

Tesis Doctoral

Rol de la subunidad beta de la glucosidasa II en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico

Stigliano, Ivan Daniel

2012

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

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

Cita tipo APA:

Stigliano, Ivan Daniel. (2012). Rol de la subunidad beta de la glucosidasa II en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Stigliano, Ivan Daniel. "Rol de la subunidad beta de la glucosidasa II en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Rol de la subunidad beta de la glucosidasa II en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Ivan Daniel Stigliano

Directora de Tesis: Dra. Cecilia D'Alessio

Consejero de estudios: Dr. Pablo Wappner

Laboratorio de Glicobiología, Fundación Instituto Leloir - Instituto de Investigaciones
Bioquímicas de Buenos Aires, CONICET

Buenos Aires, 2012.

Rol de la Subunidad β de la Glucosidasa II en el Control de Calidad del Plegamiento de Glicoproteínas en el Retículo Endoplásmico

La Glucosidasa II (GII) cumple un rol fundamental en la biogénesis de glicoproteínas en el retículo endoplásmico (RE). Es responsable por la remoción secuencial de los dos residuos de glucosa (Glc) más internos del glicano ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) transferido a los residuos de Asn en las glicoproteínas nacientes en la vía secretoria. GII participa en los ciclos de Calnexina (CNX)/Calreticulina (CRT) ya que remueve el residuo de Glc agregado a intermediarios de plegamiento por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT). La GII un es un heterodímero soluble del RE cuya subunidad α (GII α) posee el sitio catalítico mientras que el rol de la subunidad β (GII β) es controvertido, si bien ha sido involucrada en la retención en el RE de GII y en el plegamiento de GII α . En esta tesis demostramos que en ausencia de GII β , la subunidad catalítica GII α de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (un organismo que posee un mecanismo de control de calidad de plegamiento de proteínas similar al presente en células de mamíferos) adopta una conformación activa y es capaz de hidrolizar el análogo de sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido. Sin embargo GII β es necesaria para la correcta localización de GII en el RE y para la deglucosilación eficiente de los sustratos fisiológicos $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. El dominio homólogo al dominio lectina del receptor de Manosa 6-fosfato presente en el C-terminal de GII β interacciona con manosas en las ramas B y/o C de los *N*-glicanos mediando la hidrólisis del sustrato por GII α . Demostramos, también, que el dominio G2B del N-terminal de GII β es necesario para la interacción GII α -GII β . Por último, demostramos que una reducción en el contenido de manosas de los *N*-glicanos disminuyó significativamente la deglucosilación *in vivo* mediada por GII pero no afectó la glucosilación *in vivo* mediada por UGGT, favoreciendo la formación de derivados monoglucosilados. Esto sugiere que GII funcionaría como un regulador de la permanencia en los ciclos de CNX/CRT de las glicoproteínas que se pliegan muy lentamente, y por lo tanto han sido demanosiladas, otorgando más oportunidades de plegamiento a las proteínas antes de enviarlas a degradación.

Palabras clave: Glucosidasa II, Retículo Endoplásmico, *N*-glucosilación, Plegamiento de glicoproteínas, Control de Calidad

The role of Glucosidase II β subunit in the quality control of glycoprotein folding in the Endoplasmic Reticulum

Glucosidase II (GII) plays a key role in glycoprotein biogenesis in the endoplasmic reticulum (ER). It is responsible for the sequential removal of the two innermost glucose residues from the glycan ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) transferred to Asn residues in proteins. GII participates in the Calnexin (CNX)/Calreticulin (CRT) cycle as it also removes the single glucose unit added to folding intermediates and misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT). GII is a heterodimer whose α subunit ($\text{GII}\alpha$) bears the glycosyl hydrolase active site, whereas its β subunit ($\text{GII}\beta$) role is controversial and has been reported to be involved in $\text{GII}\alpha$ ER retention and folding. Here, we report that in the absence of $\text{GII}\beta$, the catalytic subunit $\text{GII}\alpha$ of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (an organism displaying a glycoprotein folding quality control mechanism similar to that occurring in mammalian cells) folds to an active conformation able to hydrolyze *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside. However, $\text{GII}\beta$ is required for correct GII ER retention and for efficient deglycosylation of the physiological substrates $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. The interaction of the mannose 6-phosphate receptor homologous domain present in the C-terminal of $\text{GII}\beta$ and mannoses in the B and/or C arms of the glycans mediates *N*-glycan hydrolysis enhancement. We also found that the N-terminal $\text{GII}\beta$ G2B domain is essential for $\text{GII}\alpha$ - $\text{GII}\beta$ interaction. Finally, we show that a decrease in the *N*-glycan mannose content significantly diminished *in vivo* GII-mediated deglycosylation but did not affect *in vivo* UGGT activity. This suggests that GII may be an *in vivo* regulator of misfolded and slow-folding glycoprotein permanence in the ER as these glycoproteins are characterized by a detectable ER mannosidase(s)-catalyzed *N*-glycan demannosylation and therefore, an increased possibility of displaying monoglucosylated structures able to interact with CNX or CRT for longer time periods is likely to occur.

Key words: Glucosidase II, Endoplasmic reticulum, *N*-glycosylation, Glycoprotein Folding, Quality Control.

A mis Padres...

A Carlos Labriola...

Agradecimientos

A mi directora, jefa y amiga **Cecilia D'Alessio**, por mi formación, por haberme apoyado en todo momento, por su ayuda y participación en todo el trabajo de tesis, por creer en mí, por acompañarme a lo largo de este camino sin bajar los brazos, por haber estado presente en todo momento, por las risas y las emociones compartidas. Gracias a tu familia también: los genios de Ari, Bruno e Ivo.

A **Armando Parodi**, un fuera de serie en todo sentido, por tomar gran parte en mi trabajo de tesis, por las enseñanzas de un científico enorme, por su gran sentido del humor y generosidad, por ser un ejemplo para todo el laboratorio y por todas las ayudas durante estos años. Gracias por todo, jefe!

Al Comité de seguimiento de tesis: **Paula Portela, Pablo Wappner y Gastón Paris**. Muchas gracias por los consejos, la dedicación y la buena predisposición siempre.

Al **CONICET** por darme el privilegio de realizar esta tesis.

A **Carlos Labriola**, la definición de genio, mi hermano de la ciencia, por regalarme su amistad, por permitirme aprender tanto y compartir tantas emociones.

A **Luli Buzzi**, mi compañera de emociones durante todo el doctorado, por crecer juntos, por su amistad incondicional, por bancarme en todas y por hacer que todo sea más fácil y feliz! Gracias Edu, genio de los sabios!

A nuestra niña mimada, **Sol Alculumbre**. No podría haberme imaginado tener una mejor compañera de equipo. Tenerte al lado este tiempo fue mucho más importante e increíble que la distancia a París. Gracias por emocionarme al límite.

A mi amigo **Rodrigo Pagano**, un genio, un fuera de serie, la fuente interminable de conocimientos, un gran consejero, un ícono de la FIL.

A **Olga Castro** por todos los momentos compartidos en el laboratorio y por bancarme tanto.

A **Mica García, Marce Aguilera** y mi gran amiga **Marcela Arango** por compartir tantos momentos lindos en el 302.

A **Julio Caramelo** por ser un genio y una fuente de inspiración y sabiduría. Gracias a todo el 213. Gracias a **Lucas Landolfo** y **Máximo López Medus** por compartir tanto conmigo y por ser tan copados y divertidos. A **Gaby Gómez** y **Anita V. Giraldo** por su onda y por calmar a las bestias.

A **Daniel Stigliano** y **Nely Lucero**, mis padres que siempre me han apoyado y dado todo y con quienes siempre puedo contar. Gracias por la vida!!! Gracias a los stents!!! Gracias a la paciencia y sensibilidad de Nely!

Gracias por el cariño de toda la **familia Lucero**, en especial de la Abuela **Berna** y la Tía **Lolita**. Muchas gracias también a **Carina** y **Jorge**, a **Rocío**, mi ahijada, y **Lucía!**. También agradecer especialmente a **Walter, Lili, Nahuel, Mati, Belén** y **Vidal...**

Gracias a **Horacio Lugones**, mi tío, un personaje sin igual que nos llena de alegría.

A **Maie Loschi** por tantas cosas que sería imposible describirlo en esta hoja. Por compartir su vida conmigo, por los mejores recuerdos, por las aventuras increíbles, por las sonrisas y las lágrimas, por ser esa persona especial y única. Gracias a **Graciela Bocaccio** y su laboratorio por bancarme todo este tiempo, a **Vero B., Vicky S., Luli L., Gabi T., Male P.** y **Darío M.**

Al **303d** viejo y nuevo. A **Ángeles Zorreguieta** y su equipo en especial a **Lore Haurigot** y **Diana Posadas**. Gracias a **Guille Lanuza** y su team por la onda increíble: **Mica, Abel, Yani** y **Dani**.

A **Vanina Alzogaray** por nuestra increíble historia. Por dejarme ciego con sonrisas, bloquearme los pasillos, por compartir tanto en tantos lugares, por apostar y creer en mí. Aguante Tres Lomas Forever!

A todo el **304** por ser una compañía y una ayuda superlativa. Muchas gracias y mis respetos a **Sebas K, Hernán B, Gastón P, Ana C, Paula B** y **Nati A**. Gracias también a **Marie, Jime, Andrés, Nacho, Inés** y **Gaby**.

Al grande entre los grandes, **Gastón Soria**. Un amigo de fierro y un tipo increíble. Gracias a todo el lab **203i**. Gracias **Vanesa G.** por dejarme molestar. Gracias **Juli** por tus sonrisas y por lo que compartimos. Gracias a mi amiga **Bel F.** por bancarme y sonreír. A **Sabri** por ser una persona genial y sensible y por domar a la bestia.

A **Sole Vázquez** por una amistad fantástica, por enseñarme tantas cosas lindas, compartir tantas alegrías. Gracias a **Sebas** por ser un genio de la vida.

A **Giselle Gheresi** y **Vera De Pino** por ser increíblemente increíbles. Por regalarme tantos momentos inolvidables.

A **Leandro M. Tosar** por las enseñanzas, las terrazas, la amistad y tanto más.

A mi mejor amiga **Marina Homberg**, tantos años compartidos, tantas charlas, tantas cosas increíbles, Cuernavaca, Pacheco, la vida!

A mi hermano **Alan Gaute**, por la descontractura constante, por la alegría, la diversión y por compartir la vida. Gracias a **Vico D.**, por su amistad increíble y la luz que nos comparte!

A mi hermano **Federico Azpeitia** por crecer juntos, por su eterna amistad y por estar siempre a pesar de la distancia.

A **Mariano “Racin” Bendersa**, por aguantarme el día a día, por ser un amigo de fierro y un compañero increíble de emociones.

A **Nicolás Dib** por el carisma, por el aguante y por la amistad incondicional. Gracias por los consejos científicos!

A **Luli GF** por mostrarme el camino tantas veces y enseñarme a querer tanto. Gracias por ser parte de mi vida y por ser una persona única en el mundo!

A mi hermano del Norte, **Víctor Antonio García Angulo**, un tipo sensacional, gracias por compartir tantas risas, momentos, salidas, comidas y un poco de ciencia. Viva México!

A **Lucas Radaelli** por ser mi gurú de la noche, la mecánica y ofrecerme su increíble amistad!

A **Luz Mangino** por el cariño, por el aguante y por darme ese enfoque distinto.

A **Ezequiel Díaz** por el Groove.

A **Nicolás Lago** por el afecto y por ponerle innumerables ruedas al doctorado.

A los chicos de **Sound Quality** en especial a **Martín, Uriel y Gastón**. Por abrirme las puertas de su planeta y compartir tanto desde el afecto!

A “**Cachetada**”: **Blue Jean, Sensación, Abril y Raymond. Sebas, Agustín y Abril** por la música, la amistad, la emoción, el CAS, las risas y lo que viene.

A mis amigos de la vida **Leo Ábalos, Daniel Otálora y Gonzalo Diciembre**, por compartir tanto todos estos años y seguir creyendo en nuestra amistad.

A mis amigos de la facultad. **Martín, Ceci, Diana, Inés, Agus y Ariel**. Pasan los años y seguimos todos ahí.

Zek Aranovich, Gus Maselli, Javi Bianchi, Sil Marcora y Mirko Legisa. Gracias por hacer todo más fácil. Fueron compañeros de oro y nunca voy a olvidar todo lo que compartimos

A **Marta Bravo y Susana Raffo** por su enorme asistencia técnica, su eterna predisposición y la increíble buena onda.

A toda la **FIL**, mi casa durante todos estos años. Estoy muy agradecido por la Beca Carlos Cardini. **Pancho, Lili Alonso, Silvia, Dora, Andrés**, toda la gente de administración, **Alfredo Monferré, Emi Axelirud y Mati Obregón** (capos de IT y cracks absolutos). Muchas gracias a **Diego Álvarez, Carina Castillo y Fernando Canda** por todos los momentos increíbles en el droguero. Gracias especiales al personal de limpieza y del lavadero por su contribución enorme a nuestro trabajo. Viví momentos maravillosos en este lugar y nunca voy a olvidar tantas alegrías!!!

Índice

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| Síntesis de proteínas en la vía secretoria | 14 |
| N-glicosilación | 16 |
| Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE | 17 |
| La Oligosacariltransferasa | 20 |
| La Glucosidasa I | 20 |
| La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa | 21 |
| La Glucosidasa II | 22 |
| Subunidad α de la Glucosidasa II (GII α) | 23 |
| Subunidad β de la Glucosidasa II (GII β) | 23 |
| Función de GII β en la retención de GII α en el RE | 24 |
| Función de GII β en el plegamiento de GII α | 25 |
| Función de GII β en el procesamiento/reconocimiento del N-glicano | 25 |
| Dominio MRH de GII β y proteínas de la vía secretoria que contienen el dominio MRH | 27 |
| Otras posibles funciones de GII β | 30 |
| Destino de glicoproteínas: ¿vía secretoria o ERAD? | 31 |
| OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 33 |
| 1) Determinar si en la levadura <i>S. pombe</i> GII β participa únicamente en la retención en el RE de GII α o también en su plegamiento y/o maduración | 34 |
| 2) Analizar si el motivo VDEL presente en GII β es suficiente para la localización de GII α en el RE de <i>S. pombe</i> | 34 |
| 3) Determinar si GII β está involucrada en el procesamiento de los glicanos G2M9 y G1M9 | 35 |
| 4) Analizar qué motivos de GII β son necesarios para el procesamiento del oligosacárido por GII | 35 |
| 5) Analizar el efecto del contenido de Man del glicano en la actividad GII | 35 |
| 6) Investigar el efecto del contenido de Man del glicano en la actividad <i>in vivo</i> de las enzimas involucradas en el Control de Calidad de Plegamiento de Glicoproteínas en el RE | 36 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |

| | |
|--|-----------|
| Materiales | 38 |
| Cepas y medios de cultivo | 38 |
| Plásmidos | 40 |
| Procedimientos con DNA | 42 |
| Preparación de DNA genómico de levaduras <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i> | 42 |
| Reacciones de PCR | 42 |
| Clonados mediante sistema Gateway | 44 |
| Mutagénesis de GII β | 45 |
| Clonado de GII α y expresión en <i>S. pombe</i> | 45 |
| Otros procedimientos con DNA | 45 |
| Transformación de bacterias <i>E. coli</i> | 46 |
| Transformación de levaduras <i>S. pombe</i> | 46 |
| Cruzamientos de cepas de levaduras | 46 |
| Cambio de marcador de selección en el genoma de levaduras <i>S. pombe</i> | 47 |
| Obtención de <i>S. pombe</i> mutantes que transfieren glicanos truncados | 48 |
| Expresión de una proteína de fusión de copia única en <i>S. pombe</i> | 50 |
| Preparación de extractos proteicos de <i>S. pombe</i> | 51 |
| Preparación de fracciones celulares enriquecidas en RE | 51 |
| Marcación de <i>S. pombe</i> y análisis de oligosacáridos formados <i>in vivo</i> | 52 |
| Resolución de glicanos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) | 53 |
| Síntesis de <i>N</i>-glicanos marcados radioactivamente | 54 |
| Ensayos de actividad GII | 54 |
| Purificación de GII de hígado de rata y proteólisis de la subunidad GIIβ | 56 |
| Ensayos de complementación en <i>trans</i> de actividad de GIIα por GIIβ | 56 |
| Producción de anticuerpos policlonales | 57 |
| Inmunodetecciones | 58 |
| Microscopía Confocal | 58 |

| | |
|--|-----------|
| RESULTADOS | 59 |
| La subunidad GII β no es requerida para el plegamiento y/o maduración de GII α pero sí para su localización subcelular en el RE | 60 |
| La VDEL presente en GII β es suficiente para la localización de GII α en el RE | 61 |
| Existen elementos adicionales en GII α y/o GII β para la retención de GII α en el RE | 64 |
| GII β es necesaria para la deglucosilación de G2M9 y G1M9 <i>in vitro</i> | 65 |
| GII β es necesaria para el procesamiento eficiente de G2M9 y G1M9 <i>in vivo</i> | 66 |
| El dominio MRH de GII β está involucrado en la estimulación de la hidrólisis de glicanos por GII mediada por GII β | 70 |
| El dominio MRH es necesario para el procesamiento eficiente de <i>N</i> -glicanos <i>in vitro</i> | 70 |
| El dominio MRH es necesario para el procesamiento eficiente de <i>N</i> -glicanos <i>in vivo</i> | 72 |
| La subunidad GII β de mamíferos es requerida para un procesamiento eficiente de ambas glucosas internas del <i>N</i> -glicano transferido a las glicoproteínas | 73 |
| El dominio G2B de GII β se haya involucrado en la interacción GII α -GII β en <i>S. pombe</i> | 75 |
| GII β reconoce residuos de manosas en las ramas B y/o C del <i>N</i> -glicano | 75 |
| La deglucosilación <i>in vivo</i> de <i>N</i> -glicanos por GII disminuye en función de su contenido de manosas | 78 |
| Efecto del contenido de manosas del <i>N</i> -glicano en los niveles de deglucosilación <i>in vivo</i> de mutantes carentes de la subunidad reguladora GII β | 82 |
| El dominio MRH reconoce <i>N</i> -glicanos desde G2M9 hasta G2M5 <i>in vivo</i> | 84 |
| Efecto del contenido de Man de los <i>N</i> -glicanos en la glucosilación mediada por UGGT <i>in vivo</i> | 86 |
| Efecto del contenido de Man de <i>N</i> -glicanos en la actividad <i>in vivo</i> de GI | 89 |
| El caso de <i>Leishmania mexicana</i> | 90 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 92 |
| GII β es necesaria para la retención del heterodímero GII en el RE, pero no para el plegamiento de GII α o su actividad sobre pNPG | 93 |
| GII β es necesaria para el procesamiento de <i>N</i> -glicanos por GII | 94 |

| | |
|---|------------|
| Dominio MRH de GIIβ y modelos de reconocimiento del oligosacárido por GII | 95 |
| El dominio G2B está involucrado en la interacción GII α -GII β | 98 |
| Efecto de la estructura del <i>N</i>-glicano en la actividad de enzimas que procesan glicanos en el RE | 98 |
| La demanosilación del sustrato reduce su reconocimiento por GII <i>in vitro</i> | 98 |
| La disminución del contenido de Man del <i>N</i> -glicano reduce la actividad GII <i>in vivo</i> : Influencia del dominio MRH | 99 |
| El contenido de Man del <i>N</i> -glicano no influye en la actividad de la GI <i>in vivo</i> | 99 |
| El contenido de Man del <i>N</i> -glicano no influye en la actividad UGGT <i>in vivo</i> | 100 |
| Glicanos de biosíntesis vs. Glicanos de degradación | 100 |
| Modelo propuesto para la función regulatoria de la GII en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE | 101 |
| Conclusiones | 103 |
| REFERENCIAS | 104 |

ABREVIATURAS

cDNA: DNA copia
CD-MPR: Receptor de manosa 6-fosfato dependiente de cationes
CI-MPR: Receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes
CNX: Calnexina
CRT: Calreticulina
DNA: Ácido desoxirribonucleico
Dol-P-P: Dolicol pirofosfato
EDEM: Proteína estimuladora de la degradación asociada al retículo endoplásmico
Endo H: Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
ERAD: Degradación asociada al Retículo Endoplásmico
GI: Glucosidasa I
GII: Glucosidasa II
Gal: Galactosa
GalNac: *N*-acetilgalactosamina
Glc: Glucosa
GlcNac: *N*-acetilglucosamina
GXMY: Oligosacárido de composición $\text{Glc}_x\text{Man}_y\text{GlcNac}_2$
HRP: Peroxidasa de rabanito
HSP: Heat Shock Protein
IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KO: Knock Out o disrupción génica
M6PR: Receptor de manosa 6 fosfato
Man: Manosa
Man6P: Manosa 6 fosfato
MRH: Dominio homólogo al dominio lectina del M6PR
OST: Oligosacariltransferasa
PCLD: Enfermedad Autosómica de Hígado Poliquístico
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDI: Proteína Disulfuro Isomerasa
PNGasa F: Peptido-N(4)-(N-acetil-beta-D-glucosaminil)asparagina amidasa F
pNPG: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE: Retículo endoplásmico
RNA: Ácido ribonucleico
UGGT: UDP-glucosa:glicoproteína glucosiltransferasa
YFP: Proteína Amarilla Fluorescente
WT: Wild type (salvaje)

INTRODUCCIÓN

Alrededor de un tercio de las proteínas sintetizadas en las células eucariontes son cotraduccionalmente translocadas al retículo endoplásmico (RE). Los polipéptidos nacientes que emergen en el lumen del RE son expuestos a maquinarias que asisten a la maduración conformacional y a mecanismos diseñados a retener y eventualmente destruir las proteínas irreversiblemente mal plegadas. La homeostasis celular depende del balance regulado entre estas actividades (1).

Síntesis de proteínas en la vía secretoria

El lumen del RE es el sitio de maduración de todas las proteínas de la vía secretoria, es decir, aquellas destinadas a los compartimentos endocíticos y exocíticos y a la membrana plasmática. Los polipéptidos que ingresan al RE se pliegan, oligomerizan y sufren modificaciones post traduccionales tales como *N*-glicosilación, isomerización de prolinas, formación de puentes disulfuro, etc (1).

La mayor parte de las proteínas que ingresan al RE están caracterizadas por la presencia de una secuencia corta en el extremo N-terminal altamente hidrofóbica: el péptido señal. Dicho péptido permite el anclaje de la proteína a la membrana del RE y su posterior translocación al lumen, y es normalmente removido cotraduccionalmente. Las proteínas son translocadas al RE a través de un canal formado por el complejo heterotrimérico Sec61 (Figura 1), al que ingresan como cadenas desplegadas. La fuerza que dirige su translocación proviene tanto de la elongación misma de la cadena como de la hidrólisis de GTP durante la traducción (2). Las cadenas polipeptídicas nacientes que emergen del poro del translocón exponen parches hidrofóbicos, cisteínas reactivas desapareadas y otros determinantes propensos a la agregación que durante el proceso de plegamiento acabarán orientados hacia el interior de los confórmeros nativos. La intervención inmediata de chaperonas moleculares como BiP/Grp78 (familia de Hsp70) y Grp94 (familia Hsp90) y de otras enzimas del plegamiento como proteínas disulfuro isomerasas (PDIs, entre las que se encuentran ERp57, ERp72 y PDI) situadas sobre la cara luminal del RE es esencial para evitar la agregación, mantener a las proteínas nacientes en un estado competente de plegamiento y para facilitar las fases de la maduración oxidativa del polipéptido (Figura 1). Así, las proteínas pueden comenzar a plegarse y ensamblarse en los complejos multiméricos incluso antes de que se complete su síntesis (1).

Aquellas proteínas que son *N*-glicosiladas son capaces de asociarse a las chaperonas/lectinas del RE Calnexina (CNX) o su homólogo soluble Calreticulina (CRT) y dicha asociación facilita la actividad de enzimas del plegamiento que catalizan reacciones

como la formación de puentes disulfuro intra o intercatenarias o la peptidil-prolil *cis/trans* isomerización.

La asociación a chaperonas y/o lectinas chaperonas también ayuda a retener proteínas dentro del RE hasta que se encuentren completamente plegadas ya que las chaperonas llevan secuencias de retención/recuperación al RE tales como XDEL para proteínas luminales o KKXX para proteínas de membrana tipo I. Las proteínas que alcanzan su correcto plegamiento continúan su camino por la vía secretoria (1).

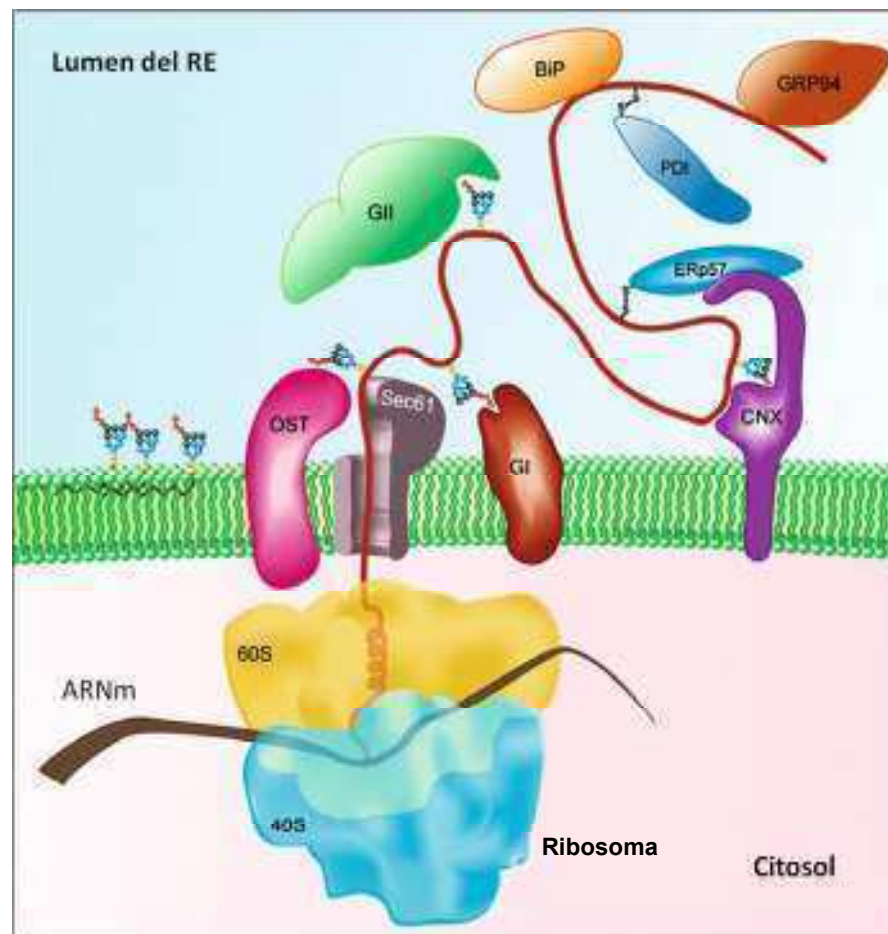


Figura 1. Translocación co-traduccional de proteínas al lumen del RE y maduración. Las cadenas nascentes son co-traduccionalmente transportadas al lumen del RE a través del complejo Sec61. Las proteínas nascentes se asocian con distintas chaperonas moleculares y enzimas del plegamiento residentes del RE (ERp57, PDI, GRP94, BiP; CNX: calnexina y PDI: proteína disulfuro isomerasa) y son sustrato de diversas enzimas modificadoras (OST: oligosaciltransferasa; GI y GII: glucosidasas I y II respectivamente). Los residuos de Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr son modificados por la OST con la adición covalente de un oligosacárido pre ensamblado en un Dolicol-P-P (*N*-glicosilación). Figura modificada a partir de la referencia 1.

N-glicosilación

La glicosilación es una modificación post-traducciona que expande la diversidad del proteoma celular. En particular, la *N*-glicosilación afecta profundamente las propiedades biofísicas de las glicoproteínas tales como su conformación y solubilidad (se agrega un grupo altamente hidrofílico y voluminoso), y permite el reconocimiento por proteínas que unen a glicanos (lectinas). Los *N*-glicanos juegan un rol crítico, además, en una gran variedad de procesos biológicos como el destino intracelular de proteínas, la motilidad celular, el reconocimiento célula-célula y la respuesta inmune. Esta modificación post-traducciona es también uno de los mecanismos destinados a asegurar que las glicoproteínas de la vía secretora alcancen una estructura nativa funcional (1).

La *N*-glicosilación se encuentra altamente conservada y ocurre en los tres dominios de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya (3). La *N*-glicosilación en eucariotas consiste en el agregado de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3M9, Figura 2) a los residuos de Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro) de péptidos naciendo en el lumen del RE. La transferencia del glicano preensamblado es llevada a cabo por la oligosacariltransferasa (OST) desde el dador lipídico dolicol pirofosfato (Dol-P-P), en la membrana del RE, cuando el residuo de Asn se encuentra a una distancia de 10-12 aminoácidos de la membrana interna del RE (Figura 1) (4, 5).

La composición del oligosacárido transferido (G3M9) durante la *N*-glicosilación en eucariotes se encuentra conservada y es la misma en animales, hongos y plantas. Esta estructura común contrasta con la enorme diversidad de glicanos encontrada en las glicoproteínas maduras, que resulta de su modificación a lo largo de la vía secretora (6). Luego de la remodelación inicial de glicanos en el RE por parte de glucosidasas y manosidasas (estos procesos serán objeto de estudio central en este trabajo), el procesamiento de *N*-glicanos en el Golgi involucra la acción de numerosas glicosiltransferasas que resultan en la generación de glicanos altamente complejos y diversos (7).

Las modificaciones post-RE de glicanos en levaduras involucran la adición de residuos de Man resultando en glicanos altamente manosilados y ramificados. En mamíferos, las glicosiltransferasas del Golgi adicionan diversos monosacáridos tales como *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), ácido siálico, fucosa, y *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (8, 9).

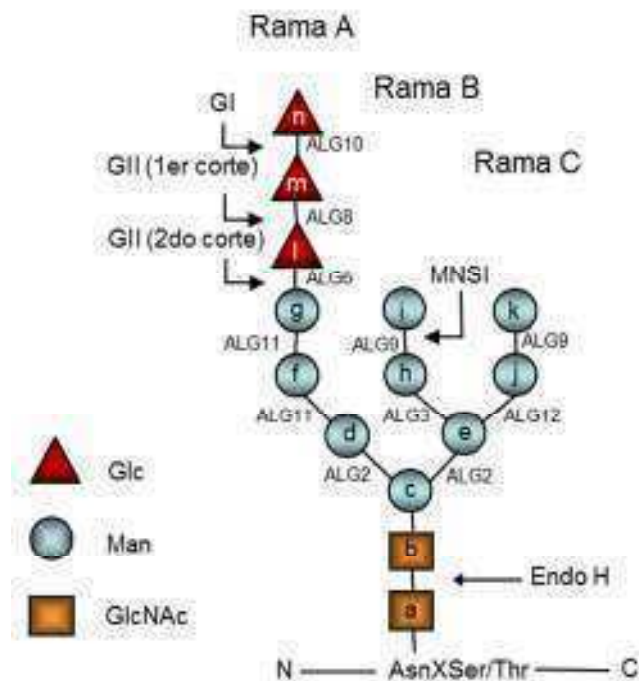


Figura 2. Estructura del oligosacárido transferido a las proteínas durante la N-glicosilación ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Las letras (a, b, c,...) siguen el orden de adición de monosacáridos durante la biosíntesis del derivado dolicol-PP y se indican los genes *alg* involucrados en dichos pasos. La Glucosidasa I (GI) remueve el residuo *n* y la Glucosidasa II (GII) los residuos *m* y *l*. La UGGT re-agrega el residuo *l*. EndoH: sitio de corte de la Endo H. La rama A comprende los residuos *d*, *f*, *g* y *l*. La rama B comprende los residuos *h* e *i*. La rama C comprende los residuos *j* y *k*.

Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE

El procesamiento del glicano G3M9 comienza inmediatamente después de su transferencia a las proteínas: la Glucosidasa I (GI) remueve el residuo de glucosa (Glc) más externo (residuo *n* en la Figura 2) formándose $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G2M9) y posteriormente la Glucosidasa II (GII) remueve los dos residuos de Glc restantes (Glc *m* y *l* en la Figura 2), formándose sucesivamente $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1M9) y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9) (3). La remoción de las Glc por GI y GII determina la formación de estructuras monoglucosiladas que permiten la interacción de las glicoproteínas con las lectinas/chaperonas del RE CNX y CRT (Figuras 1 y 3) (6). CNX es una proteína de membrana de tipo I y CRT es su homólogo soluble. Ambas contienen un único dominio globular de unión a carbohidratos y un dominio rico en prolina, llamado dominio P. Este dominio recluta a la oxidoreductasa ERp57 (Figura 1) que cataliza la formación de puentes disulfuro en polipéptidos en proceso de plegamiento. El dominio globular de tipo lectina de CNX y CRT puede acomodar la rama A completa del glicano monoglucosilado sobre una lámina β cóncava, donde la Glc interacciona por uniones

de tipo puente hidrógeno con tres residuos aminoacídicos (3). La interacción de las glicoproteínas monoglucosiladas con CNX y/o CRT facilita el plegamiento y previene la agregación, permitiendo la interacción con otras chaperonas y reteniendo a las glicoproteínas en el RE hasta que adquieran su estructura terciaria nativa. La remoción de la Glc mas interna (residuo I, Figura 2) libera a las glicoproteínas de la unión a CNX y/o CRT (6) (Figura 3).

