada total do fenol. O resíduo final era resuspenso em clorofórmio-metanol (2:1).

Contava-se a radioatividade na alíquota da fase aquosa e fenólica.

2.9. Caracterização da configuração α ou β entre a ose e o fosfato

2.9.1. Tratamento alcalino

Amostra secada em nitrogênio dissolvida em 0,1M de NaOH em n-propanol 99%, a temperatura de 62-68°C, 90 minutos (GARCIA et alii, 1974; HERSCOVICS et alii, 1974). Ao final do período se acrescentava clorofórmio e água (1:1). Após a centrifugação formavam-se 2 fases.

A fase clorofórmica (inferior) era lavada 3 vezes com água destilada, sendo as águas de lavagem reunidas e neutralizadas em colunas de Dowex 50Wx2 (H⁺), 200 a 400 mesh. Numa alíquota contava-se a radioatividade.

2.9.2. Hidrólise ácida

Parte do material extraído na fase aquosa, após tratamento alcalino, sofria hidrólise ácida (HCl 1N, pH1) 100°C, 5 minutos) (GARCIA et alii, 1974).

2.9.3. Fosfatase alcalina

Parte da amostra resultante da hidrólise ácida, era submetida a ação da fosfatase alcalina, mediante o seguinte sistema de incubação:

Tris-HCl 0,1M, pH 8,2, fosfatase alcalina (Escherichia coli, sigma), amostra 5.000cpm, num volume total de 100 μ l, durante 15 minutos, a 30°C (JUNG e TANNER, 1975).

Os compostos resultantes após tratamento alcalino, hidrólise ácida e fosfatase alcalina eram aplicados em eletroforese em papel, no sistema tampão E.

2.10. Tratamento com pronase

Este tratamento era efetuado no material insolúvel em butanol e água. Consistia de uma pré-incubação da enzima proteolítica no seguinte meio:

pronase 4mg/ml, Tris HCl 0,2M pH8, CaCl₂ 0,002M, a 50°C, por 30 minutos.

A seguir procedia-se a incubação do material insolúvel ("pellet") num meio com a seguinte composição: "pellet" (1mg de proteína/2,0ml de meio), Tris-HCl 0,2M, pH8, CaCl₂ 0,002M, etanol 4% e 0,3 ml de pronase pré-incubada e 1 gota de tolueno. Temperatura ambiente, durante 72 horas, sendo que após 24 e 48 horas acrescentava-se mais 0,3 ml de pronase pré-incubada. Procedia-se a inativação da atividade enzimática a 100°C por 2 minutos (ARIMA et alii, 1972). Acrescentava-se "carrier" albumina, precipitava-se com TCA na concentração final entre 5 e 10% e centri

fugava-se. O sobrenadante era lavado 3 vezes com éter saturado com água. A radioatividade era contada numa alíquota do sobrenadante e no precipitado, através do filtro, com Whatman-glass fibre paper - 2,5 cm GF/A, segundo técnica já citada.

2.11. Hidrólise ácida suave da fração butanólica

Hidrólise realizada em material solúvel em butanol.

A hidrólise da amostra era feita em meio de butanol, metanol e HCl 0,01N, 1) minutos, 100°C (GARCIA et alii, 1974; COUSO et alii, 1980). Resfriava-se e extraía-se 3 vezes com partição butanol-água. Na fase butanólica extraía-se o glicolipídio não hidrolizado. Contava-se a radioatividade desta fase, para calcular a percentagem de hidrólise.

A fase aquosa era secada em evaporador rotatório a vácuo, e acrescida de água, sucessivas vezes, até retirada total do ácido. O residuo era aplicado em cromatografia descendente em papel, no sistema A.

2.12. Hidrólises realizadas na fração insolúvel em butanol e água

As hidrólises a seguir foram realizadas sobre o material insolúvel em butanol e água ("pellet").

2.12.1. Hidrólise ácida total

Ácido tri-fluoro-acético 2N em ampolas fechadas com atmosfera inerte, a 120°C, durante 1 hora (GOLD e HAHN, 1976).

2.12.2. Hidrólise ácida parcial

Ácido tri-fluoro-acético 0,1M em ampolas fechadas com atmosfera inerte, a 100°C, durante 45 minutos (IVATT e GILVARG, 1979).

O material submetido a hidrólise era resfriado e centrifugado. O material solúvel obtido então era retirado e secado em evaporador rotatório à vácuo, e acrescido, várias vezes, de água destilada a fim de retirar o ácido. O resíduo resultante era analisado em cromatografia

descendente em papel, no sistema A e B, respectivamente.

2.12.3. Hidrólise alcalina redutora forte (GOLD e HAHN, 1976)

NaOH 2N e NaBH₄ 2M em ampola fechada, com atmosfera inerte, 100⁰C, 6 horas.

2.12.4. Hidrólise alcalina redutora suave (GOLD e HAHN, 1978)

NaOH 0,1N e NaBH₄ 0,1M, em ampolas fechadas com atmosfera inerte, temperatura ambiente, 24 horas.

Após ambas as hidrólises o material era resfriado e neutralizado com ácido acético glacial. Acrescentava-se TCA a fim de se obter concentração final entre 5 e 10%. Passava-se por coluna de DOWEX - 50 WX2 (H⁺).

O eluído da coluna era lavado 3 vezes com éter sulfúrico saturado com água. Secava-se em evaporador rotatório a vá

cuo, acrescentando sucessivas vezes, metanol acidificado para retirada de borohidreto. O resíduo era aplicado em cromatografia descendente em papel, no sistema B.

2.13. Re-incubação do lipídio-fosfato-manose endógeno produzido a 0°C

A primeira fase de incubação dava-se nas condições descritas anteriormente, exceto quanto ao volume total de 200 μ l, tempo de 10 min e temperatura de 0°C.

A reação era suspensa pela adição de EDTA 10mM, Tris-HCl 70mM, pH 7,5 (20 volumes). Centrifugava-se a 30.000 xg por 20 min. O precipitado formado era lavado com tampão Tris-HCl 0,5M, pH 7,5, numa relação de 20 vezes o volume inicial. Centrifugava-se a 30.000 xg, por 20 min.

O precipitado era resuspenso e acrescido de MgCl₂ 15mM, MnCl₂ 10mM, de Tris-HCl 75mM, pH 7,5, num volume final de 200 μ l. A re-incubação se dava a temperatura de 30°C, 15 min. Além da mistura de incubação, num dos tubos acrescentava-se GDP-manose não radioativa, e em outro tubo

controle acrescentava-se GDP-manose [$C^{14}(U)$] (COU SO et alii, 1980).

Inativava-se a reação com 0,6ml de butanol saturado com água, e seguia-se o processo extrativo já citado.

2.14. Re-incubação do lipídio-fosfato-manose exógeno

O dolicol-fosfato-manose obtido nas incubações era reunido e purificado por DEAE-celulose forma acetato, e usado como substrato.

O dolicol-fosfato-manose [C^{14}], acrescido de $MgCl_2$ 15mM e/ou $MnCl_2$ 10mM, era evaporado à vácuo. Este resíduo se resuspendia com agitação com 0,05% de Triton X-100 e logo se adicionava Tris-HCl 75mM, pH 7,5 e material enzimático, num volume final de 100 μ l. Incubava-se durante 1 hora, a 30°C. Em outro ensaio se adicionava GDP-manose não radioativa, e em outro tubo, como controle da atividade enzimática GDP-manose [$C^{14}(U)$]. (GOLD e HAHN, 1976).

O mesmo experimento foi realizado exceto adicionando-se outro detergente, deoxicolato de sódio 1%.

III- R E S U L T A D O S

I I I - R E S U L T A D O S

O estudo foi realizado com a forma levedura do fungo Mucor rouxii, utilizando-se precipitado obtido a 30.000 xg, segundo foi descrito em Material e Métodos. Neste material enzimático foi testada a atividade de incorporação de três glicídios, a partir de seus respectivos nucleotídeos-açúcares: UDP-glicose [$C^{14}(U)$], UDP-ácido glicurônico [$C^{14}(U)$] e GDP-manose [$C^{14}(U)$].

Em experiências preliminares determinou-se incorporação total, interrompendo-se a reação com ácido tri-cloro-acético 5%. Como se pode observar na tabela (III) ocorre incorporação de ose, em compostos precipitáveis por ácido tri-cloro-acético 5%, com os três nucleotídios testados, sendo maior a atividade quando se utiliza GDP-manose [C^{14}] como doador.

A fim de investigar-se a presença de glicolipídios, se efetuou outra incubação, utilizando-se butanol satura

do com água para interromper a reação.

Por este método, descrito em Material e Métodos, po-de-se separar compostos lipofílicos, glicoproteínas e/ou polissacarídeos. Obteve-se incorporação em composto solúvel em butanol e no "pellet", material insolúvel em butanol e água, porém não se encontrou radioatividade na fração clorofórmio: metanol: água (1:2:0,3) (tabela III).

TABELA III

Incorporação de hexoses em material enzimático obtido da forma levedura do fungo Mucor rouxii

| Nucleotídio açúcar | Incorporação de hexose [C ¹⁴] pmol. mg prot ⁻¹ | | |
|---|--|-------------------|----------|
| | TCA 5% | Fração butanólica | "Pellet" |
| GDP-manose [C ¹⁴] | 70 | 42 | 25 |
| UDP-glicose [C ¹⁴] | 37 | 2 | 32 |
| UDP-ácido glicurônico [C ¹⁴] | 13 | 2 | 10 |

O material solúvel em butanol, obtido por incubação em presença de UDP-glicose [C^{14}] analisado em coluna de DEAE-celulose-acetato, revelou presença de 75% de radioatividade na fração correspondente a lipídios neutros. O estudo destes glicolipídios escapa aos objetivos do presente trabalho, motivo pelo qual foi descartada a fração correspondente.

Por outro lado nas incubações com UDP-ácido glicurônico [C^{14}] o glicolipídio extraído na fração butanólica não se hidroliza em condições ácidas suaves (pH2), como se esperaria de um poliprenol-fosfato-açúcar.

Com base nestes resultados, passamos a incubar o material enzimático com GDP-manose [C^{14}].

Foram, em primeiro lugar, estabelecidas as condições ótimas das reações de transferência, tais como: estabilidade do material enzimático, tempo de reação, necessidade de íon divalente, concentração de proteína, substrato, pH ótimo.

1. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE REAÇÃO

1.1. Estabilidade do material enzimático

Para se testar a estabilidade do material enzimático, guardou-se por 24 horas as leveduras em congelador. Verificou-se perda de atividade em 80%, na transferência de manose, tanto para material precipitável por TCA 5%, quanto para material solúvel em butanol e insolúvel em butanol e água. Em outra experiência o sedimento obtido a 30.000 xg de leveduras novas foi guardado em congelador por 24 horas, constatou-se perda de atividade entre 80-90%. Também se testou o processo de liofilização das leveduras, e observou-se desnaturação total do material. Por estes motivos, preparava-se o material enzimático no dia de cada experimento, a partir de cultivos recentes.

1.2. Curva de tempo

Constatou-se pela curva de tempo (figura 7), realizada a 30°C, que nos 20 minutos de incubação tem-se o máximo de incorporação, tanto em compostos solúveis, em butanol, quanto compostos insolúveis em butanol e água.

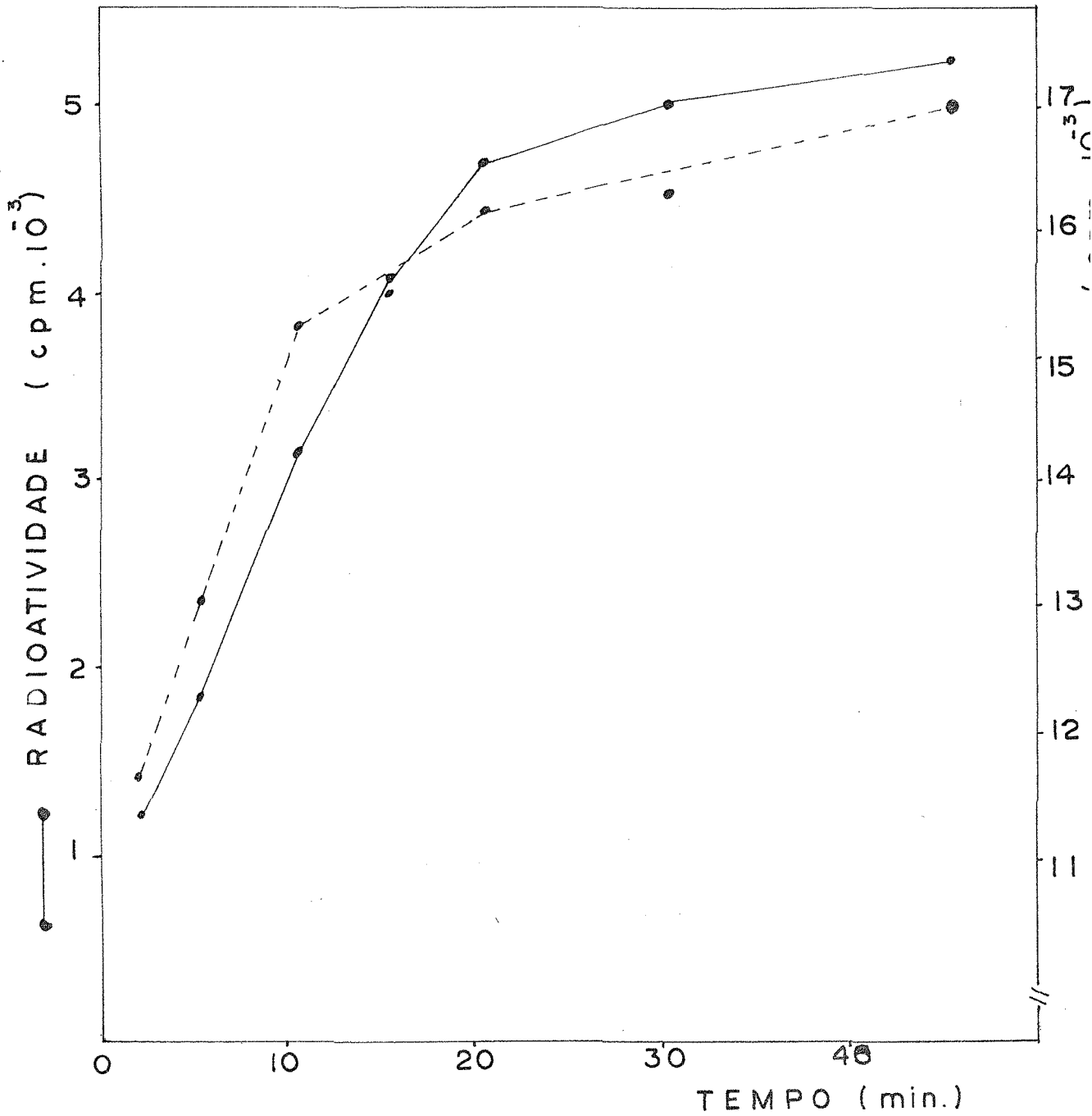


Figura 7 - Curva de tempo - realizada a 30°C como foi descrito em Material e Métodos, variando o tempo de incubação.

(• --- •) incorporação de manose [C¹⁴] na fração butanólica

(• —•) incorporação de manose [C¹⁴] no "pellet"

Após este tempo, a incorporação na fração butanólica a "pellet" não varia.

Realizou-se extração do "pellet" com a mistura clorofórmio: metanol: água (1:1:0,3), porém não se obteve incorporação em compostos extraídos neste sistema.

Tendo em vista que a velocidade das reações enzimáticas se alteram com a temperatura e tentando se detectar a formação de composto solúvel em clorofórmio: metanol: água, realizou-se uma curva de tempo a 0°C (figura 8).

Observou-se que a incorporação na fração butanólica atinge um máximo aos 20 minutos e depois passa a ser constante. O mesmo não ocorre com o "pellet", pois a transferência é praticamente nula nesta fração.

