

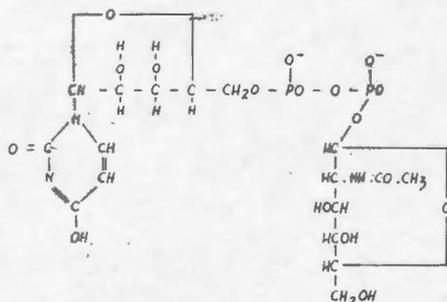
URIDINA-DIFOSFATO-ACETILGLUCOSAMINA

Aislamiento e identificación

ENRIQUE CABIB, LUIS F. LELOIR Y CARLOS E. CARDINI

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar
Julián Alvarez 1719, Buenos Aires, Argentina*

Se demostró en trabajos anteriores que la transformación del galactosa-1-fosfato en glucosa-1-fosfato requiere una coenzima: el uridina-difosfato-glucosa (UDPG)^{1,2}. Estudiando por la cromatografía sobre papel preparaciones de esta substancia obtenidas de levadura y parcialmente purificadas, se descubrió junto al UDPG la presencia de un compuesto que al parecer difería de éste por contener una substancia. (X) diferente de la glucosa³. Este nuevo compuesto fue designado provisoriamente UDPX, pero actualmente resulta más apropiado designarlo UDPAG.



Park y Johnson⁴ observaron que substancias de estructura parecida se acumulan en el *Staphylococcus aureus* tratado con penicilina, y Park⁵ ha llegado a la conclusión que uno de estos compuestos sería similar al UDPG, pero que en lugar de glucosa contendría un resto de ácido amino urónico.

Recientemente, separando los nucleótidos libres de la levadura de panadería con resinas aniónicas, se ha logrado obtener mayores cantidades de UDPAG y se han podido llevar a cabo estudios sobre su estructura.

La preparación se efectuó por extracción de levadura de panadería comercial con alcohol, seguida de precipitación con sales de mercurio y separación cromatográfica de los nucleótidos con una columna de resina Do-

wex-1, siguiendo en líneas generales la técnica descrita por Cohn⁶. El UDPAG contenido en las fracciones obtenidas con este tratamiento fue luego absorbido sobre carbón, eluido con alcohol acuoso amoniacal y precipitado como sal de calcio.

La substancia reductora diferente de la glucosa que se libera del UDPAG por hidrólisis ácida moderada (ácido sulfúrico 0.01 N, 10 minutos a 100°C), fue identificada como acetilglucosamina en base a las propiedades siguientes: 1) da la reacción de Morgan y Elson⁷ para acetilhexosaminas; 2) su R_f en cromatografía de papel con distintos solventes es idéntico al de la acetilglucosamina; 3) por hidrólisis prolongada con ácido sulfúrico 0.1 N se libera glucosamina, como se puede comprobar por la reacción de Elson y Morgan⁸ para hexosaminas no acetiladas, y por el R_f en el papel, usando un solvente compuesto de piridina, acetato de etilo, amoníaco y agua. Como la reacción de Morgan y Elson efectuada sobre el UDPAG sin hidrolizar es negativa, la acetilglucosamina debe estar sustituida en el C1, como la glucosa en el UDPG.

La estructura del resto de la molécula del UDPAG fue investigada con métodos similares a los utilizados para el UDPG.

La uridina se identificó y determinó cuantitativamente por su espectro de absorción en el ultravioleta. La relación uridina: fosfato: acetilglucosamina es aproximadamente 1:2:1. Las curvas de hidrólisis en ácido del azúcar y del grupo fosfato lábil del UDPAG son similares a las del UDPG. Los nucleótidos liberados por hidrólisis de 10 minutos en ácido 0.01 N y de 20 minutos en ácido 1 N a 100°C, fueron identificados respectivamente como uridina-5'-pirofosfato y uridina-5'-fosfato por cromatografía en papel, compa-

rando con especímenes conocidos. La posición del fosfato en el uridina-monofosfato fue confirmada por tratamiento con una fosfatasa de veneno de serpiente que hidroliza específicamente los 5'nucleótidos⁹.

La curva de titulación electrométrica del UDPAG muestra, como en el caso del UDPG, dos grupos fosfato primarios y ningún secundario. Un grupo fosfato secundario aparece después de hidrolizar la acetilglucosamina y otro se pone en libertad al hidrolizar el fosfato lábil.

De todas estas determinaciones se puede deducir que en el UDPAG el uridina pirofosfato está unido a la posición 1 de la acetilglucosamina, como se ve en la fig. 1. Los datos analíticos obtenidos para una muestra

de la sal de calcio fueron los siguientes (las cifras representan porcentaje en peso y aquéllas entre paréntesis son las teóricas calculadas para la fórmula de la fig. 1): nitrógeno, 6.35 (6.4); fósforo total, 8.2 (9.46); fósforo lábil (20 minutos ácido 1 N a 100°C), 4.05 (4.73); uridina (por absorción a 260 m μ), 37.2 (36.0); acetilglucosamina, 34.4 (33.8).

Se han realizado diversos ensayos para determinar la función del UDPAG en la levadura, pero sin resultado hasta ahora. Dada la similitud de su estructura con la del UDPG se puede pensar que tenga también una función coenzimática análoga en el metabolismo de las hexosaminas.

Este trabajo será publicado próximamente "in extenso".

BIBLIOGRAFÍA

(1) CARDINI, C. E., PALADINI, A. C., CAPUTTO, R., LELOIR, L. F.: *Nature*, 1950, **165**, 191.

(2) CAPUTO, R., LELOIR, L. F., CARDINI, C. E., PALADINI, A. C.: *J. Biol. Chem.*, 1950, **184**, 333.

(3) PALADINI, A. C., LELOIR, L. F.: *Biochem. J.*, 1952, **51**, 426.

(4) PARK, J. T., JOHNSON, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 585.

(5) PARK, J. T.: *J. Biol. Chem.*, 1952, **194**, 897.

(6) COHN, W. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 1471.

(7) MORGAN, W. T. J., ELSON, L. A.: *Biochem. J.*, 1934, **28**, 988.

(8) ELSON, L. A., MORGAN, W. T. J.: *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1824.

(9) HEPPEL, L. A., HILWOE, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 1951, **188**, 665.