Los oligosacáridos monoglucosilados se producen no sólo por deglucosilación del glicano transferido sino también por re-glucosilación del oligosacárido M9 por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT). La UGGT actúa como un sensor del estado conformacional de las proteínas, ya que esta transfiere una Glc (residuo I, Figura 2) al oligosacárido M9 de glicoproteínas solo si no han alcanzado aún su estructura plegada nativa. Durante su plegamiento, las glicoproteínas alternan entre los estados monoglucosilado y deglucosilado, catalizados por las actividades opuestas de UGGT y GII. Estos estados permiten la re-asociación y disociación de las glicoproteínas con CNX y CRT dando lugar al llamado “ciclo de CNX/CRT”. Una vez plegadas correctamente, las glicoproteínas son sustrato de GII pero no de UGGT y siguen su tránsito hacia el aparato de Golgi. Este proceso se conoce como “Control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE” (Figuras 3) (8).

Si el plegamiento resulta defectuoso, la prolongada permanencia en el RE expone a los *N*-glicanos a α 1,2-manosidasas de RE (ERManI y EDEM 1, 2 y 3, en mamíferos, o MnsIp y Htm1p en levaduras) que remueven los residuos terminales de Man. La progresiva demanosilación del glicano bajaría su afinidad como ligando de CNX y/o CRT. Esto facilitaría la interrupción del ciclo y conduciría a las glicoproteínas irreversiblemente mal plegadas a ser retrotranslocadas al citosol donde son degradadas en los proteasomas. Este proceso es conocido como “degradación asociada al RE” (ERAD) (Figura 3) (10, 11).

A continuación se describen las características de las enzimas que catalizan la *N*-glicosilación y la modificación posterior del glicano transferido.

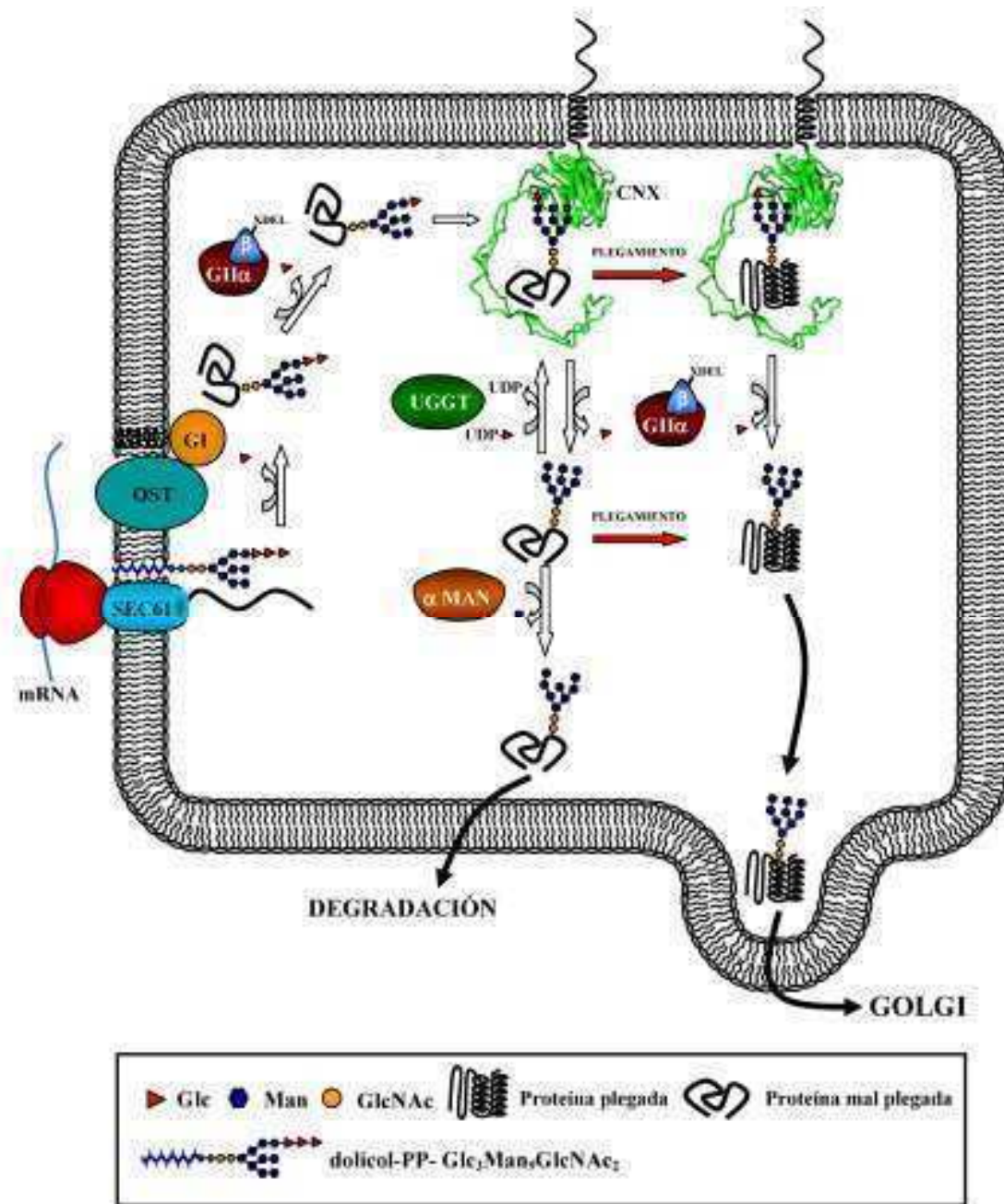


Figura 3. Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE. Las proteínas que ingresan al RE son N-glicosiladas por la OST al emerger del translocón Sec61. Dos Glc son removidas por la acción secuencial de G1 y GII para generar especies monoglucosiladas que son reconocidas por CNX y/o CRT (sólo se muestra CNX). El complejo formado por CNX y las glicoproteínas en proceso de plegamiento o mal plegadas es dissociado cuando el residuo de Glc mas interno es removido por GII. Si la proteína continúa mal plegada la UGGT agrega un residuo de Glc y la glicoproteína vuelve a interaccionar con CNX/CRT. Una vez que las glicoproteínas han alcanzado su conformación nativa, GII remueve el residuo de Glc remanente y libera a la glicoproteína del anclaje a la lectina. Estas especies, correctamente plegadas, no son reconocidas por UGGT y son transportadas al Golgi. Las glicoproteínas incapaces de plegarse correctamente son demanosiladas por la ER-α-manosidasa I (ERManI) y retrotranslocadas al citosol donde son degradadas por los proteasomas. Figura tomada de la referencia 12.

La Oligosacariltransferasa

La OST es un complejo multiproteico que cataliza la transferencia en bloque de un oligosacárido de alta manosa preensamblado a los residuos de Asn de los polipéptidos nacientes que ingresan al lumen del RE (13). El oligosacárido dador unido a pirofosfato ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$) se ensambla secuencialmente por glicosiltransferasas (codificadas por genes *alg*) localizadas en las caras citoplasmática y luminal de la membrana del RE (Figura 1).

La OST esta ubicada a la salida del poro del translocón y monitorea las cadenas nacientes en busca de la secuencia consenso de la *N*-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr). El grupo hidroxilo de la Ser o la Thr se posiciona próximo al grupo amida de la Asn que es activado para recibir la adición covalente del oligosacárido preensamblado. Las OST pertenecientes a vertebrados y levaduras son complejos hetero-oligoméricos sorprendentemente complejos que constan de siete u ocho subunidades (Ost1p, Ost2p, Ost3p/Ost6p, Ost4p, Ost5p, Stt3p, Wbp1p y Swp1p en levaduras; riboforina I, DAD1, N33/IAP, OST4, STT3A/STT3B, Ost48 y riboforina II en mamíferos). Recientes avances de diversos laboratorios han provisto evidencia que la subunidad STT3 es crucial para la actividad catalítica (13, 14). Mas aún, un homólogo de STT3 (PglB), ha sido descrito codificado en el genoma de la bacteria *Campylobacter jejuni* (15).

La Glucosidasa I

La GI es una proteína de membrana de tipo II, miembro de la familia de las glicosil hidrolasas 63. Es una α 1,2-exoglucosidasa, que se encuentra asociada al complejo del translocón en proximidad con la OST (Figura 1). Luego de la incorporación del *N*-glicano, el mismo se encuentra accesible a la GI que remueve la Glc más externa cuando el oligosacárido se halla a 72 residuos del sitio P del ribosoma, que es la misma distancia requerida para la incorporación del azúcar (4). La reacción es inmediata y muestra que los sitios activos de OST y GI se encuentran en gran proximidad uno del otro (1). Este hecho apoyaría la hipótesis de que el procesamiento de la GI contribuiría a una mayor eficiencia de la glicosilación por desplazamiento del equilibrio de la reacción catalizada por la OST hacia el producto, ya que el mismo es sustrato de GI (3).

La estructura generada por GI (G2M9) no ha sido muy estudiada, tomándose sólo como un intermediario transitorio del procesamiento que rápidamente era procesado por la GII. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado una proteína de membrana tipo I

llamada Malectina, residente de RE y altamente conservada entre especies, como una putativa lectina de oligosacáridos diglucosilados de alto contenido en Man (16). La identificación de Malectina sugiere una posible función para el intermediario de procesamiento del glicano generado por Gl, G2M9, en la biogénesis de glicoproteínas, pero la misma no ha sido definida aún (3).

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa

La UGGT es una proteína particular que combina las actividades de chaperona clásica junto con la de glucosiltransferasa. Esta enzima reconoce glicanos de alto contenido de Man (M6-9) en el contexto de proteínas que no han adquirido su estructura nativa (17, 18). La UGGT se encuentra presente en la mayoría de los organismos eucariotas con la notable excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (19).

La UGGT es una proteína monomérica soluble del RE compuesta de aproximadamente 1600 residuos aminoacídicos y que lleva una señal peptídica del tipo XDEL para la retención/recuperación en el RE en su extremo C-terminal (12). La UGGT es una glucosiltransferasa de la familia 24 que transfiere un único residuo de Glc desde el nucleótido azúcar UDP-Glc a la Man terminal de la rama A (residuo 1, Figura 2) del *N*-glicano de composición M9 unido a proteínas (10). La presencia de este residuo de Glc determina que la glicoproteína pueda interactuar con CNX/CRT y prolongar su permanencia en este ambiente de plegamiento (Figura 3).

La UGGT se compone de al menos 2 dominios estructurales. El dominio N-terminal comprende alrededor del 80% de la molécula y no posee homología con otras proteínas conocidas. Este es el dominio que se encargaría del reconocimiento de conformaciones no nativas. El dominio C-terminal contiene el sitio catalítico y el sitio de unión a UDP-Glc y comprende cerca del 20% de la proteína (20). La UGGT reconoce el grado de exposición del núcleo hidrofóbico en los intermediarios de plegamiento, centrando su actividad en estados de plegamiento avanzados del tipo glóbulo fundido, mientras que otras chaperonas, como BiP, son las encargadas de lidiar con intermediarios de plegamiento tempranos (21).

La actividad de UGGT no solo depende de la estructura de la proteína sustrato sino también de la estructura del oligosacárido receptor de la Glc unido a la proteína. Se ha reportado que el residuo más interno de GlcNAc sería importante en el reconocimiento (12). También se ha demostrado, *in vitro*, que la UGGT tiene alta afinidad por el *core* pentasacárido $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. El reconocimiento del residuo más interno de GlcNAc podría ser un elemento adicional en la preferencia de la enzima por glicoproteínas en estado no

nativo, ya que este residuo tiene alta interacción con los aminoácidos vecinos cuando la especie se haya completamente plegada (10). Por otro lado, se determinó *in vitro* que glicanos aislados de composición $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (M8) y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (M7), que poseen intacta la rama A son glucosilados por la UGGT sólo un 50 y un 15% respectivamente de la glucosilación del glicano de composición M9 (22). Si bien estos resultados indicarían que un mayor procesamiento de los residuos de Man por las manosidasas del RE, disminuiría el grado de glucosilación por UGGT, no hay aún evidencias *in vivo* que confirmen estos resultados.

La Glucosidasa II

La GII es una glicosil hidrolasa soluble del RE responsable de la remoción de las dos Glc mas internas del de los *N*-glicanos transferidos a las proteínas durante la biogénesis de las glicoproteínas y de la Glc agregada por UGGT (residuos *l* y *m* de la Figura 2), es decir la hidrólisis de G2M9 (enlace $\text{Glc}\alpha 1,3\text{Glc}$) y G1M9 ($\text{Glc}\alpha 1,3\text{Man}$) (Figura 4 y Referencia 12).

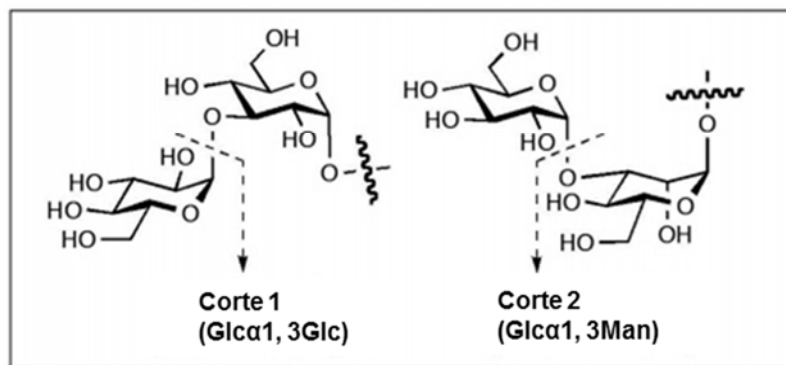


Figura 4. Enlaces hidrolizados por GII. Se detallan las reacciones de hidrólisis de GII. El paso de G2M9 a G1M9 implica un corte de un enlace $\text{Glc}\alpha 1,3\text{Glc}$ mientras que el segundo corte (el paso de G1M9 a M9) resulta del procesamiento de un enlace $\text{Glc}\alpha 1,3\text{Man}$.

Se ha propuesto que el primer y segundo corte de la enzima poseen cinéticas diferentes, siendo más rápida para la formación de G1M9 que para la de M9 (23, 24, 25). Debido a que el último residuo de Glc se encuentra en diferente orientación espacial que el anterior, este último evento de corte requiere de la separación momentánea y reposicionamiento del sitio activo de GII (3). Esta ventana de tiempo es posiblemente aprovechada por CNX y/o CRT para asociarse con el intermediario monoglucosilado durante el proceso de plegamiento.

La GII es un heterodímero compuesto por las subunidades $\text{GII}\alpha$ y $\text{GII}\beta$ unidas de forma no covalente (26, 27). La naturaleza heterodimérica de la GII fue demostrada

bioquímicamente (26) y por aproximación genética en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (27). En este organismo, el mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas es similar al presente en células de mamíferos (27): a diferencia de *S. cerevisiae* posee UGGT, además de GI, GII y CNX.

La GII actúa con un pH óptimo neutro y se inhibe por 1-deoxinojirimicina, castanospermina y bromocondroitol. La actividad de GII ha sido ensayada tanto usando el pequeño análogo de sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) como *N*-glicanos (28, 29, 30). *In vitro* se ha determinado que la actividad de GII sobre *N*-glicanos con un alto contenido en Man disminuiría junto con la remoción de las Man de las ramas B y/o C del oligosacárido (Figura 2) (31), pero estos resultados no se han verificado *in vivo*.

Subunidad α de la Glucosidasa II (GII α)

La subunidad GII α , de aproximadamente 107 kDa, se encuentra ampliamente conservada en levaduras, mamíferos, parásitos y plantas. La GII α es la subunidad catalítica, ya que posee la secuencia (G/F)(L/I/V/M)WXDMNE característica del sitio activo de la familia de glicosil hidrolasas 31. Posee, además, la secuencia *N*-terminal hidrofóbica de ingreso a vía secretoria (péptido señal) (12). En todas las especies estudiadas, esta subunidad carece de la señal aminoacídica consenso para la retención de proteínas solubles en el RE de tipo XDEL en su extremo C-terminal (26, 27, 32).

En humanos y ratones, se expresan dos mensajeros que codifican GII α , los cuales son variantes de *splicing* que varían en 66pb y ambos originan isoformas catalíticamente activas (33).

Subunidad β de la Glucosidasa II (GII β)

La función de la subunidad GII β , de 58 kDa, está menos definida y ha sido objeto de creciente interés en los últimos años, dado que mutaciones en el gen humano que codifica GII β (pero no GII α) causan las formas autosómicas dominantes de la enfermedad de hígado poliquístico (34).

El gen de GII β codifica en su extremo *N*-terminal el péptido señal requerido para la translocación de proteínas al lumen del RE. Tanto la GII β humana como la de la levadura de fisión *S. pombe* poseen además la secuencia canónica para la retención de proteínas solubles en el RE de tipo XDEL en su extremo C-terminal (26, 27), mientras que no la llevan la del parásito *Trypanosoma cruzi* ni la de la levadura *S. cerevisiae* (12) (Figura 5). GII β también contiene, según la especie, motivos EF-hand de unión a Ca²⁺, un motivo rico en

ácido glutámico (dominio ácido), y un dominio homólogo al dominio lectina del receptor de Man6P (M6PR, receptor responsable del llenado de las vesículas lisosomales en el *trans* Golgi) denominado MRH por M6PR homologous domain (35). La superficie de GII β que interaccionaría con GII α se encontraría en un dominio altamente conservado entre GII β de distintas especies llamado G2B y situado en la región N-terminal (36).

GII β sería una subunidad regulatoria, que ha sido involucrada en distintas funciones que se discuten en las siguientes secciones.

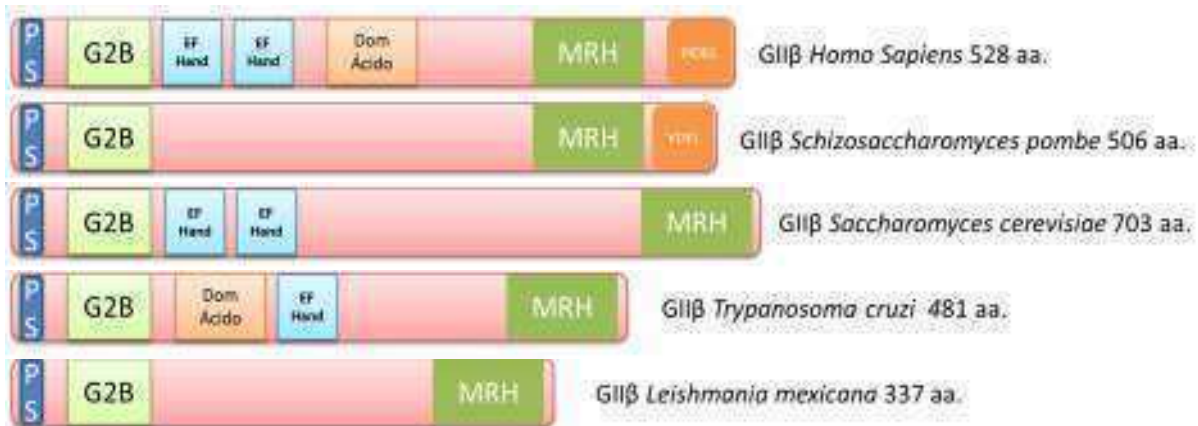


Figura 5. Estructura y dominios de GII β en distintas especies. Se ilustran los dominios conservados de la proteína así como también las diferencias entre las proteínas de distintas especies. PS: péptido señal. El tamaño de los dominios no se esquematiza a escala.

Función de GII β en la retención de GII α en el RE

En células eucariontes la mayoría de las proteínas que residen en el RE contienen información en su estructura primaria que determina su localización subcelular (37). La localización en RE de proteínas solubles depende, principalmente, de la presencia del tetrapéptido específico del tipo XDEL (o secuencias estrechamente relacionadas) en su extremo C-terminal (38). La secuencia aminoacídica en mamíferos es por lo general KDEL, mientras que en *S. pombe* se conocen proteínas residentes de RE con secuencias VDEL, ADEL, PDEL, etc. La utilización de diferentes secuencias tetrapeptídicas fusionadas a proteínas de la vía secretoria no residentes del RE utilizadas como sondas reporteras, ha demostrado que estas señales son suficientes para la retención de proteínas solubles en el RE (39, 40). El mecanismo de retención en el RE dependiente de las secuencias de tipo XDEL es en realidad de retención/recuperación, mediante el cual cada vez que las proteínas escapan de esta organela a un compartimento post-RE son recuperadas mediante la interacción con un receptor específico y un transporte vesicular retrógrado desde el Golgi hacia el RE que utiliza vesículas recubiertas por COP I (41, 42).

Si bien hay cierto consenso en la literatura de que la subunidad $GII\beta$ es necesaria para la localización de $GII\alpha$ en el RE en células de mamífero (43) y de *S. pombe* (27), en un trabajo reciente se demostró que en la levadura *S. cerevisiae* no lo es (44). Cabe aclarar que tanto $GII\beta$ como $GII\alpha$ de *S. cerevisiae* carecen de secuencia de retención en el RE por lo que se desconoce su mecanismo de localización en el RE. Por otro lado, no hay casos conocidos de una enzima que requiera de una subunidad adicional sólo para su localización en el RE, por lo que la hipótesis es que la subunidad $GII\beta$ le aporta además alguna otra función a la subunidad catalítica $GII\alpha$.

En la referencia 27 se describe como la disrupción de *GII\alpha* resultó en una total pérdida de actividad GII tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que en *S. pombe* carentes de $GII\beta$ se pudo observar la formación de glicanos de estructura G1M9 *in vivo*. Se asumió que la falta de $GII\beta$ evitaba la correcta localización de $GII\alpha$ en el RE pero que $GII\alpha$ en tránsito a través del RE era la responsable de la poca actividad detectada. Sin embargo, tampoco era posible descartar un plegamiento defectuoso o parcial de la subunidad catalítica.

Función de $GII\beta$ en el plegamiento de $GII\alpha$

A $GII\beta$ se le atribuyen funciones estructurales asistiendo al plegamiento y/o maduración de $GII\alpha$, ya que si se expresa $GII\alpha$ en células COS o en sistema de baculovirus/célula de insecto la proteína es inactiva y se agrega, y sólo se forma un complejo activo capaz de hidrolizar sustratos cuando se co-expresa junto a $GII\beta$ (43). Si bien otros autores fueron capaces de expresar $GII\alpha$ activa en sistema de baculovirus/célula de insecto en ausencia de $GII\beta$, la coexpresión de $GII\beta$ resultó en un aumento de la actividad GII (45). Se planteó, entonces, la hipótesis de que $GII\beta$ era necesaria para la maduración y/o actividad de $GII\alpha$. Trabajos posteriores demostraron que si se purifica el heterodímero a partir de hígado de rata y se proteoliza selectivamente $GII\beta$, la actividad catalítica de la enzima utilizando pNPG como sustrato no se modificaba (32), por lo que se postuló que $GII\beta$ participaría en la maduración del heterodímero pero no en la actividad de GII una vez plegadas las subunidades y formado el complejo.

Función de $GII\beta$ en el procesamiento/reconocimiento del N-glicano

Se le atribuyen a $GII\beta$ además funciones regulatorias de la actividad GII: aunque se ha asumido que el reconocimiento del sustrato del primer corte de la GII ($Glc\alpha1,3Glc$) es equivalente al segundo ($Glc\alpha1,3Man$), y se ha demostrado que la $GII\alpha$ posee un único sitio catalítico, existen evidencias de que los dos pasos son mecanísticamente distintos siendo

mucho más lenta la reacción para el segundo (23, 44, 46) (Figura 4), lo que hace atractiva la posibilidad de que la diferencia esté dada por un reconocimiento diferencial por parte de $GII\beta$. En este sentido se han publicado dos trabajos aparentemente contradictorios entre sí. En el primer trabajo se demostró *in vitro* que en células de mamífero se requería de más de un oligosacárido en la misma glicoproteína para la remoción *in vivo* de la primera Glc por GII (Glc *m*, Figura 2), es decir, para el procesamiento de G2M9 (46). Se sugirió un modelo por el cual el primer corte por $GII\alpha$ requiere de la activación *en trans* por la unión de un segundo oligosacárido al dominio lectina MRH de $GII\beta$. Esto induciría un cambio conformacional en la subunidad catalítica $GII\alpha$ que activaría el clivaje del oligosacárido G2M9 unido al sitio catalítico. Una vez producido este corte, la Glc más interna del glicano (Glc *l*, Figura 2) sería procesada sin la necesidad de una activación *en trans* por otro oligosacárido (Figura 6). Esta explicación se basó en el hecho de que la estructura por RMN del oligosacárido $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ mostró una necesidad de reorientar el sustrato para el segundo corte lo que probablemente previene el corte consecutivo de las dos Glc, permitiendo la formación de oligosacáridos monoglucosilados y por lo tanto la unión a CNX y/o CRT.

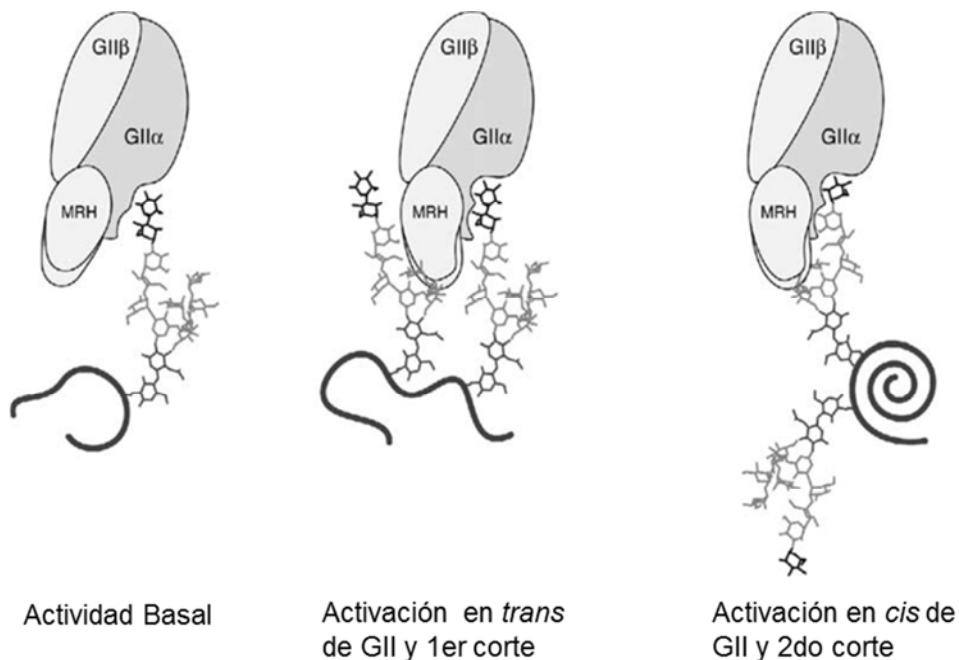


Figura 6. Uno de los modelos propuestos para la hidrólisis por GII . Helenius y colaboradores sugirieron que existe una actividad basal de GII y que $GII\alpha$ puede ser activada por la unión de residuos de Man del glicano al dominio MRH de $GII\beta$. Dada la orientación del primer enlace ($Glc\alpha 1, 3Glc$), GII solo puede ser activada por Man en un segundo glicano (*trans* activación). Para el segundo corte, que ocurre del lado opuesto de la Rama A, GII puede ser activada por Man del mismo glicano (activación *en cis*). Figura modificada a partir de la Referencia 46.

En el segundo trabajo, realizado en la levadura *S. cerevisiae*, se demostró que la presencia de GII β es clave para el procesamiento de la Glc más interna del oligosacárido transferido a la proteína G1M9 (44). Aunque se había asumido que este organismo carecía de GII β , se reportó que su genoma codifica una proteína de 703 aminoácidos a la que se llamó Gtb1p (por glucosidase two beta subunit). Dicha proteína se localiza en el RE y experimentos de co-inmunoprecipitación revelaron que interacciona físicamente con GII α , pero, como ya se mencionó más arriba, no posee señal del tipo XDEL en su extremo C-terminal. La disrupción del gen que codifica GII β no afectó la localización de GII α en el RE ni la conversión de glicanos diglucosilados a monoglucosilados, pero impidió la remoción del residuo de Glc más interno de los mismos. Se especuló que GII β de alguna manera modificaba el sitio catalítico o de unión al sustrato permitiendo así la formación de glicanos totalmente deglucosilados. Esta función postulada es de gran interés, ya que el procesamiento del oligosacárido G1M9 para el que sería requerido GII β es lo que libera a las glicoproteínas de la interacción con CNX y/o CRT, permitiendo que éstas sigan su camino en la vía secretoria si ya han adquirido la estructura nativa o de lo contrario vuelvan a ser reglucosiladas por UGGT.

Dominio MRH de GII β y proteínas de la vía secretoria que contienen el dominio MRH

Como hemos mencionado previamente, los *N*-glicanos se hayan involucrados en procesos intracelulares como el plegamiento de proteínas y destino intracelular de especies proteicas, los cuales requieren el reconocimiento de ciertas estructuras específicas de dichos oligosacáridos. Aunque algunas proteínas de la vía secretoria con funciones de lectina han sido identificadas, poco se sabe acerca de las bases estructurales de dichos reconocimientos (35).

En las células eucariontes los receptores de Man6P (M6PRs) participan en el direccionamiento de ~60 diferentes hidrolasas ácidas sintetizadas *de novo* a los lisosomas (Figura 7). Los M6PRs reconocen una señal de Man6P que se encuentra en los *N*-oligosacáridos de dichas enzimas a través de un dominio lectina. Existen dos M6PRs distintos: el Receptor de Man6P dependiente de cationes de 46 kD (CD-MPR) y el Receptor de Man6P independiente de Cationes (CI-MPR) de alrededor de 300 kDa (47).

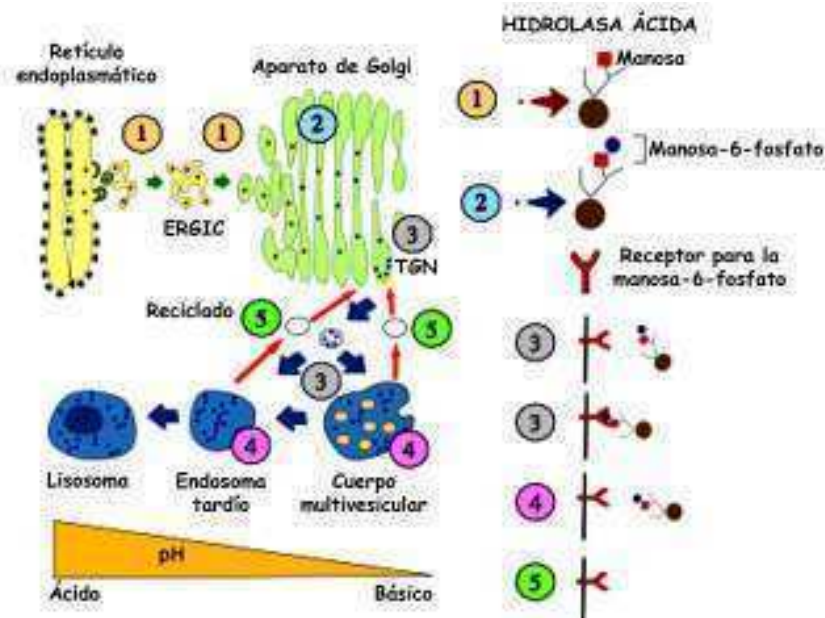
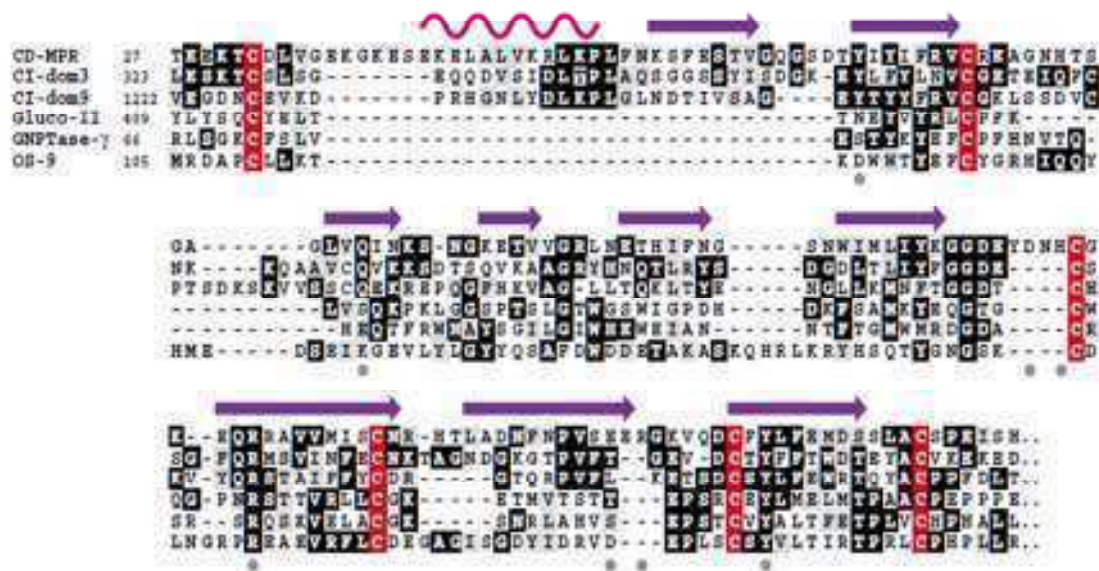


Figura 7. Formación de Lisosomas y direccionamiento de enzimas lisosomales. Las hidrolasas son sintetizadas y N-glicosiladas en el RE y viajan al Golgi mediante transporte vesicular (Paso 1). Allí dos enzimas realizan la modificación glicosídica que forma Man6P en los N-glicanos (Paso 2). Los M6PRs reconocen la señal en el glicano y dirigen las enzimas hacia los lisosomas (Paso 3), donde luego se disocian del receptor debido al cambio de pH en el medio (Paso 4). Los M6PRs son posteriormente reciclados hacia el Golgi (Paso 5). En el panel derecho se indican en detalle las modificaciones sobre el glicano y la interacción con el M6PR en cada paso.