1.3. Curva concentração de íon Mg^{+2} e Mn^{+2}

Sabendo-se que as reações de transferência de glicídios, dos respectivos nucleotídeos para receptores lipídicos e glicoproteínas, dependem de íon divalente Mg^{+2} e/ou Mn^{+2} , fez-se curvas de concentração de ambos os íons, variando de

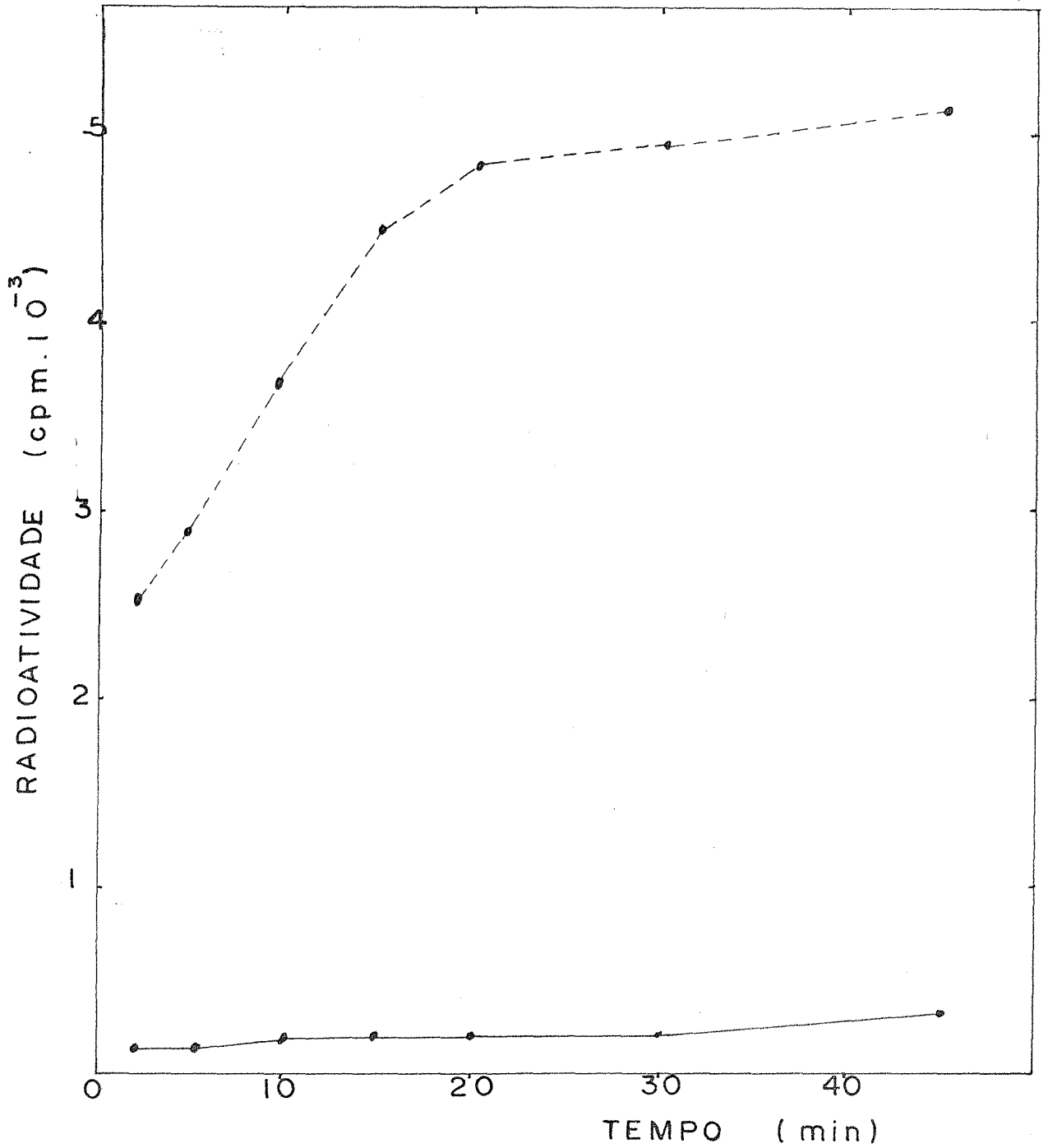


Figura 8 - Curva de tempo - realizada a 0°C como foi descrito em material e Métodos, variando o tempo de incubação.

(•---•) incorporação de manose $[\text{C}^{14}]$ na fração butanólica

(•—•) incorporação de manose $[\text{C}^{14}]$ no "pellet"

2 a 50mM de $MgCl_2$ e de 2 a 20mM de $MnCl_2$ (figura 9).

Constatou-se que as reações são dependentes de um destes íons. Obtem-se na fração butanólica e "pellet", máximo de incorporação quando se tem uma concentração de 10mM de Mg^{+2} , tendendo a uma atividade constante com o aumento da concentração. Quanto ao íon Mn^{+2} , tem-se maior atividade de incorporação na fração butanólica, na concentração de 5mM e de 10mM para o "pellet". Em ambos os casos o aumento da concentração do íon, provoca um decréscimo na ativação.

1.4. Curva concentração de proteína

Nesta curva a concentração variou de 48,9 a 1466,6 μg de proteína por tubo de incubação.

Observando a figura (10) constatou-se que com o aumento da concentração protéica, tem-se maior incorporação de manose $[C^{14}]$. Na fração clorofórmio: metanol: água não se conseguiu transferência com o aumento de material enzimático.

As experiências realizadas utilizavam concentração protéica entre 800 a 1000 μg por mistu

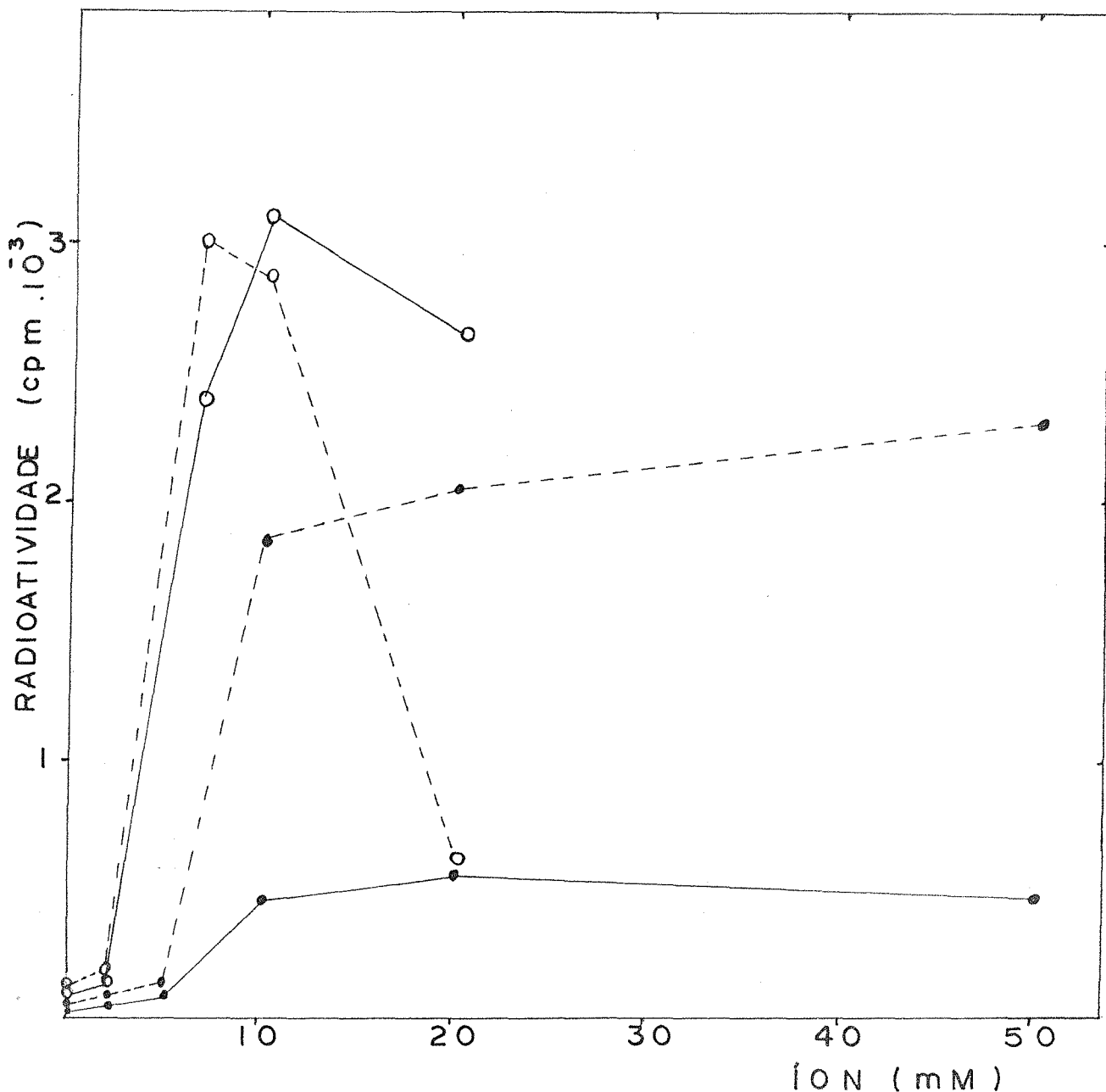


Figura 9 - Efeito da concentração de íons. As incubações foram efetuadas como foi descrito em Material e Métodos, em presença de Mg^{+2} ou Mn^{+2} nas concentrações indicadas.

(o --- o) curva de Mn^{+2} - incorporação na fração butanólica

(o — o) curva de Mn^{+2} - incorporação no "pellet"

(• --- •) curva de Mg^{+2} - incorporação na fração butanólica

(• — •) curva de Mg^{+2} - incorporação no "pellet"

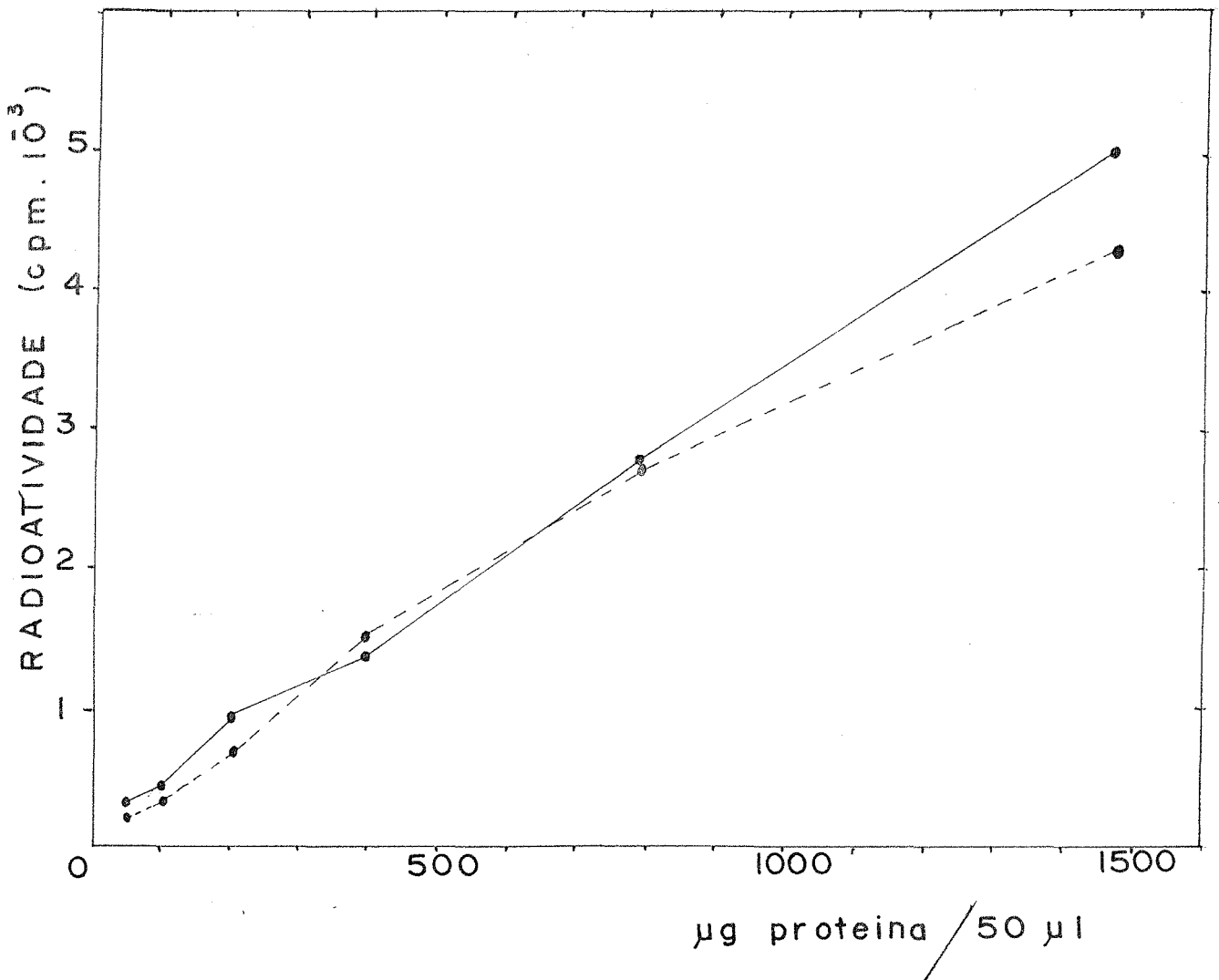


Figura 10 - Curva de concentração enzimática. A incubação foi segundo Material e Métodos, variando as concentrações de material enzimático.

(•---•) incorporação de manose [C^{14}] na fração butanólica

(•—•) incorporação de manose [C^{14}] no "pellet"

ra de incubação.

1.5. Curva concentração de substrato

Nesta curva, a concentração de GDP-manose [C^{14}] variou entre 14,8 a 1870 pmol. Verifica-se na figura (11) que tanto para a formação de produto da fração butanólica como do "pellet" tem-se concentração saturante de 370 pmol de substrato.

As concentrações de GDP-manose [C^{14}] utilizadas nos experimentos seguintes foram ao redor da concentração saturante.

1.6. Curva de pH

A curva de pH foi realizada com o tampão Tris-maleato-NaOH 75mM, variando o pH entre 6 e 8.

De acordo com a figura (12), observa-se que a transferência de manose [C^{14}] para composto lipossolúvel é mais efetiva em pH 7,0. Porém a transferência da ose para composto insolúvel em butanol e água é maior em pH 7,5.