La familia de proteínas que contienen dominios con homología al dominio lectina del receptor de Man6P (dominios MRH) incluye a proteínas residentes del RE (GII β , XTP3-B, OS-9) y a una glicosiltransferasa de Golgi (subunidad γ - de la GlcNAc-fosfotransferasa), y todas se caracterizan por la presencia de uno o más dominios MRH (Figura 8 A). Muchas de estas proteínas actúan como lectinas y unen N-glicanos de alta Man fosforilados (M6PRs) o no fosforilados (XTP3-B, OS-9). Esta familia de proteínas juega un rol importante en la vía secretoria: mientras que GII β , XTP3-B y OS-9 se hayan involucradas en la biosíntesis de glicoproteínas en el RE, los M6PRs y la subunidad γ - de la GlcNAc-fosfotransferasa están involucrados en el llenado de los lisosomas como mencionamos anteriormente (48).

Estudios estructurales y de unión de oligosacáridos al M6PR han permitido identificar con detalle los aminoácidos en el dominio lectina que contactan a los residuos de Man del glicano (Figura 8 B) (49, 50). Todos los aminoácidos involucrados en la interacción con los residuos de Man se encuentran conservados en la subunidad GII β de *S. pombe* con la notable excepción de aquellos que interaccionan con el fosfato (Figura 8 A) (35). Por tal motivo el dominio MRH presente en GII β se presenta como un candidato interesante a cumplir funciones de reconocimiento de oligosacáridos durante el procesamiento de los N-glicanos en el RE por la GII.

A



B

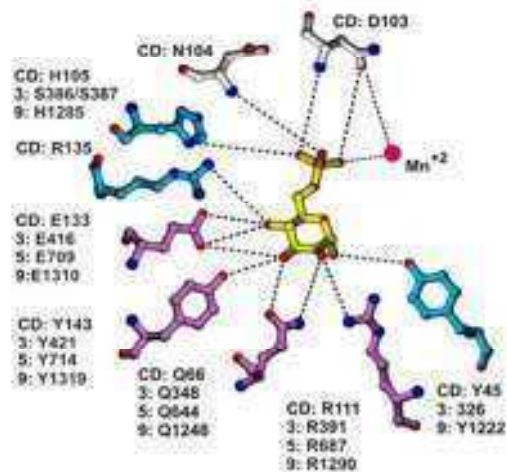


Figura 8. Proteínas con dominio MRH e interacción del dominio lectina del M6PR con Man6P. (A) Alineamiento de secuencias de las regiones indicadas de los M6PRs humanos y otras tres proteínas humanas que contienen un dominio MRH. Gluco-II (Subunidad GIIβ), GNPTase-γ (Subunidad γ de la GlcNAc fosfotransferasa). Los residuos idénticos o conservados entre tres o más secuencias se somborean en negro y gris respectivamente. Se detalla la estructura secundaria del CD-MPR con líneas onduladas (α -hélices) y flechas (lámina β). Se indican con puntos los residuos involucrados en el contacto con el ligando del CD-MPR (35). (B) Esquema de las interacciones entre Man6P y el CD-MPR. Las líneas punteadas señalan potenciales enlaces de hidrógeno. Análisis mutacionales demostraron que los cuatro residuos en violeta son esenciales para el contacto con el glicano. Se indican además los residuos homólogos en el CI-MPR (Figura obtenida de la referencia 51).

Otras posibles funciones de GII β

Además del rol que GII β estaría cumpliendo en el procesamiento de oligosacáridos en el RE, recientes estudios han ubicado a GII β en distintos procesos celulares que aumentan las implicancias e importancia de los estudios sobre dicha subunidad.

La enfermedad autosómica de hígado poliquístico (PCLD) remite a una condición patológica en la que numerosos quistes se hayan dispersos a lo largo del parénquima hepático. En 2000, el gen que causa la PCLD fue localizado en un intervalo de 12.5-centimorgans (cM) en el cromosoma 19p13.2-13.1 (52). Posteriormente se identificó al gen PRKCSH (proteína sustrato de proteína kinasa C 80K-H) como el gen responsable de la PCLD (34). Se denominó Hepatocistina al producto proteico de PRKCSH, una proteína de 59 kDa, y estudios posteriores la identificaron como la subunidad β de la GII, de expresión ubicua en los tejidos y altamente conservada en la evolución desde la levadura de fisión *S. pombe* hasta los humanos (53, 54). Se han descrito hasta el momento ocho diferentes mutaciones causantes de PCLD las cuales indican que a pesar de la naturaleza dominante de esta patología, la PCLD surge a partir de una pérdida de función de la proteína (55). Se observó, en estudios de transfección en células HeLa que variantes mutantes de GII β (truncadas en el C-terminal, carentes de la señal XDEL) son incapaces de interactuar con GII α , pierden retención en el RE y son secretadas al medio (56). Esto llevó a pensar que la no retención de GII llevaría a sucesos patológicos. Sin embargo, en 2008 el grupo de Drenth demostró que la variante mutante de Hepatocistina no es secretada a los quistes de pacientes con PCLD (57).

Por otra parte, se ha encontrado que el mRNA de GII β , pero no el de GII α , se induce durante la diferenciación de células progenitoras neurales de rata y también en respuesta al factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (58).

En otro estudio, se investigan los mecanismos de la regulación por etanol de la subunidad NR1 del receptor NMDA. Se identificaron tres proteínas que actúan *en trans* y se unen a dicho transcritto, y una de ellas resultó ser GII β . Se observó además como dicha proteína aumenta su síntesis en presencia crónica de etanol (50 mM, 5 días) (59).

A pesar de que fue siempre descrita como una proteína residente del RE, hay otros estudios que también involucran a GII β en funciones citoplasmáticas. La CRT es la única proteína descrita hasta ahora en la literatura que es capaz de retrotranslocar al citosol y cumplir funciones en diversos compartimentos celulares (60, 61). GII β sería el segundo caso de confirmarse estos estudios. Es interesante destacar que tanto la CRT como la GII β de *H. Sapiens* poseen en sus secuencias un dominio o motivo con una gran extensión de

aminoácidos cargados negativamente lo que sería responsable de la habilidad de retrotranslocar debido a la modificación estructural que este dominio sufre en respuesta a fluctuaciones de Ca^{2+} en el RE (61).

Por último, la secuencia de $\text{GII}\beta$ de mamíferos y *T. cruzi* presenta dominios EF-hand de unión a Ca^{2+} . Recientemente un estudio demostró una nueva función para la proteína 80K-H ($\text{GII}\beta$) como un regulador (que depende de los dominios EF-hand) del canal de Ca^{2+} TRPV5 (62).

Todas estas funciones han sido propuestas para $\text{GII}\beta$ y no para $\text{GII}\alpha$ lo que permite inferir que dichos roles no estarían relacionados con las funciones de GII en el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE.

Destino de glicoproteínas: ¿vía secretoria o ERAD?

Las proteínas que alcanzan su estado de plegamiento correcto y se encuentran completamente ensambladas pueden abandonar el RE en vesículas transportadoras cubiertas por la proteína citosólica COPII. En levaduras, las vesículas cubiertas por COPII se dirigen directamente al Golgi mientras que en mamíferos, las mismas se fusionan con un compartimiento intermedio entre el RE y el Golgi (ERGIC). Desde aquí, las proteínas alcanzan el *cis*-Golgi en vesículas cubiertas por COPI. La exportación de ciertas glicoproteínas del RE requiere la presencia de lectinas que ciclan entre este compartimiento y el Golgi (1, 3).

Las proteínas que finalmente fallan en su intento de alcanzar su conformación nativa deben ser removidas del lumen del RE y degradadas en un proceso conocido como ERAD (degradación asociada al RE) ya que su acumulación podría inhibir la capacidad del RE de asistir al plegamiento de las cadenas nacientes.

Como se mencionó anteriormente, el procesamiento del *N*-glicano de las glicoproteínas jugaría un rol esencial en el proceso de diferenciar un intermediario de plegamiento que puede continuar en el ciclo de CNX/CRT, de una glicoproteína irreversiblemente mal plegada. La intervención secuencial de las manosidasas sería requerida para generar la señal de ERAD en el glicano. Estas últimas son retrotranslocadas al citosol donde son poli-ubiquitinadas y degradadas en los proteasomas. Por otro lado, dado que los oligosacáridos monoglucosilados son capaces de interactuar con lectinas chaperonas del RE, la salida del ciclo de CNX/CRT de forma definitiva sólo es posible luego del procesamiento de una Man de la rama A del glicano (Figura 2), ya que se removería el residuo necesario para la reglucosilación por la UGGT (3).

Las señales que envían a las glicoproteínas a ERAD deben ser luego reconocidas y las glicoproteínas retrotranslocadas al citosol (63). Receptores de tipo lectina reconocerían los sustratos de ERAD: las proteínas OS9.1/OS9.2 (Yos9p, de levaduras) y XTP3-B.1/XTP3-B2 se encuentran implicadas en el reconocimiento de las glicoproteínas mal plegadas. El dominio MRH de OS9 se uniría a glicanos con residuos Man terminales α 1,6 (3), por lo que se requiere de una demanosilación previa del oligosacárido (Figura 2) unido a la glicoproteína destinada a ERAD. Además OS9 es parte del complejo Hrd1p (E3 ubiquitin ligasa) al que se encuentra unido a través de SEL1 (Hrd3p en levaduras), una proteína de transmembrana con un dominio luminal que llevaría a cabo la actividad de reclutar a las proteínas mal plegadas mientras que OS9 escanearía la estructura del glicano del sustrato.

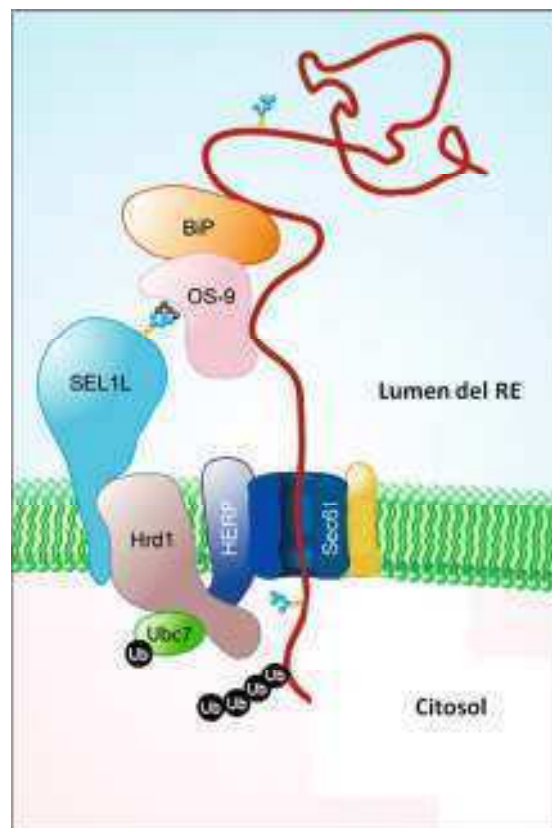


Figura 9. Modelo de retrotranslocación de proteínas irreversiblemente mal plegadas al citosol. Complejo regulador de la retrotranslocación desde el lumen del ER al citosol de una glicoproteína que no logró alcanzar su estado nativo de plegamiento. Se muestra parte del complejo Hrd1p (E3 ubiquitin ligasa) y el canal en la membrana del RE, Sec61, por el que se retrotransloca la glicoproteína (Figura modificada a partir de la referencia 1).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general del trabajo es comprender cuál es el rol de la subunidad GII β de la GII en el procesamiento de los oligosacáridos de las proteínas que entran en el llamado “control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE”, analizando su función en la localización en el RE y en la adquisición de la conformación nativa de la subunidad GII α , su requerimiento para el procesamiento de los dos residuos de Glc del oligosacárido unido a las proteínas y su influencia en la permanencia de las glicoproteínas en los ciclos de CNX/CRT. Se detallan a continuación los objetivos puntuales que nos propusimos y las hipótesis de trabajo para abordar cada problema planteado. Utilizaremos como modelo experimental, principalmente, a la levadura de fisión *S. pombe* debido a que es un microorganismo versátil para la manipulación genética y para realizar experimentos bioquímicos. Por otra parte la GII β de *S. pombe* posee un alto grado de homología (mayor al presente en GII β de *T. cruzi* o de *S. cerevisiae* entre otros) con la GII β de mamíferos. Por último, *S. pombe* posee un mecanismo de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas similar al presente en células de mamíferos (27).

1) Determinar si en la levadura *S. pombe* GII β participa únicamente en la retención en el RE de GII α o también en su plegamiento y/o maduración

Una de las funciones postuladas para GII β es la de localizar a la subunidad GII α en el RE a través de su secuencia de retención/recuperación del tipo XDEL. Por otro lado, también, diversos autores postulan que GII β sería necesaria para el plegamiento de GII α de forma catalíticamente activa. Nuestra hipótesis fue que en la levadura *S. pombe*, la GII β participaría de la retención de GII α en el RE a través de su tetrapéptido C-terminal VDEL, pero no en la adquisición de una estructura terciaria nativa de la subunidad catalítica. Para verificar esta hipótesis se comparó la actividad GII en extractos celulares totales con fracciones microsomales (fracción subcelular enriquecida en RE) de *S. pombe* carentes de GII β . Si GII β participara sólo de la retención se esperaba encontrar GII α activa, pero deslocalizada del RE, mientras que si participara del plegamiento de la subunidad catalítica, GII sería inactiva en todos los casos.

2) Analizar si el motivo VDEL presente en GII β es suficiente para la localización de GII α en el RE de *S. pombe*

Postulamos que la señal de retención/recuperación VDEL en el C-terminal de GII β es suficiente para la localización de GII α en el RE. Se expresó, en levaduras carentes de GII α y GII β , la subunidad GII α con el agregado en su C-terminal del tetrapéptido VDEL presente en

GII β , se midió la actividad de GII α en RE y se evaluaron los niveles de GII α por inmunodetección. Si el tetrapéptido VDEL es suficiente para retener a GII α , esperábamos detectar GII α activa en el RE.

3) Determinar si GII β está involucrada en el procesamiento de los glicanos G2M9 y G1M9

Reportes previos sugerían, por un lado, que GII β sería necesaria para la hidrólisis de G1M9 en *S. cerevisiae* (44) y, por otro lado, que la interacción de GII β con un glicano permitiría el corte de G2M9 de otro glicano presente en la misma glicoproteína (46). Nos propusimos analizar si existía un requerimiento de GII β para el procesamiento de ambos sustratos fisiológicos de GII: G2M9 y G1M9. La hipótesis de trabajo fue que GII β sería responsable de modular el procesamiento por GII de G2M9 y G1M9. Para verificar dicha hipótesis se determinó la capacidad de hidrolizar G2M9 y G1M9 *in vivo* e *in vitro* de *S. pombe* carentes de GII β que expresan GII α en el RE. Se esperaba que si GII β fuese necesaria para el procesamiento eficiente, G2M9 y/o G1M9 no serían procesados (o el procesamiento no sería eficiente) en ausencia de GII β .

4) Analizar qué motivos de GII β son necesarios para el procesamiento del oligosacárido por GII

La región C-terminal de GII β posee un dominio altamente homólogo al dominio lectina del M6PR involucrado en el transporte de glicoproteínas del Golgi a lisosomas (35), denominado dominio MRH. Los aminoácidos responsables de la interacción del receptor con los residuos de Man del oligosacárido Man6P están presentes en GII β , lo que sugirió que este dominio podría estar involucrado en el reconocimiento del glicano mediado por GII β . Si el MRH está involucrado en el reconocimiento del glicano, esperábamos que la mutagénesis de aminoácidos clave en el dominio MRH de GII β afectaría la capacidad de GII de procesar los sustratos G2M9 y/o G1M9 de la misma forma que la ausencia de GII β .

5) Analizar el efecto del contenido de Man del glicano en la actividad GII

Postulamos que el dominio MRH de GII β interacciona con los *N*-glicanos de las glicoproteínas y modula la actividad de GII. Para ello analizamos los residuos de Man que son reconocidos en el sustrato por GII. Si GII β , a través del dominio MRH, reconoce residuos de Man en las ramas B y/o C del *N*-glicano la actividad GII se vería reducida si el sustrato es demanosilado enzimáticamente hasta lograr estructuras de G2M4-5 o G1M4-5, del mismo modo que mutando el dominio MRH.

6) Investigar el efecto del contenido de Man del glicano en la actividad *in vivo* de las enzimas involucradas en el Control de Calidad de Plegamiento de Glicoproteínas en el RE

El objetivo fue comprender si la demanosilación de los *N*-glicanos, un proceso que ocurre en células de mamífero en glicoproteínas que tienen una permanencia extensa en el RE (glicoproteínas mal plegadas, complejos glicoproteicos ensamblados de modo incompleto), resultaba en un aumento relativo de la glucosilación por UGGT por sobre los de deglucosilación por GII, y por lo tanto en un aumento de la permanencia de las especies mal plegadas en los ciclos de CNX/CRT. Para tal objetivo, utilizamos levaduras *S. pombe* mutantes en las que se interfirió genéticamente en la biosíntesis del oligosacárido transferido y por lo tanto transfieren a las proteínas glicanos truncados. Para dicho objetivo propusimos en particular:

a) Determinar los niveles relativos de deglucosilación mediada por GII de glicanos de composición G2M9, G2M7, G2M6 y G2M5 transferidos a las glicoproteínas. Hipotetizamos que a medida que decrece el contenido de Man en los *N*-glicanos, GII no sería capaz de procesar glicanos eficientemente debido a un menor reconocimiento por el MRH de GII β .

b) Evaluar si podría existir un efecto de la demanosilación del sustrato en las actividades *in vivo* de UGGT y GI. Se evaluaron los niveles relativos de deglucosilación mediada por GI de glicanos de composición G3M9, G3M7, G3M6 y G3M5 y también las tasas relativas de glucosilación mediada por UGGT de glicanos de composición M9, M7, M6 y M5 en mutantes de *S. pombe* que transfieren dichos oligosacáridos truncados. Hipotetizamos que podría existir una influencia de la demanosilación en la actividad *in vivo* de ambas enzimas. Este objetivo fue realizado en conjunto durante la tesis de licenciatura de la Lic. Solana Alculumbre.

c) Evaluar la especificidad del dominio MRH en organismos que transfieren naturalmente glicanos de bajo contenido de Man. Se empleó el modelo del protozoo tripanosomátido *L. mexicana* que transfiere Man₆GlcNAc₂ (M6) a sus glicoproteínas. Se comparó la actividad GII respecto de G1M6 y G1M9 para determinar si la GII de dicho parásito prefiere el glicano con el contenido de Man que transfiere fisiológicamente (G1M6) o G1M9.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El extracto de levadura, la bactopectona y la base nitrogenada de levadura con o sin sulfato de amonio fueron de Difco. El extracto de malta fue de Britannia. La Endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa H (Endo H), la *N*-glicosasa (PNGasa F), la tripsina porcina, la jack bean α -manosidasa, la lisozima, los inhibidores de proteasa, el *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido (pNPG), el ditioneitol (DTT), los aminoácidos y suplementos para medios de cultivo fueron de Sigma. La [¹⁴C]Glc (301 Ci/mol) fue de Perkin Elmer Life Sciences. La *N*-metil-1-deoxinojirimicina (NMDNJ) y la 1-deoximanojirimicina fueron de Toronto Biochemicals. La Geneticina (o G418) de Invitrogen y la Nurseotricina fueron de Werner BioAgents. La Zimoliasa 100T fue de Seikagaku Corporation. Las enzimas utilizadas en procedimientos de DNA recombinante fueron de New England Biolabs. La Clonasa Gateway LR fue de Invitrogen.

Cepas y medios de cultivo

Las cepas de bacterias *Escherichia coli* utilizadas para procedimientos de clonado fueron DH5 α (*fhuA2*, Δ (*argF-lacZ*)U169, *poa*, *glnV44*, Φ 80, Δ (*lacZ*)M15, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*) y JA226 (*hsdR*, *hsdM*, *trpE5*, *fecA1*, *LeuB6*, *Zopll*, *thil*, *recBC*, *strR*), mientras que para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizaron *E. coli* BL26 (*F*⁻, λ ⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*, *gal*, *lon*, Δ *lacZ*). Las bacterias se crecieron a 37°C en medio LB (NaCl 0,5%, triptona 1%, extracto de levadura 0,5%) con ampicilina 200 mg/L o kanamicina 35 mg/L. En todos los casos los medios sólidos se hicieron con agar 2%.

Las cepas de *S. pombe* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 1. Las levaduras *S. pombe* se crecieron a 28°C en medio rico YEA (extracto de levadura 0,5%, Glc 3%, adenina 75 mg/L) o en medio mínimo EMM (KH ftalato 0,3%, Na₂HPO₄ 0,22%, NH₄Cl 0,5%, Glc 2%, con agregado de sales, minerales y vitaminas (descriptas en referencias 64 y 65). Los medios mínimos fueron suplementados con adenina (75 mg/L), uracilo (75 mg/L) y/o leucina (250 mg/L). Los cruzamientos se realizaron en medio sólido ME (Extracto de Malta 3% pH 5,5 suplementado con adenina, uracilo y leucina). Para la selección del marcador *KanMX6* se utilizó geneticina 200 mg/L y para la selección del marcador *NatMX6* se utilizó nurseotricina 100 mg/L, ambas en YEA. En los casos en que se realizó una doble selección por marcadores de auxotrofia y antibiótico, se reemplazó el NH₄Cl en el EMM por L-glutamato monosódico 0,37%. Para la marcación *in vivo* de oligosacáridos de *S. pombe* se utilizó el medio YNB (base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos 1%, NH₄SO₄ 0,5%).

| Cepa (Nombre coloquial) | Genotipo | Origen |
|---|--|--|
| Sp61 (WT) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1</i> | Stock del laboratorio (D'Alessio <i>et al.</i> , 1999) |
| Sp61IIα (ΔGIIα) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1, Δgls2α::ura4⁺</i> | Stock del laboratorio (Soussilane <i>et al.</i> , 2009) |
| SpADIIβ (ΔGIIβ) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δgls2β::ura4⁺</i> | Stock del laboratorio (D'Alessio <i>et al.</i> , 1999) |
| SpADIIαβ (ΔGIIαβ) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δgls2α::ura4⁺, Δgls2β::ura4⁺</i> | Stock del laboratorio (Soussilane <i>et al.</i> , 2009) |
| SPBC1734.12C (Δalg12) | <i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg12::KanMX4</i> | Bioneer |
| SPAC1834.05 (Δalg9) | <i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg9::KanMX4</i> | Bioneer |
| Sp61A (Δalg6) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1, Δalg6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| ADpA3 (Δalg3) | <i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg3::KanMX6</i> | Tesis de Licenciatura Solana Alculumbre |
| SpA6A12-3D (Δalg6/Δalg12) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg6::ura4⁺, Δalg12::KanMX4</i> | Tesis de Licenciatura Solana Alculumbre |
| SpA6A3-8C (Δalg6/Δalg3) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg6::ura4⁺, Δalg3::KanMX6</i> | Tesis de Licenciatura Solana Alculumbre |
| SPAC56F8.06c (Δalg10) | <i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg10::KanMX4</i> | Bioneer |
| SpA10-4AK (Δalg10-K) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg10::KanMX4</i> | Este trabajo |
| SpA10-4AN (Δalg10-N) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg10::NatMX4</i> | Este trabajo |
| SpA10A12-2B (Δalg10/Δalg12) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg10::KanMX4, Δalg12::KanMX4</i> | Este trabajo |
| SpA10A9-7C (Δalg10/Δalg9) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg10::NatMX4, Δalg9::KanMX4</i> | Este trabajo |
| SpA10A3-7A (Δalg10/Δalg3) | <i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg10::NatMX4, Δalg3::KanMX6</i> | Este trabajo |
| SpA10GIIβ-1C (Δalg10/ΔGIIβ) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg10::KanMX4, Δgls2β::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| SpA10A12GIIβ-10B (Δalg10/Δalg12/ΔGIIβ) | <i>h⁺, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, Δalg10::KanMX4, Δalg12::KanMX4, Δgls2β::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| SpA10A9GIIβ-12D (Δalg10/Δalg9/ΔGIIβ) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg10::NatMX4, Δalg9::KanMX4, Δgls2β::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| SpA10A3GIIβ-14A (Δalg10/Δalg3/ΔGIIβ) | <i>h⁻, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, Δalg10::NatMX4, Δalg3::KanMX6, Δgls2β::ura4⁺</i> | Este trabajo |

Tabla 1. Cepas de levaduras *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 2. Las levaduras *S. cerevisiae* fueron crecidas a 28°C en medio rico (YPDA, extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, Glc 2%, adenina 20 mg/L) o en medio mínimo SD (base nitrogenada sin aminoácidos 0,67%, Glc 2%) más los suplementos apropiados. Se agregó geneticina 200 mg/L al medio para la selección del marcador *KanMX4*. Para la doble selección de *KanMX4* y un marcador de auxotrofia, la base nitrogenada del SD fue reemplazada por base nitrogenada sin sulfato de amonio 1,7% y *L*-glutamato monosódico 0,1%. Las mutantes de *S. cerevisiae* *MK1-11B 9.16a* y *BY4741Δgls2* fueron gentilmente cedidas por A. Herscovics (McGill Cancer Centre, Montreal, QC, Canadá) y A. Colman-Lerner (FCEN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina), respectivamente.

Las células del parásito *L. mexicana* fueron crecidas a 26°C en medio líquido Infusión brain heart 34 g/L (Difco), triptosa 2 g/L, Na₂HPO₄ 3 g/L, KCl 0,4 g/L, Hemina (Sigma) 0,02 g/L y suero fetal bovino 20% v/v (66).

| Cepa | Genotipo | Origen |
|----------------------|--|-------------------------------|
| <i>MK1-11B 9.16a</i> | <i>MATα, his4-619, mns1::URA3, ams1::LEU2</i> | Puccia <i>et al.</i> (1993) |
| <i>BY4741Δgls2</i> | <i>MATα, ura3Δ0, leu2, his3Δ1, met15Δ0, Δgls2α::KanMX4</i> | Winzeler <i>et al.</i> (1999) |
| <i>GIIM-36</i> | <i>MATα, Δgls2α::KanMX4, mns1::URA3, leu2Δ0</i> | Este trabajo |

Tabla 2. Cepas de levaduras *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Plásmidos

Los mapas de los vectores utilizados se muestran en la Figura 10. El vector pBluescript II KS (+) fue utilizado para el clonado de *GIIα* de *S. pombe*. El vector pET22b(+) fue utilizado para la expresión de *GIIα* o *CNX* de *S. pombe*. El plásmido pDONR201, conteniendo el clon 26/D11 (correspondiente a la secuencia de *GIIβ* de *S. pombe*, RIKEN DNA Bank), fue utilizado como dador de *GIIβ* o *GIIβ* mutante en los clonados por recombinación del sistema Gateway (Invitrogen), o bien como templado de PCR para la mutagénesis de *GIIβ*. El vector pREP3X se utilizó para la expresión en *S. pombe* de *GIIα* o *GIIα* fusionada al tetrapéptido VDEL. El vector pREP1-ccdB2 fue utilizado en las recombinaciones del sistema Gateway como plásmido aceptor para expresar las variantes mutantes de *GIIβ* en *S. pombe*. Por último, el vector de expresión en *S. pombe* pDUAL-YFH1c se utilizó para expresar *GIIβ* y *GIIβ* mutada en el dominio MRH fusionadas a la proteína amarilla fluorescente (YFP).

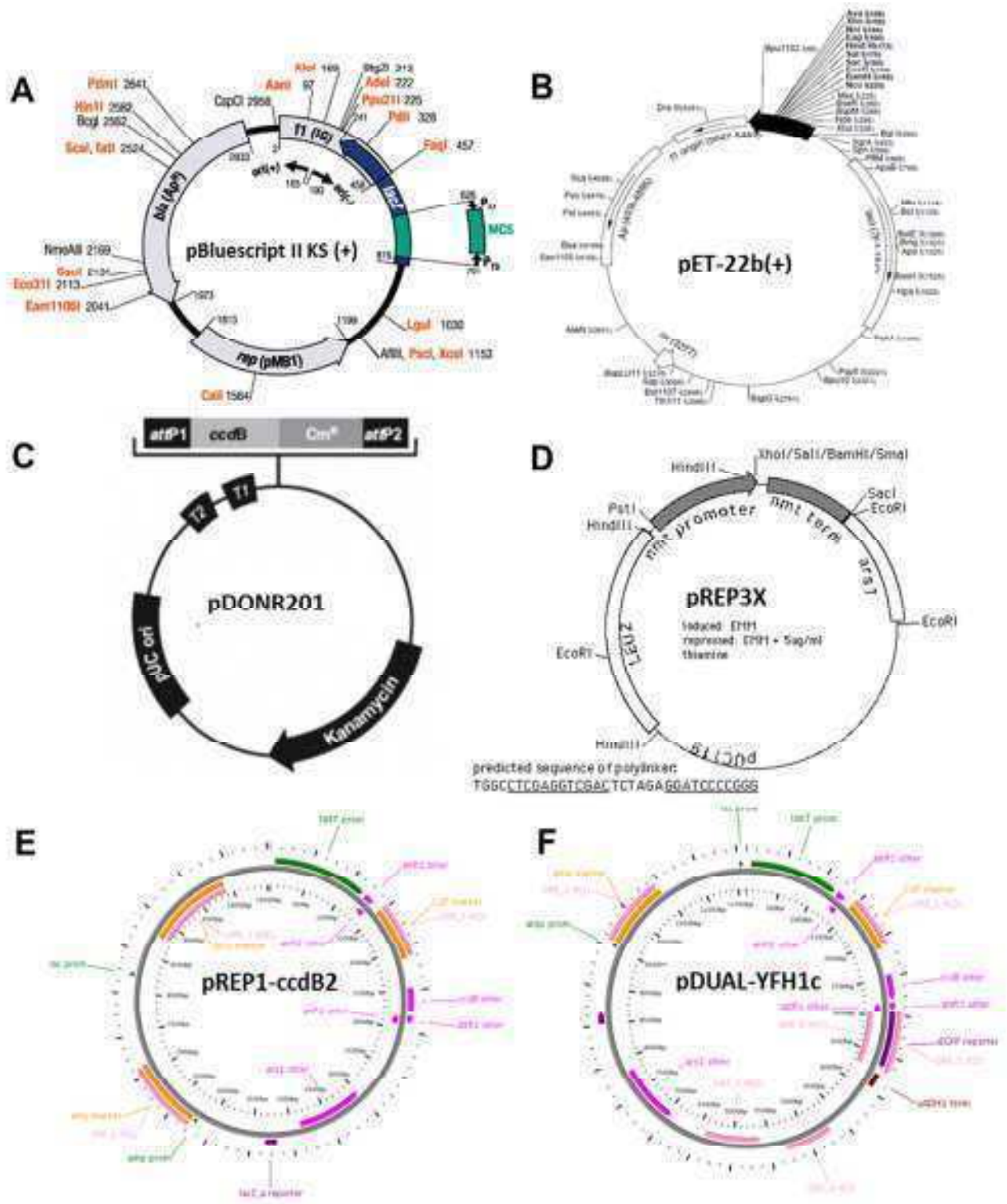


Figura 10. Vectores utilizados en este trabajo. (A-C) Vectores Bacterianos. (D-F) Vectores *shuttle* Bacterias-Levaduras. (A) Mapa del vector pBluescript II KS (+). (B) Mapa del vector pET22b(+). (C) Mapa de pDONR201. (D) Mapa del vector para expresión en *S. pombe* pREP3X. (E) Mapa del vector de expresión en *S. pombe* pREP1ccdB2 y (F) Mapa del vector de expresión en *S. pombe* pDUAL-YFH1c-ccdB2.