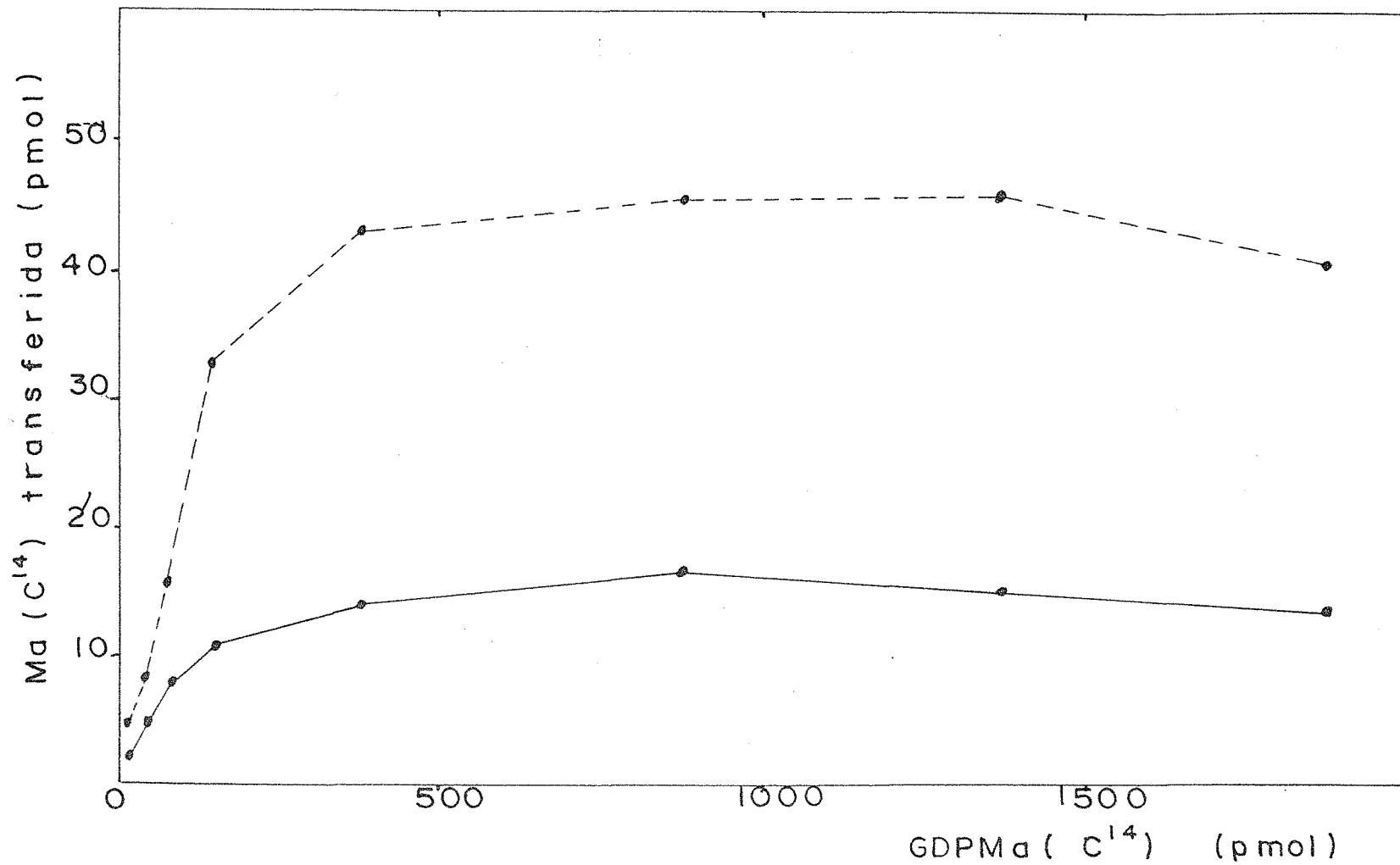


Figura 11 - Curva de concentração de substrato. A incubação seguiu-se de acordo Material e Métodos, variando a concentração de GDP-manose $[\text{C}^{14}]$
 (•---•) incorporação de manose $[\text{C}^{14}]$ na fração butanólica
 (•—•) incorporação de manose $[\text{C}^{14}]$ no "pellet"

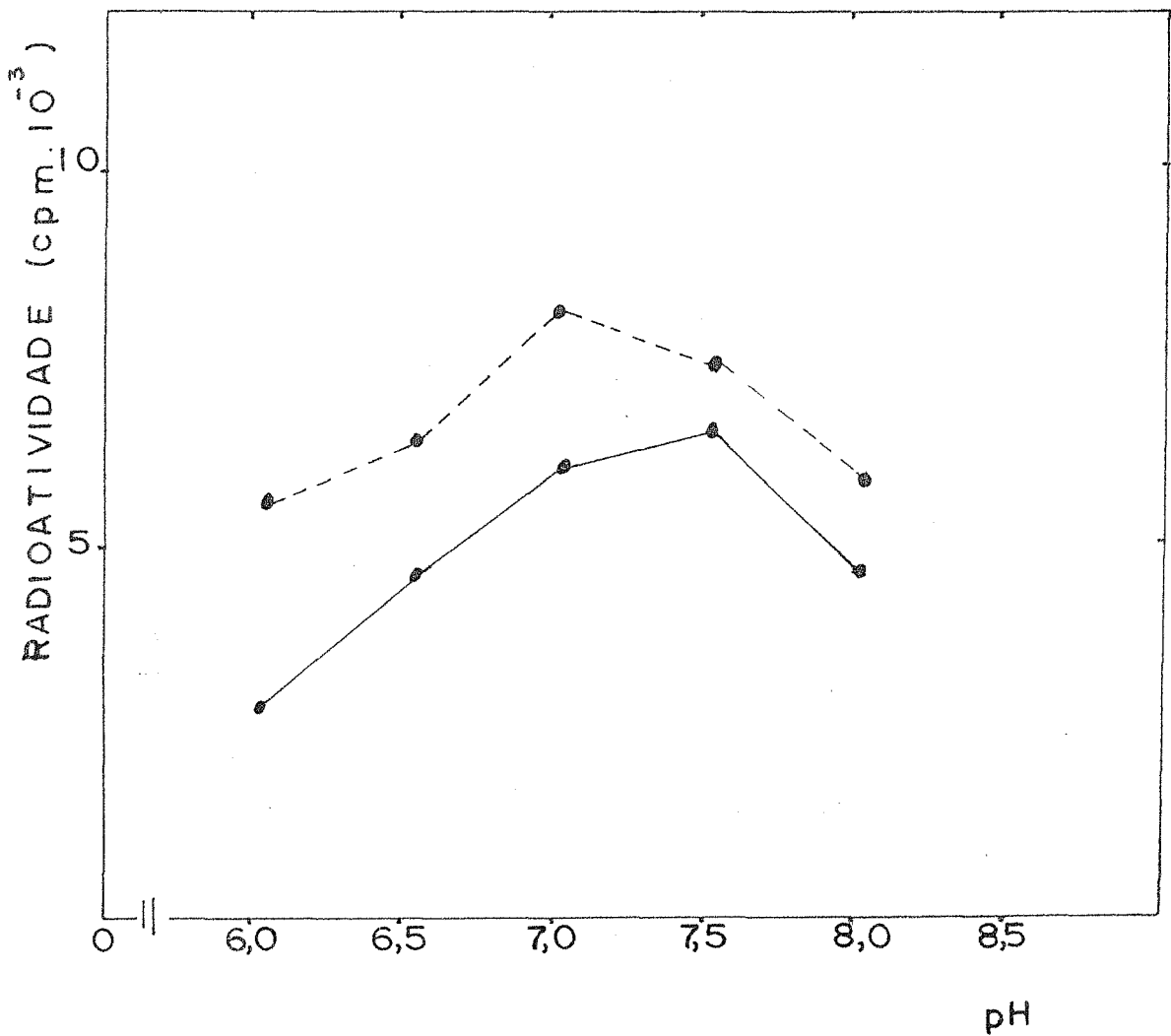


Figura 12 - Curva de pH. A incubação foi efetuada de acordo Material e Métodos, variando o pH do meio de 6,0 a 8,0 em tampão Tris-maleato 75mM.
(• --- •) incorporação de manose [C¹⁴] na fração butanólica
(• —•) incorporação de manose [C¹⁴] no "pellet"

1.7. Efeito do íon Ca^{+2}

Na tabela (IV) observa-se que o íon Ca^{+2} , ativa as reações de transferência da manose [C^{14}] para compostos extraídos na fração butanólica e para aqueles insolúveis em butanol e água "pellet"), isto comparando com o sistema sem íons. Porém ao incubar-se com íon Ca^{+2} e Mg^{+2} ocorre uma diminuição na atividade de incorporação, em relação a incubação que só tem íon Mg^{+2} .

O efeito de ativação do íon Ca^{+2} é muito menor do que o observado com o íon Mg^{+2} .

TABELA IV

Efeitos do íon Ca^{+2} na atividade de transferência de manose $[\text{C}^{14}]$, a partir de GDP-manose $[\text{C}^{14}]$, para compostos solúveis em butanol e para aqueles in solúveis em butanol e água

| | Incorporação de manose $[\text{C}^{14}]$ pmol. mg prot ⁻¹ | |
|---|---|----------|
| | Fração butanó lica | "Pellet" |
| Sem íon | 0,9 | 2 |
| C/ Mg^{+2} (15mM) | 70 | 25 |
| C/ Ca^{+2} (10mM) | 15 | 14 |
| C/ Mg^{+2} + Ca^{+2} (15mM - 10mM) | 7 | 8 |

1.8. Incubação com outros nucleotídeos açúcares

Tentando-se a formação de oligossacarídeos mais complexos, adicionou-se ao meio de incuba

TABELA V

Efeito de UDP-glicose (UDPG), UDP-ácido glicurônico (UDPGA), UDP-galactose (UDPGAL), UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) na transferência de manose $[C^{14}]$, a partir de GDP-manose $[C^{14}(U)]$ a compostos solúveis em butanol e insolúvel em butanol e água

| Fração | Controle | +UDPG | +UDPGA | +UDPGAL | +UDPGlcNAc | +UDPG UDPGA UDPGAL UDPGlcNAc |
|------------------|----------------------|--------|--------|---------|------------|---------------------------------------|
| | (cmp/mg de proteína) | | | | | |
| Butanólica | 12.000 | 11.100 | 11.500 | 9.000 | 10.000 | 11.300 |
| "Pellet" | 4.400 | 4.200 | 3.900 | 4.300 | 3.800 | 3.600 |
| CMH ⁺ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

+ CMH: clorofórmio: metanol: água (1:2:0,3)

Todos os nucleotídeos-açúcares não radioativos se encontravam no meio de incubação com concentração final de 0,25 μ M.

ção, além do substrato radioativo, outros nucleotídeos açúcares, não radioativos. Usou-se UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico, UDP-galactose, UDP-N-acetilglicosamina todos a uma concentração de 0,25 μ M.

Observando-se a tabela (V) constata-se que não ocorre estímulo da incorporação de radioatividade, tanto no produto obtido na fração butanólica quanto no "pellet". Da mesma forma não se obteve transferência para composto extraído com clorofórmio: metanol: água.

Conclui-se que a incorporação de manose [C^{14}] tanto na fração butanólica quanto no "pellet", independe de uma ligação anterior com outro glicídio.

2. ANÁLISE DA FRAÇÃO BUTANÓLICA

Com o objetivo de identificar o produto lipossolúvel obtido na fração butanólica.

2.1. Cromatografia descendente em papel

Material solúvel em butanol foi aplicado em cromatografia descendente em papel, no solvente B. Observa-se na figura (13) que o composto radioativo se desloca num só pico perto da linha de frente (R_f 0,9), movendo-se como se pode esperar de substâncias lipofílicas.

2.2. Coluna de DEAE-celulose, acetato em metanol 99% (70 x 3 mm)

Esta coluna foi montada com a finalidade de se determinar a natureza do composto lipídico (neutro ou carregado).

Observou-se que 25% do material radioativo é eluído em metanol 99%, como um composto neutro. O restante, 75% é eluído em acetato de amônio 0,4M. Conclui-se que se trata de um lipídio carregado.

2.3. Hidrólise ácida suave

Esta hidrólise foi realizada com a finalidade

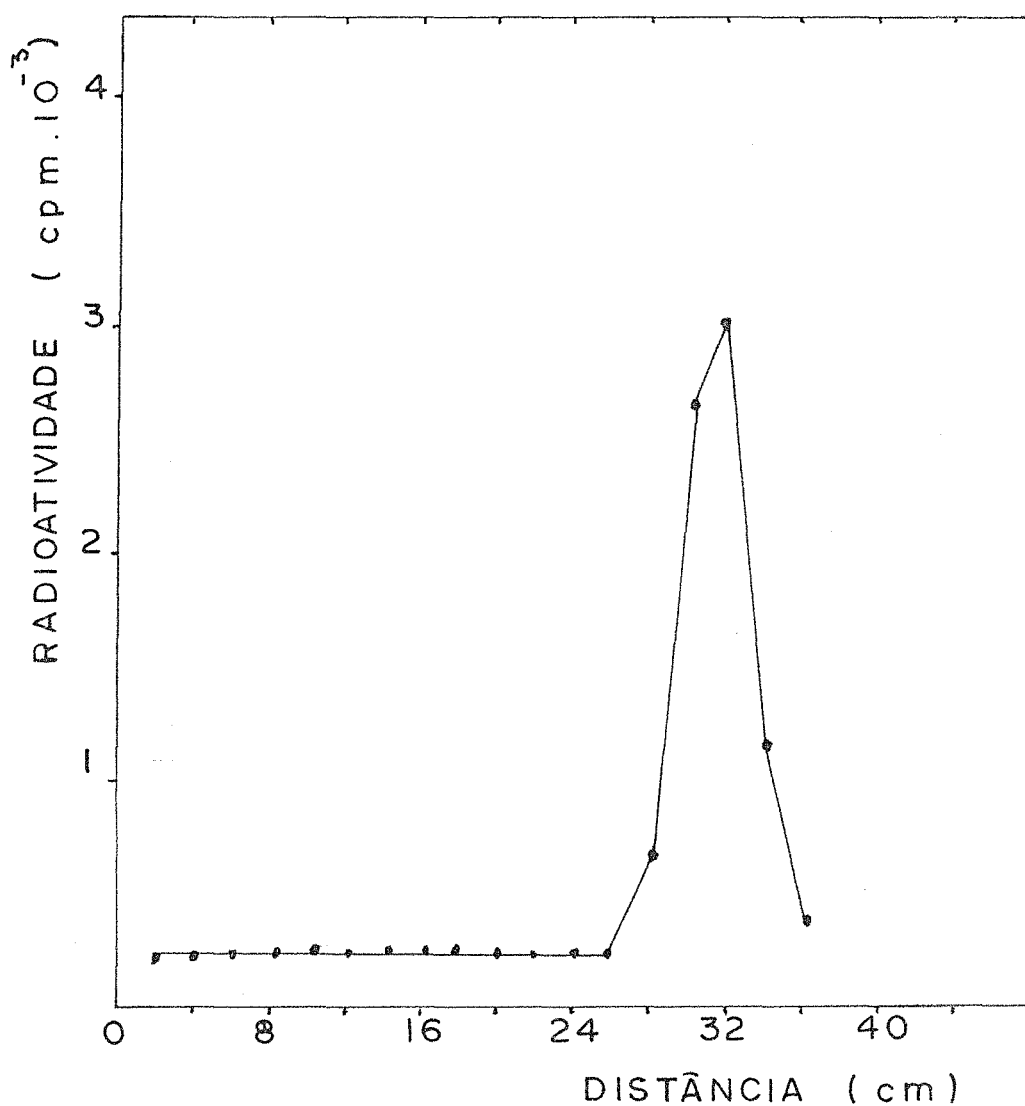


Figura 13 - Cromatografia descendente em papel do composto extraído na fração butanólica, após incubação do material enzimático do Mucor rouxii com GDP-manose [C¹⁴]. Eluente - butanol: piridina: água (4:3:4)

de de investigar união lábil em meio ácido, como é a ligação do fosfato ao carbono anômero do glicídio.

A hidrólise foi com HCl 0,01N, 10 minutos, 100°C, de acordo Material e Métodos. Obteve-se 70% de hidrólise.

O material hidrolizado, solúvel em água, foi submetido a cromatografia descendente em papel, no solvente A. Identificou-se um só composto que se desloca como manose (figura 14).

2.4. Coluna de DEAE-celulose, acetato em metanol 99%
(30 x 2 cm)

Para se verificar se o composto da fração butanólica é eluído como fosfato ou pirofosfato fez-se esta coluna.

A amostra, aplicada na coluna, foi eluída com várias concentrações de acetato de amônio em metanol 99%, de acordo com Material e Métodos.

Observando-se a figura (15) constata-se que o lipídio é eluído na concentração de 0,2M de acetato de amônio, como os poliprenois-monofosfatados.

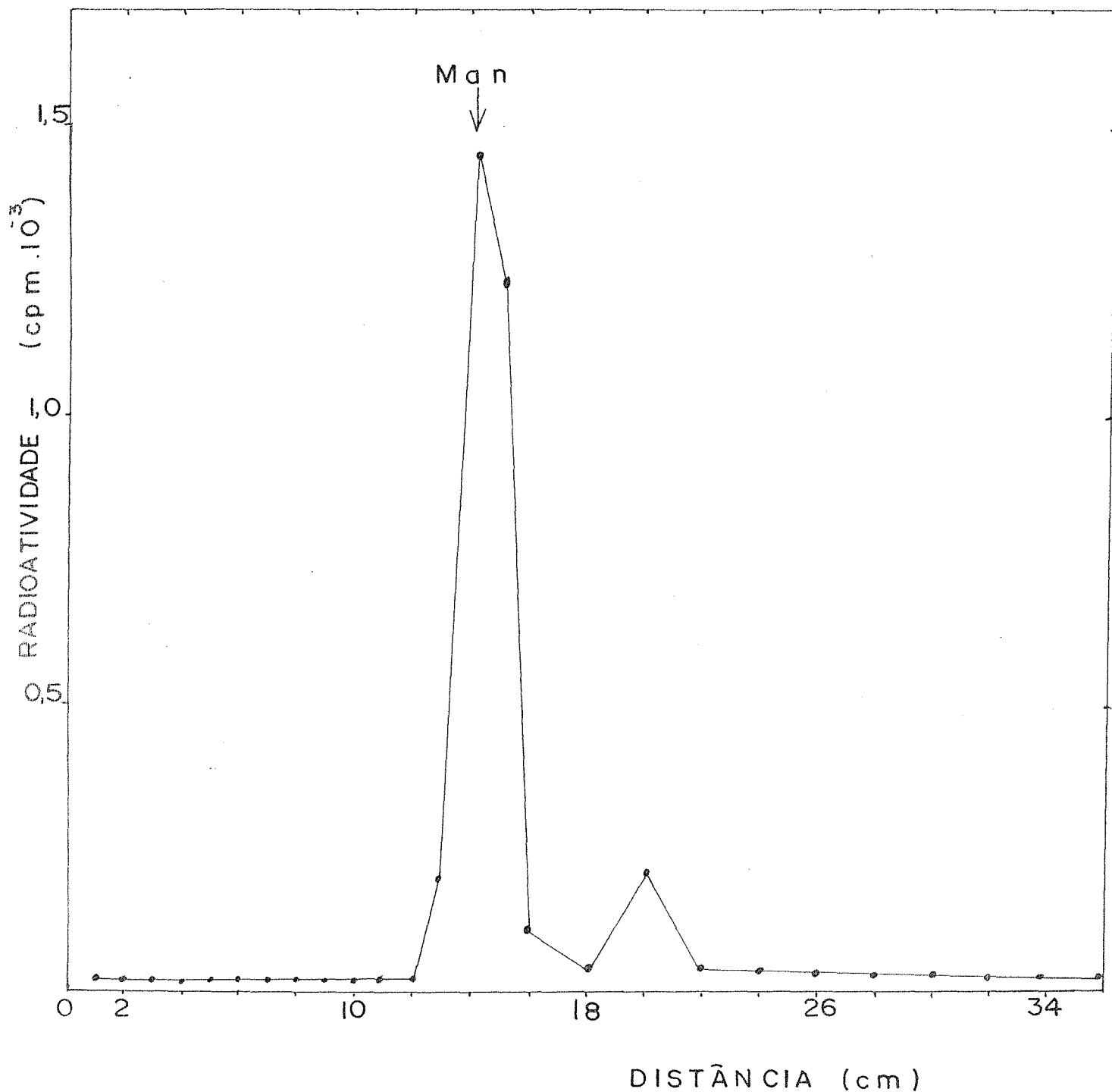


Figura 14 - Cromatografia descendente em papel do produto solúvel em água, obtido na hidrólise ácida suave (0,01N HCl, 100⁰C, 10 min) do composto solúvel em butanol. Eluente - butanol: piridina: água (6:4:3). Man - manose

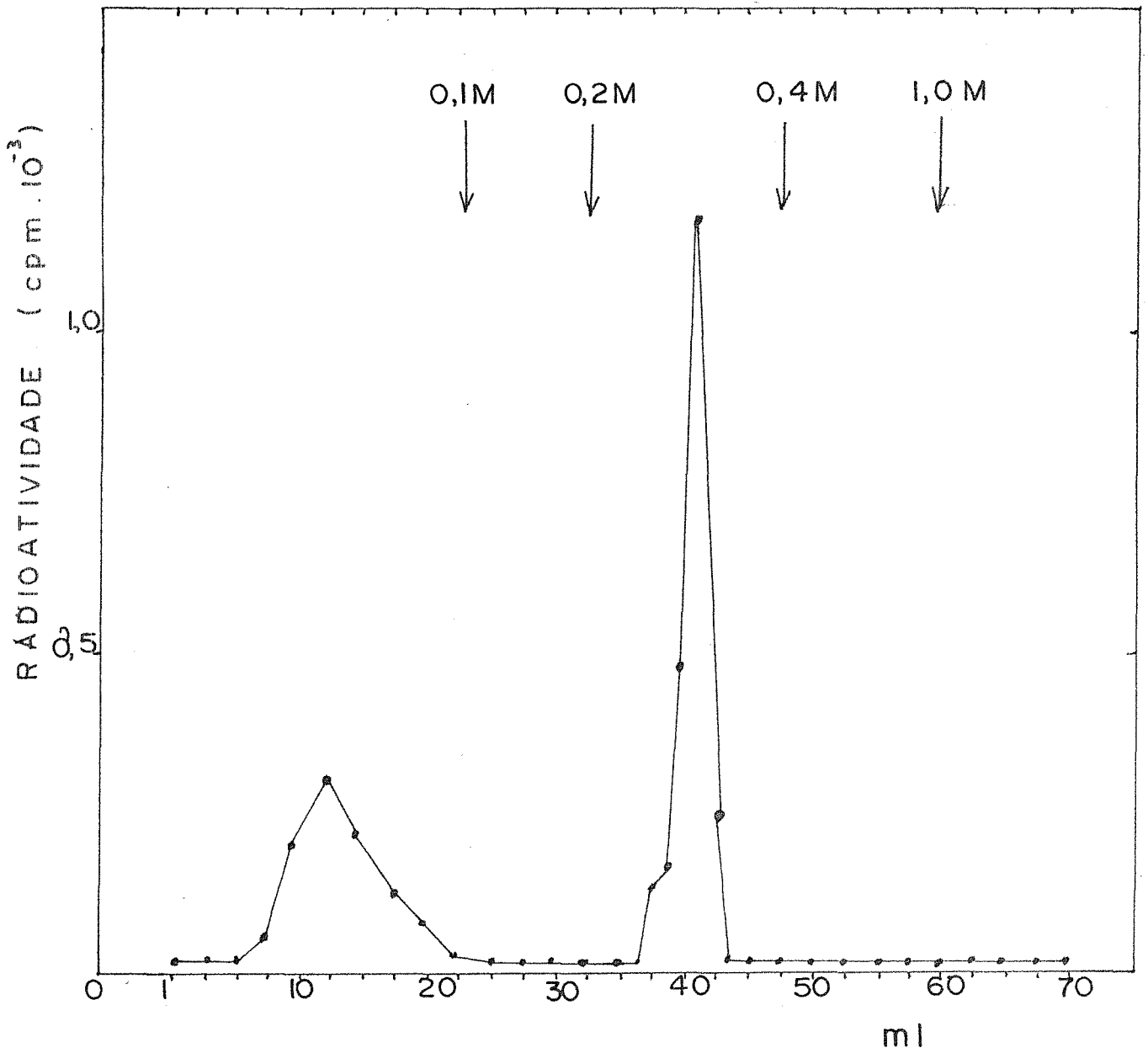


Figura 15 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Ex trações butanólicas de várias incubações foram reunidas e aplicadas. A coluna foi eluída com metanol 99% e acetato de amônio 0,1; 0,2; 0,4 e 1,0M em metanol 99%. Frações de 1 ml foram coletadas e a radioatividade medida.

Se o composto fosse pirofosfato, seria eluído em concentrações mais elevadas de acetato de amônio.

Este composto, purificado pela coluna de DEAE-celulose-acetato, foi 100% hidrolizado quando submetido a hidrólise ácida suave. O produto de hidrólise, solúvel em água, foi aplicado em cromatografia descendente em papel, no solvente A, e foi identificado como manose.

2.5. Cromatografia em camada delgada

Para confirmar os resultados obtidos, a amostra em análise foi aplicada em cromatografia em camada delgada, com o sistema de solvente D.

Na figura (16) observa-se que a amostra se desloca, junto com o padrão utilizado: dolicol-fosfato-glicose.

2.6. Tratamento fenólico

Tendo evidências de que a maior parte do produto lipossolúvel se comporta como poliprenol-fosfato-manose, submeteu-se o mesmo a um trata

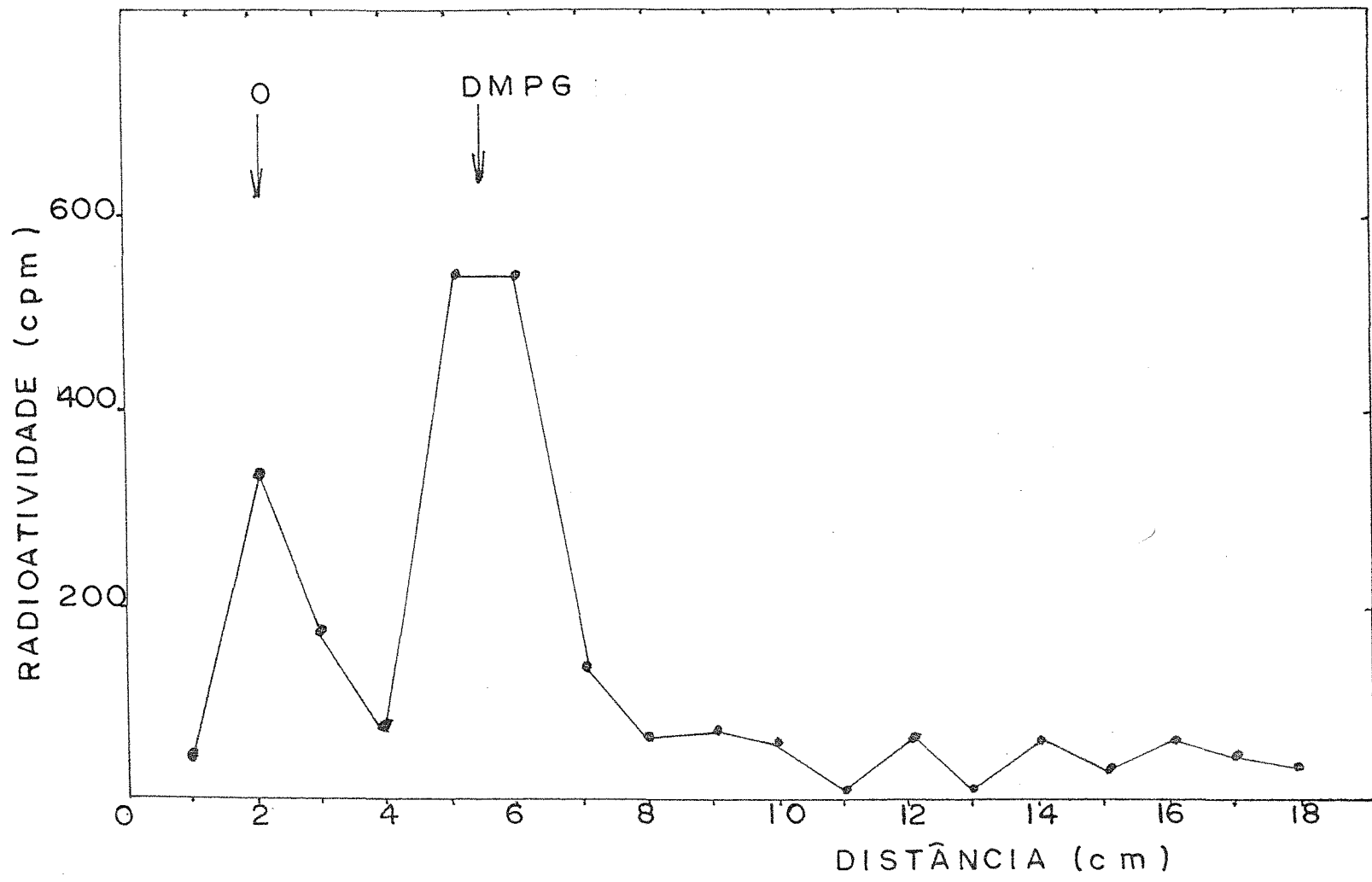


Figura 16 - Cromatografia em camada delgada de silica gel G. Amostra obtida por extração com butanol, após incubação de GDP-manose [C¹⁴] com fração enzimática de 30.000 xg. Eluente - clorofórmio: metanol: água (60:20:2). DMPG-dolicol-P-glicose. 0 → origem.

mento fenólico. Este determina se o lipídio apresenta a unidade \mathcal{L} -isopreno saturada ou insaturada.

Com o tratamento fenólico, se o lipídio é insaturado, tem-se ruptura da ligação éster entre o poliprenol e fosfato-manose, obtendo-se a radioatividade na fase aquosa após extração. Se o lipídio é saturado não ocorre a ruptura da ligação, e a radioatividade é encontrada na fase fenólica (PONT LEZICA et alii, 1975).

Usou-se como controle, ficaprenol-fosfato-galactose, obtido utilizando-se: material enzimático de Acetobacter xilinum no seguinte sistema de incubação: Tris-HCl pH7,5-0,05M; $MgCl_2$ 0,1M; UDP-galactose [C^{14}] (268 $\mu Ci/\mu mol$) e ficaprenol-fosfato (ver Material e Métodos), num volume de 100 μl , 30°C, 40 minutos (ROMERO et alii, 1977). A incubação foi inativada com 0,25 ml de butanol saturado com água, para extrair o ficaprenol-fosfato-galactose.

Ficaprenol-fosfato-galactose é um lipídio \mathcal{L} -isopreno insaturado, que quando submetido a tratamento fenólico, rompe-se a ligação entre ficaprenol e fosfato e obtêm-se galactose-1-fosfato, solúvel em água.

De acordo com a tabela (VI), pode-se observar que o composto obtido por incubação com a levedura permaneceu 97% de material radioativo na fase fenólica, ao contrário do controle (ficaprenol-fosfato-galactose) 64%, foi liberado na fase aquosa. Conclui-se que se trata de um poli-isopreno \mathcal{L} -saturado, ou seja, do tipo dolícólico.

TABELA VI

Tratamento fenólico do glicolipídio solúvel em butanol

| Amostra | % de radioativo | |
|---|-----------------|---------------|
| | Fase aquosa | Fase fenólica |
| Ficaprenol-fosfato-galactose [C^{14}] | 64 | 36 |
| Lipídio-fosfatomanose [C^{14}] | 3 | 97 |

2.7. Tratamento alcalino

Pelas evidências apresentadas, o composto extraído na fração butanólica e purificado pela colu

na de DEAE-celulose-acetato, é dolicol-fosfato-manose.

A ligação manose-fosfato pode ter duas configurações: α ou β . Para se determinar a configuração fez-se sucessivas reações. Um tratamento alcalino forte rompe a ligação entre o fosfato e o poliprenol, liberando manose-fosfato. Se a manose está em configuração cis(β) durante o tratamento alcalino, forma-se um composto cíclico intermediário, manose-1,2-fosfato, que nas condições de reação, rompe a ligação entre fosfato e C₁ da ose, liberando-se manose-2-fosfato. Se a configuração é trans(α), não há a formação do composto cíclico, e o glicídio liberado é quase que totalmente destruído, nas condições de reação da hidrólise alcalina. O resultado da hidrólise alcalina forte é observado na eletroforese em papel, no tampão E (figura 17 A), em que o produto de hidrólise se desloca como manose-fosfato.

Para confirmar que o fosfato se encontra ligado ao C₂ da manose, fez-se uma hidrólise ácida do produto, obtido com o tratamento alcalino. Esta hidrólise rompe a ligação fosfato com o C₁ da manose, se esta existir.