Procedimientos con DNA

Preparación de DNA genómico de levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae*

Cultivos en fase exponencial ($OD_{600} = 2$) se cosecharon por centrifugación a 6.000 xg durante 5 min y las células se resuspendieron en 0,2 ml de agua. Se agregaron 0,2 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y luego 0,2 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se rompieron las células por agitación en vortex en presencia de 300 mg de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y luego se agregaron 0,2 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). La muestra se centrifugó a 10.000 xg y se recuperó la fase acuosa. Se agregó 1 ml de etanol 100% para precipitar el DNA, se centrifugó, se resuspendió el pellet en 0,4 ml de buffer TE conteniendo 3 μ g de RNasa A y se incubaron 5 min a 37°C. Se agregó un volumen de cloroformo, se centrifugó a 10.000 xg durante 5 min y se conservó la fase acuosa. Se precipitó el DNA agregando 1 ml de etanol 100% y 10 μ l de NH_4Ac 4 M. Se centrifugó, se lavó el pellet con etanol 70% y luego se resuspendió en 20 μ l de agua libre de DNAsas.

Reacciones de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizaron como templados DNA genómico de *S. pombe* o plásmidos. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM y 1 μ M de cada oligonucleótido-primer (Tabla 3). Se utilizaron las polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Invitrogen) o KOD (Merck). La enzima KOD fue empleada en amplificaciones para clonados por su mayor fidelidad, mientras que para verificaciones se utilizó la enzima Taq polimerasa. El templado fue desnaturalizado a 95°C por 5 min y se llevaron a cabo 30 ciclos de desnaturalización/hibridación/extensión. La temperatura de hibridación fue entre 50°C y 55°C según el caso y 72°C la de extensión. Luego de 30 ciclos se incubó por 10 min adicionales a 72°C y se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa 1% en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8).

“Colony” PCR de *E. coli*, *S. pombe* y *S. cerevisiae*: se resuspendió una colonia de bacteria o *S. pombe* aislada en 50 μ l de la mezcla de reacción de PCR y se elevó el tiempo inicial de desnaturalización a 10 min. Para el caso de *S. pombe*, las reacciones de PCR se realizaron como se describió pero elevando el número de ciclos totales a 35. Las colonias de *S. cerevisiae* se incubaron 5 min a 95°C en 50 μ l de NaOH 20 mM y se tomaron 2 μ l como templado para la PCR.

| Nombre | Secuencia |
|-------------------------------|---|
| GII α fwd | 5'-AAACCGCTCGAGATGAGATATCATGGCATATG-3' |
| GII α rev | 5'-CGCGGATCCTTAAACCAAAAAAAGTTGTGG-3' |
| GII α VDEL rev | 5'-CGCGGATCCTTATAACTCATCGACAACCAAAAAAAGTTGTGG-3' |
| E73A fwd | 5'-GATGCACCAGGTAATAAGC-3' |
| E73A rev | 5'-TGACCCGTCAGGGCAATCAC-3' |
| E114A fwd | 5'-GATGCAAGTCTTATTAATGC-3' |
| E114A rev | 5'-AGAACCGTCACAGCAATC-3' |
| Y462F fwd | 5'-GAGTTTTTAATCAAATGAAGAGC-3' |
| Y462F rev | 5'-ACATTTCTGAGCCTCCAGTAC-3' |
| E456Q fwd | 5'-CAGGCTCAGAAATGTGAG-3' |
| E456Q rev | 5'-CAGTACACTAACAATCTC-3' |
| R437K fwd | 5'-AAATCTGCCATTGTTACTG-3' |
| R437K rev | 5'-ATGAGGACCATTCCAGCAAC-3' |
| Q407E fwd | 5'-GAAGATTCCATTCTATTAGG-3' |
| Q407E rev | 5'-AAAAACATTTTCGTAAAACACC-3' |
| Y462F/E456Q fwd | 5'-GTGTACTGCAGGCTCAGAAATGTGAGTTTTTAATCAAATG-3' |
| Y462F/E456Q rev | 5'-CATTTTGATTAATAAACTCACATTTCTGAGCCTGCAGTACAC-3' |
| MD1 | 5'-CGGATCCCCGGGTTAATTAAGGCG-3' |
| MD2 | 5'-GAATTCGAGCTCGTTAAACACTGGATGGCGTTAGTATCG-3' |
| KanMX rev | 5'-AAACAACCTCTGGCGCATCG-3' |
| SpAlg10s 5'NC | 5'-CCAAACTTCCTGCCAACAAC-3' |
| ClonNat Fwd | 5'-CTTCGTGGTCGTCTCGTAC-3' |
| SpAlg10 3'NCa | 5'-ACCAAAAATCAACGAGCACC-3' |
| W-alg12s | 5'-GATGAAGCGGGATGACTTCT-3' |
| SpAlg9 5'NC | 5' TTCATCGTTCCGCTAGGTAC 3' |
| W-alg3s | 5'-TCACAGTAATGATTACGCTCCG-3' |
| X-KanMX-alg3a | 5'-GGGGATCCGTGCACCTGCAGCGTACGAGTAACCAGCCATAGGAACCAAG-3' |
| Y-KanMX-alg3s | 5'-GTTTAAACGAGCTCGAATTCATCGATCACATCCGACTACAGAAAACCC-3' |
| Z-alg3a | 5'-ATCAATCTGTCAATCCCCTGAG-3' |
| Spalg3s-5'NC | 5'-TACGACTTTTTGGTTAGGCG-3' |
| GII α -Nde1 fwd | 5'-GAATCCCCATATGCAAGCTCATAAACC-3' |
| GII α -Xho1 rev | 5'-CGGCGGCTCGAGTTCAGCGTCAGGGTTGCC-3' |
| CNXsNdel | 5'-GGAATTCATATGCCTGAATCCGAACAAGAACC-3' |
| CNXaXhoI | 5'-TCCGCTCGAGCTCGATGATGGTTTCAAACACTAG-3' |
| MT1 | 5'-AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG-3' |
| MP | 5'-ACGGTAGTCATCGGTCTTCC-3' |
| MM | 5'-TACGTTCAAGTAGACGTAGTG -3' |
| GII β Δ VDEL fwd | 5'-GATGAGTTATAACCCAGC -3' |
| GII β Δ VDEL rev | 5'-TGCCTCGCAGGAAGGAAATG -3' |

Tabla 3. Primers utilizados en este trabajo. Se subrayan las regiones en las que se introdujeron mutaciones a la secuencia original.

Clonados mediante sistema Gateway

Gateway (Invitrogen) es una tecnología de clonación por recombinación que se basa en la integración del bacteriófago lambda en el genoma de *E. coli* durante su ciclo lisogénico. En el presente trabajo utilizamos el kit de reacción LR que se encarga de la recombinación de los sitios *attL* presentes en los vectores de entrada con los sitios *attR* presentes en los vectores de destino, catalizando así la transferencia de un inserto del primer vector al segundo. Se realiza una mezcla de ambos plásmidos (entrada y destino), se incuban con la mezcla comercial de enzimas (LR clonase) según instrucciones del fabricante y luego se transforma una alícuota de esta reacción en bacterias *E. coli* DH5 α (Figura 11). La selección positiva se realiza mediante la resistencia de la bacteria al antibiótico presente en el vector de destino. Además es posible una selección negativa dado que los vectores de destino que no hayan recibido el inserto contienen el gen *ccdB* el cual es citotóxico para la cepa de *E. coli* transformada (67).

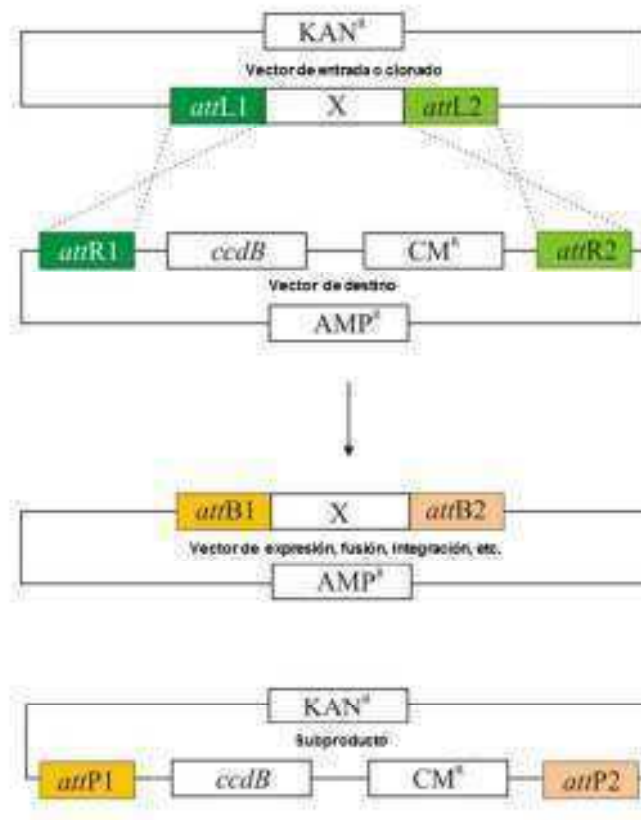


Figura 11. Esquema de la reacción de clonado por recombinación LR del sistema Gateway. El kit comercial de enzimas cataliza la reacción de recombinación mediada por los sitios *attL* y *attR* en el cual el inserto contenido en el vector de entrada se transfiere al vector de destino. Figura obtenida de la referencia 67.

Mutagénesis de GII β

Las versiones mutadas del DNA de GII β (E77A, E114A, Y462F, E456Q, R437K, Q407E y GII β Δ VDEL) fueron generadas por PCR inversa utilizando el plásmido pDONR201 (Figura 10) compatible con el sistema Gateway que contiene el clon 26/D11 (subunidad GII β de *S. pombe*, SPCC825.02) del banco de RIKEN DNA Bank como templado (72). Los fragmentos amplificados fueron fosforilados, religados y transformados a células *E. coli* JA226. Los primers utilizados fueron: E73A fwd y E73A rev, E114A fwd y E114A rev, Y462F fwd y Y462F rev, E456Q fwd y E456Q rev, R437K fwd y R437K rev, Q407E fwd y Q407E rev, y GII β Δ VDEL fwd y GII β Δ VDEL rev (Tabla 3). Se construyó además una variante de GII β con dos mutaciones utilizando los siguientes primers: Y462F/E456Q fwd y Y462F/E456Q rev. Los clones de GII β WT y mutados fueron transferidos a los vectores de expresión en *S. pombe* compatibles con el sistema Gateway pREP1-ccdB2 y pDUAL-YFH1c-ccdb2 (RIKEN). Debe aclararse que en las anteriores construcciones (utilizando el vector pREP1-ccdB2) existieron 10 aminoácidos extra río abajo de la secuencia final VDEL en el C-terminal de GII β , debido a las secuencias de recombinación de las cuales se vale el sistema.

Clonado de GII α y expresión en *S. pombe*

El gen de GII α de *S. pombe*, que carece de intrones, fue amplificado por PCR utilizando DNA genómico como templado con los primers GII α fwd y GII α rev o GII α VDEL rev (Tabla 3) para obtener GII α , o GII α con la señal de retención VDEL fusionada en el C-terminal, respectivamente. Los productos de PCR fueron luego ligados al vector de expresión en *S. pombe* pREP3x bajo el control del promotor *nmt1* (por no message in thiamine), obteniendo así las construcciones pGII α y pGII α VDEL. Estas últimas fueron electroporadas a *S. pombe* y los niveles de expresión fueron regulados con el agregado de tiamina 0,5 μ M al medio de cultivo.

Otros procedimientos con DNA

La preparación de DNA plasmídico en bacterias se realizó mediante el método de lisis alcalina que se describe en la referencia 68. Los cortes con enzimas de restricción, ligaciones, fosforilaciones y purificaciones de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa fueron realizados como se describe en la referencia 68.

Transformación de bacterias *E. coli*

Preparación de E. coli competentes: Se inocularon 5 ml de medio LB con una colonia aislada de *E. coli* y se creció 16 hs (ON) a 37°C en agitación. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 2 hs adicionales. Luego se colocó el cultivo en hielo durante 10 min y se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6.000 xg durante 3 min. Las bacterias se resuspendieron en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M, se incubó la preparación en hielo durante 30 min y se centrifugó igual que en el paso anterior. Se resuspendieron las bacterias en 5 ml de CaCl₂ 0,1 M, glicerol 15% a 4°C y se conservaron a -80°C en alícuotas de 100 µl.

Transformación: Las células fueron transformadas con 200 ng de DNA plasmídico, con un shock térmico de 1 min a 42°C seguido de 10 min en hielo, como se describe en la referencia 68.

Transformación de levaduras *S. pombe*

Preparación de S. pombe competentes: Se crecieron células de *S. pombe* en EMM hasta alcanzar una OD₆₀₀= 1. Se cosecharon las células por centrifugación a 3.000 xg durante 5 min y se realizaron dos lavados con agua y otro con sorbitol 1 M a 4°C. Finalmente se resuspendieron las células en sorbitol 1 M en un volumen 100 veces menor al del cultivo original.

Transformación: Se emplearon 40 µl de la suspensión celular, que se incubaron con 1 µg de DNA y se electroporaron a 1,5kV, 200 Ohm y 25 µF en un electroporador Biorad. Las células fueron recuperadas en 1 ml de Sorbitol 1M y se plaquearon en el medio selectivo adecuado. Cuando se transformó con el plásmido de integración pDUAL-YFH1c, se digirieron 2 µg de DNA, los cuales fueron dializados y posteriormente el volumen total se electroporó en las condiciones descriptas anteriormente.

Cruzamientos de cepas de levaduras

Las doble mutantes haploides se obtuvieron por disección de tetradas de diploides generadas por el cruzamiento de las simples mutantes indicadas (64). Las cepas se cruzaron en medio ME sólido a 28°C ON. En los casos en los que se observó esporulación, la disección de tetradas se realizó directamente a partir del medio ME. Cuando no se observó esporulación en ME, fue necesario realizar una selección de los cigotos diploides por marcadores de auxotrofías y resistencia a geneticina y/o nurseotricina en medio mínimo,

donde además se induce la esporulación. Las colonias diploides esporuladas fueron transferidas a un tubo eppendorf. Las paredes de los ascos, conteniendo las cuatro ascosporas, fueron digeridas en agua con 2 mg/ml de Zimoliasa 100T durante 5 min a temperatura ambiente y luego la disección se realizó en medio rico YEA utilizando un microscopio con micromanipulador manual (Singer Instruments Co). Las esporas se dejaron germinar a 28°C y las colonias resultantes fueron repicadas a distintos medios selectivos para analizar la resistencia a antibióticos o la adquisición de prototrofías.

La determinación del tipo de apareamiento h^+ o h^- de las mutantes de *S. pombe* obtenidas fue realizada por cruzamiento de las mismas con cepas de tipo de apareamiento conocido. El cruzamiento fue realizado en medio ME y se observó en qué casos aparecían cigotos y/o esporulación. El tipo de apareamiento fue también determinado por *colony* PCR utilizando los primers MT1, MP, y MM (Tabla 3).

Cambio de marcador de selección en el genoma de levaduras *S. pombe*

A fin de cambiar el marcador de selección de *S. pombe* mutantes $\Delta alg10::kanMX$ para posibilitar los cruces realizados para generar dobles y triples mutantes se realizó un intercambio de *cassettes* de resistencia a antibiótico en el genoma. Los primers MD1 y MD2 fueron utilizados para obtener el marcador de resistencia a nurseotricina (*NatMX6*) flanqueado por las regiones P_{TEF} y T_{TEF} mediante PCR a partir del plásmido pCR2.1-Nat (gentilmente cedido por el Dr. Toda, London Research Institute, Reino Unido, 69). Este fragmento lineal de DNA fue purificado y luego utilizado para transformar levaduras mutantes $\Delta alg10-K$ (Tabla 1, Figura 12). Las colonias resistentes a nurseotricina fueron repicadas a diferentes medios para corroborar su sensibilidad a geneticina y la resistencia a nurseotricina. La recombinación homóloga fue corroborada mediante *colony* PCR y la cepa obtenida fue denominada $\Delta alg10-N$.

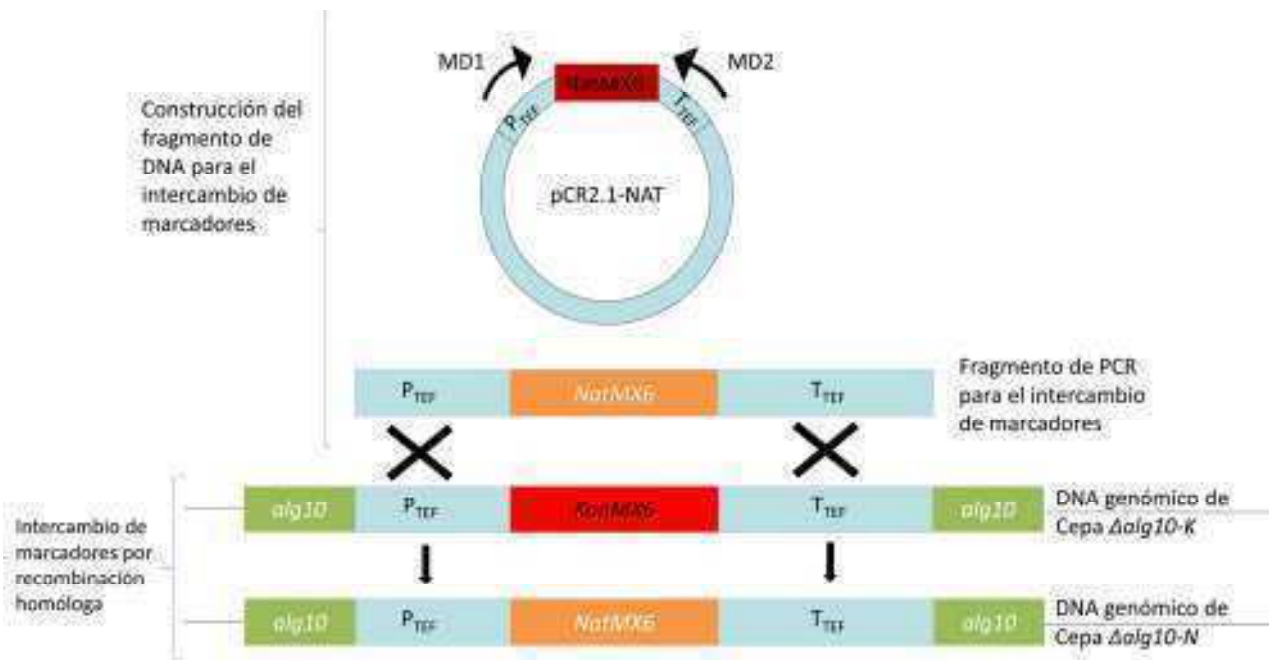


Figura 12. Estrategia empleada en el intercambio de marcadores de resistencia a antibióticos. Se construyó un fragmento de DNA conteniendo el *cassette* *NatMX6* con las regiones flanqueantes 5' P_{TEF} y 3' T_{TEF}, presentes en los marcadores de selección *KanMX6* y *NatMX6*, a partir del plásmido pCR2.1-Nat. Luego se transformaron células de *S. pombe* competentes $\Delta alg10-K$ con el DNA obtenido y se seleccionaron por su resistencia a nurseotricina.

Obtención de *S. pombe* mutantes que transfieren glicanos truncados

Producción de cepas: Para determinar la influencia de los residuos de Man sobre la actividad de GII, GI y UGGT *in vivo* se construyeron mutantes de *S. pombe* que durante la *N*-glicosilación transfieren oligosacáridos con diferente cantidad de Man y Glc (G3-0M9, G3-0M7, G3-0M6 o G3-0M5). Las cepas $\Delta alg10$, $\Delta alg12$ y $\Delta alg9$, ($\Delta alg12$, no forma la rama C del oligosacárido; $\Delta alg9$, no forma la rama C ni completa la rama B del oligosacárido y $\Delta alg3$, no forma las ramas C ni B del oligosacárido, Figura 2) que transfieren glicanos de composición G2M9, G3M7 y G3M6 respectivamente, fueron obtenidas en la compañía Bioneer (Daejeon, Korea). La mutante *S. pombe* $\Delta alg6$, que transfiere M9, fue obtenida como en la referencia 70, pero en el contexto genético Sp61. La obtención de la cepa *S. pombe* $\Delta alg3$, que transfiere G3M5, se describe en la referencia 71.

La cepa de *S. pombe* $\Delta alg10$ (h^+ , Tabla 1) fue apareada con la cepa *ADm* (h^-) para luego obtener la cepa $\Delta alg10-K$. De este modo se intercambi6 el sexo de la levadura para poder cruzarla con otras cepas de interés. Posteriormente se realizó el intercambio del marcador de Geneticina por el de Nurseotricina para obtener la mutante $\Delta alg10-N$, como se describe más arriba. Las mutantes $\Delta alg10$ así obtenidas se cruzaron con las mutantes que

no pueden completar la síntesis de las ramas B y/o C del glicano. Así, las dobles mutantes $\Delta alg10/\Delta alg12$ transfieren G2M7, las dobles mutantes $\Delta alg10/\Delta alg9$ transfieren G2M6 y las dobles mutantes $\Delta alg10/\Delta alg3$ transfieren G2M5 durante la *N*-glicosilación a las proteínas que emergen del translocón. Cada una de estas cepas fue cruzada, posteriormente, con la cepa $\Delta GII\beta$ para obtener dobles y triples mutantes que transfieren glicanos truncados diglucosilados con distinto contenido de Man y que además carecen de la subunidad $GII\beta$.

Los cruzamientos que produjeron cepas que transfieren oligosacáridos completamente deglucosilados con distinto contenido de Man ($\Delta alg6/\Delta alg12$: M7, $\Delta alg6/\Delta alg9$: M6 y $\Delta alg6/\Delta alg3$: M5) se detallan en la referencia 71.

Verificación de Cepas: En todos los casos se buscaron los clones capaces de crecer en presencia de Nurseotricina (genotipo $\Delta alg10::NatMX6$) y en presencia de Geneticina (genotipos $\Delta alg12::KanMX4$, $\Delta alg9::KanMX4$ o $\Delta alg3::KanMX6$) (Figura 13). Los genotipos de interés fueron también verificados por *Colony* PCR y PCR a partir de DNA purificado a partir de cultivos de los clones de interés utilizando primers específicos (Figuras 12 y 13 y Tabla 3) como se describió. Para el caso de las triples mutantes $\Delta alg10/\Delta GII\beta$, $\Delta alg10/\Delta alg12/\Delta GII\beta$, $\Delta alg10/\Delta alg9/\Delta GII\beta$, y $\Delta alg10/\Delta alg3/\Delta GII\beta$, la selección se realizó como se detalla anteriormente pero además seleccionando el crecimiento auxotrófico en ausencia de uracilo en el medio de cultivo. Los siguientes primers (Tabla 3) fueron utilizados para verificar los genotipos de las cepas: para $\Delta alg10::KanMX4$, SpAlg10s 5'NC y KanMX rev; para $\Delta alg10::NatMX6$, ClonNat Fwd y SpAlg10 3'NCa; para $\Delta alg12::kanMX4$, W-*alg12s* y KanMX rev; para $\Delta alg9::kanMX4$, *alg9s* 5'NC y KanMX rev; para $\Delta alg6::ura4+$, los primers fueron descritos en la referencia 71.

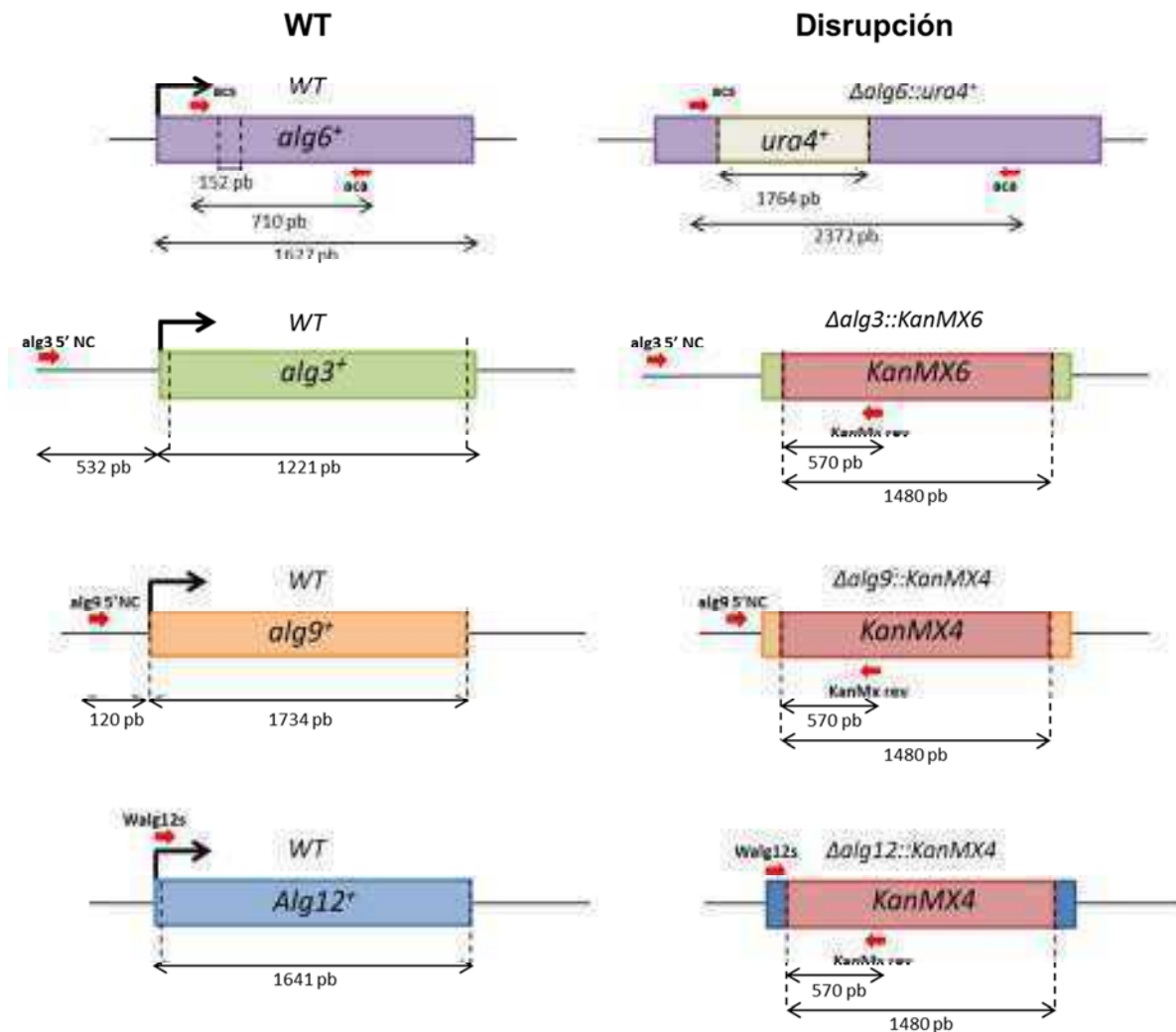


Figura 13. Esquema de los genes *alg* WT y sus disrupciones. *KanMX4* y *KanMX6*, cassettes de resistencia a Geneticina con promotor y terminador de la transcripción funcionales en *S. pombe*; *ura4+*, gen de uracilo WT. Se muestran los primers que fueron utilizados en la corroboración de los genotipos correspondientes. El gen mutante *alg 10* se describe en la Figura 12. Figura obtenida de la tesis de licenciatura en Cs. Biológicas de Solana Alculumbre, FCEN, UBA.

Expresión de una proteína de fusión de copia única en *S. pombe*

Para determinar la localización subcelular de $GII\beta$ y variantes mutantes de $GII\beta$ utilizamos el plásmido pDUAL-YFH1c (Figura 10). Este plásmido es capaz de integrarse en el locus del gen *leu1* restaurando la capacidad de biosintetizar leucina de mutantes *leu1-32* e integrando al genoma una única copia del gen de interés fusionado a la YFP en su C-terminal (Figura 14). Luego de clonar el gen de interés en el vector, la construcción es digerida con enzimas de restricción y el fragmento lineal es transformado a las levaduras electrocompetentes como se describe en la referencia 72. La correcta integración del plásmido al genoma de *S. pombe* fue corroborada mediante PCR.

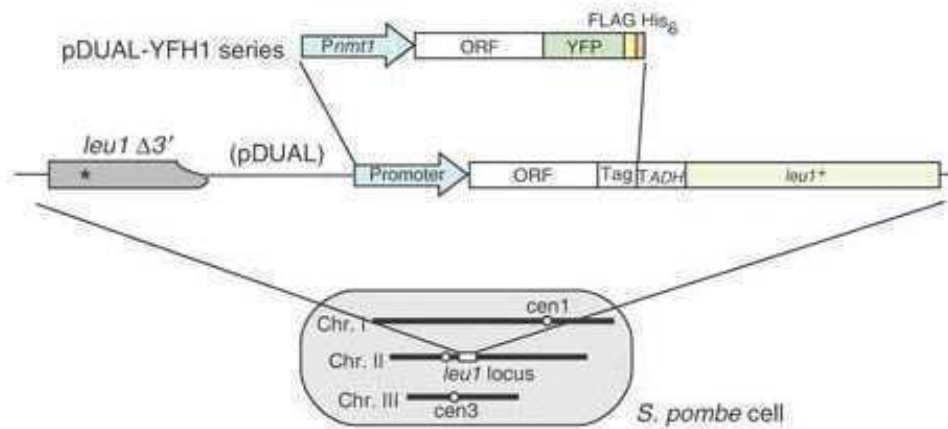


Figura 14. Integración en el genoma de *S. pombe* de una copia de GII β -YFP. Esquema de la integración del gen de interés al locus *leu1* en *S. pombe*. Figura modificada a partir de la referencia 72.

Preparación de extractos proteicos de *S. pombe*

Los extractos proteicos totales de *S. pombe* fueron preparados a partir de 20 ml de cultivo en fase exponencial a OD₆₀₀= 2. Las células se cosecharon, lavaron con agua y se resuspendieron en Tritón X-100 1%, Hepes 0,1 M pH 7,2 y EDTA 5 mM en presencia de inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 μ M, *L*-1-tosilamida-2-feniletíl-clorometilcetona (TPCK) 10 μ M, *N* α -*p*-tosil-*L*-lisina clorometil cetona (TLCK) 10 μ M, leupeptina 10 μ M, pepstatina 10 μ M y E64 10 μ M). Se rompieron mediante 10 ciclos repetitivos de vortex por 1 min y hielo por 1 min con bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. El lisado fue centrifugado a 20.000 xg durante 20 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante.

La determinación de la concentración proteica del extracto obtenido se realizó por el ensayo BioRad Protein Assay como describe el fabricante.

Preparación de fracciones celulares enriquecidas en RE

La preparación de fracciones microsomales de *S. pombe* (enriquecidas en RE) se realizó como se describió en la referencia 19. Brevemente, se partió de 250 ml de cultivo de *S. pombe* en fase exponencial, las células fueron cosechadas por centrifugación a 3.000 xg durante 5 min, luego lavadas con NaN₃ 5 mM y centrifugadas nuevamente. El pellet se resuspendió en 2 ml/g de pellet de Solución A (sacarosa 0,25 M, imidazol 20 mM, EDTA 5 mM pH 8) en presencia de los inhibidores de proteasas descritos más arriba. Para la

ruptura de las células se agregó un volumen de bolitas de vidrio y se realizaron 10 ciclos de ruptura agitando durante 1 min con vortex e incubando en hielo 1 min. El homogenato fue centrifugado a 4.000 xg durante 10 min a 4°C. Se guardó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en Solución A con inhibidores de proteasas y se repitieron los 10 ciclos de ruptura. Se centrifugó a 4.000 xg durante 10 min a 4°C, se juntaron ambos sobrenadantes y la muestra se ultracentrifugó a 100.000 xg durante 1 h a 4°C. Las fracciones microsomales (pellet) fueron resuspendidas en Solución A con ayuda de una espátula y homogeneizadas con pipeta de punta ancha para preservar la integridad de las membranas. La cuantificación de la concentración proteica se realizó por el ensayo BioRad Protein Assay.

El contenido soluble del RE de *L. mexicana* fue preparado mediante el congelado-descongelado de los parásitos como fue previamente descrito para *Trypanosoma cruzi* (73).