Na figura 17 B, observa-se que, mesmo após a hidrólise ácida, o composto liberado continua car

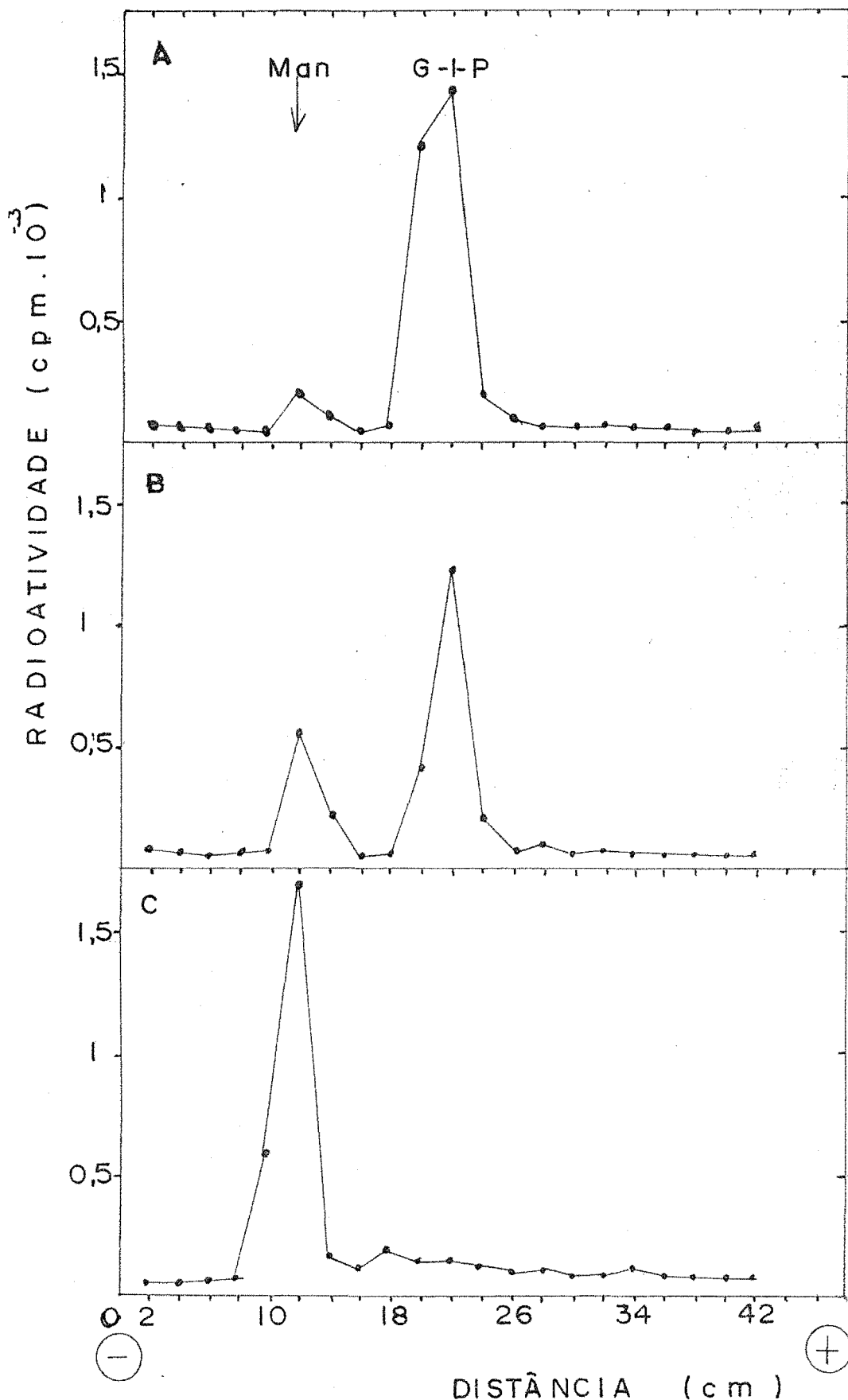


Figura 17 - Eletroforese em papel do produto solúvel em água obtido por tratamento alcalino (A); o mesmo material após hidrólise ácida (B); tratamento da fração anterior com fosfatase alcalina (C). Tampão acetato de piridina pH 6,5, 50mA, 4 h 30 min. Man - manose. G-I-P- glicose-1-fos

regado, se deslocando como manose-fosfato.

Para provar que a carga do composto, separado por eletroforese, se deve ao fosfato ligado a manose, a amostra que resultou da hidrólise ácida, foi tratada com fosfatase alcalina (vide Material e Métodos). Liberou-se um composto, que em eletroforese no sistema E, se comportou como neutro e se deslocou como manose (figura 17 C).

Conclui-se que a manose está ligada ao fosfato com configuração β . Com isto se demonstrou a existência de dolicol-fosfato- β -manose no material lipossolúvel extraído com butanol.

3. RE-INCUBAÇÃO COM DOLICOL-FOSFATO-MANOSE

Para investigar se o dolicol-fosfato-manose transfere a porção glicídica para algum composto, glicoproteína ou polissacarídeo, testou-se o glicolipídio (purificado segundo Material e Métodos) como substrato no sistema de incubação.

Não se obteve transferência de manose [C^{14}] ao "pellet", mesmo quando GDP-manose não radioativa era acrescentada ao meio de incubação, a fim de estimular a reação.

Observando-se a curva de tempo a 0°C (figura 8), constata-se que há acúmulo de glicolipídio radioativo na fração butanólica, sem haver transferência de manose [C¹⁴] para a glicoproteína ("pellet"). Com estes dados tentou-se a transferência de manose [C¹⁴] para a proteína, a partir do dolicol-fosfato-manose [C¹⁴] endógeno, formado a 0°C, re-incubando-se a 30°C.

O procedimento que seguiu-se, foi descrito em Material e Métodos. Não houve incorporação de manose [C¹⁴] na proteína.

Num tubo controle, re-incubado com GDP-manose [C¹⁴], não se encontrou atividade, o que demonstra a inativação das enzimas durante o processo, por isso não se pode concluir algo a respeito deste experimento.

4. ANÁLISE DO COMPOSTO INSOLÚVEL EM BUTANOL E ÁGUA

4.1. Tratamento com pronase

Investigando-se a possibilidade da presença de uma glicoproteína no material insolúvel em butanol e água, submeteu-se o "pellet" a digestão com enzima proteolítica (pronase), como foi descrito

em Material e Métodos.

Paralelamente se fez um controle, em que a amostra foi incubada sem enzima proteolítica.

Após 72 horas de tratamento, se liberou 99% da radioatividade, numa forma solúvel em água. No controle só se solubilizou 15%.

Os produtos obtidos pela digestão com pronase, foram aplicados em coluna de Sephadex G 25. A amostra foi eluída dentro do volume de inclusão da coluna, comprovando a diminuição peso molecular da glicoproteína, por ação da enzima proteolítica. A glicoproteína não tratada com pronase, foi eluída no volume de exclusão (figura 18).

Para provar a natureza dos compostos solubilizados por pronase, se utilizou eletroforese em papel em tampão ácido (tampão F).

Observando-se a figura (19) constata-se um deslocamento do produto radioativo para o polo negativo como acontece com glicopeptídeos.

Os resultados confirmam a existência de glicoproteína, com um ou mais glicídios ligados, o que será analisado a seguir.

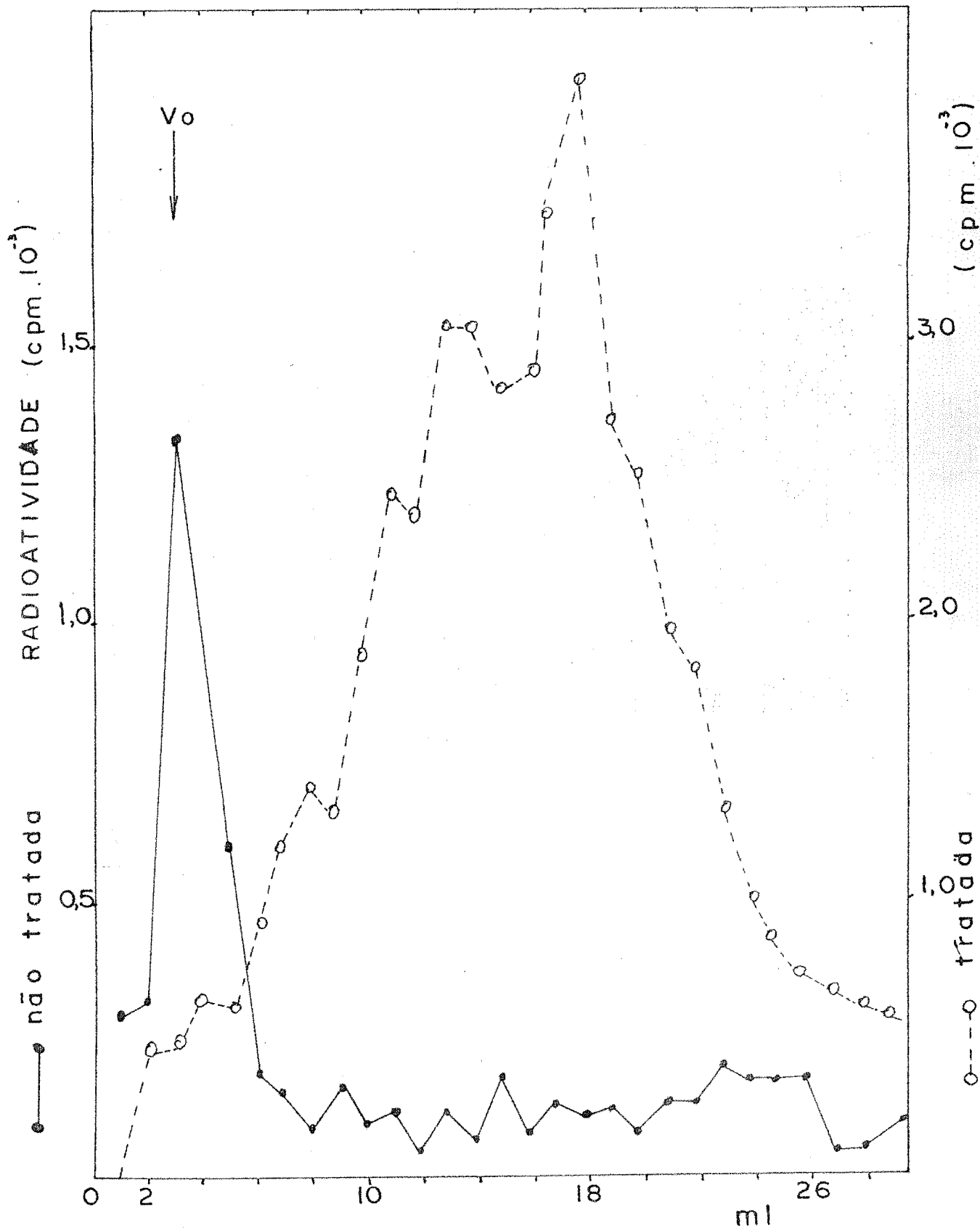


Figura 18 - Gel filtração do glicopeptídeo. Uma coluna de Sephadex G 25 foi preparada como foi descrito em Material e Métodos. Aplicou-se glicopeptídios liberados após tratamento com pronase (O---O) e proteína não tratada (●—●), solubilizada com 1% de SDS em tampão. Frações de 1 ml foram coletadas

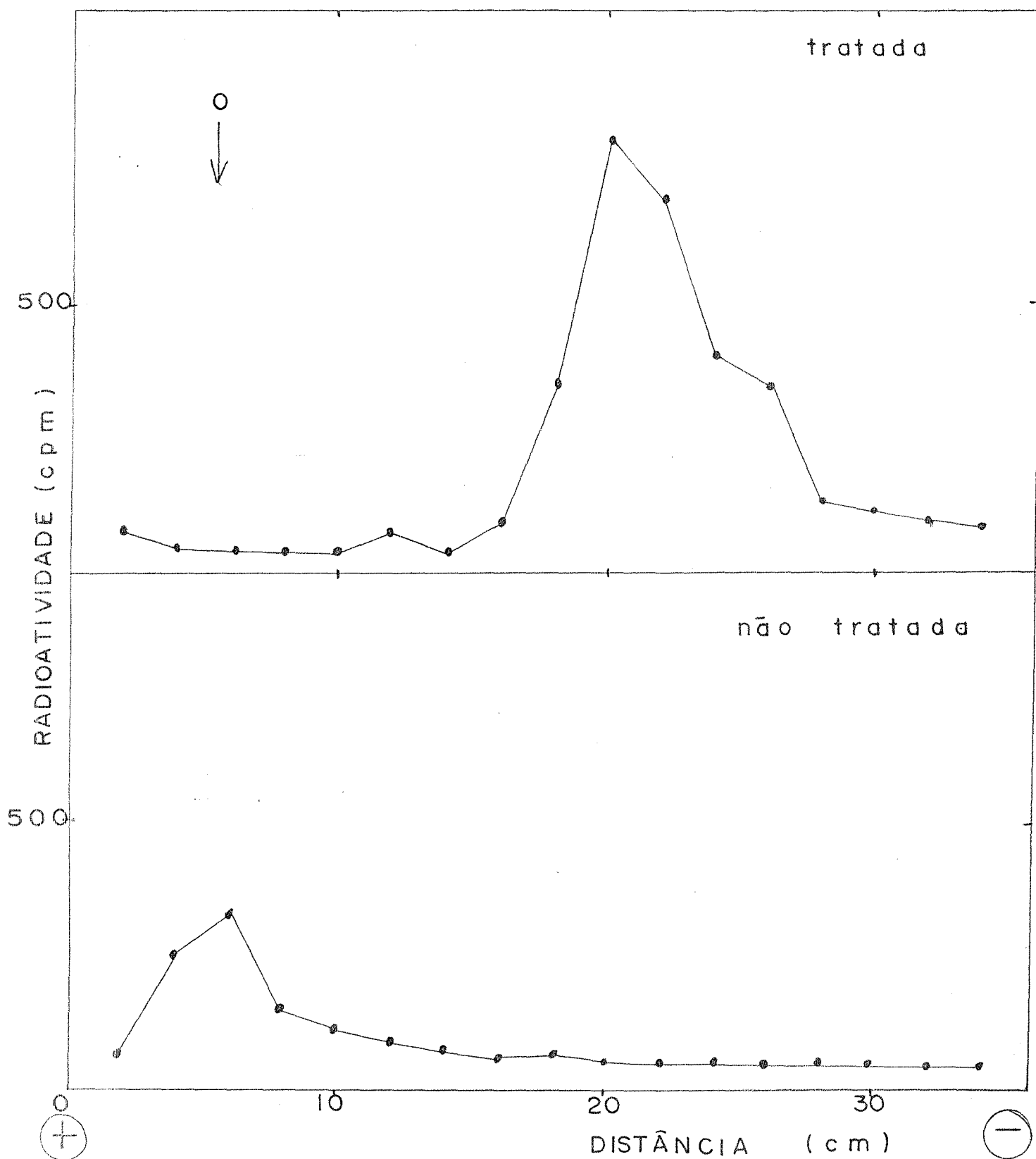


Figura 19 - Eletroforese em papel dos produtos solúveis, obtidos incubando a glicoproteína em presença ou ausência de pronase. Tampão ácido fórmico 5%, 40 mA, 6 horas.

4.2. Hidrólises ácidas

Com a finalidade de analisar quais e quantos glicídios estão ligados à glicoproteína, realizou-se respectivamente hidrólise ácida total e parcial.

Com a hidrólise ácida total (ácido Tri-fluoro-acético (2N - 1h - 120°C) obteve-se 95% de hidrólise. O hidrolizado foi submetido a cromatografia descendente em papel, no sistema A.

Na figura (20) observa-se que só se encontra manose.

Efetuada-se uma hidrólise ácida parcial se liberou 75% de radioatividade que ao ser aplicada em cromatografia descendente em papel, no sistema B, 50% desta radioatividade fica no ponto de aplicação e o restante se desloca como manose.

4.3. Hidrólises alcalinas redutoras

É conhecido que os carboidratos das glicoproteínas podem estar unidos por ligações N-glicosídicas ou O-glicosídicas, através dos respectivos aminoácidos: asparagina, serina ou treonina; hidroxí

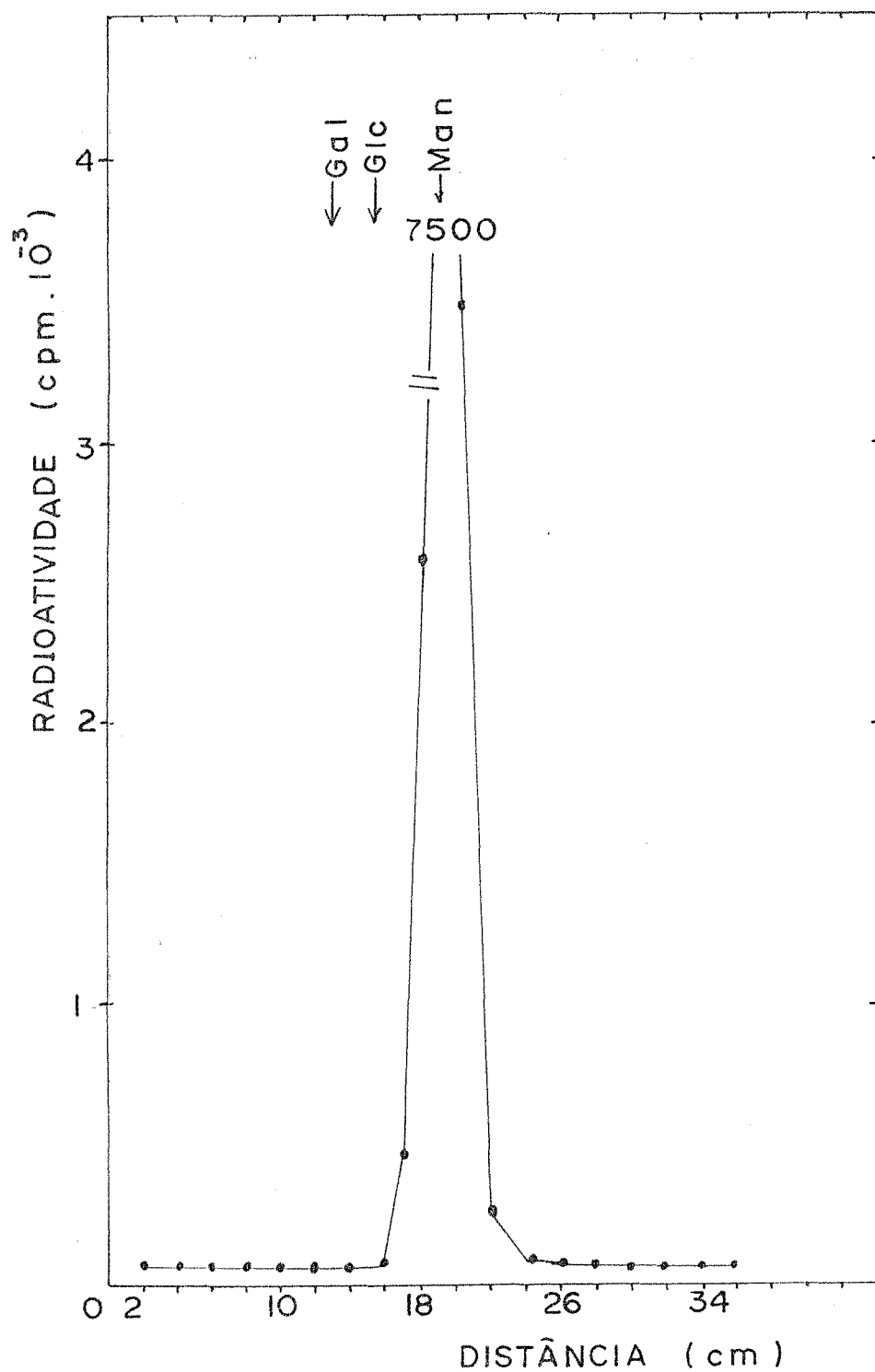


Figura 20 - Cromatografia descendente em papel, do produto obtido, após hidrólise ácida total da glicoproteína (2NTFA, 120°C, 1 h). Eluente - butanol: piridina: água (6:4:3). Gal - galactose. Glc - glicose. Man - manose.

lisina e hidroxiprolina.