Marcación de *S. pombe* y análisis de oligosacáridos formados *in vivo*

Para analizar la composición de los glicanos presentes en las glicoproteínas del RE se partió de 250 ml de cultivo de *S. pombe*. Las células fueron cosechadas en fase exponencial y lavadas 3 veces con 40 ml de medio YNB 1% sin Glc y resuspendidas en 2 ml/g del mismo medio. Las células fueron luego preincubadas durante 5 min con DTT, agente reductor, que previene la salida del RE de las glicoproteínas. La marcación se realizó con un pulso de 15 min a 28°C en Glc 5 mM con [¹⁴C]Glc 300 Ci/mol. La incorporación total de la marca en los N-glicanos fue lineal durante el tiempo de incubación. La reacción fue detenida por el agregado de 10 ml de ácido tricloroacético 10% (TCA). En experimentos de pulso y caza, la concentración de DTT fue aumentada a 10 mM y se agregó cicloheximida (CHX) 25 mg/L. La incubación fue detenida luego de 30 min a 28°C.

Para la obtención y purificación de los oligosacáridos marcados Endo H sensibles los precipitados de TCA obtenidos luego de la marcación fueron resuspendidos en 1 ml de agua y se realizaron los siguientes pasos de lavado: agua:metanol (33:67), metanol, metanol:ClCH (33:67), metanol, agua:metanol (33:67) y un último lavado con agua. Las glicoproteínas desnaturalizadas se incubaron ON a 37°C con pronasa (punta de espátula) en 3 ml de buffer Tris-HCl 0,15 M pH 8,0, CaCl₂ 5 mM. Se centrifugó a 4.000 xg durante 5 min y los sobrenadantes fueron concentrados a 1 ml por calor bajo flujo de aire o N₂. Los glicopéptidos se desalaron por pasaje a través de una columna Sephadex G-10 de 1,2 x 57 cm equilibrada en 2-propanol 7%. El pico eluido en el V₀ de la columna, donde se encuentran los glicopéptidos, fue sometido a electroforesis en papel en ácido fórmico 10% durante 2,5 hs a 25 V/cm. El pico cargado positivamente, donde se encuentran los oligosacáridos unidos al

residuo de Asn, migra hacia el cátodo durante la corrida. El papel fue seccionado en tiras de 1 cm, cada fracción contada con líquido de centelleo (tolueno + PPO (2,5-difeniloxazol) + POPOP (1,4-bis(5-feniloxazol-2-il) benceno) en un contador Wallac 1214 RackBeta y las fracciones conteniendo el pico radiactivo cargado positivamente fueron eluidas del papel con agua. Los eluidos fueron concentrados y tratados con 0,01 unidades de Endo H en 0,3 ml de buffer trietilamina-acetato 75 mM pH 5,5 durante 16 hs a 37°C. Esta enzima hidroliza el oligosacárido en la unión β 1,4 presente entre los dos residuos de GlcNAc (Figura 2). Las muestras fueron sometidas a una electroforesis en papel igual a la anterior. Los oligosacáridos Endo H sensibles neutros no migran durante la corrida por lo que en este caso las fracciones eluidas fueron las que se encontraban en el origen de siembra

En la cepa que lleva la mutación $\Delta alg3$, que transfiere M5, las proteínas totales de las células fueron degradadas con tripsina porcina en lugar de pronasa y la remoción de los *N*-glicanos se realizó con 5 mU de *N*-glicanasa. Esto se debe a que los glicanos conteniendo cinco residuos de Man son resistentes al tratamiento con Endo H. Además, para la actividad de *N*-glicanasa es necesario que la Asn a la que se encuentra unido el glicano se encuentre sustituida por aminoácidos en los grupos amino y carboxilo.

Los glicanos fueron separados por cromatografía en papel descendente usando papel Whatman 1 y como solvente *n*-propanol:nitrometano:agua (5:2:4). Los glicanos fueron identificados por estándares corridos en paralelo. Para la obtención de una mayor resolución, los glicanos identificados se eluyeron del papel con agua y se resolvieron por HPLC como se describe más adelante.

Resolución de glicanos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La resolución de las muestras de glicanos se llevó a cabo mediante una columna TSK-GEL Amido-80 de 4,6 mm x 25 cm (Tosoh Bioscience) donde la separación se produce por la polaridad de las especies. Como fase móvil se utilizó H₂O:CH₃CN en un gradiente lineal de 35:65 a 55:45 en 67 min, a un flujo de 0,75 ml/min a temperatura ambiente. Se recolectaron muestras de 1 ml, las cuales fueron secadas por evaporación en una Speed Vac hasta obtener un volumen de 0,1 ml. A estas muestras se les agregó 500 μ l de Optiphase Hisafe (PerkinElmer) y se contaron en un contador Wallac 1214 RackBeta. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC y degaseados previo a su uso.

Síntesis de *N*-glicanos marcados radioactivamente

El sustrato de GII [^{14}C]Glc₂Man₉GlcNAc (G2M9) marcado en Glc y Man fue obtenido por la marcación *in vivo* y purificación de *N*-glicanos de la cepa de *S. cerevisiae* G11M-36, como se describe en la sección anterior. El sustrato [^{14}C -Glc]Glc₁Man₉GlcNAc (G1M9) se obtuvo por glucosilación de tiroglobulina bovina desnaturalizada en presencia de UDP-[^{14}C]Glc y microsomas purificados de hígado de rata como se describió en la referencia 17. Estos microsomas son una fuente de UGGT que transfiere un residuo de Glc a los *N*-glicanos presentes en la tiroglobulina desnaturalizada. Luego de la reacción se purificó el glicano como se describió en las secciones anteriores para oligosacáridos Endo H sensibles y previamente en las referencias 17 y 74.

Los *N*-glicanos [^{14}C]Glc₂Man₄₋₅GlcNAc (G2M5) y [^{14}C]Glc₁Man₄₋₅GlcNAc (G1M5) fueron obtenidos por tratamiento con Jack bean α -manosidasa de los glicanos mencionados previamente.

Para el experimento de actividad GII de *L. mexicana* los oligosacáridos marcados en Glc y Man [^{14}C]Glc₁Man₉GlcNAc (G1M9) y [^{14}C]Glc₁Man₆GlcNAc (G1M6) fueron obtenidos luego de la marcación *in vivo* y purificación de *N*-glicanos de células de *S. pombe* mutantes $\Delta alg6$ o $\Delta alg6/\Delta alg9$. Las levaduras fueron preincubadas con NMDNJ 5 mM durante 60 min y con DTT 5 mM por 5 min y luego incubadas durante 45 min en Glc 5 mM conteniendo 500 μCi de [^{14}C]Glc. Los glicanos monoglucosilados Endo H sensibles G1M9 y G1M6 fueron separados de los compuestos no glucosilados mediante dos cromatografías en papel sucesivas en el solvente *n*-propanol:nitrometano:agua (5:2:4). La marca en residuos de Glc resultó ser de 27% y 35% del total de G1M9 y G1M6 respectivamente determinado por hidrólisis ácida total de los glicanos seguida por una cromatografía en papel en el solvente *n*-butanol:piridina:agua (10:3:3).

Ensayos de actividad GII

Sustrato pNPG: La actividad GII fue determinada en extractos proteicos totales de levaduras *S. pombe*, fracciones microsomales de *S. pombe* o *L. mexicana* o preparaciones de GII purificada a partir de hígado de rata, utilizando pNPG o glicanos marcados radioactivamente como sustratos. Para los experimentos con pNPG como sustrato se desarrolló un ensayo en placa de 96 pocillos, en el cual las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 50 μl conteniendo pNPG 5 mM, buffer HEPES 0,1 M pH 7,2 durante 20 min a 37°C utilizando 125 μg de proteína de extractos totales o de microsomas de *S. pombe*,

o 0,5 µg de GII pura de rata. Las reacciones fueron detenidas con el agregado de 20 µl de SDS 10% y 50 µl de Tris base 2 M. La hidrólisis fue cuantificada midiendo la absorbancia de las muestras a 405 nm en un lector de placas Multimode Detector DTX 880 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (Figura 15). Determinamos que el valor de Km para la GII de *S. pombe* respecto de pNPG resulto ser de ~4 mM.

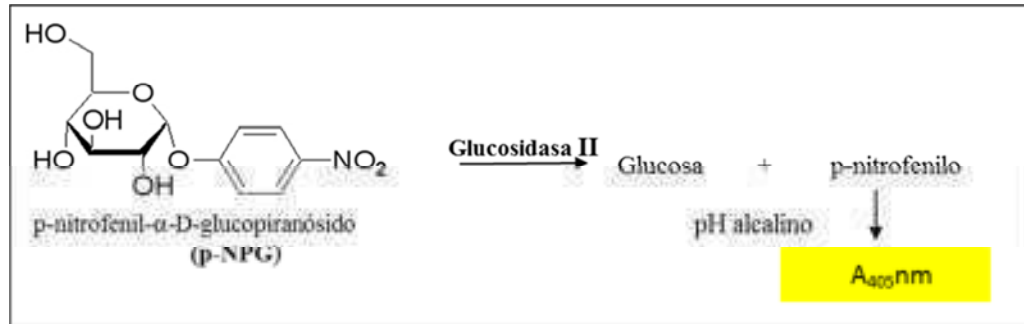


Figura 15. Estructura y reacción de hidrólisis del pNPG por GII. La GII produce la hidrólisis del enlace entre el grupo nitrofenilo y la Glc. La liberación del grupo aromático a un medio básico produce un color amarillo en el medio, cuya intensidad es proporcional a dicha liberación. De tal modo la reacción se monitorea mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm.

Sustratos Fisiológicos: La actividad de GII utilizando como sustratos glicanos marcados radioactivamente, fue medida en microsomas de levadura y de *L. Mexicana* así como en GII purificada a partir de hígado de rata. Se incubaron las concentraciones indicadas de proteína con los sustratos en buffer fosfato de sodio 40 mM pH 7,2 durante 15 min a 30°C. En este caso se utilizaron 125 µg de fracción microsomal de *S. pombe* o *L. mexicana* o 0.1 µg de proteína GII pura de rata. Las reacciones fueron detenidas por el agregado de 50 µl de metanol e incubadas a 65°C por 5 min. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 14.000 xg, quedando los glicanos solubles en el sobrenadante. La Glc marcada radiactivamente liberada por GII se separó del sustrato remanente, por cromatografía en papel ascendente usando como solvente 2-propanol:ácido acético:agua (25:4:9) y papel Whatman 1 en tiras de 2,5 x 12 cm. Durante la corrida, la Glc asciende quedando los glicanos en la línea de siembra.

En los experimentos de actividad en microsomas de *L. mexicana* se agregó 1-deoximanojirimicina 1 mM con o sin NMDNJ 1 mM.

Cálculos de Actividad GII: La actividad de GII se determinó como el porcentaje de Glc liberada respecto del total. Dicho total corresponde a la suma de la marca en el origen más la marca de Glc que migra. Cuando se utilizó el sustrato G1M9 el único residuo marcado era la Glc, de modo tal que el 100% de la radioactividad se corresponde con la marca total que se

detecta. En la reacción se utilizaron 2.000 cpm del sustrato. Basándonos en la radioactividad específica dichas cuentas de UDP- ^{14}C Glc (300 Ci/mol) usados para la síntesis de G1M9, se calculó que la concentración final de este sustrato en el ensayo fue de 0,06 μM . La concentración de G2M9 utilizada en el ensayo fue de 10 μM . Ambos valores calculados están por debajo de los valores de K_m para GII por glicanos (~80 μM para la GII de mamíferos). Para glicanos marcados en Glc y Man (G2M9, G2M5, G1M9 y G1M6), el 100% de la radioactividad corresponde a la marca sólo de unidades de Glc. Para determinar el porcentaje de Glc marcada radioactivamente se realiza una hidrólisis ácida total de los glicanos, en donde se logran separar las unidades de Glc y Man marcadas. Para el sustrato G2M9 la marca de Glc fue del 33% de la marca total, mientras que para G2M5 resultó ser del 38%. En los glicanos G1M9 y G1M6 utilizados para los experimentos de actividad en *L. mexicana* el porcentaje de marca de Glc fue de 27% y 35% respectivamente.

Purificación de GII de hígado de rata y proteólisis de la subunidad GII β

La purificación de GII fue realizada como se describió previamente (26). La subunidad GII β de rata purificada fue proteolizada específicamente del heterodímero como se describió en la referencia 32, con mínimas modificaciones. Brevemente, 10 μg de GII purificada fueron incubados durante 5 min a 25°C con quimotripsina en una relación proteasa:GII de 1:500 en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0. La reacción fue detenida por la adición de PMSF 1 mM. Como controles se realizaron experimentos sin proteasa o sólo con PMSF. La proteólisis fue monitoreada mediante SDS-PAGE 9%.

Ensayos de complementación en trans de actividad de GII α por GII β

Dado que GII β no posee una actividad enzimática conocida *per se*, su funcionalidad fue determinada por su habilidad o no de complementar la capacidad de la subunidad GII α para hidrolizar sustratos fisiológicos (G1M9). Se utilizaron 125 μg de proteínas de fracciones microsomales de *S. pombe* conteniendo GII α pero no GII β (células $\Delta\text{GII}\alpha\beta$ transformadas con pGII α VDEL), 125 μg de microsomas *S. pombe* que solo contenían variantes de GII β pero no GII α (Ej.: mutantes $\Delta\text{GII}\alpha$ +pREP3x) o una mezcla de ambos. Se preincubaron las cantidades de proteína indicadas en presencia de lubrol 0,4%, en buffer fosfato 40 mM pH 7,2, Tritón X-100 1%, en un volumen final de 50 μl durante 30 min a 4°C. Luego se ensayó la actividad de GII sobre el sustrato G1M9 durante 20 min a 30°C para evaluar la habilidad de GII β de restaurar la capacidad de GII α de procesar los *N*-glicanos. Las reacciones de actividad GII fueron realizadas y cuantificadas como se describe previamente.

Producción de anticuerpos policlonales

Producción de suero anti-GII α . El suero policlonal de ratón anti-GII α de *S. pombe* se obtuvo de la siguiente manera: un fragmento de 1030 pb del DNA que codifica parte de GII α fue amplificado por PCR utilizando DNA genómico de *S. pombe* como templado (obtenido como se describió más arriba) utilizando los primers GII α -Nde1 fwd y GII α -Xho1 (Tabla 2). El fragmento se clonó en el plásmido pET22b(+) y se expresó en bacterias *E. coli* BL26 como una proteína de fusión a un Tag de 6X-His en su extremo C-terminal. Luego de la inducción con IPTG 1 mM a 37°C durante 4 hs, se verificó la expresión de la proteína recombinante por electroforesis en SDS-PAGE 10%. Se preparó extracto proteico de bacterias por sonicado de las mismas en buffer de binding (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 0,5 M, imidazol 5 mM) adicionado con inhibidores de proteasas, Tritón X-100 0,5% v/v, lisozima (punta de espátula) y urea 8M. Las muestras fueron purificadas por afinidad en una columna IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography, Chelating Sepharose, General Electric) precargada con NiCl₂. Se sembró el extracto proteico obtenido y la columna fue lavada con 10 volúmenes del buffer de binding conteniendo urea 8 M y luego con 10 volúmenes de buffer de lavado (igual al buffer de binding pero con imidazol 60 mM) conteniendo urea 8 M. Estos lavados permiten limpiar de la columna el material unido de forma inespecífica. La elución de la proteína se realizó con buffer de elución (buffer de Binding con Imidazol 1M) suplementado con urea 8 M. Se monitoreó la purificación por SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras y las fracciones conteniendo la proteína fueron dializadas contra buffer fosfato 50mM pH7,4, NaCl 10 mM, en sucesivos pasos con concentraciones decrecientes de urea (8, 4, 2 y 0 M) a 4°C. Se centrifugó y verificó por SDS-PAGE del sobrenadante que la proteína se mantuviera en la fracción soluble luego de la diálisis. Se inyectaron intradérmicamente 7,5 μ g de la proteína dializada en ratones BALb/C y se realizaron dos inoculaciones más de 5 μ g cada una a los 15 y 30 días. Se analizó la especificidad del suero de 10 ratones y se juntaron los sueros de los ratones que reconocieron a la subunidad GII α tanto en extractos totales como microsomales de *S. pombe*.

Producción de suero anti-CNX: Para la producción del suero anti-CNX producido en conejo, se clonó una variante soluble de la proteína CNX (sin el péptido señal y sin el fragmento transmembrana) de *S. pombe*. Se expresó y purificó como se describió previamente para GII α , utilizando los primers CNXsNde1 y CNXaXho1 (Tabla 3) para amplificar el producto de PCR. Los conejos fueron inmunizados con 100 μ g de Cnx1p recombinante y se dieron tres refuerzos de 50 μ g cada uno a las semanas 2, 4 y 6 (75). Solo

un suero de los tres conejos utilizados reconoció a CNX en extractos totales y microsomales de *S. pombe*.

Inmunodetecciones

Se resolvieron 250 µg de extractos proteicos microsomales por SDS-PAGE 9%. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas ImmobilonP (Millipore) de PVDF (polifluoruro de vinilideno) a 100 mA durante 1 h. Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBST (Tris-HCl 50 mM pH7,6, NaCl 300 mM, Tween 20 0,1%) conteniendo leche 3%. Las membranas fueron luego incubadas con un anticuerpo policlonal de ratón anti-CNX (1:100.000), con un suero policlonal de ratón anti-GIIα (1:1.000) o con un suero policlonal de ratón anti-GIIβ descrito en la referencia 71 (1:1.000) en TBST con 3% leche. Como anticuerpos secundarios se utilizaron sueros de cabra anti-ratón (1:5.000) o anti-conejo (1:30.000) conjugados a peroxidasa de rabanito (HRP) (Sigma). Las reacciones fueron detectadas por quimioluminiscencia con el sustrato West Pico SuperSignal (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Microscopía Confocal

Para la determinación de la localización subcelular de GIIβ o sus variantes mutadas se utilizó microscopía de fluorescencia confocal. Levaduras creciendo en fase exponencial fueron fijadas con *p*-formaldehído 4% y luego colocadas sobre portaobjetos previamente tratados con polilisina. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal LSM510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo plan Apochromat 63X/1.4. La adquisición de imágenes se realizó mediante el software LSM (Carl Zeiss).

RESULTADOS

La subunidad GII β no es requerida para el plegamiento y/o maduración de GII α pero sí para su localización subcelular en el RE

Con el fin de analizar si en la levadura *S. pombe* GII β está involucrada en el plegamiento o actividad de GII α , comparamos la actividad GII en microsomas enriquecidos en RE con la de extractos proteicos totales, tanto de *S. pombe* WT como de mutantes carentes de la subunidad GII α (Δ GII α) o de la subunidad GII β (Δ GII β) (Tabla 1). Para determinar la actividad se utilizó el análogo de sustrato colorimétrico pNPG (Figura 15). Como se observa en la Figura 16 las levaduras Δ GII α tuvieron una actividad casi indetectable tanto en extractos celulares totales como en fracción microsomal, mientras que en las células Δ GII β se observó una gran actividad en extractos totales y una muy baja actividad en microsomas. Se puede concluir, por lo tanto, que GII β no se requiere para el plegamiento o maduración de GII α ni para su actividad catalítica respecto del sustrato pNPG. Las condiciones experimentales utilizadas aseguraron que la actividad detectada fue esencialmente la de GII dado que: 1) el sustrato utilizado (pNPG) no es hidrolizado por GI, 2) la adición de NMDNJ 5 mM (un inhibidor de la actividad GII) abolió la actividad por completo, 3) se obtuvieron resultados similares cuando los ensayos fueron realizados en condiciones en las cuales las glucosidasas vacuolares (lisosomales) son inactivas y/o inestables (pH 8.0) (76) y 4) no se detectó actividad en extractos totales o microsomas de levaduras Δ GII α .

La actividad GII se ve significativamente reducida en la fracción microsomal de células Δ GII β (Figura 16 B) respecto de extractos proteicos totales, sugiriendo que GII β está involucrada en la localización de GII α en el RE. Un resultado inesperado fue el aumento de la actividad GII α en extractos totales de células carentes de GII β . Dicho resultado aún no fue explicado, pero postulamos que GII α no es retenida en el RE y queda asociada a la pared celular en el espacio periplásmico, siendo muy fácilmente liberada en el proceso de preparación del extracto proteico total.

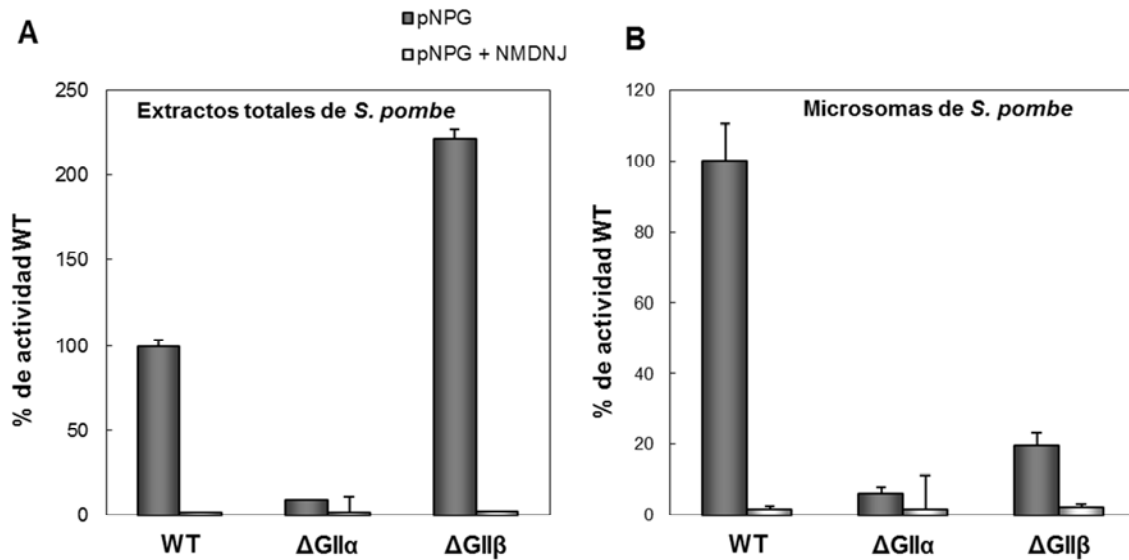


Figura 16. GII β no es necesaria para la actividad catalítica de GII α pero si para su retención en el RE. La actividad GII fue medida en extractos celulares totales y en fracciones microsomales. Se incubaron 125 μ g de extractos proteicos totales de *S. pombe* (A) o de fracciones microsomales (B) de levaduras WT, $\Delta GII\alpha$, o $\Delta GII\alpha\beta$ con pNPG 5 mM durante 20 min a 37°C. Las reacciones fueron detenidas con 20 μ l de SDS 10% y 50 μ l de Tris base 2 M. La absorbancia fue medida a 405 nm. La actividad se tomó relativa a la actividad de extractos totales (A) o de fracción microsomal (B) de levaduras WT.

La señal de retención VDEL presente en GII β es suficiente para la localización de GII α en el RE

Con el fin de indagar más en el rol de GII β en la retención de GII α en el RE, expresamos GII α con (GII α VDEL) o sin (GII α) la señal de retención/recuperación en RE presente en el C-terminal de GII β (VDEL) en levaduras *S. pombe* $\Delta GII\alpha$ y en doble mutantes carentes simultáneamente de GII α y GII β ($\Delta GII\alpha\beta$). Utilizamos el vector de expresión pREP3x que dirige la expresión bajo el control del promotor *nmt1*, el cual se reprime con el agregado de tiamina al medio de cultivo. Dado que la total ausencia de tiamina resulto en expresiones muy altas que resultaron tóxicas para el crecimiento celular, pusimos a punto la concentración a utilizar para tener niveles de expresión detectables sin comprometer la viabilidad. Determinamos que una concentración de tiamina de 0,5 μ M es óptima para niveles de expresión de GII α compatibles con el crecimiento celular normal. Esta concentración además produjo niveles de actividad GII similares para las construcciones GII α y GII α VDEL (Figura 17), indicando que el agregado del tetrapéptido no modifica la actividad enzimática.

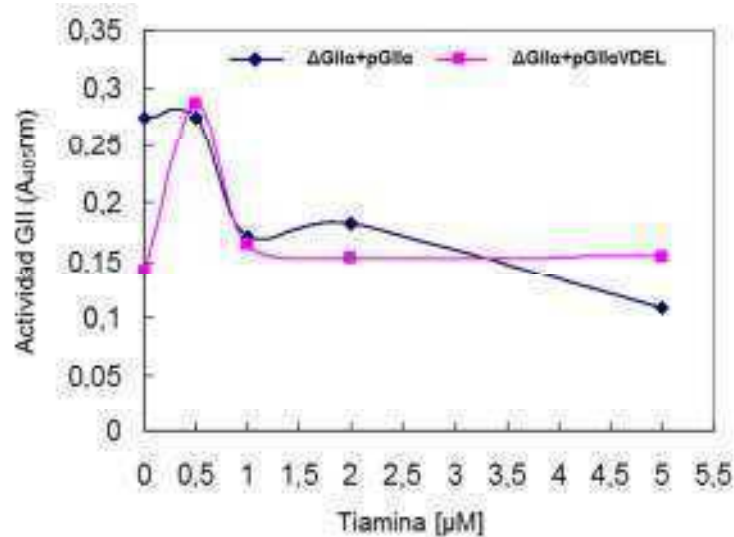


Figura 17. El agregado del tetrapéptido VDEL a GII α no modifica su actividad enzimática. Se incubaron 125 μ g de fracciones microsomales de levaduras Δ GII α que expresaban pGII α o pGII α VDEL con pNPG 5 mM durante 20 min a 37°C. Las reacciones fueron detenidas con 20 μ l de SDS 10% y 50 μ l de Tris base 2 M. La absorbancia fue medida a 405 nm.

Como se puede observar en la Figura 18 A, fracciones microsomales de mutantes Δ GII α (que poseen GII β endógena) que expresaban GII α presentaron niveles de actividad similares a los que expresaban GII α VDEL. En cambio, a pesar de que hubo niveles más bajos de actividad en las levaduras doble mutantes Δ GII $\alpha\beta$ que expresan ambas variantes de GII α , una actividad más alta fue detectada en el caso de microsomas de doble mutantes que expresaban GII α VDEL (Figuras 18 A y 18 C) respecto de las que expresaban GII α , alcanzando niveles similares a aquellos observados para células *WT*. En todos los casos la actividad GII fue medida utilizando pNPG como sustrato y no se observó actividad alguna en presencia del inhibidor de GII NMDNJ (datos no mostrados).

Para determinar si los mayores niveles de actividad GII presentes en las levaduras Δ GII $\alpha\beta$ expresando GII α VDEL respecto de las que expresan GII α correlaciona con una mayor retención de GII α en el RE realizamos una inmunodetección de GII α en fracciones microsomales. Como se puede observar en la Figura 18 B los niveles de expresión de GII α presentes en microsomas, determinados por Western blot, correlacionan con las determinaciones de actividad (Figura 18 A). La cinética de la reacción de GII respecto del pNPG se muestra en la Figura 18 C, siendo más rápida para las levaduras que expresan el plásmido que contiene GII α VDEL. Se puede concluir que GII β participaría en la localización subcelular de GII a través de su motivo de retención VDEL, dado que su adición a GII α mejora significativamente la retención en el RE.

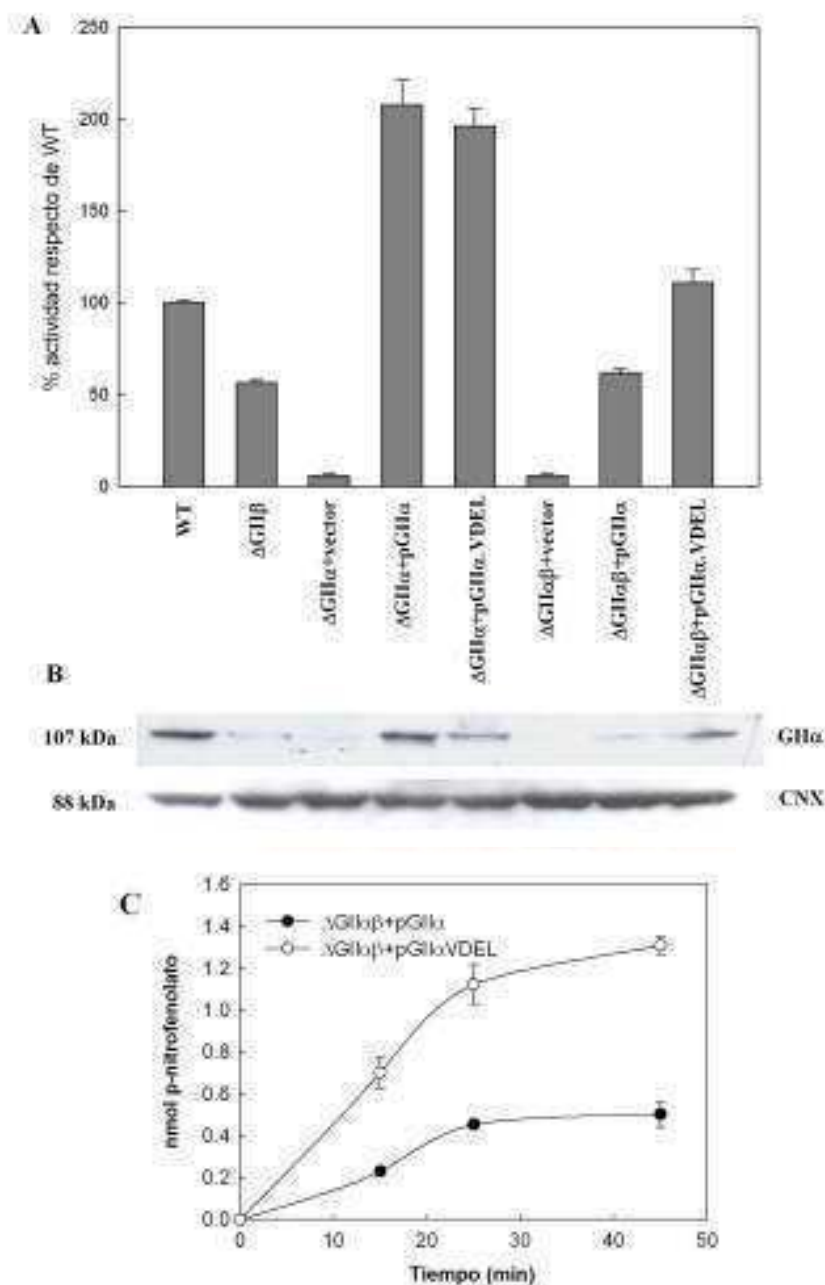


Figura 18. Rol del tetrapéptido VDEL en la localización de GII α en el RE. (A y C) La actividad GII fue medida incubando 125 μ g de proteínas microsomales de levaduras *S. pombe* WT, o mutantes $\Delta GII\alpha$, $\Delta GII\beta$ o $\Delta GII\alpha\beta$ transformadas con el vector de expresión vacío o con las construcciones pGII α o pGII α VDEL con pNPG durante 20 min a 37°C. (B) Inmunodetección de GII α en fracciones microsomales de las levaduras analizadas en el panel A. Se sembraron 250 μ g de proteínas microsomales en cada calle, se resolvieron en SDS-PAGE 9% y transfirieron a PVDF como se indica en Materiales y Métodos. La membrana fue revelada utilizando sueros policlonales anti-GII α de ratón (1:1.000) y anti-CNX de conejo (1:100.000). Los anticuerpos secundarios desarrollados en cabra acoplados a HRP fueron anti-IgG de ratón o de conejo, 1:5.000 y 1:30.000, respectivamente. Las reacciones fueron detectadas por quimioluminiscencia.

Existen elementos adicionales en GII α y/o GII β para la retención de GII α en el RE

El hecho de que si bien hay una disminución importante (>50%) en la retención de GII α en el RE en ausencia de GII β , esta no es total (Figura 18), sugirió que podía existir algún elemento adicional en GII α y/o GII β responsable de dicha actividad remanente. Con el fin de determinar si el tetrapéptido de retención VDEL presente en GII β es el único elemento de GII β involucrado en la localización en el RE del heterodímero expresamos GII β removiendo dicha señal de su secuencia (pGII β Δ VDEL) en levaduras *S. pombe* Δ GII β y Δ GII $\alpha\beta$. Se analizaron mediante inmunodetección los contenidos de las subunidades GII α y GII β (Se reveló CNX, proteína residente del RE, como control de carga) en fracciones microsomales de las levaduras transformadas con pGII β y pGII β Δ VDEL. No se observaron diferencias en los niveles de GII α y GII β en presencia o ausencia del elemento de retención VDEL en GII β (Figura 19), por lo que se pudo concluir que la señal VDEL presente en GII β no es el único elemento de GII β involucrado en la localización subcelular del heterodímero, y que existen elementos adicionales en GII α y/o en GII β que contribuyen a la retención del heterodímero soluble en el RE de *S. pombe*. El hecho de que en ausencia total de GII β exista una pequeña actividad GII α residual, que además correlaciona con los niveles de GII α en RE evidenciados por Western Blot sugiere que o bien GII α en tránsito es responsable de dicha actividad residual (Figura 16) o que hay un elemento en GII α que contribuye parcialmente a su localización.

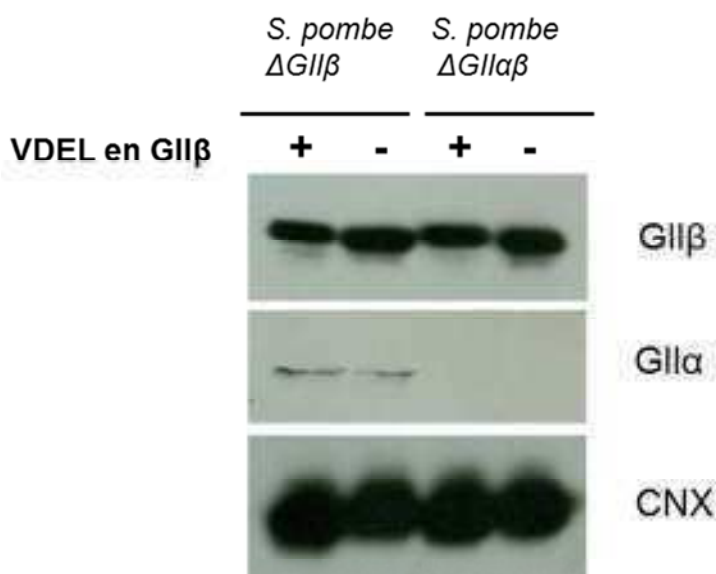


Figura 19. El tetrapéptido de retención/recuperación VDEL no es el único elemento de GII β responsable de la localización de GII α en el RE. Inmunodetección de GII α , GII β y CNX en fracciones microsomales de células Δ GII β o Δ GII $\alpha\beta$ transformadas con pGII β o pGII β Δ VDEL. 250 μ g de proteínas microsomales fueron separadas mediante SDS-PAGE 9% y transferidas a membranas de PVDF. Los anticuerpos primarios fueron: anti-GII α (1:1.000) y anti-GII β (1:1.000), ambos producidos en ratón, y anti-CNX (1:100.000) producido en conejo. La obtención de los anticuerpos primarios se describe en Materiales y Métodos. Anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón o de conejo (1:5.000 y 1:30.000, respectivamente). Las reacciones fueron detectadas por quimioluminiscencia.

GII β es necesaria para la deglucosilación de G2M9 y G1M9 *in vitro*

Se reportó previamente que en la levadura *S. cerevisiae* GII β es requerida para el procesamiento de G1M9 pero no para el de G2M9, por lo que se hipotetizó que en este organismo GII β es requerida para el procesamiento de la Glc mas interna (44). Nuestro próximo objetivo fue determinar el rol de GII β en el procesamiento de ambos sustratos fisiológicos (G2M9 y G1M9) por parte de GII en *S. pombe*. Las fracciones microsomales ensayadas en la capacidad de hidrolizar pNPG en la Figura 18 fueron ahora utilizadas para medir su actividad respecto de los sustratos fisiológicos G2M9 y G1M9 marcados radioactivamente (Figura 20). Cuando se utilizaron microsomas derivados de la mutante Δ GII $\alpha\beta$ que expresaba GII α VDEL se observó un eficiente procesamiento de pNPG, sin embargo, dichas fracciones no fueron capaces de procesar los sustratos G2M9 o G1M9 (comparar Figuras 18 A y 20). Estos resultados demuestran que si bien GII β no es necesaria para hidrolizar el pequeño análogo de sustrato pNPG, en *S. pombe* GII β es necesaria, *in vitro*, para el primer y segundo corte de Glc del N-glicano por GII.

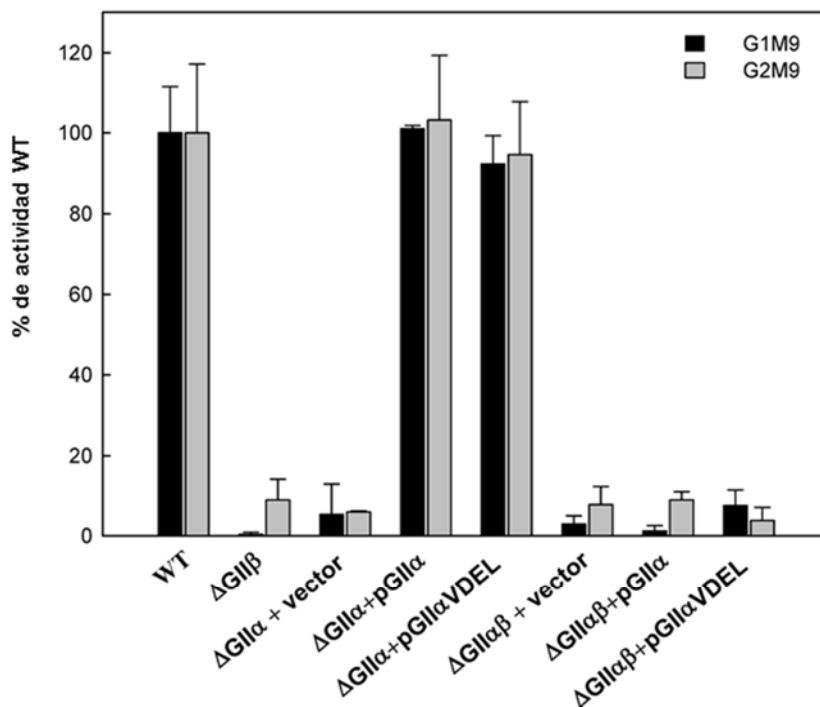


Figura 20. GII β es requerida para un procesamiento eficiente de G2M9 y G1M9 *in vitro*. Se incubaron 125 μ g de proteínas de fracción microsomal de las levaduras indicadas, junto con 6.000 cpm de G2M9 o 2.000 cpm de G1M9 (Ver Materiales y Métodos para los porcentajes de Glc marcada en cada sustrato) durante 15 min a 30°C en buffer fosfato de sodio 40 mM, pH 7.2. Las reacciones fueron detenidas y las Glc liberadas fueron separadas por cromatografía en papel. Los resultados obtenidos para cada sustrato se expresan respecto de la actividad de la cepa WT.

Para confirmar estos resultados, ensayamos la hidrólisis de G1M9 de microsomas de la mutante $\Delta GII\alpha\beta$ que expresaba $GII\alpha$ VDEL (fuente de $GII\alpha$), de microsomas derivados de células $\Delta GII\alpha$ (que contienen a la subunidad $GII\beta$ endógena) o de una mezcla de ambos preincubados en presencia de Tritón X-100 1%. Como se muestra en la Figura 21, se observó una hidrólisis sustancialmente más alta con la mezcla de microsomas, demostrando que $GII\beta$ es capaz de corregir *en trans* la imposibilidad de $GII\alpha$ de procesar *N*-glicanos eficientemente.

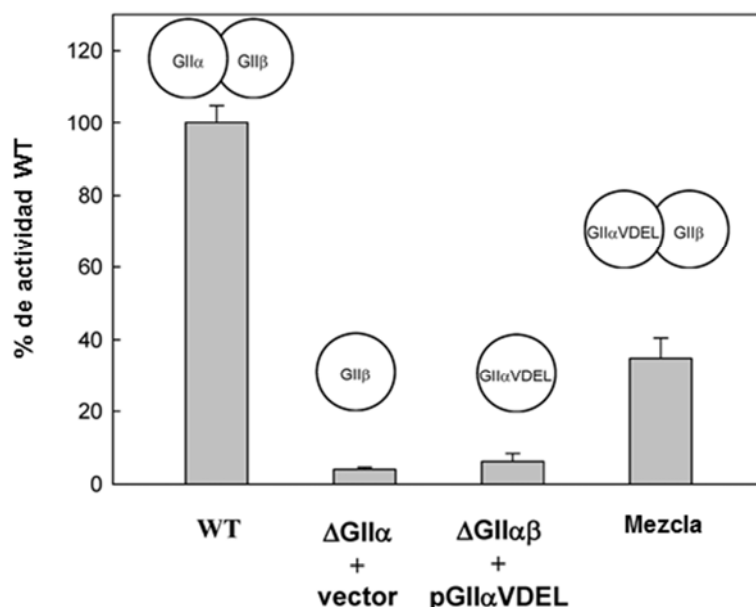


Figura 21. Complementación *in vitro* entre las subunidades $GII\alpha$ y $GII\beta$. Se incubaron 125 μ g de microsomas de levaduras que contenían solo $GII\beta$ (mutantes $\Delta GII\alpha$), 125 μ g de microsomas de levaduras que contenían solo $GII\alpha$ (células $\Delta GII\alpha\beta$ transformadas con pGII α VDEL) o la mezcla de ambos (Mezcla: microsomas de mutantes $\Delta GII\alpha$ + microsomas de levaduras $\Delta GII\alpha\beta$ transformadas con pGII α VDEL) durante 30 min a 4°C en buffer HEPES pH 7.2, EDTA 5 mM, y Tritón X-100 1%. Posteriormente fue ensayada su actividad GII utilizando 2.000 cpm de [14 C]-Glc G1M9 como sustrato, como se describe en la Figura 20.

$GII\beta$ es necesaria para el procesamiento eficiente de G2M9 y G1M9 *in vivo*

Para corroborar $GII\beta$ es también requerida *in vivo* para una eficiente conversión de G2M9 a G1M9 y de este último a M9 analizamos el patrón de *N*-glicanos unidos a proteínas de levaduras carentes de $GII\beta$. Para ello, incubamos levaduras *S. pombe* en fase exponencial de crecimiento ($OD_{600} = 2$) con [14 C]Glc durante 15 min en presencia de DTT 5 mM como se describe en Materiales y Métodos. Como fue reportado previamente, el DTT impide durante los tiempos del experimento la formación de puentes disulfuro y por lo tanto la salida de proteínas desde el RE hacia el Golgi, previniendo una posterior extensión de los

N-glicanos recién sintetizados (77). La adición en el Golgi de muchas unidades de Man y Gal hubiese imposibilitado la medición de la proporción de glicanos con dos, uno u ningún residuo de Glc a ser evaluado (Figura 22).

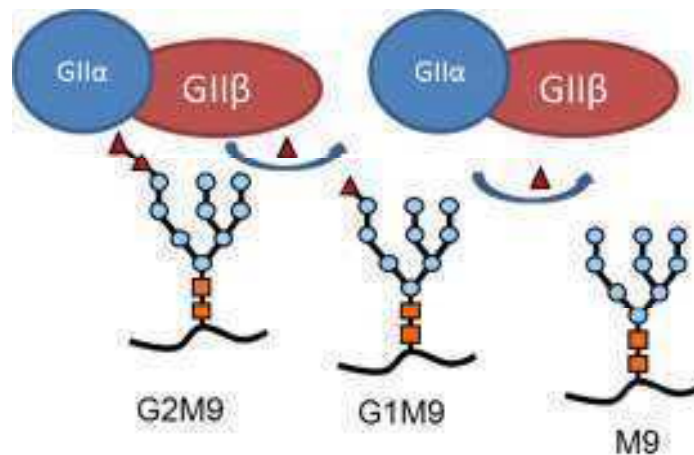


Figura 22. Reacciones catalizadas por GII. En los experimentos de marcaciones *in vivo* de oligosacáridos se evalúa la proporción de glicanos di, mono y sin Glc unidos a proteínas en el RE. De tal manera, se evalúa la capacidad de GII de hidrolizar *in vivo* los sustratos presentes en las glicoproteínas en el RE. En el panel se ejemplifica la evaluación de la capacidad de hidrólisis de GIIα en presencia de GIIβ.

Luego de 15 min de marcación, la muestra de las levaduras *WT* presentó un único pico de M9 demostrando que la deglucosilación total es extremadamente rápida en *S. pombe* (Figura 23 A). Por el contrario, las muestras de 15 min producidas tanto por células $\Delta GII\beta$ que expresan GIIα endógena, como por células doble mutantes $\Delta GII\alpha\beta$ que expresan GIIαVDEL (células carentes de GIIβ que expresan GIIα en forma estable en el RE), mostraron una conversión muy limitada de G2M9 a G1M9 (Figuras 23 B y 23 D).

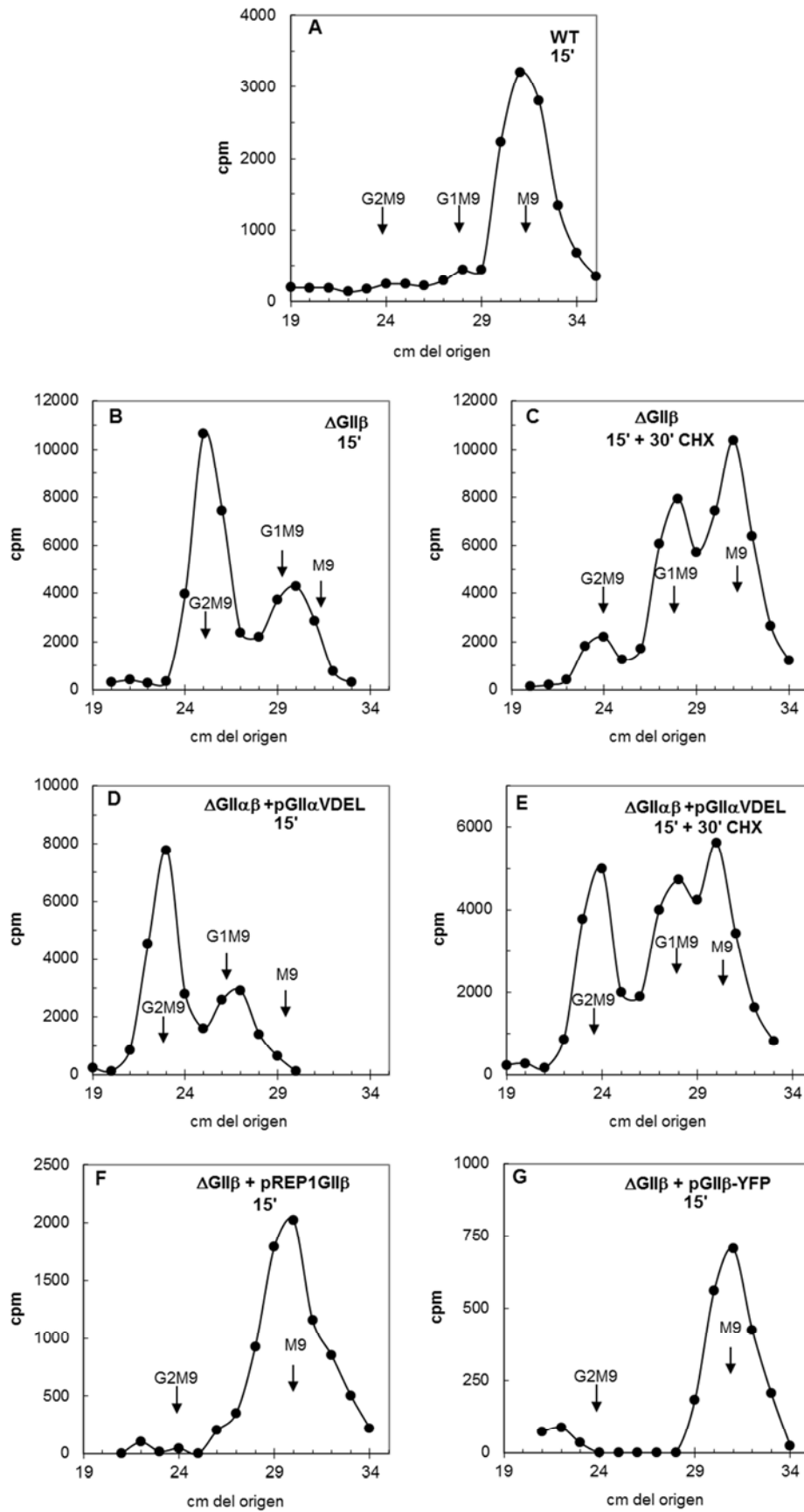
A continuación, agregamos CHX a modo de inhibir la síntesis proteica y cualquier *N*-glicosilación adicional e incubamos a las células por otros 30 min. En las muestras de la caza de ambos tipos celulares se pudo observar la lenta conversión de G1M9 a M9 (Figuras 23 C y 23 E). Estos patrones revelan que GIIα es, de hecho, capaz de hidrolizar G2M9 y G1M9 en ausencia de GIIβ, en aparente contradicción con los resultados obtenidos *in vitro*, pero a tasas extremadamente lentas. Dichas tasas de deglucosilación observadas no pueden ser atribuidas a un menor contenido de GIIα, dado que los experimentos realizados en la Figura 18 A revelan que los niveles de hidrólisis de pNPG fueron similares en microsomas derivados de células *WT* y en células que expresan GIIαVDEL. Más aún, los patrones que se observan en las Figuras 23 C y 23 E, indican, que G2M9 y G1M9 fueron deglucosilados por GIIα a aproximadamente los mismos niveles: una deglucosilación preferencial de G2M9 hubiese mostrado una proporción mucho más importante de G1M9 que de M9, mientras que

si existiese una preferencia por el segundo corte se hubiesen observado las proporciones opuestas de dichos glicanos. Los niveles de deglucosilación, a grandes rasgos, similares para ambos sustratos concuerdan con resultados previos obtenidos en ensayos *in vitro* en los cuales se simularon las condiciones de concentración proteica del RE (78).

La prueba de que GII β es responsable de la aceleración de ambas reacciones de deglucosilación de glicanos por GII se pone de manifiesto en el experimento en que la re-expresión de GII β en células mutantes carentes de dicha subunidad restablece la rápida deglucosilación de G2M9 y G1M9 (Figuras 23 F y 23 G). La correcta expresión de GII β en el RE está demostrada en la observación de variante de GII β fusionada a YFP (Figura 25 B).

Estos resultados muestran que si bien GII β no es necesaria para el plegamiento de GII α ni para su actividad respecto del pequeño análogo de sustrato pNPG, sí es requerida para el procesamiento de ambos sustratos fisiológicos (G2M9 y G1M9) por GII.

Figura 23 (Página siguiente). GII β es requerida para un procesamiento eficiente in vivo de G2M9 y G1M9. Células de *S. pombe* WT (A), mutantes Δ GII β que expresan GII α endógena (B y C), dobles mutantes Δ GII $\alpha\beta$ que expresan pGII α VDEL (D y E), o mutantes Δ GII β que expresan GII β exógena (F) o GII β fusionada a YFP (G) fueron incubadas durante 15 min con [14 C]Glc (A, B, D, F, y G), e incubadas con CHX durante 30 min adicionales (D y E). Se indica con flechas la posición de los estándares.



El dominio MRH de GII β está involucrado en la estimulación de la hidrólisis de glicanos por GII mediada por GII β

El dominio MRH es necesario para el procesamiento eficiente de N-glicanos in vitro

La presencia del dominio MRH en GII β sugirió fuertemente que este dominio podría estar involucrado en el aumento mediado por GII β de la hidrólisis de G1M9 y G2M9 por GII. Trabajos previos con el M6PR bovino demostraron que los siguientes cuatro aminoácidos fueron esenciales para unir el motivo de carbohidratos: Q66, R111, E133 y Y143 (49, 50). En el alineamiento que se observa en la Figura 24, los residuos de GII β R437, E456 e Y462 pero no Q407 alinean perfectamente con los residuos idénticos en las cuatro proteínas que se observan. Para determinar si los equivalentes de dichos residuos están involucrados en la estimulación de la actividad hidrolítica de GII por GII β , expresamos variantes mutadas de dicha subunidad en los aminoácidos mencionados en una cepa de *S. pombe* carente de GII β endógena. Realizamos las mutaciones Y462F, E456Q, R437K y también Q407E, dado que era la única Q presente en la cercanía río arriba de los tres residuos mencionados. Las construcciones de GII β y mutantes individuales o doble (Y462F/E456Q) mutantes fueron transformadas a una cepa Δ GII β , se prepararon microsomas y se determinó la actividad GII.

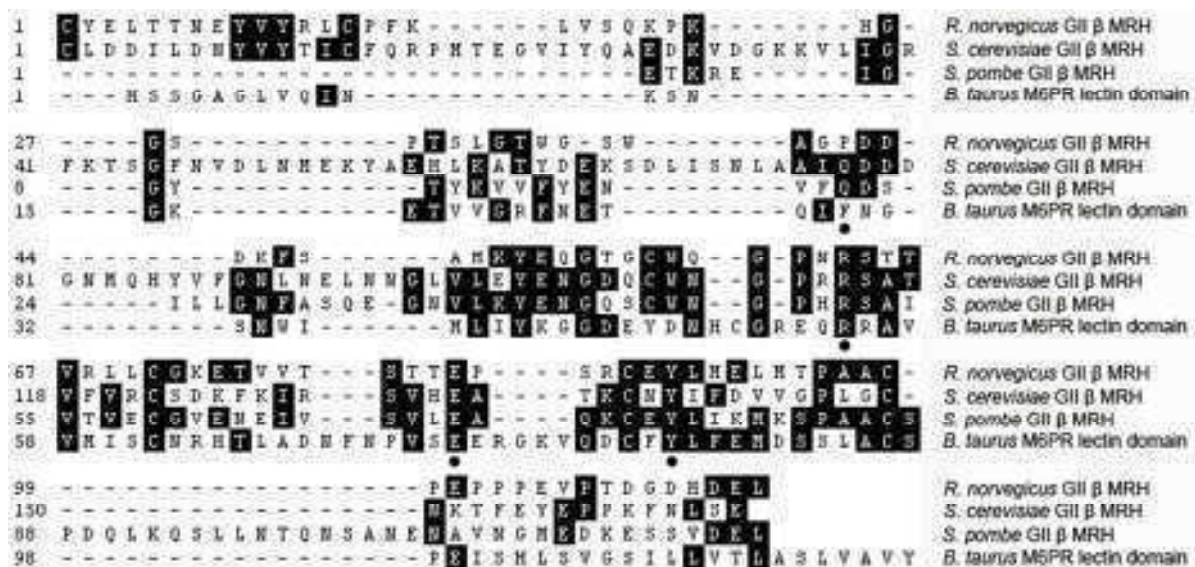


Figura 24. El dominio MRH de GII β conserva los aminoácidos involucrados en la interacción del M6PR con el glicano. Alineamiento de secuencias de los dominios MRH de GII β de *S. pombe*, *S. cerevisiae* y rata (*Rattus norvegicus*) y el dominio lectina del M6PR bovino (*Bos Taurus*). Los aminoácidos idénticos se encuentran sombreados en negro. Los puntos indican los residuos mutagenizados en GII β de *S. pombe* en este trabajo. Figura tomada de la referencia 79.

Mientras que las células que expresaron GII β exógena fueron capaces de corregir el defecto en la deglucosilación de G2M9 y G1M9 de las células Δ GII β , ninguna de las variantes mutantes en el MRH de GII β pudo restablecer la correcta hidrólisis de dichos sustratos *in vitro* (Figura 25). Por otra parte, todos los heterodímeros mutantes formados fueron capaces de hidrolizar el pNPG a niveles óptimos. En las observaciones por microscopía confocal GII β y la mutante de GII β R437K expresadas en células Δ GII β , ambas fusionadas a la YFP mostraron una localización subcelular típica de RE de *S. pombe* (Figura 25 B). Estos resultados demuestran: primero, que el dominio MRH presente en GII β es responsable del procesamiento eficiente de los sustratos fisiológicos de GII α G2M9 y G1M9, pero no del procesamiento de pNPG y segundo, que el dominio MRH no es responsable de la interacción GII α -GII β ni tampoco de la localización subcelular del heterodímero GII.

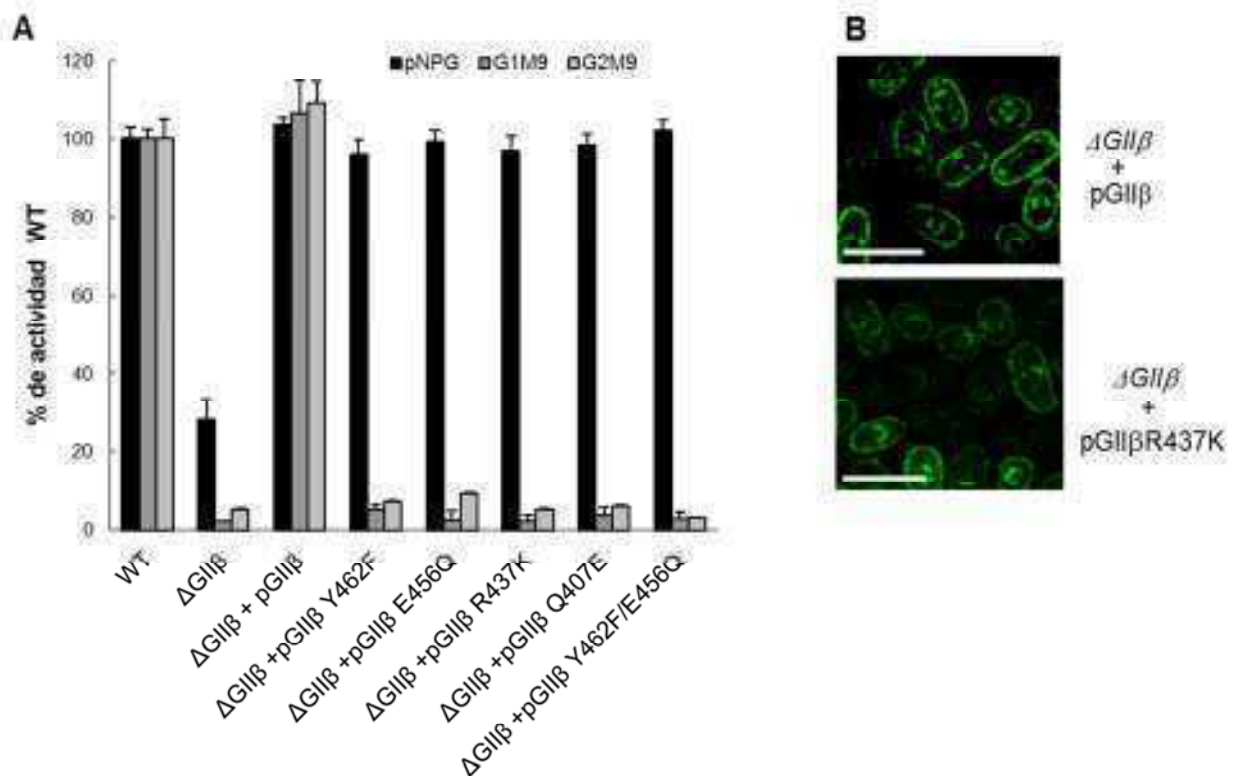


Figura 25. Rol del dominio MRH de GII β en el procesamiento de N-glicanos *in vitro*. (A) Microsomas de mutantes Δ GII β transformadas con pREP1 conteniendo GII β o GII β con las mutaciones indicadas fueron incubados con pNPG, G2M9 o G1M9. La cuantificación de las actividades GII sobre los distintos sustratos se realizó como se describe en las figuras previas y en Materiales y Métodos. (B) Microscopía confocal de células Δ GII $\alpha\beta$ complementadas con GII β y GII β R437K, ambas fusionadas a YFP. Barra, 10 μ m.

El dominio MRH es necesario para el procesamiento eficiente de N-glicanos in vivo

Para confirmar que el dominio MRH también participa en el procesamiento de los sustratos fisiológicos *in vivo*, expresamos dos mutantes de GII β (Y462F y E456Q) en células Δ GII β y analizamos el patrón de glicanos unidos a proteínas en el RE. Para ello, realizamos una marcación *in vivo* de glicanos seguido de 30 min de caza con CHX como se describió anteriormente. Los resultados obtenidos con la mutante Y462F (se obtuvieron resultados casi idénticos con la mutante E456Q) se pueden observar en la Figura 26. Analizando el patrón de N-glicanos formados en la muestra de 15 min de incubación se observa la presencia de G2M9, G1M9, y un hombro en la posición de M9. Este último compuesto, fue mayoritario luego de la caza de 30 min. Comparando las Figuras 26 y 23 A se puede confirmar que se requiere un dominio MRH funcional en GII β para una eficiente deglucosilación de G2M9 y G1M9 *in vivo*.

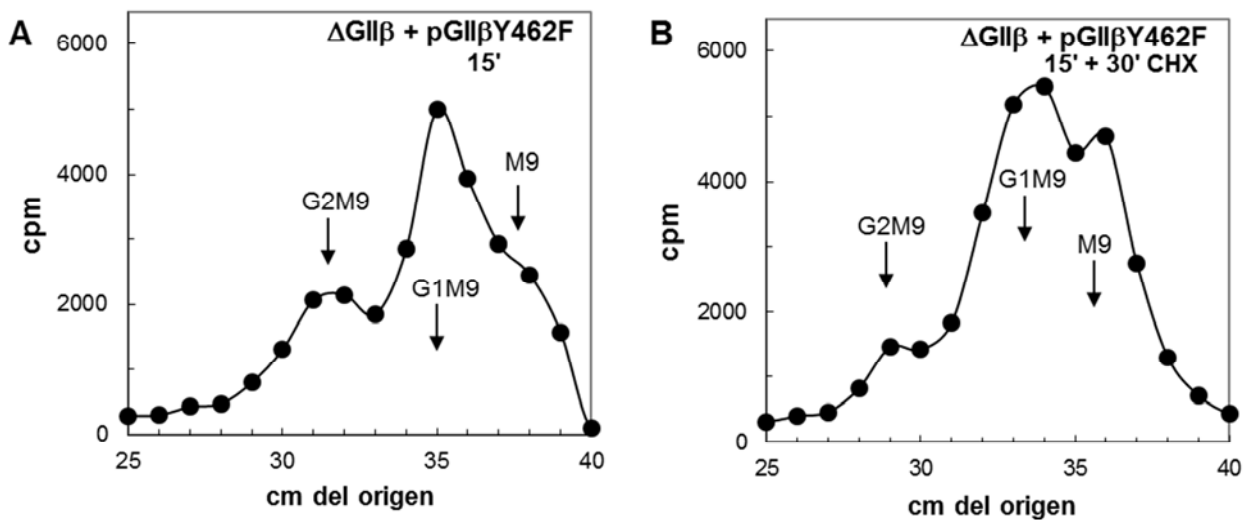


Figura 26. Rol del dominio MRH de GII β en el procesamiento de N-glicanos *in vivo*. Procesamiento *in vivo* de glicanos en células Δ GII β transformadas con la mutante GII β Y462F. Las levaduras fueron incubadas durante 15 min con [14 C]Glc (A) y luego de la adición de CHX incubadas durante 30 min adicionales (B). Los glicanos Endo H-sensibles fueron aislados y analizados en cromatografía en papel. Se indica, con flechas, la posición de los estándares.

La subunidad GII β de mamíferos es requerida para un procesamiento eficiente de ambas glucosas internas del *N*-glicano transferido a las glicoproteínas

GII tiene una estructura altamente asimétrica: mientras GII α tiene estructura globular, GII β adopta una conformación extendida lo que la hace mucho más susceptible al tratamiento con proteasas. Para analizar si también en células de mamífero la subunidad GII β asiste a GII α en el procesamiento de *N*-glicanos, el heterodímero purificado de hígado de rata fue sujeto a proteólisis controlada con quimotripsina. Como fue comunicado por Trombetta y colaboradores (32), la proteólisis controlada de GII resulta en una degradación preferencial de GII β que, al menos en las primeras etapas, no afecta el procesamiento de pNPG. Repetimos el experimento, confirmando la degradación parcial de GII β pero no de GII α mediante SDS-PAGE (Figura 27 A, inserto) y comparamos la hidrólisis de pNPG entre preparaciones nativas y proteolizadas. Como se observa en la Figura 27 A, la actividad respecto de pNPG no se modifica por el tratamiento. En cambio, la proteólisis de GII β resultó en una disminución de la actividad enzimática cuando se emplearon G2M9 y G1M9 como sustratos (Figura 27 B). Estos resultados demuestran que, del mismo modo que en *S. pombe*, en mamíferos la subunidad GII β modula el procesamiento de los glicanos G2M9 y G1M9.