O tipo de ligação O-glicosídica (com serina ou treonina) é lábil em condições alcalinas suaves, entretanto a ligação N-glicosídica (via asparagina) se mostra resistente nestas condições.

Por este motivo se realizou hidrólise alcalina suave redutora (0,01N NaOH, 0,1M NaBH₄ - 24h - temperatura ambiente), seguindo técnica descrita em Material e Métodos. Obteve-se 80% de hidrólise. Este material liberado foi aplicado em cromatografia descendente em papel, no sistema B. Constatou-se pela figura (21) que o tratamento alcalino só produz manose.

Com a hidrólise alcalina forte redutora (2N NaOH, 2M NaBH₄ - 6 horas - 100°C) obteve-se 95% de hidrólise. O material hidrolizado foi aplicado em cromatografia descendente em papel, no sistema B. Apresentou o mesmo resultado das condições anteriores (figura 22).

O material desta cromatografia foi eluído e aplicado no sistema cromatográfico C, que permite separar manose de manitol. Observa-se na figura (23) que o composto liberado pelo tratamento alcalino redutor, é identificado como manitol confirmando que só uma manose está ligada a glicoproteína

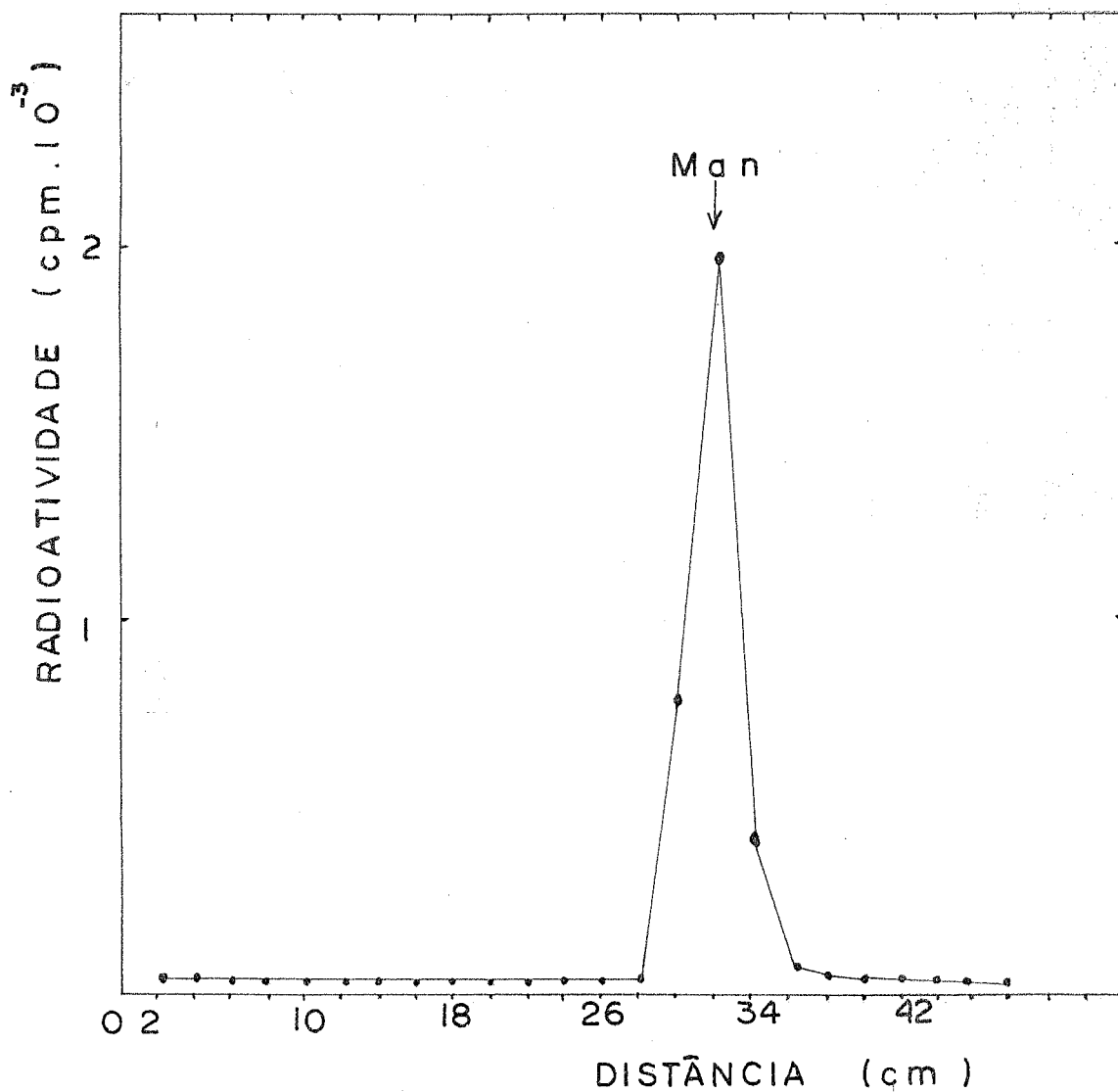


Figura 21 - Cromatografia descendente em papel do produto obtido, após hidrólise alcalina redutora sua ve, da glicoproteína (0,1N NaOH - 0,1M NaBH₄, temperatura ambiente, 24 h). Eluente - butanol: piridina: água (4:3:4). Man - manose.

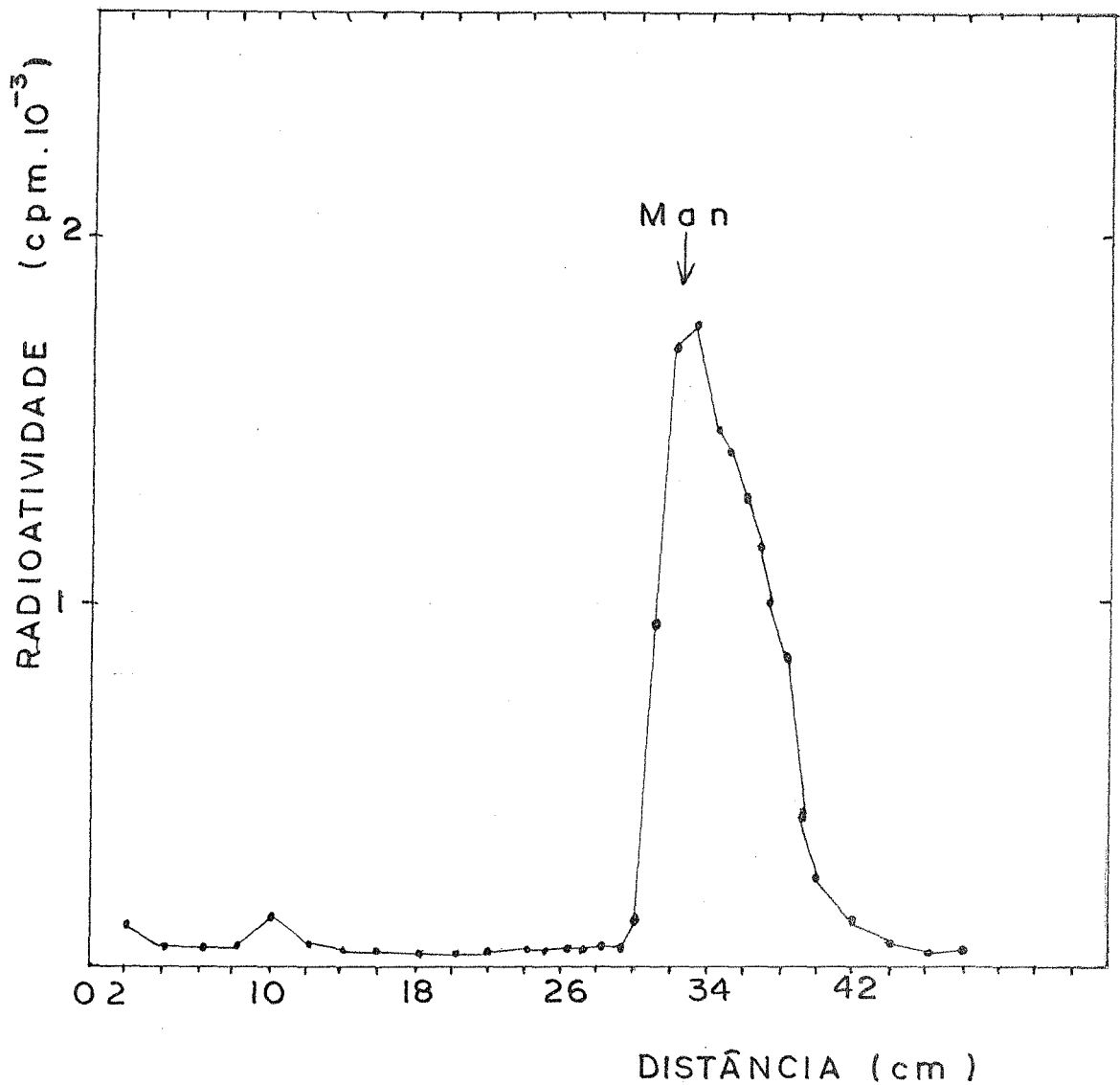


Figura 22 - Cromatografia descendente em papel do produto obtido após hidrólise alcalina redutora forte da glicoproteína (2N NaOH - 2M NaBH₄, 100°C, 6 horas). Eluente - butanol: piridina: água (4:3:4).

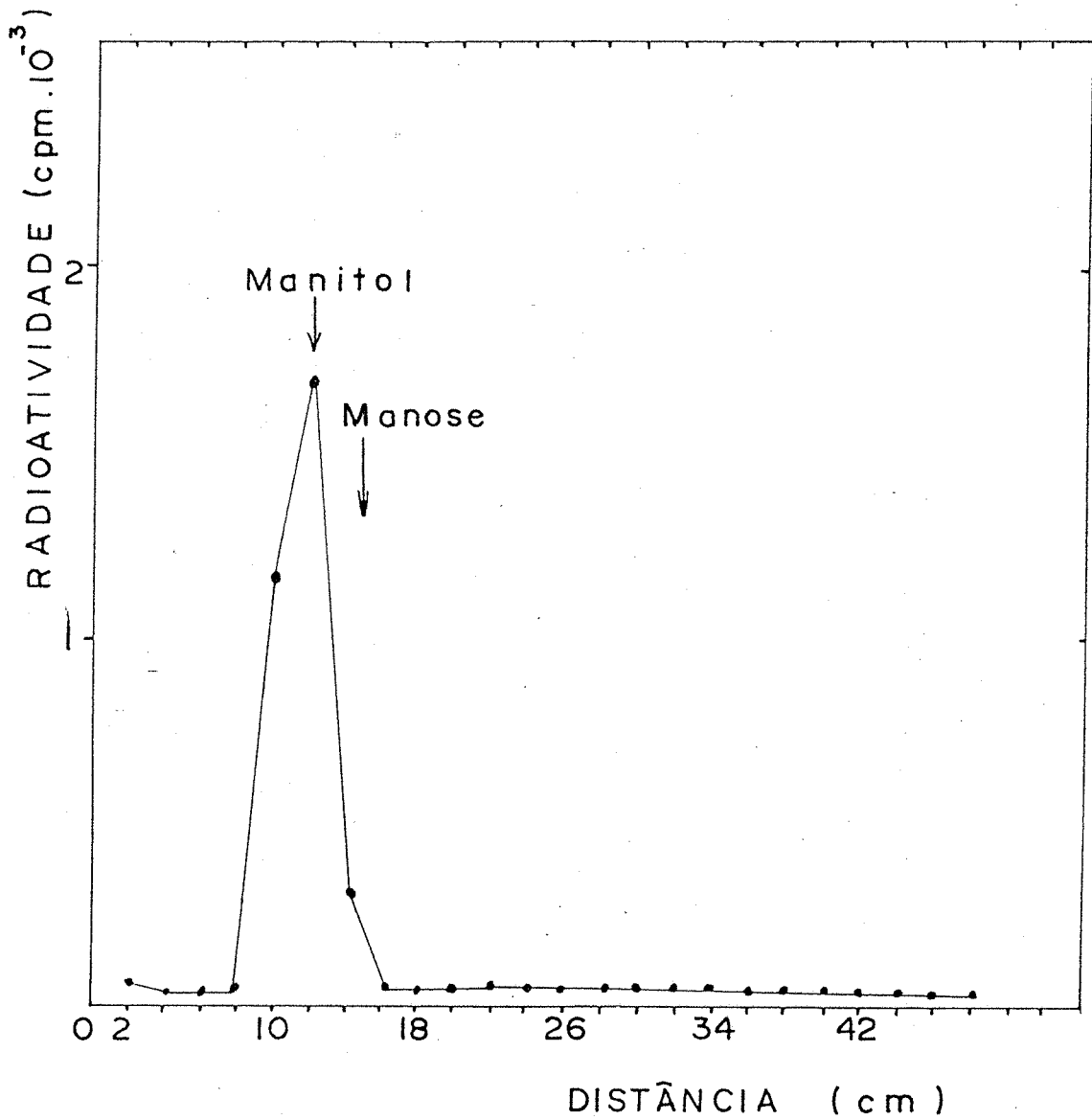


Figura 23 - Cromatografia descendente em papel do produto obtido após β -eliminação redutora da glicoproteína [C^{14}]. O composto isolado na figura foi eluído e recromatografado no sistema de solventes: butanol: etanol: água (10:1:2).

na pelo extremo redutor.

Para confirmar a ausência das glicoproteínas via asparagina, efetuou-se incubação do material enzimático obtido de levedura, na presença de tunicamicina (10 $\mu\text{g/ml}$). Este antibiótico inibe a síntese de glicoproteína com ligação N-glicosídicas. Porém, observando a tabela (VII) constata-se que não há inibição de transferência de manose para a glicoproteína.

TABELA VII

Efeito da Tunicamicina na transferência de manose [C^{14}] a compostos solúveis em butanol e insolúveis em butanol e água

| Condições de incubação | Fração butanólica "Pellet" | |
|--|----------------------------|------|
| | cpm/mg de proteína | |
| Controle | 9000 | 3700 |
| + Tunicamicina (10 $\mu\text{g/ml}$) | 9000 | 3600 |

De acordo com os resultados pode-se concluir

que a porção glicídica de glicoproteína é formada por uma manose, ligada com união O-glicosídica, aos aminoácidos serina e/ou treonina, da proteína.