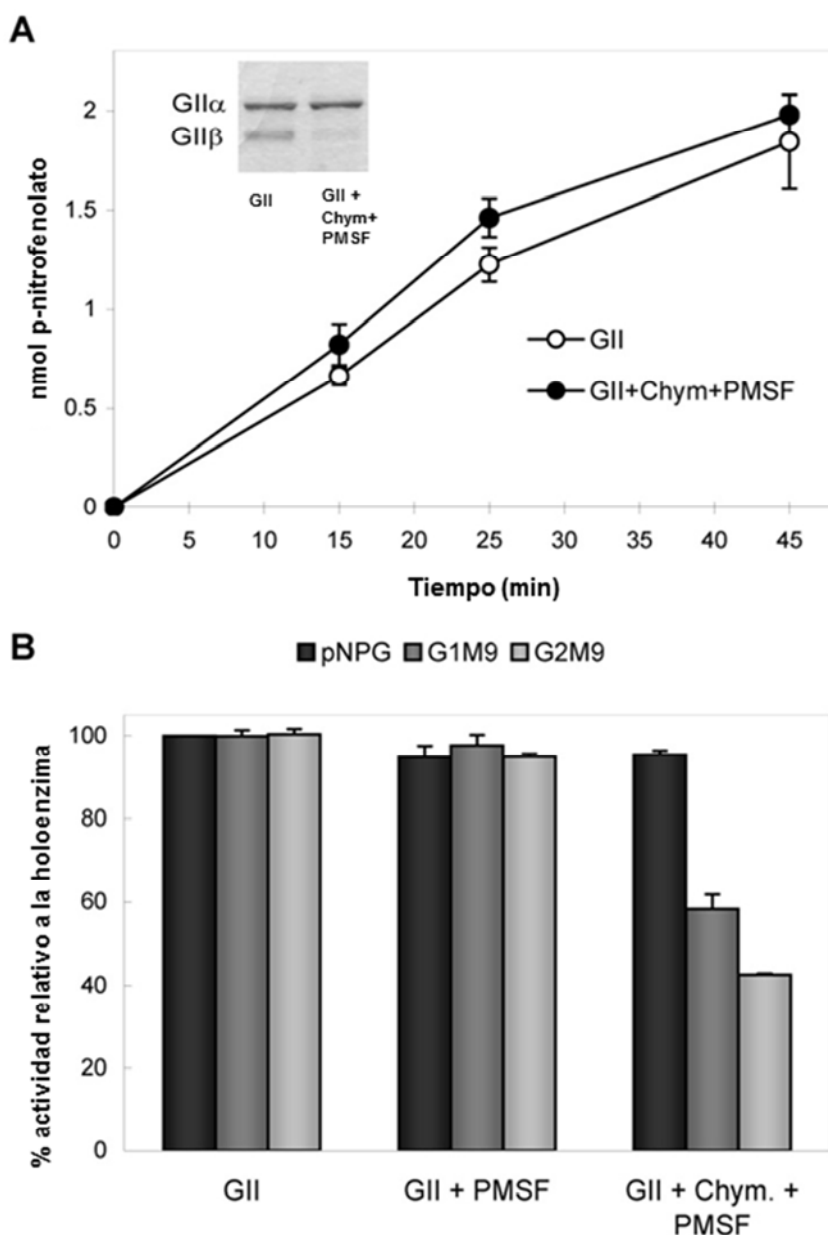


Figura 27. La proteólisis regulada de la subunidad GII β de hígado de rata compromete el procesamiento de G2M9 y G1M9 pero no de pNPG. 10 μ g de GII β de hígado de rata purificada fueron proteolizadas con quimotripsina en una relación proteasa:GII de 1:500 por 5 min a 25°C. Las reacciones fueron detenidas con PMSF 1 mM. (A) Hidrólisis de pNPG de muestras nativas y parcialmente proteolizadas de GII purificada a partir de hígado de rata, medida a los tiempos indicados. La proteólisis parcial fue monitoreada mediante SDS-PAGE 9% (inserto). (B) La actividad GII respecto de pNPG, G1M9 y G2M9 fue determinada utilizando 0.5 μ g (pNPG) o 0.1 μ g (*N*-glicanos) de proteína de muestras nativas o proteolizadas. La actividad en las muestras tratadas con quimotripsina (GII + Chym + PMSF) o los controles con PMSF (GII + PMSF) fueron referidos relativos a la actividad de GII sin tratar.

El dominio G2B de GII β se haya involucrado en la interacción GII α -GII β en *S. pombe*

Además del dominio C-terminal MRH, existe en la subunidad GII β un dominio cercano al N-terminal denominado G2B (Glucosidase II Beta) que se encuentra conservado entre las subunidades GII β de distintas especies (Figuras 5 y 28).

```

H. sapiens  -----MLLP L L L L P M C W A V E V K R P R G V S L T N H H - - F Y D E S K - - - P F T C L D - G S A T I P E D Q V N D D Y C D C K D G S D E P G T A A C P N 72
S. pombe   --MKF S Q W Y T L T A P L L I S S L Y T V N A A N D L R G V A S D K S D L Y K P D A - K G N W K C L G - S D K L I S E N Q V N D D Y C D C P D G S D E P G T S A G H N 81
L. mexicana -- M A T I R W T L F A V I L L F C S V L T P V H G R I L G V Q S R H T A Y F A A K N - T G A F R C L D - G S A T I P E S A V N D I C D C T D G S D E P G T S A G T A 80
S. cerevisiae M V S M F S L F L L L I E Q S P L V A S L Q Q S Q R H I V G V P W E K Q H L Y D S N E P D L T K W H C L N H E D I V L D I S Q I N D G V C D C P D G S D E P G S A A G V E 85

H. sapiens  G S ----- F H C T N T G V K P L Y I P S N R V N D G V C D C C D G I D E Y N S G V I C E N T C K - - - - - E K G R K E 123
S. pombe   G K ----- F F C K N T G Y I S S Y I P S N R V D D I V C D C C D G S D E S - - L I K C P N T C A - - - - - Q K A R E Y 130
L. mexicana I R G S A L T L F P Q D W - - K F Q C T S E E P V S Q A F P H N H V N D G I C D C C D G S D E V G S P T L C P N R C A - - - - - E M A R E L 143
S. cerevisiae D I F K S V A E G G G K V N K Y F Y C D N K G F I P R Y I R K S E V A D G I C D C C D C S D E L L S G Y E L F D A G S N C S Q L K N E F D I M A S K E L S S Y R E G R E A 170

```

Figura 28. GII β posee un dominio N-terminal denominado G2B que se haya altamente conservado en distintas especies. Alineamiento de secuencias de los dominios G2B de GII β de humanos, *S. pombe*, *L. mexicana* y *S. cerevisiae*. Los aminoácidos idénticos se encuentran sombreados en negro, mientras que los semiconservados se resaltan en gris. Los puntos indican los residuos mutagenizados en la GII β de *S. pombe*.

Antecedentes en la bibliografía sugieren que este dominio podría estar involucrado en la interacción entre GII α y GII β en células de mamífero y/o en el procesamiento de la Glc mas interna del N-glicano (Glc *m*, Figura 2) en *S. cerevisiae* ya que se introdujeron una serie de mutaciones en el dominio G2B de la subunidad GII β de *S. cerevisiae* y la mutación E132A permitió la interacción GII α -GII β pero produjo un menor procesamiento de G2M9 *in vivo* (36, 80). Para intentar determinar si en *S. pombe* el rol del dominio G2B es interaccionar con GII α o intervenir en el procesamiento de G2M9 realizamos la mutación del aminoácido equivalente en GII β de *S. pombe* (E114A) y en el aminoácido E73A (Figura 28). En primer lugar realizamos un ensayo de complementación *en trans*: se incubaron mezclas de microsomas fuente de GII α activa en RE (Δ GII $\alpha\beta$ + pGII α VDEL) con microsomas fuente de las variantes de GII β a ensayar con los sustratos radioactivos. Los extractos microsomales de levaduras doble mutantes Δ GII $\alpha\beta$ que expresaban pGII β -E73A o pGII β -E114A no fueron capaces de complementar la actividad del procesamiento de G1M9 de microsomas de *S. pombe* que expresaban solo GII α en el RE (Figura 29 A). La expresión de GII β doble mutante para el dominio MRH Y462F/E456Q (de aquí en más referida como GII β -MRH*) (Δ GII $\alpha\beta$ + pGII β -MRH*) tampoco fue capaz de restaurar *en trans* la capacidad de GII de hidrolizar G1M9. Por el contrario, aquellos microsomas que expresaban GII β exógena sin mutar sí fueron capaces de restablecer el procesamiento del sustrato fisiológico *in vitro* (Figura 29 A).

A continuación realizamos experimentos de determinación de actividad GII en los microsomas de las mutantes utilizando el análogo de sustrato pNPG o bien G1M9 como sustratos. Como hemos mencionado antes, las mediciones de actividad GII α con el sustrato pNPG reflejan el contenido de GII α en el RE. Al medir la actividad GII con pNPG pudimos observar que mutaciones en el dominio G2B, pero no el dominio MRH, afectaron la actividad enzimática en microsomas, sugiriendo que G2B influye en la retención de GII α en RE (Figura 29 B). En contraste, cuando utilizamos G1M9 como sustrato, las mutaciones en ambos dominios afectaron la actividad: microsomas de mutantes *S. pombe* Δ GII β que expresaban GII β con mutaciones en el dominio G2B (Δ GII β + pGII β -E114A y Δ GII β + pGII β -E73A) no registraron actividad cuando se ensayaron con G1M9 como sustrato, de igual modo que las mismas mutantes que expresaban GII β -MRH* (Figura 29 B).

Los análisis de Western blot demostraron que las mutaciones en el dominio G2B E114A y E73A resultaron en niveles reducidos de GII α en RE, los cuales fueron similares a aquellos presentes en mutantes Δ GII β , a pesar del hecho de que la mutación en G2B afectó solo ligeramente los niveles de GII β (Figura 29 C). Por el contrario, la expresión de GII β WT o GII β mutante en el dominio MRH restauraron por completo los niveles de GII α en RE.

A partir de los resultados obtenidos aquí, podemos concluir que en *S. pombe* el dominio N-terminal G2B presente en GII β juega un rol en la interacción de ambas subunidades del heterodímero GII (GII α -GII β), ya que su mutación reduce la actividad de GII sobre pNPG debido a una reducción en los niveles de GII α en el RE. En cambio, la mutación del dominio MRH afecta la actividad GII sobre G1M9 y no sobre pNPG, no afectando los niveles de GII α en el RE. Por otro lado, levaduras con la mutación E114A en su GII β fueron capaces de procesar, *in vivo*, G2M9 a G1M9 y M9, indicando que el dominio G2B no está involucrado en el procesamiento del glicano (datos no mostrados). Al expresar las variantes mutantes en el dominio G2B pudimos observar una banda de menor peso molecular que reaccionó con los anticuerpos anti-GII β . Aún no hemos identificado esta proteína, pero es posible que surja a partir de un clivaje proteolítico o quizás a partir de una conformación más inestable de dicha subunidad mutante.

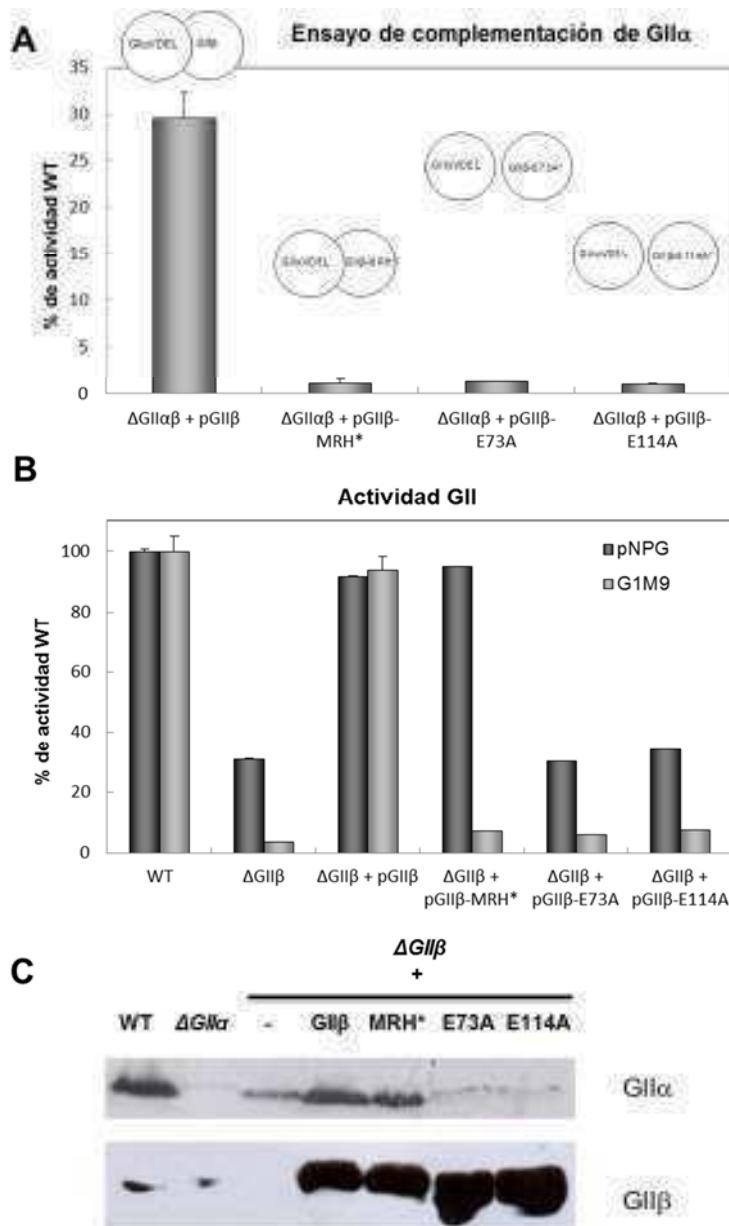


Figura 29. La interacción GII α -GII β se ve comprometida por mutaciones en el dominio G2B. (A) Ensayo de complementación entre GII α y variantes de GII β . Microsomas de levaduras *S. pombe* mutantes $\Delta GII\alpha\beta$ que expresaban pGII α VDEL (fuente de GII α) se preincubaron en presencia de Tritón X-100 1% con microsomas de levaduras $\Delta GII\alpha\beta$ que expresaban GII β (pGII β), GII β con el dominio MRH mutado (pGII β -MRH*), o con el dominio G2B mutado (pGII β -E73A o pGII β -E114A) (fuentes de GII β). Los ensayos de actividad con G1M9 fueron realizados como se describe anteriormente. (B) Actividad GII en microsomas de *S. pombe* que expresan variantes de GII β . La actividad GII fue medida en fracciones microsomales WT, mutantes $\Delta GII\beta$ que expresaban GII β exógena o GII β con los dominios MRH o G2B mutados. La actividad se midió con pNPG o G1M9 y se expresó relativa a la WT. (C) Inmunodetección de GII α y GII β en fracciones microsomales de *S. pombe*. 250 μ g de proteínas microsomales de células WT, mutantes $\Delta GII\alpha$ o $\Delta GII\beta$ transformados con el vector vacío (-), GII β (GII β), o GII β mutante en el dominio MRH (MRH*) o en el dominio G2B (E73A y E113A) fueron resueltas en un SDS-PAGE 9%, transferidas a una membrana de PVDF e incubadas con un suero de ratón anti-GII α (1:1.000) o anti-GII β (1:1.000). El anticuerpo secundario fue anti-ratón (1:5.000). Las reacciones fueron reveladas mediante quimioluminiscencia.

GII β reconoce residuos de manosas en las ramas B y/o C del N-glicano

Para estudiar la posibilidad de que el dominio MRH de GII β este interaccionando con residuos de Man en las ramas B y/o C de los N-glicanos en los N-glicanos (Figura 2), decidimos investigar si dichas Man del glicano son necesarias para su reconocimiento por GII. Para ello, incubamos microsomas de células WT y de levaduras Δ GII $\alpha\beta$ que expresaban GII α VDEL (GII α funcional en RE) con los sustratos G2M5 o G1M5, es decir con glicanos cuyas Man en las ramas B y C habían sido removidos mediante el tratamiento con α -manosidasa. Como se observa en la Figura 30, la remoción de las unidades de Man del glicano redujo drásticamente los niveles de procesamiento de la Glc de dichos glicanos, del mismo modo que ocurrió eliminado la subunidad GII β o mutando el dominio MRH (Figura 25 A). Estos resultados sugieren que GII β reconoce Man en las ramas B y/o C del glicano y no en la rama A, a través de su dominio MRH.

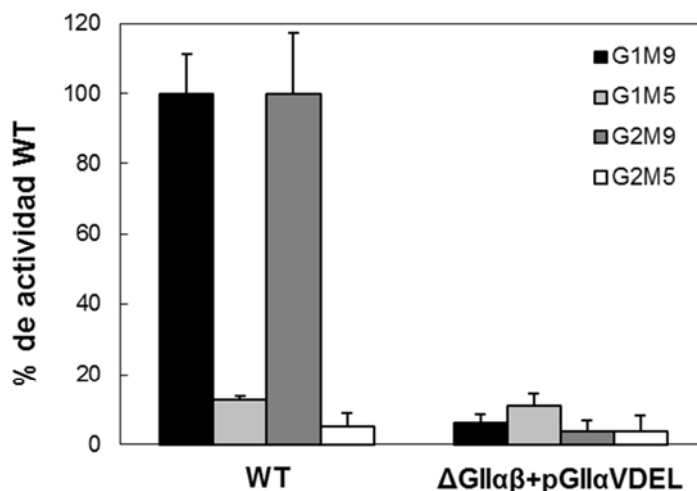


Figura 30. Procesamiento de glicanos truncados por GII *in vitro*. Los ensayos fueron realizados como se indica en la Figura 20 con proteínas microsomales de células WT o mutantes Δ GII $\alpha\beta$ que expresan pGII α VDEL. Los sustratos G2M9, G2M5, G1M9, o G1M5 fueron obtenidos como se describe en Materiales y Métodos. La actividad se expresa respecto de la actividad WT con G1M9 como sustrato.

La deglucosilación *in vivo* de N-glicanos por GII disminuye en función de su contenido de manosas

El hecho de que la actividad glucosidasa de GII se encuentre disminuida cuando el sustrato posee bajo contenido de Man en las ramas B y/o C (Figura 30) sugiere por un lado que son estas ramas las que son reconocidas por GII β , y por otro lado, que el contenido de Man tiene una influencia importante en la actividad GII.

Para estudiar si un contenido reducido de Man en el *N*-glicano unido a las proteínas afecta la actividad GII de procesamiento de Glc también *in vivo*, construimos una serie de mutantes de la levadura de fisión *S. pombe* que transfieren *N*-glicanos truncados con 9, 7, 6 o 5 Man a las proteínas nacientes y analizamos los posibles patrones de glicanos producidos *in vivo* (Figura 31). Para eliminar cualquier efecto posible del contenido de Man en el *N*-glicano sobre la actividad de la Glucosidasa I (GI) las mutantes utilizadas poseen la mutación $\Delta alg10$. Alg10p cataliza la transferencia de la última Glc desde el dador Dol-P-Glc a Glc₂Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol, por lo que las mutantes utilizadas transfieren *N*-glicanos con solo dos Glc (Figura 2). La cepa $\Delta alg10$ fue cruzada con las cepas $\Delta alg12$ (transfiere glicanos con 7 Man), $\Delta alg9$ (transfiere glicanos con 6 Man) y $\Delta alg3$ (transfiere glicanos con 5 Man) como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose así cepas que transfieren G2M9 ($\Delta alg10$), G2M7 ($\Delta alg10/\Delta alg12$), G2M6 ($\Delta alg10/\Delta alg9$) y G2M5 ($\Delta alg10/\Delta alg3$) (Tabla 4). Las marcaciones y purificación de oligosacáridos *in vivo* fueron realizadas como se describió anteriormente y se analizaron mediante HPLC.

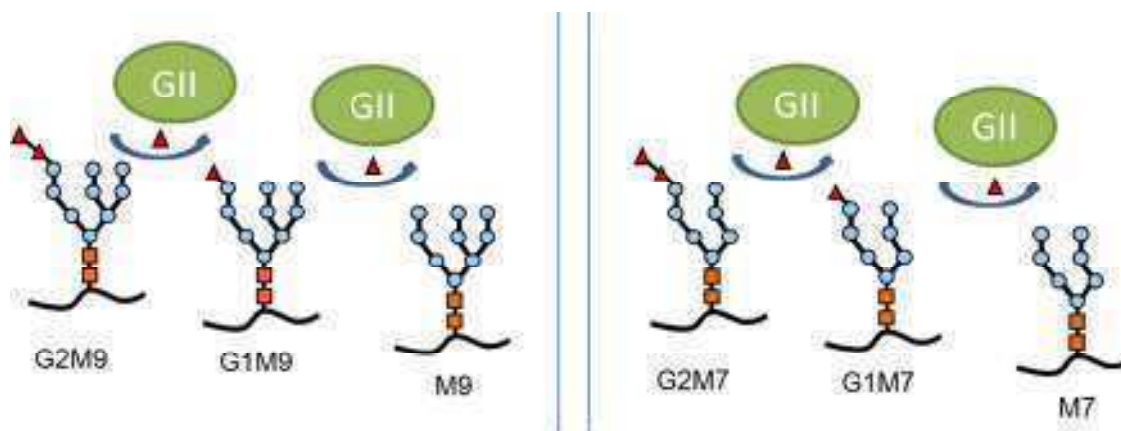










Figura 31. Reacciones catalizadas por GII. En los experimentos de marcaciones *in vivo* de oligosacáridos se evalúa la proporción de glicanos di mono y sin Glc luego del tiempo de incubación. De tal manera se evalúa la capacidad de GII de hidrolizar los sustratos presentes en las glicoproteínas en el RE. En la figura se ejemplifica la evaluación de la capacidad de hidrólisis de GII respecto de *N*-glicanos con 9 y 7 Man en sus oligosacáridos.

Los patrones de *N*-glicanos obtenidos con las mutantes $\Delta alg10$, $\Delta alg10/\Delta alg12$, $\Delta alg10/\Delta alg9$, y $\Delta alg10/\Delta alg3$ revelaron que, mientras que la deglucosilación de G2M9 fue tan rápida que ningún glicano conteniendo Glc fue detectado, la cantidad de glicanos glucosilados aumentaron a medida que disminuyó el contenido de Man de los mismos (Figura 32). El total de las fracciones de cada pico fue sumado y se relativizó cada uno de los picos al total de cuentas para la cuantificación de los resultados (Figura 32 E). Estos

resultados están en acuerdo con reportes previos de ensayos *in vitro* en los que la disminución del contenido de Man del glicano resultó en un descenso en la actividad GII (Figura 30 y referencias 30 y 31). No se pueden obtener mutantes que transfieran G2M8 debido a que la misma manosiltransferasa (Alg9p) es responsable de la adición del séptimo y noveno residuo de Man al precursor del glicano unido a Dol-P-P (Figura 2).

| N-Glicanos reconocidos por GII | | |
|--------------------------------|---------------------------|---|
| Mutante | Oligosacárido transferido | Estructura |
| $\Delta alg10$ | G2M8 |  |
| $\Delta alg10/\Delta alg12$ | G2M7 |  |
| $\Delta alg10/\Delta alg9$ | G2M6 |  |
| $\Delta alg10/\Delta alg3$ | G2M5 |  |

| N-Glicanos reconocidos por UGGT | | |
|---------------------------------|---------------------------|---|
| Mutante | Oligosacárido transferido | Estructura |
| $\Delta alg6$ | M9 |  |
| $\Delta alg6/\Delta alg12$ | M7 |  |
| $\Delta alg6/\Delta alg9$ | M6 |  |
| $\Delta alg6/\Delta alg3$ | M5 |  |





| N-Glicanos reconocidos por GI | | |
|-------------------------------|---------------------------|---|
| Mutante | Oligosacárido transferido | Estructura |
| WT | G3M8 |  |
| $\Delta alg12$ | G3M7 |  |
| $\Delta alg9$ | G3M6 |  |
| $\Delta alg3$ | G3M5 |  |

Tabla 4. Estructura de los N-glicanos transferidos por las mutantes *S. pombe*.

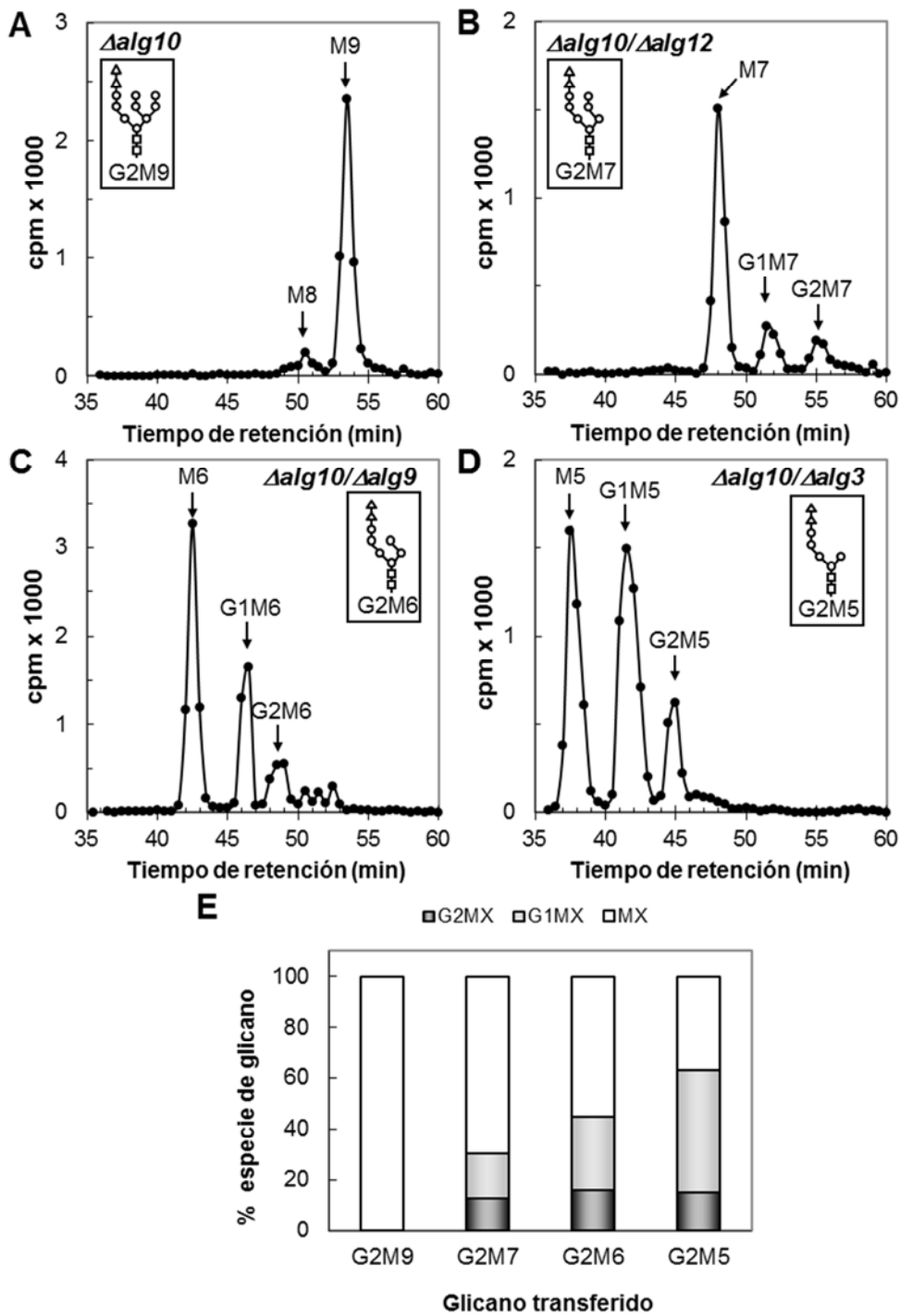


Figura 32. Patrones de glicanos sintetizados por *S. pombe* mutantes que transfieren glicanos diglucosilados que contienen de nueve a cinco residuos de Man. (A) G2M9 ($\Delta alg10$), (B) G2M7 ($\Delta alg10/\Delta alg12$), (C) G2M6 ($\Delta alg10/\Delta alg9$) y (D) G2M5 ($\Delta alg10/\Delta alg3$). Las estructuras de los glicanos transferidos por cada mutante se indican como inserto en el panel correspondiente. (E) Cuantificación de las cantidades relativas de las especies di, mono, y no glucosiladas de los paneles A–D. En el panel A la marca de M8 fue adicionada a la de M9 en la cuantificación de las especies deglucosiladas.

Efecto del contenido de manosas del *N*-glicano en los niveles de deglucosilación *in vivo* de mutantes carentes de la subunidad regulatoria GII β

Con el objeto de determinar la influencia de GII β en la disminución del procesamiento de glicanos con contenido reducido en Man por GII, se repitieron los experimentos de determinación de los patrones de *N*-glicanos con cepas mutantes que transfieren G2M9, G2M7, G2M6 y G2M5 y que adicionalmente eran Δ GII β (cepas Δ alg10/ Δ GII β , Δ alg10/ Δ alg12/ Δ GII β , Δ alg10/ Δ alg9/ Δ GII β , y Δ alg10/ Δ alg3/ Δ GII β). Si bien la ausencia de GII β resultó en una disminución del contenido de GII α como se pudo observar mediante Western blot (Figura 33, calles 3, 6, 9, y 12), confirmando el rol de GII β en la retención de GII α en RE, las mutantes que transferían G2M7, G2M6 y G2M5 y que a su vez carecían de GII β mostraron patrones similares de *N*-glicanos entre sí, demostrando que el contenido de Man no influyó sobre la deglucosilación de GII α de dichos glicanos en ausencia de la subunidad regulatoria (Figura 34).

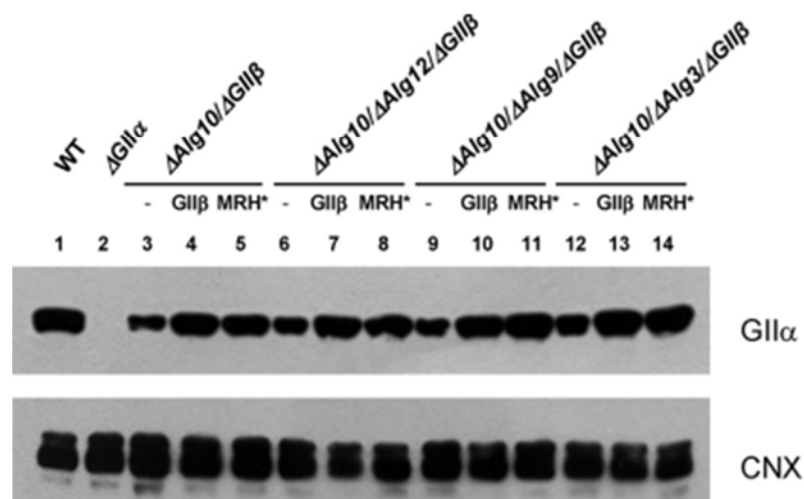


Figura 33. Contenido de GII α en RE de *S. pombe* que transfieren oligosacáridos truncados y que carecen de GII β o expresan variantes mutadas en el dominio MRH. 250 μ g de proteínas microsomales de células Δ GII β , o Δ GII β que expresan GII β WT o GII β -MRH* (MRH*) se sometieron a un SDS-PAGE 9% y transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana fue revelada utilizando suero policlonal de ratón anti-GII α (1:1.000) y suero policlonal de conejo anti-CN α (1:100.000) como anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-ratón (1:5.000) e IgG anti-conejo (1:30.000) acopladas a HRP. Las reacciones fueron detectadas por quimioluminiscencia.

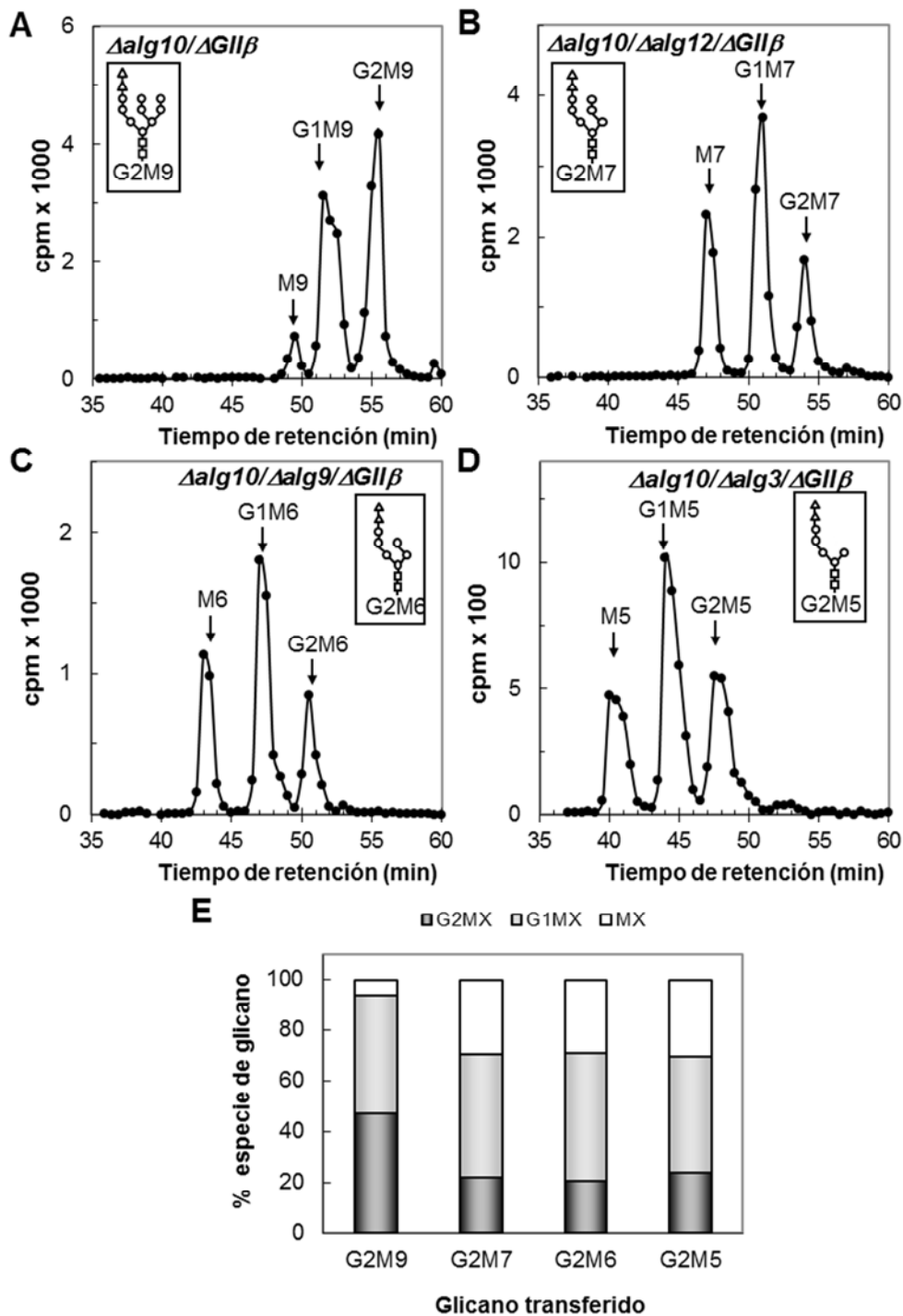


Figura 34. Patrones de glicanos sintetizados por mutantes que transfieren glicanos con dos Glc, conteniendo de nueve a cinco Man y carentes de $GII\beta$. (A) G2M9 ($\Delta alg10/\Delta GII\beta$), (B) G2M7 ($\Delta alg10/\Delta alg12/\Delta GII\beta$), (C) G2M6 ($\Delta alg10/\Delta alg9/\Delta GII\beta$) y (D) G2M5 ($\Delta alg10/\Delta alg3/\Delta GII\beta$). Las estructuras de los glicanos transferidos por cada mutante se indican en los paneles correspondientes. (E) Cuantificación de los cantidades relativas de especies di- mono- y deglicosiladas de los paneles A–D.