IV - D I S C U S S Ã O .

I V - D I S C U S S Ã O

A participação de lipídios fosfatados como carreadores de grupos glicosilas ativados, tem sido objeto de estudo em tecidos animais, plantas, bactérias, fungos e leveduras.

Várias oses ou derivados de oses são transferidos de seus respectivos nucleotídeos para lipídios intermediários, na biossíntese de glicoproteínas, em células eucarióticas e procarióticas. Evidências de tais reações têm sido obtidas com respeito à manose (CACCAN et alii, 1969; TETAS et alii, 1970; WAECHTER et alii, 1973; BEHRENS et alii, 1973), galactose (TETAS et alii, 1970; HELTING e PETERSON, 1972), glicose (BEHRENS et alii, 1970, 1971), N-acetilglicosamina (TETAS et alii, 1970; BEHRENS et alii, 1973) e xilose (WAECHTER et alii, 1974).

Foi demonstrado por GLASER (1958) que procariotes, como o Acetobacter xylinum sintetizam celulose a partir de UD^R-glicose como doador de radicais glicosil.

Mais tarde, COLVIN e colaboradores (1959, 1961) sugeriram a participação de lipídios intermediários na biossíntese de celulose por este organismo.

E, em 1978, estes conhecimentos foram demonstrados por HOPP e colaboradores.

Incubando-se fração particulada de vários tecidos com nucleotídeos-açúcares radioativos, observa-se que o resíduo marcado é encontrado numa fração solúvel em solvente orgânico. Tentando observar mais detalhadamente esta atividade enzimática de transferência em precipitado obtido a 30.000 xg do fungo Mucor rouxii, crescido em anaerobiose incubou-se este material com os três nucleotídeos-açúcares: UDP-glicose [$C^{14}(U)$], GDP-manose [$C^{14}(U)$] e UDP-ácido glicurônico [$C^{14}(U)$].

Constatou-se que o material enzimático utilizado transferia o resíduo glicídico marcado para compostos precipitáveis por ácido tri-cloro-acético 5%. O mesmo foi observado em fração particulada da forma micélio deste fungo quando se incubava este material na presença de UDP-N-acetilglicosamina e GDP-fucose, além dos três derivados nucleotídicos já citados.

Estudando-se a natureza dos produtos de reação, obtidos na incubação com a forma levedura, verificou-se que a transferência se fazia para dois compostos: um de caráter lipofílico, solúvel em butanol e outro insolúvel, tanto no

solvente orgânico como em água.

Constatou-se que o produto insolúvel em butanol e água é de natureza protéica, porque, quando submetido a pronase (enzima proteolítica) apresenta 85% de hidrólise.

Foi demonstrado em Neurospora crassa que a presença de Mg^{+2} e/ou Mn^{+2} é necessária para que ocorra a transferência de manose, a partir de GDP-manose para um lipídio poliprenólico e um acceptor endógeno protéico (GOLD e HAHN, 1976, 1978). O mesmo foi observado em outros organismos.

Na forma micélio do fungo Mucor rouxii (BERNARD et alii, 1982) foi constatada a necessidade de íon divalente, e o mesmo foi observado na forma levedura.

A incorporação de manose [C^{14}] no lipídio e glicoproteína é dependente do íon Mg^{+2} e/ou Mn^{+2} .

O íon Ca^{+2} quando acrescentado ao meio de incubação, estimula pouco a atividade enzimática de transferência, porém quando ambos, íon Ca^{+2} e Mg^{+2} , se encontram no meio de reação, ocorre inibição por parte de Ca^{+2} .

WAECHTER e LENNARZ (1976) relataram que vários organismos, contêm enzimas que formam oligossacarídeos ligados a lipídios. Os resíduos glicídicos ligados a estes compostos podem ser N-acetilglicosamina, manose, glicose e outros. O oligossacarídeo formado encontra-se unido a um li

píidio-difosfato. Este produto de reação pode ser separado de outros lipídios por sua solubilidade em solvente contendo clorofórmio: metanol: água, nas proporções 1:1:0,3 (STANELONI e LELOIR, 1977). Tais compostos foram encontrados em quase todos tecidos animais (PARODI et alii, 1973) e levedura (PARODI, 1977).

No fungo Mucor rouxii, não se constatou transferência de manose [C^{14}] para composto solúvel em clorofórmio: metanol: água (1:1:0,3). Na tentativa de obter tal composto, incubou-se fração particulada do fungo com GDP-manose [C^{14}] e outros derivados nucleotídicos com a porção glicídica transferível, não radioativa. Porém, não se obteve aumento de incorporação no lipídio ou proteína, nem mesmo teve-se a formação de lipídio-oligossacarídeo. Isto não exclui a possibilidade de existência deste composto na forma levedura do fungo. Indica apenas que não é formado no preparado enzimático obtido a 30.000 xg.

Como já foi exposto anteriormente, os lipídios carreadores descritos até o momento, se dividem em dois grupos: um que contem um fosfato entre o lipídio e a porção glicídica, e outro que contem um pirofosfato nesta posição.

Em coluna de DEAE-celulose forma acetato, o lipídio-manose foi eluído como undecaprenol-monofosfato-manose.

Estes dados foram confirmados pela labilidade ácida do glicolipídio. Houve liberação de manose [C^{14}] como uni

co composto solúvel em água. Resultado esperado para um lípídio-monofosfato-manose, desde que um derivado pirofosfato daria um éster cíclico de manose-fosfato (LEZICA et alii, 1976).

Os lípidios glicosilados encontrados em tecidos animais (BURGOS et alii, 1963; CACCAN et alii, 1969; WAECHTER et alii, 1973), fungos (TANNER et alii, 1972; BABCZINSKI e TANNER, 1973) e plantas (ALAM e HEMMING, 1973) são provavelmente dolícolis monofosfatados. Estes lípidios pertencem a família dos poli-isoprenos com uma cadeia carbonada de C_{40} a C_{100} . Diferem dos poli-isoprenos de bactérias pelo tamanho da cadeia, como também, porque os dolícolis tem a unidade isoprênica terminal saturada (LENNARZ, 1975). Consequentemente a ligação fosfato-dolícol é estável frente ao tratamento fenólico.

A fim de se determinar, se em fungos, a unidade poli-isoprênica terminal do glicolípídio, obtido nas incubações, era saturada ou insaturada, submetemos a um tratamento fenólico. A amostra se mostrou resistente a este tratamento, comparando-se com ficaprenol-fosfato-galactose de Acetobacter xylinum, que possui unidade \mathcal{L} -isoprênica insaturada (GARCIA et alii, 1974). Conclui-se que o lípídio em questão é do tipo dolícolico.

A configuração anomérica da manose pode ser \mathcal{L} ou β .

Os anômeros \mathcal{L} e β do dolícol-fosfato-manose podem

ser distinguidos pelos produtos formados após hidrólise alcalina, ou pela ação de \mathcal{L} -manosidase (HERSCOVICS et alii, 1974).

Conforme foi exposto em Resultados, HERSCOVICS e colaboradores observaram o comportamento de dolicol-fosfato \mathcal{L} ou β -manose diante do tratamento alcalino.

Na figura (24) observa-se que quando existe configuração cis (β) entre o fosfato e o grupo hidroxila do C_2 da manose, é possível formar-se um composto cíclico intermediário, que se transforma em manose-2-fosfato. Se a configuração é trans (\mathcal{L}) não é possível haver a ciclização, e o resíduo de manose é rompido com este tratamento.

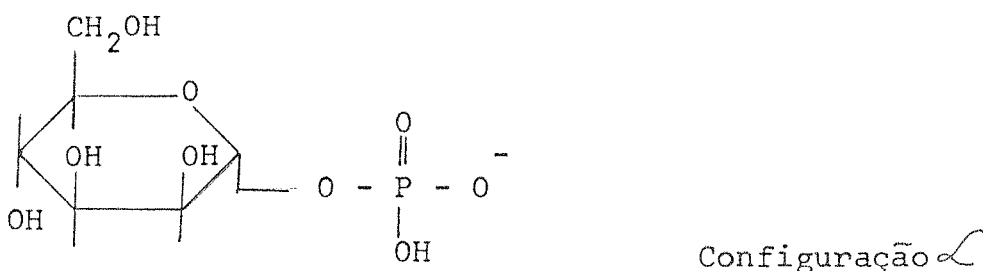
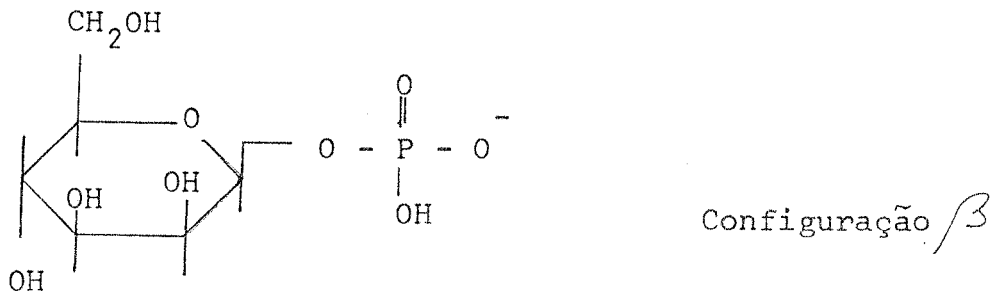


Figura 24 - Estrutura de fosfato- β -manose e fosfato- \mathcal{L} -manose

Tratamento alcalino do dolicol-fosfato-manose obtido nas incubações liberou um composto que se deslocava como glicose-fosfato, em eletroforese. O produto deste tratamento foi submetido a uma hidrólise ácida, formando ainda composto carregado, provavelmente manose-2-fosfato, pois a ligação fosfato no C₁ da manose é lábil com esta hidrólise.

O tratamento com fosfatase alcalina veio complementar as conclusões anteriores, segundo as quais a carga da molécula se deve a um grupo fosfato.

Diante dos resultados, concluímos que o glicolipídio é dolicol-fosfato- β -manose.

Sabendo-se que um grande número de proteínas, de diversas origens e funções biológicas são conhecidas por conterem resíduos glicídicos ligados covalentemente a cadeias laterais dos resíduos de certos aminoácidos, suspeitamos que o produto radioativo, insolúvel em solvente orgânico e água, tivesse esta natureza.

Este composto foi submetido a digestão exaustiva por pronase, havendo 85% de hidrólise. Os resultados da gel filtração em Sephadex G 25 da amostra tratada e não tratada por pronase, mostram uma diminuição do peso molecular com o tratamento proteolítico.

Os produtos liberados por pronase, aplicados em eletroforese em meio ácido, se deslocam para o polo negativo,

confirmando o caráter de glicopeptídeo.

Para elucidar a estrutura da parte glicídica desta glicoproteína, quanto ao tipo e número de resíduos glicídicos ligados, realizou-se hidrólise ácida total e parcial da amostra.

A cromatografia, do produto de hidrólise total, revelou que o glicídio radioativo liberado era manose, excluindo a possibilidade de alguma reação paralela que transformasse o substrato, por exemplo epimerização.

O produto de hidrólise ácido parcial também correu como manose, sugerindo que possui manose com ligação ácido lábil.

Os oses ou derivados podem se ligar a proteína através de união O-glicosídica ou N-glicosídica, isto depende da cadeia lateral do resíduo de aminoácido, envolvido na ligação.

Sabe-se que o manano, uma glicoproteína estudada em Saccharomyces cerevisiae (WAECHTER e LENNARZ, 1976; PARODI, 1979) contém resíduos de manose ligados a cadeia polipeptídica por uma ponte alcali-lábil com os resíduos de serina e/ou treonina. Outras manoses estão unidas por ligação alcali-estável, provavelmente através de pontes N-glicosídicas de N-acetilglicosamina com asparagina.

A glicoproteína em estudo apresentou-se suscetível a hidrólise alcalina redutora suave, liberando uma manose, que estava unida a proteína. Este comportamento se deve a ligação O-glicosídica da ose com as cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos serina e/ou treonina.

Eluição e recromatografia do composto revelou que o tratamento alcalino redutor libera manitol.

Outro resultado que veio confirmar nossas conclusões foi o efeito da Tunicamicina. Este é um antibiótico que inibe a síntese de dolicol-pirofosfato-N-acetilglicosamina e conseqüentemente afeta a formação de glicoproteínas com ligação N-glicosídicas (TAKATSUKI et alii, 1971; TKACZ e LAMPEN, 1975; STRUCK e LENNARZ, 1977; WAECHTER e HARFORD, 1977; ERICSON et alii, 1977; JAMES e ELBEIN, 1980).

Tunicamicina, ao ser acrescentada no meio de incubação, não produz efeito inibitório na transferência de manose para a glicoproteína. Isto confirma os dados apresentados, e exclue a possibilidade de se formar uma manoproteína com união N-glicosídica, no sistema de reação.

Reunindo os resultados de análise, deduzimos que a porção glicídica consta de somente uma manose ligada a proteína por união O-glicosídica.

Apesar de se ter estabelecido, que a forma levedura, do fungo Mucor rouxii, sintetiza um manolipídio e uma mano

proteína, a partir de GDP-manose, não se pode estabelecer uma relação precursor produto.

O trabalho apresentado só nos permite afirmar que na forma levedura do fungo Mucor rouxii, são formados, a partir de GDP-manose, dolicol-fosfato- β -manose e uma glicoproteína, com manose ligada ao resíduo de serina e/ou treonina da proteína.

V - R E S U M O E C O N C L U S Õ E S.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

A transferência de glicídios, a partir de seus respectivos nucleotídeos para compostos complexos (polissacarídeos e glicoproteínas), via lipídio intermediário, tem sido pouco investigada em fungos.

O estudo desenvolvido nesta dissertação tentou acrescentar informações à respeito destes organismos.

O trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de transferência de glicídios, a partir de nucleotídeos-açúcares, na biossíntese de polissacarídeos ou glicoproteínas no fungo dimórfico, Mucor rouxii.

Verificou-se que, na fração particulada da forma leve dura, deste fungo, ocorre a transferência de manose [C^{14}], a partir de GDP-manose [C^{14}], a um composto de natureza lipídica e a outro de natureza protéica.

Em primeiro lugar, determinou-se as condições ótimas de reação, quanto ao tempo de incubação, concentração de substrato, concentração de material enzimático, dependência de íons e pH do meio.

Observou-se que a 30°C obtem-se o máximo de incorporação de manose [C^{14}] no lipídio e glicoproteína, em 20 minutos, porém a 0°C, só ocorre transferência para o composto lipossolúvel.

Constatou-se que a reação de transferência é dependente de íon divalente, Mg^{+2} ou Mn^{+2} , sendo que Ca^{+2} atua com muito menor intensidade, e que além disso, este último inibe o efeito dos dois primeiros.

Analisando os produtos obtidos conclui-se que o glicolipídio é um composto poli-isoprênico, com unidade terminal saturada, ou seja, do tipo dolicolico.

Este poli-isopreno se encontra esterificado com um fosfato, e a este, está ligada uma manose com configuração β . Ou seja, o produto foi identificado como dolicol-fosfato- β -manose.

O composto insolúvel em butanol e água foi identificado como de natureza protéica, de acordo com o tratamento de pronase e eletroforese dos glicopeptídios liberados.

A glicoproteína foi caracterizada por apresentar uma

ligação do tipo O-glicosídica, entre uma única manose e a cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos, serina e/ou treonina, da cadeia polipeptídica.

VI - REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

V I - R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

- ALAM, S. S; HEMMING, R. W. (1973). Polyprenol phosphates and mannosyl transferases in Phaseolus aureus. Phytochemistry 12: 1641-1649
- ARIMA, T.; SPIRO, M. J.; SPIRO, R. G.(1972). Studies on the carbohydrate units of thyroglobulin. Evaluation of their microheterogeneity in the human and calf proteins. J. Biol. Chem. 247: 1825-1835.
- BABCZINSKI, P.; TANNER, W. (1973). Involvement of dolichol monophosphate in the formation of specific mannosyl-linkages in yeast glycoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 1119-1124.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1963). Symposiun on biochemical bases of morphogenesis in fungi. III. Mold-yeast dimorphism of Mucor. Bacteriol. Rev. 27: 293-304.

BARTNICKI-GARCIA, S. (1968 a). Control of dimorphism in Mucor by hexoses inhibition of hyphal morphogenesis. J. of Bacteriology. 96: 1586-1594.

BARTNICKI-GARCIA, S. (1968 b). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol. 22: 87-108.

BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. (1961). Thiamine and nicotinic acid: anaerobic growth factors of Mucor rouxii. J. Bacteriol. 82: 142-148.

BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. (1962 a). Induction of yeast-like development in Mucor by carbon dioxide. J. Bacteriol. 84: 829-840.

BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. (1962 b). Nutrition, growth and morphogenesis of Mucor rouxii. J. Bacteriol. 84: 841-858.

BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. (1962 c). Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Mucor rouxii. Biochem. Biophys. Acta. 58: 102-119.

BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, W. J. (1962 d). Assimilation of carbon dioxide and morphogenesis of Mucor rouxii. Biochem. Biophys. Acta. 64: 548-551.

- BARTNICKI-GARCIA, S.; REYES, E. (1968). Polyuronides in the cell walls of Mucor rouxii. Biochem. Biophys. Acta. 170: 54-62.
- BEHRENS, N. H.; CARMINATTI, H.; STANELONI, R. J.; LELOIR, L. F.; CANTARELLA, A. I. (1973). Formation of lipid-bound oligosaccharides containing mannose. Their role in glycoprotein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3390-3394.
- BEHRENS, N. H.; LELOIR, L. F. (1970). Dolichol monophosphate glucose: an intermediate in glucose transfer in liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 66: 153-159.
- BEHRENS, N. H.; PARODI, A. J.; LELOIR, L. F. (1971 a). Glucose transfer from dolichol monophosphate glucose. The product formed with endogenous microsomal acceptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2857-60.
- BEHRENS, N. H.; PARODI, A. J.; LELOIR, L. F.; KRISMAN, C. R. (1971 b). The role of dolichol monophosphate in sugar transfer. Arch. Biochem. Biophys. 143: 375-383.
- BERNARD, E. A.; GUARAGNA, R.; AMARAL, B. B.; PERRY, M. L. S.; PEREIRA, I. R. G. (1982). Formation of lipid-linked sugar compounds in mycelial and yeast-like forms of Mucor rouxii. Mol. Cell. Biochem in press.
- BEYTÍA, E. D.; PORTER, J. W. (1976). Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. 45: 113-142.

- BRETT, C. T.; LELOIR, L. F. (1977). Dolichyl monophosphate and its sugar derivatives in plants. *Biochem. J.* 161: 93-101.
- BRETHAUERS, R. K.; WU, S. (1975). Synthesis of the mannosyl-O-serine (threonine) linkage of glycoproteins from polyisoprenyl-phosphate mannose in yeast (Hansenula holstii). *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 151-160.
- BURGOS, J.; HEMMING, F. W.; PENNOCK, J. F. (1963). Dolichol: a naturally-occurring C₁₀₀ isoprenoid alcohol. *Biochem. J.* 88: 470-482.
- BUTTERS, T. D.; HUGHES, R. C. (1980). Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 640: 655-671.
- BUTTERWORTH, P. H. W.; HEMMING, F. W. (1968). Intracellular distribution of the free and esterified forms of dolichol in pig liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 128: 503-508.
- CACCAN, J. C.; JACKSON, J. T.; EYLAR, E. H. (1969). The biosynthesis of mannose-containing glycoproteins: a possible lipid intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 505-511.

COLVIN, J. R. (1959). Synthesis of cellulose in ethanol extracts of Acetobacter xylinum. Nature (Lond). 183: 1135-1136.

COLVIN, J. R.; KHAN, A. W. (1961) Synthesis of Bacterial cellulose from labeled precursor. Science. 133: 2014-2015.

COUSO, R. O.; IELPI, L.; GARCIA, R. C.; DANKERT, M. A. (1980). Synthesis of mannosyl cellobiose diphosphate-prenol in Acetobacter xylinum. Arch. Biochem. Biophys. 204: 434-443.

DANKERT, M.; WRIGHT, A.; KELLY, W. S.; ROBBINS, P. W. (1966). Isolation, purification and properties of the lipid-linked intermediates of O-antigen biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 116: 425-435.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S.; WOOD, Jr. W. B. (1973). Crescimento em meios líquidos. Microbiologia, Fisiologia bacteriana, 1 volume. Edart -São Paulo-Livraria Editora Ltda. 141-146.

DOW, J. M.; CARREON, R. R.; VILLA, V. D. (1981). Role of membranes of Mycelial Mucor rouxii in synthesis and secretion of cell wall matrix polymers. J. Bacteriology. 145: 272-279.

DOW, J. M.; RUBERY, P. H. (1977). Chemical fractionation of the cell walls of mycelial and yeast-like forms of Mucor rouxii: a comparative study of the polysaccharide and glycoprotein components. J. Gen. Microbiol. 99: 29-41.

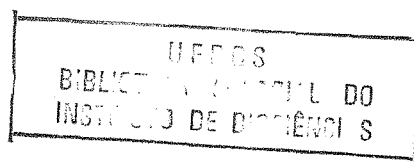
EIBEIN, A. D. (1979). The role of lipid-linked saccharides in the biosynthesis of complex carbohydrates. Annu Re. Plant Physiol. 30: 239-272.

ERICSON, M. C.; DELMER, D. P. (1977). Glycoprotein synthesis in plants. I- role of lipid intermediates. Plant Physiol. 39: 341-347.

ERICSON, M. C.; GAFFORD, J. T.; EIBEIN, A. D. (1977). Tunicamycin inhibits GlcNAc-lipid formation in plants. J. Biol. Chem. 252: 7431-7433.

FRIEDENTHAL, M.; EPSTEIN, A.; PASSERON, S. (1973). Effect of Potassium Cyanide, Glucose and anaerobiosis on Morphogenesis of Mucor rouxii. J. Gen. Microbiology. 82: 15-24.

GARCIA, R. C.; RECONDO, E.; DANKERT, M. (1974). Polysaccharide biosynthesis in Acetobacter xylinum. Enzymatic synthesis of lipid diphosphate and monophosphate sugars. Eur. J. Biochem. 43: 93-105.



- GLASER, L. (1958). The synthesis of cellulose in cell free extracts of Acetobacter xylinum. J. Biol. Chem. 232: 627-636.
- GOLD, M. H.; HAHN, H. J. (1976). Role of a mannosyl lipid intermediate in the synthesis of Neurospora crassa glycoproteins. Biochemistry. 15: 1808-1814.
- GOLD, M. H.; HAHN, H. J. (1978). Effect of divalent metal ions on the synthesis of oligosaccharide side chains of Neurospora crassa glycoproteins. Phytochemistry. 18: 1269-1272.
- HAIDE, C. W.; STORCK, R. (1966). Control of dimorphism in Mucor rouxii. J. Bacteriology. 92: 1236-1244.
- HELTING, T.; PETERSON, P. A. (1972). Galactosyltransfer in mouse mastocytoma synthesis of a galactose containing polar metabolite of retinol. Biochem. Biophys. Res Commun. 46: 429-436.
- HERSCOVICS, A.; WARREN, C. D.; JEANLOZ, R. W. (1974). Occurrence of a β -D-mannopyranosyl phosphate residue in the polyprenyl mannosyl phosphate formed in calf pancreas microsomes and in human Lymphocytes. Febs Letters. 45: 312-317.

- HOPP, H. E.; ROMERO, P. A.; DALEO, G. R.; PONT-LEZICA, R. (1978). Synthesis of cellulose precursors. The involvement of lipid-linked sugars. *Eur. J. Biochem.* 84: 561-571.
- HUGHES, R. C.; BUTTERS, T. D. (1981). Glycosylation patterns in cells: an evolutionary marker. *Tibs - september*: 228-230.
- HUNT, L. A.; ETCHISON, J. R.; SUMMERS, D. F. (1978). Oligosaccharide chains are trimmed during synthesis of the envelope glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 754-758.
- IVATT, J. R.; GILVARG, C. (1979). The primary structure of the teichuronic acid of Bacillus megaterium. *J. Biol. Chem.* 254: 2759-2765.
- JAMES, D. W. Jr.; EIBEIN, A. D. (1980). Effects of several tunicamycin-like antibiotics on glycoprotein synthesis in mung beans and suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 65: 460-464.
- KORNFELD, R.; KORNFELD, S. (1976). Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annu Rev. Biochem.* 45: 217-237.

KORNFELD, S.; LI, E.; TABAS, I. (1978). The synthesis of complex-type oligosaccharides II. Characterization of the processing intermediates in the synthesis of the complex oligosaccharide units of the vesicular stomatitis virus G protein. *J. Biol. Chem.* 253: 7771-7778.

LELOIR, L. F.; CAPUTTO, R.; CARDINI, C. E.; PALADINI, A. (1950). Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.* 184: 333-350.

LENNARZ, W. J. (1975). Lipid linked sugars in glycoprotein synthesis the oligosaccharide chain of certain glycoproteins is preassembled on a polyprenol carrier. *Science.* 188: 986-991.

LENNARZ, W. J.; SCHER, M. G. (1972). Metabolism and function of poly-isoprenol sugar intermediates in membrane associated reactions. *Biochem. Biophys. Acta Rev.* 265: 417-441.

LÉTOUBLON, R. C.; COMTE, J.; GOT, R. (1973). Transfert de mannose, à partir de GDP-mannose, à des accepteurs lipidiques chez Aspergillus niger. *Eur. J. Biochem.* 40: 95-101.

LÉTOUBLON, R.; GOT, R. (1974). Rôle d'un intermédiaire lipidique le transfert du mannose à des accepteurs glycoprotéiques endogènes chez Aspergillus niger. Febs. Letters. 46: 214-217.

LI, E.; TABAS, I.; KORNFELD, S. (1978). The synthesis of complex-type oligosaccharides I - structure of the lipid-linked oligosaccharides precursor of the complex-type oligosaccharides of the vesicular stomatitis virus G protein. J. Biol. Chem. 253: 7762-7770.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A. L.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

MOLNAR, J.; CHAO, H.; IKEHARA, Y. (1971). Phosphoryl-N-acetylglucosamine transfer to a lipid acceptor of liver microsomal preparations. Biochem. Biophys. Acta. 239: 401-410.

MOLNAR, J.; TETAS, M.; CHAO, H. (1970). Incorporation of carbohydrates into endogenous acceptors of liver microsomal fractions. Arch. Biochem. Biophys. 138: 135-146.

PARODI, A. J. (1977). Synthesis of glucosyldolichol derivatives in Baker's yeast and their role in Protein glycosylation. Eur. J. Biochem. 75: 171-180.

PARODI, A. J. (1978). Lipid intermediates in the synthesis of the Inner core of yeast Mannan. *Eur. J. Biochem.* 83: 253-259.

PARODI, A. J. (1979 a). Biosynthesis of yeast glycoproteins. Processing of the oligosaccharides transferred from dolichol derivatives. *J. Biol. Chem.* 254: 10051-10060.

PARODI, A. J. (1979 b). Biosynthesis of yeast mannoproteins: synthesis of mannan outer chain and of dolichol derivatives. *J. Biol. Chem.* 254: 8343-8352.

PARODI, A. J.; LELOIR, L. F. (1979). The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell. *Biochem. Biophys. Acta.* 559: 1-37.

PARODI, A. J.; STANELONI, R. J.; CATARELLA, A. I.; LELOIR, L. F.; BEHRENS, N. H.; CARMINATTI, H.; LEVY, J. A. (1973). Further studies on a glycolipid formed from dolichyl-D-glucosyl monophosphate. *Carbohydr. Res.* 26: 393-400.

PONT LEZICA, R.; BRETT, C. T.; ROMERO, P. M.; DANKERT, M. A. (1975). A glucose acceptor in plants with the properties of an alphasaturated polyprenyl-monophosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 980-987.

PONT LEZICA, R.; ROMERO, P. M.; DANKERT, M. A. (1976). Membrane-bound UDP-glucose: lipid glucosyltransferases from peas. *Plant physiol.* 58: 675-680.

PONT LEZICA, R.; ROMERO, P. M.; HOPP, H. E. (1978). Glucosylation of membrane-bound proteins by lipid-linked glucose. *Planta.* 140: 177-183.

QUESADA-ALLUÉ, L. A.; BELOCOPITOW, S. (1978). Lipid bound oligosaccharides in insects. *Eur. J. Biochem.* 88: 529-541.

ROBBINS, P. W.; HUBBARD, S. C.; TURCO, S. J.; WIRTH, D. F. (1977). Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins. *Cell.* 12: 895-900.

ROMERO, P.; GARCIA, R. C.; DANKERT, M. (1977). Synthesis of polyprenol-monophosphate-beta-galactose by Acetobacter xylinum. *Moll. Cell. Biochem.* 16: 205-212.

ROMERO, P. A.; HOPP, H. E.; LEZICA, R. P. (1979). Lipid carriers in the synthesis of High-mannose glycoproteins in algae. *Biochem. Biophys. Acta.* 586: 545-559.

ROTHFIELD, L.; ROMEO, D. (1971) Role of lipids in the biosynthesis of the bacterial cell envelope. *Bacteriol. Rev.* 35: 14-38.

- SHARMA, C. B.; BABCZINSKI, P.; LEHLE, L.; TANNER, W. (1974). The role of dolichol-monophosphate in glycoprotein biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 46: 35-41.
- STANELONI, J. R.; LELOIR, L. F. (1977). Oligosaccharides containing glucose and mannose in glycoproteins of the thyroid gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 1162-1166.
- STONE, K. J.; WELLBURN, A. R.; HEMMING, F. W.; PENNOCK, J. F. (1967). The characterization of ficaprenol 10-11 and 12 from the leaves of Ficus elástica (decorative Rubber plant). Biochem. J. 102: 325-330.
- STRUCK, D. K.; LENNARZ, W. J. (1977). Evidence for the participation of saccharide lipids in the synthesis of the oligosaccharide chain of ovalbumin. J. Biol. Chem. 252: 1007-1013.
- TANNER, W. (1969). A lipid intermediate in mannan biosynthesis in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35: 144-150.
- TANNER, W.; JUNG, P.; LINDEN, J. C. (1972). In Biochemistry of the glycosidic linkage (Piras, R.; Pontis, H. G.; eds). 227-235. Academic-Press, New York.

- TAKATSUKI, A.; ARIMA, K.; TAMURA, G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic I. Isolation and characterization of tunicamycin. J. Antibiot (Tokyo). Ser. A. 24: 215-223.
- TERENZI, H. F.; STORCK, R. (1969). Stimulation of fermentation and yeast-like morphogenesis in Mucor rouxii by phenethyl alcohol. J. Bacteriology. 97: 1248-1261.
- TKACZ, J. S.; LAMPEN, J. O. (1975). Tunicamycin inhibition of polyisoprenol-N-acetyl-glucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65: 248-257.
- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. Nature. 166: 444-445.
- VILLENEZ, C. L.; CLARK, A. F. (1969). A particle bound intermediate in the biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. Biochem, Biophys. Res. Commun. 36: 57-63.
- WAECHTER, C. J.; HARFORD, J. B. (1977). Evidence for the enzymatic transfer of N-acetylglucosamine from UDP-N-acetylglucosamine into dolichol derivatives and glycoproteins by calf brain membranes. Arch. Biochem. Biophys. 181: 185-198.

WAECHTER, C. J.; LENNARZ, W. J. (1976). The role of poly
prenol-linked sugars in glycoprotein synthesis. *Annu.
Rev. Biochem.* 45: 95-112.

WAECHTER, C. J.; LUCAS, J. J.; LENNARZ, W. J. (1973). Mem
brane glycoproteins I. Enzymatic synthesis of mannosyl
phosphoryl polyisoprenol and its role as a mannosyl do
nos in glycoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 248:
7570-7579.

WAECHTER, C. J.; LUCAS, J. J.; LENNARZ, W. J. (1974). Evi
dence for xylosyl lipids as intermediates in xylosyl
transfers in hen oviduct membranes. *Biochem. Biophys.
Res. Commun.* 56: 343-350.

WEINER, I. M.; HIGUCHI, T.; ROTHFIELD, L.; SALTMARSH-AN-
DREW, M.; OSBORN, M. J.; HORECKER, B. L. (1965). Biosyn
thesis of Bacteriol Lipopolysaccharide, V. Lipid-linked
intermediates in the biosynthesis of the O-antigen
groups of Salmonella Typhimurium. *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA.* 54: 228-235.

WRIGHT, A.; DANKERT, M.; ROBBINS, P. W. (1965). Evidence
for an intermediate stage in the biosynthesis of the
salmonella O-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54: 235
-241.