No obstante, el patrón producido por la mutante que transfiere G2M9 indicó que el glicano que contenía todas las unidades de Man fue deglucosilado a una tasa aún menor, dado que prácticamente no se observaron glicanos desprovistos de Glc (Figura 34). Los residuos de Man *j* y/o *k* del glicano de la Figura 2, probablemente interaccionan con el sitio activo de GII α o bien con los residuos de Glc, reduciendo de este modo los niveles de deglucosilación.

Por otra parte, demostramos que la subunidad GII β no fue esencial para la remoción de la Glc mas interna a diferencia de lo que había sido previamente reportado (44), ya que no existió tal condición para G2M7, G2M6, o G2M5 (Figura 34, B-D).

El dominio MRH reconoce N-glicanos desde G2M9 hasta G2M5 *in vivo*

Hemos demostrado previamente que los pobres niveles de deglucosilación observados en mutantes que no expresan GII β y transfieren G3M9 pueden ser revertidos a niveles WT complementando dicha cepa con GII β exógena. Por otro lado, la expresión de variantes mutantes en residuos del dominio MRH (equivalentes a aquellos que han sido descritos interaccionando con Man en el M6PR) no pudo corregir dicha deficiencia aun cuando los niveles de GII α en RE habían sido reestablecidos (Figuras 25 y 26). En este ensayo, realizamos el mismo experimento pero con mutantes que transfieren G2M7, G2M6, y G2M5 (mutantes $\Delta alg10/\Delta alg12/\Delta GII\beta$, $\Delta alg10/\Delta alg9/\Delta GII\beta$, y $\Delta alg10/\Delta alg3/\Delta GII\beta$) expresando exógenamente variantes de GII β . La expresión de GII β restableció los patrones observados en las mutantes que expresaban GII β endógena (comparar Figura 35 A–D, con Figura 32 B–E) mientras que, la expresión de GII β mutante en el dominio MRH no fue capaz de restaurar completamente los patrones originales. Estos resultados indican, que el dominio MRH reconoce N-glicanos que contienen de nueve a cinco unidades de Man *in vivo*, aunque con distintas afinidades, ya que las diferencias entre mutantes que expresaban GII β y GII β -MRH* fueron mucho mayores para mutantes que transfieren N-glicanos con un alto contenido de Man (comparar Figura 35, E–H, con Figura 35, A–D). Además, los análisis de Western blot mostraron que la expresión tanto de GII β como de GII β -MRH* restablecieron a GII α en RE a niveles similares (Figura 33 calles 4 y 5, 7 y 8, 10 y 11, y 13 y 14).

GII es capaz de sensar la demanosilación del N-glicano a través del dominio MRH, disminuyendo su actividad a medida que decrece el contenido de Man. Dicha propiedad sitúa a GII como un regulador de la permanencia de glicoproteínas en los ciclos de CNX/CRT. Se analizará a continuación si la demanosilación afecta a las otras enzimas que procesan los oligosacáridos durante el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE.

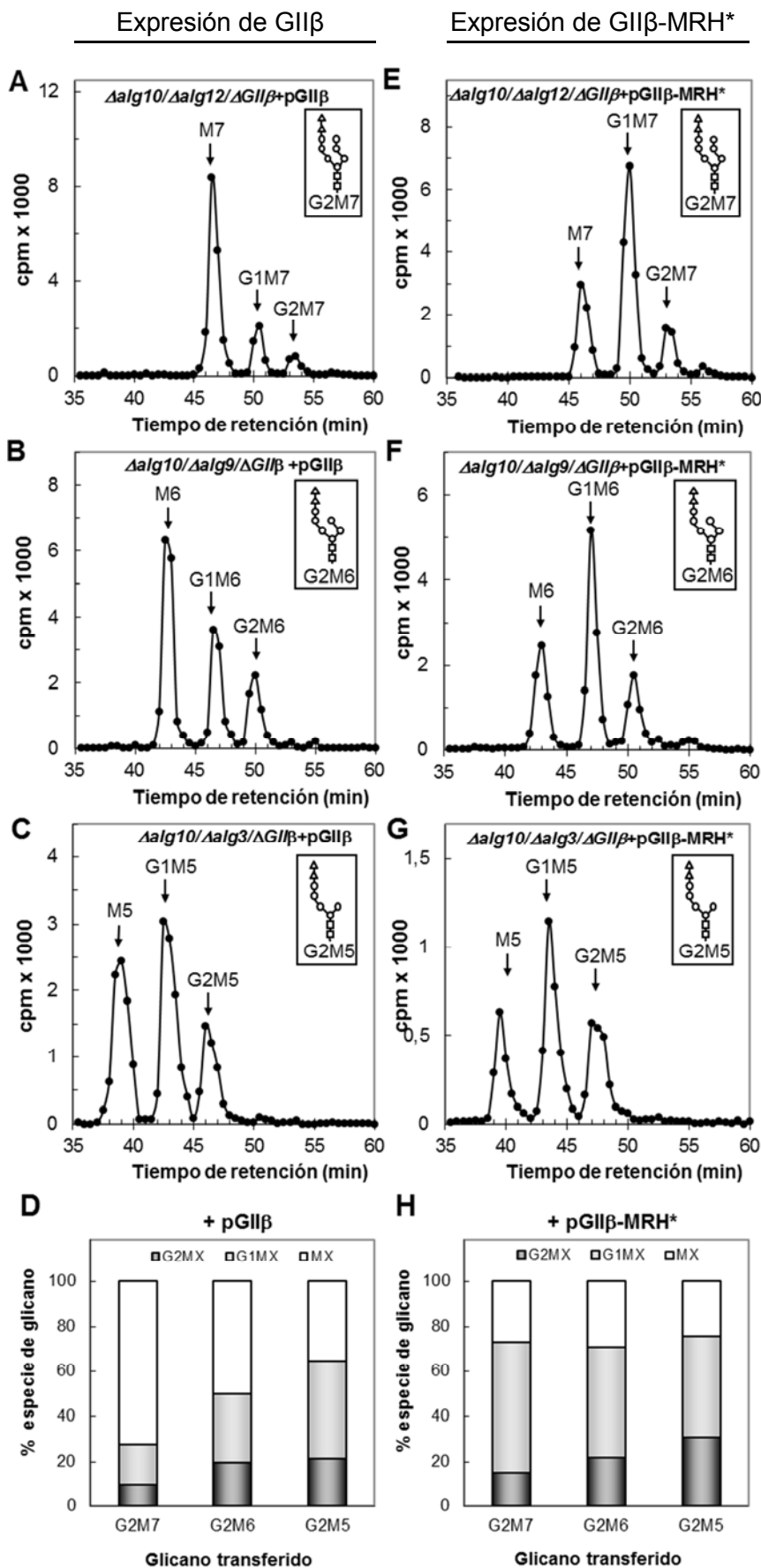


Figura 35. Patrones de glicanos sintetizados por mutantes que transfieren glicanos con dos Glc que contienen de siete a cinco Man y expresan exógenamente GII β (A–D) o GII β con el dominio MRH mutado (E–H). (A) G2M7 ($\Delta alg10/\Delta alg12/\Delta GII\beta + pGII\beta$), (B) G2M6 ($\Delta alg10/\Delta alg9/\Delta GII\beta + pGII\beta$), (C) G2M5 ($\Delta alg10/\Delta alg3/\Delta GII\beta + pGII\beta$), (E) G2M7 ($\Delta alg10/\Delta alg12/\Delta GII\beta + pGII\beta\text{-MRH}^*$), (F) G2M6 ($\Delta alg10/\Delta alg9/\Delta GII\beta + pGII\beta\text{-MRH}^*$) y (G) G2M5 ($\Delta alg10/\Delta alg3/\Delta GII\beta + pGII\beta\text{-MRH}^*$). Las estructuras de los glicanos transferidos por cada mutante se indican en los paneles correspondientes. (D y H) Cuantificación de las cantidades relativas de las especies di-, mono-, y deglicosiladas de los paneles A–C (D) y E–G (H).

Efecto del contenido de manosas de los *N*-glicanos en la glucosilación mediada por UGGT *in vivo*

La UGGT es una enzima central en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas porque actúa como sensor conformacional agregando una etiqueta de Glc al *N*-glicano de composición M9 de glicoproteínas que no han adquirido aún su estructura nativa. Dado que el contenido de Man del oligosacárido, funciona como un *timer* molecular que indica el tiempo de permanencia de una glicoproteína en el RE, se quiso evaluar si, *in vivo*, la actividad UGGT es sensible al contenido de Man. Para ello se utilizaron mutantes de *S. pombe* que transfieren *N*-glicanos con diferente contenido de Man: M9, M7, M6 y M5 (mutantes $\Delta alg6$, $\Delta alg6/\Delta alg12$, $\Delta alg6/\Delta alg9$ y $\Delta alg6/\Delta alg3$ respectivamente, Tabla 4).

Los oligosacáridos monoglucosilados se pueden originar tanto por deglucosilación del oligosacárido transferido como por reglucosilación por UGGT (Figura 36). Para poder evaluar la actividad *in vivo* de UGGT, los glicanos truncados deben transferirse a las glicoproteínas completamente deglucosilados, por lo tanto se trabajó con mutantes $\Delta alg6$ las cuales no incorporan la primera Glc ni las subsiguientes al oligosacárido que se va a transferir a las proteínas. En las mutantes $\Delta alg6$, la presencia de un residuo de Glc en los *N*-glicanos sólo puede deberse a la acción de la UGGT.

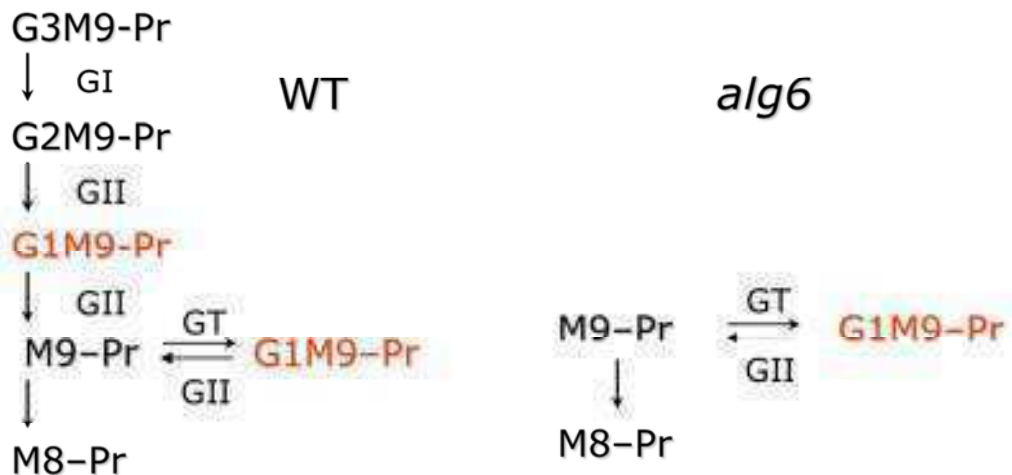


Figura 36. Origen de los oligosacáridos monoglucosilados en *S. pombe* WT y $\Delta alg6$. Los oligosacáridos monoglucosilados pueden originarse tanto por de-glucosilación del oligosacárido transferido como por re-glucosilación por UGGT. En las mutantes $\Delta alg6$, el glicano transferido carece de Glc y por lo tanto el G1M9 sólo se genera por la acción de UGGT. Figura modificada a partir de la referencia 70.

Resultados de la tesis de licenciatura de Solana Alculumbre y la referencia 71 indicaron que en *S. pombe* la actividad de UGGT *in vivo*, a diferencia de lo que ocurre con GII, no se ve afectada por una disminución en el contenido de Man del glicano (Figura 37)

En efecto, se preincubaron las levaduras mutantes con NMDNJ 5 mM durante 60 min (a modo de inhibir la GII) y luego se las incubó con [¹⁴C]Glc por 15 min en presencia de DTT 5 mM. Luego de analizar los patrones de glicanos unidos a proteínas resultantes (en todas las mutantes la proporción de glicanos monoglucosilados/deglucosilados es muy similar, Figura 37 A-D) se puso de manifiesto que el contenido de Man no influencia la actividad de UGGT *in vivo* a diferencia de lo previamente reportado *in vitro* (22).

Estos resultados también fueron confirmados en ausencia de NMDNJ. Como se observa en la Figura 37 E-H, no se detecta presencia de G1M9 en la mutante $\Delta alg6$ pero cantidades crecientes de los respectivos *N*-glicanos monoglucosilados se observan al ir reduciendo el contenido de Man, poniendo de manifiesto la disminución de la actividad GII respecto de glicanos con menor contenido de Man que ya hemos observado (comparar Figura 37 J con 32 E).

Estas observaciones en conjunto con los resultados obtenidos para GII permiten proponer un modelo en el cual UGGT no sería el principal regulador de la permanencia de las glicoproteínas mal plegadas que han sido sustrato de manosidasas en los ciclos de CNX/CRT como se creía hasta el momento. La disminución de la actividad GII respecto de glicanos demanosilados y la ausencia de influencia del contenido de Man en la actividad UGGT favorece la persistencia en el tiempo de especies proteicas con glicanos monoglucosilados, capaces de interaccionar con las lectinas chaperonas CNX y/o CRT y por lo tanto aumenta su probabilidad de plegarse correctamente. La GII adoptaría un rol de regulador central sensible a la demanosilación del sustrato y por lo tanto capaz de regular la permanencia de glicoproteínas mal/lentamente plegadas del RE, en los ciclos de CNX/CRT (ver modelo en la Figura 41).

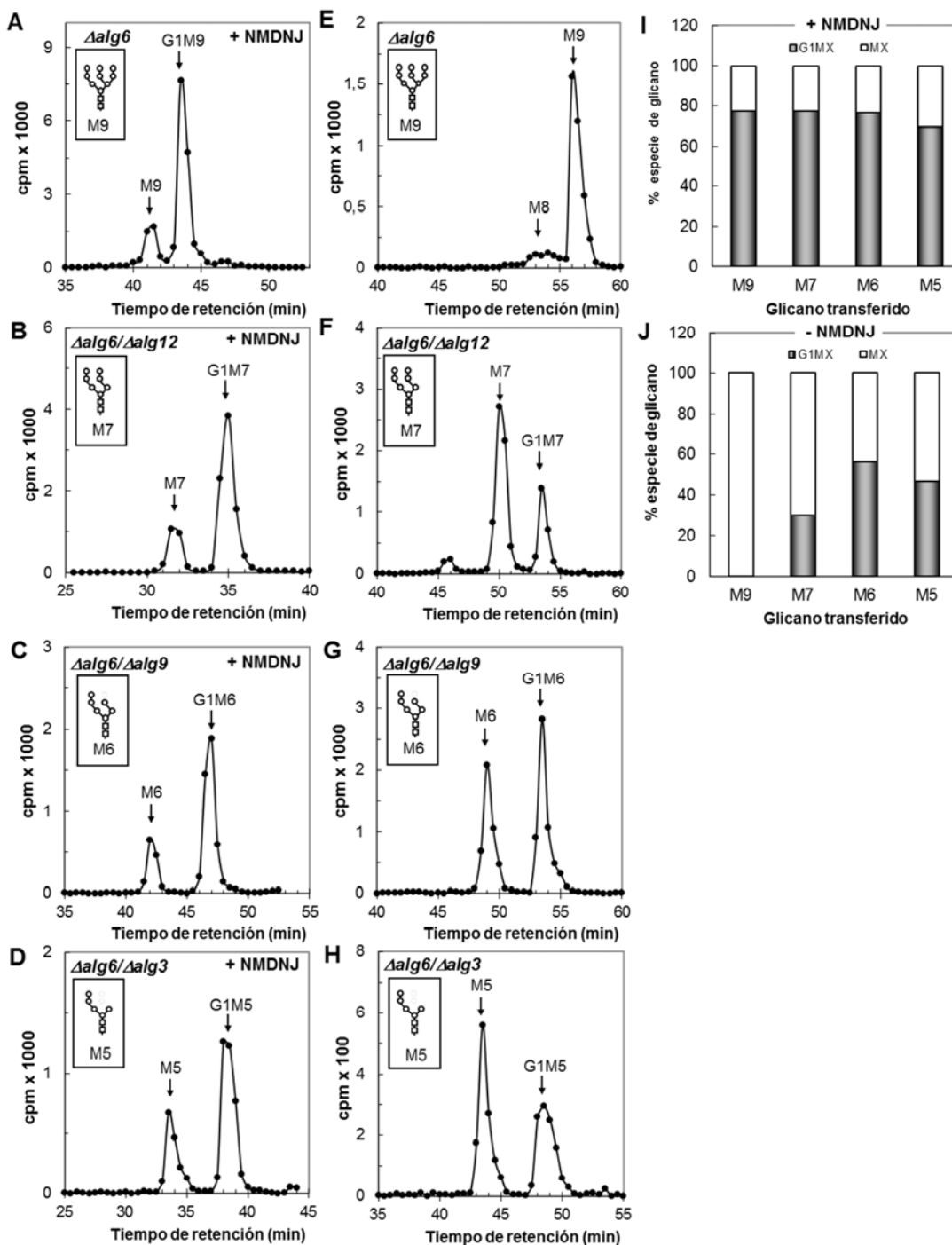


Figura 37. Patrón de glicanos unidos a proteínas en mutantes *S. pombe* que transfieren glicanos deglicosilados con un contenido de Man de nueve a cinco, en condiciones de inhibición o no. (A y E) M9 ($\Delta alg6$), (B y F) M7 ($\Delta alg6/\Delta alg12$), (C y G) M6 ($\Delta alg6/\Delta alg9$) y (D y H) M5 ($\Delta alg6/\Delta alg3$). Las mutantes de los paneles A-D fueron tratadas con NMDNJ 5 mM. Las estructuras de los glicanos transferidos por cada mutante se indican en los paneles correspondientes (I y J). Cuantificación de las cantidades relativas de los glicanos marcados glucosilados y no glucosilados de los paneles A-D (I) y E-H (J). Figura modificada a partir de la referencia 71 y de la Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Lic. Solana Alculumbre, FCEN, UBA.

Efecto del contenido de Man de *N*-glicanos en la actividad *in vivo* de GI

Para descartar un efecto de GI en la disminución de la deglucosilación *in vivo* por GII se analizó la influencia del contenido de Man sobre la actividad GI *in vivo*. Se realizaron marcaciones, como las antes descritas, de mutantes *S. pombe* que transfieren oligosacáridos triglucosilados: G3M9, G3M7 y G3M5 (mutantes $\Delta alg12$, $\Delta alg9$ y $\Delta alg3$, Tabla 4). Estos resultados no mostraron diferencias con los obtenidos para las correspondientes mutantes que transfieren glicanos diglucosilados (Figura 38) y al mismo tiempo no se encuentran restos de glicanos triglucosilados en ninguno de los casos. Esto permitió concluir que en *S. pombe* el contenido de Man no influye en el procesamiento de la Glc más externa por GI. Alternativamente, si existiera un efecto, el mismo sería mucho menor que sobre la deglucosilación mediada por GII.

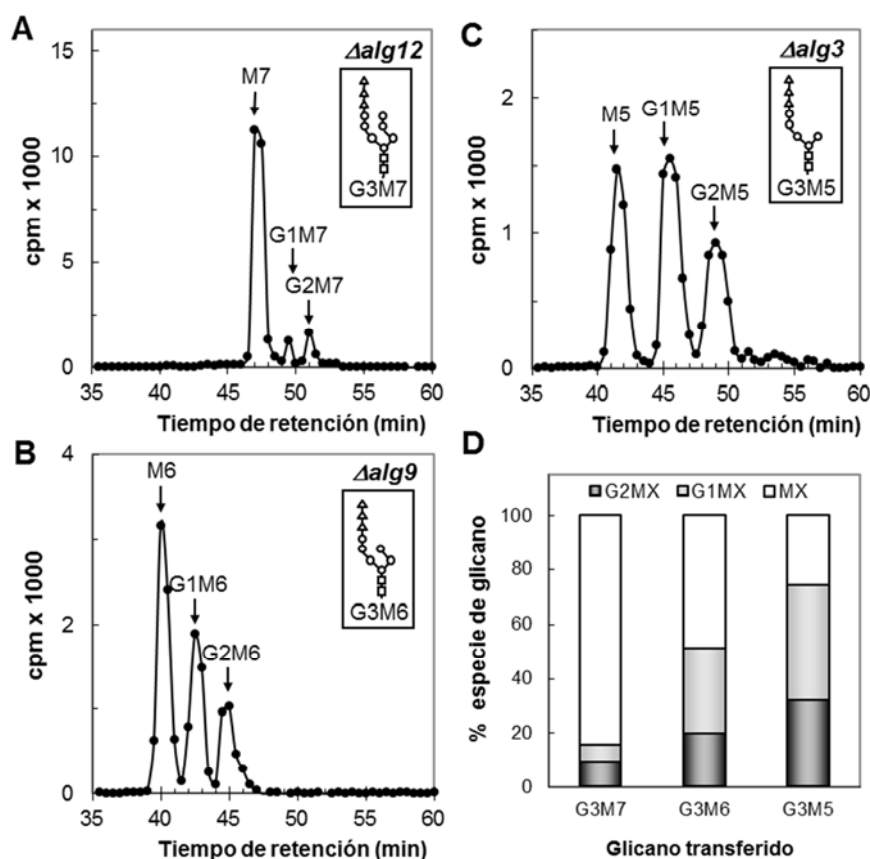
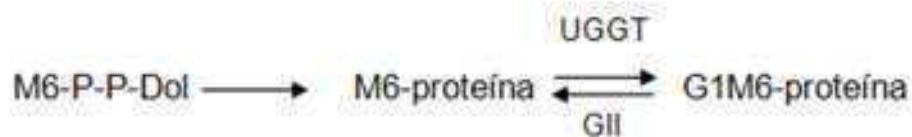


Figura 38. Patrón de glicanos sintetizados por mutantes que transfieren *N*-glicanos triglucosilados con un contenido de Man de siete a cinco. (A) G3M7 ($\Delta alg12$), (B) G3M6 ($\Delta alg9$) y (C) G3M5 ($\Delta alg3$). Se indica en cada panel la estructura del glicano transferido durante la *N*-glicosilación. (D) Cuantificación relativa de las especies de glicanos di, mono y no glucosiladas en los paneles A-D. Figura modificada a partir de la Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Lic. Solana Alculumbre, FCEN, UBA.

El caso de *Leishmania mexicana*

La pregunta que surgió a continuación es si la existencia prolongada de glicanos monoglucosilados debido a la pérdida de actividad GII provocada por la demanosilación en el RE es relevante o no para prevenir la salida de especies mal plegadas de los ciclos CNX/CRT, o para aumentar la probabilidad de que las glicoproteínas con un proceso difícil de plegamiento adquieran la estructura tridimensional correcta. Una manera de intentar contestar dicho interrogante fue analizando lo que ocurre en protozoos tripanosomátidos, los cuales transfieren especies deglucosiladas con menor contenido de Man (M9, M7, o M6 dependiendo de la especie) (81). Estos protozoarios no poseen la enzima que sintetiza el Dol-P-Glc y dependiendo de la especie una o más manosiltransferasas dependientes de Dol-P-Man (82). Además, Samuelson y colaboradores propusieron que existió una pérdida secundaria de glicosiltransferasas a partir de un ancestro que las poseía todas (83). En el caso de *L. Mexicana* se observaron las siguientes reacciones de *N*-glicosilación/procesamiento de *N*-glicanos en RE (66):



El genoma de *L. Mexicana* posee genes putativos para las subunidades GII α y GII β y esta última posee dominios G2B y MRH. Por lo tanto, el dominio MRH de GII β de *L. Mexicana* tiene dos posibilidades: o ha evolucionado hacia una estructura con mayor afinidad por glicanos de menor contenido de Man o bien ha conservado la afinidad por M9 del microorganismo ancestral. Si el dominio MRH de GII β de *L. Mexicana* tuviese una mayor afinidad por glicanos con bajo contenido de Man, esto eliminaría la posibilidad de prevenir la salida de especies mal/lentamente plegadas hacia el Golgi, extendiendo la existencia de glicanos monoglucosilados. Por otra parte, mantener una alta afinidad por glicanos de alto contenido de Man resultaría en una deglucosilación lenta de todas las glicoproteínas, incluyendo las especies mal plegadas o de plegamiento lento.

Para contestar dicho interrogante se ensayaron fracciones microsomales de *L. mexicana* comparando la deglucosilación de G1M9 con la de G1M6 (ambos con la misma actividad específica) y se observó que el dominio MRH de GII β mantuvo la especificidad original por *N*-glicanos de alto contenido de Man (Figura 39). Estos glicanos fueron marcados tanto en los residuos de Man como en los de Glc, de modo que confirmamos la medición de

deglucosilación y no de demanosilación agregando a la mezcla de reacción 1-deoximanojirimicina (un inhibidor de manosidasas de RE) sólo o en combinación con NMDNJ. La deglucosilación del sustrato fue completamente inhibida cuando se agregó ambos inhibidores en conjunto (Figura 39).

Dado que el dominio MRH de GII β de *L. mexicana* reconoce preferencialmente glicanos con alto contenido de Man, aquellas especies mal plegadas o de plegamiento lento que permanecen en el RE por períodos prolongados de tiempo son capaces de presentar glicanos monoglucosilados que les permitan completar su proceso de plegamiento mediante la interacción con lectinas/chaperonas del RE CNX y/o CRT. Estos resultados sugieren que la regulación de la existencia de glicanos monoglucosilados mediada por GII es un factor importante en el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE.

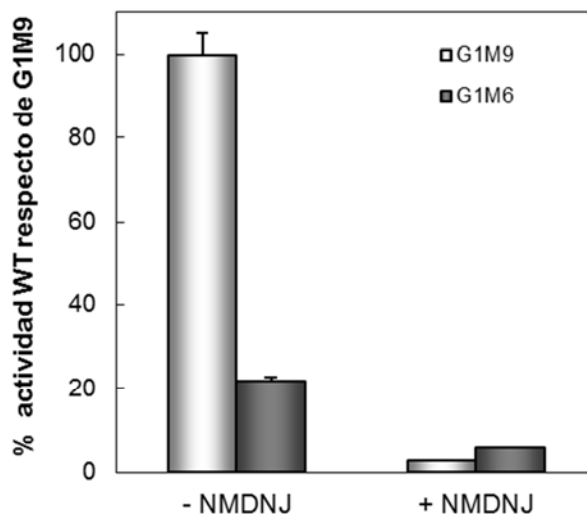


Figura 39. Actividad de GII de *L. mexicana* respecto de los sustratos G1M9 o G1M6. Se determinó la actividad GII en 125 μ g de microsomas. En todos los casos las reacciones contenían 1-deoximanojirimicina 1 mM y, donde se indica, la misma concentración de NMDNJ. El porcentaje de Glc total liberada fue calculada a partir del contenido de [14 C]Glc de cada glicano (Ver Materiales y Métodos). El valor para G1M9 fue tomado como 100%.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

GII β es necesaria para la retención del heterodímero GII en el RE, pero no para el plegamiento de GII α o su actividad sobre pNPG

Cuando se reportó por primera vez la estructura dimérica de GII, se asumió que el único rol de la subunidad GII β sería el de proveer un elemento (el motivo XDEL en el C-terminal) para la localización en RE de la subunidad GII α (26, 27). Trabajos posteriores asignaron nuevas posibles funciones para GII β . Por ejemplo, se postuló que en células de mamífero era requerida para un plegamiento eficiente de la subunidad catalítica (36). Reportes más recientes cuestionaron estos dos roles (localización en RE y plegamiento eficiente de GII α) dado que en *S. cerevisiae* GII α alcanzó una conformación activa y una localización en RE en ausencia de GII β (44). Más aún, en dicha levadura GII β carece de señal de retención/recuperación en RE. Sorprendentemente, en este mismo organismo se reportó que GII β sería requerida para el corte de la Glc mas interna pero no para la Glc del medio (Residuos *l* y *m* respectivamente, Figura 2). Los resultados que se muestran en esta tesis demuestran que en *S. pombe* GII β no es requerida para el plegamiento correcto de GII α ni para su actividad, dado que células Δ GII β mostraron una actividad GII completa cuando esta fue medida con pNPG como sustrato, valor que fue aún mayor al que presentan las células *WT* (Figura 16).

Aquí demostramos que en *S. pombe* GII β está, de hecho, involucrada en la localización subcelular del heterodímero GII. La disrupción de GII β disminuyó el contenido de GII α en el RE y además la adición del tetrapéptido de retención VDEL presente en GII β al extremo C-terminal de GII α y la expresión de dicha construcción en células Δ GII $\alpha\beta$ resultó en una mejora significativa de la retención en RE de la subunidad catalítica (Figura 18). Sin embargo, a pesar de que la señal de retención/recuperación en RE de tipo XDEL pudo suplir el rol de GII β en la retención de GII α no se le puede atribuir la completa función de retención de la holoenzima en RE. Los resultados que se observan en las Figuras 23 F y 23 G, indican que existió un procesamiento normal de glicanos cuando la señal de retención estuvo ocluida por diez aminoácidos o bien por YFP (Ver Materiales y Métodos), sugiriendo la presencia de mecanismos adicionales de retención además de la secuencia mencionada anteriormente. Ha sido reportado que tanto remover como ocluir la señal de retención en RE tiene efectos similares en la localización de proteínas (38). Cuando removimos el tetrapéptido de retención en el RE de GII β y expresamos esta variante en células Δ GII β o Δ GII $\alpha\beta$, no existieron variaciones significativas en los niveles de GII α en el RE ni tampoco en los niveles de GII β , respecto de la GII β conteniendo VDEL (Figura 19).

Se puede concluir por lo tanto que GII β y su señal de retención en el RE presente en el C-terminal cumplen un papel en la retención de GII en RE, pero que otros mecanismos adicionales de retención parecen estar operando. Más aún, aquellas células que carecían de GII β presentaron un contenido de GII α en el RE que varió entre el 20 y el 50% comparado con las células *WT* en diferentes preparaciones (Figuras 16, 18, y 25), lo cual sugiere que la subunidad GII α podría poseer en su secuencia alguna otra señal desconocida de localización en el RE.

Se han descrito mecanismos de localización subcelular redundantes para otras proteínas solubles de RE como la CRT (84). Mieskes y colaboradores proponen dos mecanismos independientes de retención/recuperación para CRT: un mecanismo provee la retención en el RE de manera Ca²⁺-dependiente, mientras que el otro mecanismo está basado en la señal de retención del tipo XDEL. La GII β de mamíferos posee dominios EF-hand de unión a Ca²⁺, por lo tanto resultaría significativo analizar si existe un rol de dichos dominios en la retención de GII en el RE de mamíferos.

GII β es necesaria para el procesamiento de *N*-glicanos por GII

El hallazgo más significativo reportado en la primera serie de experimentos de esta tesis consiste en que GII β es un requerimiento absoluto para la hidrólisis eficiente de los sustratos fisiológicos de la GII, G2M9 y G1M9, pero no para la hidrólisis del sustrato pNPG, una molécula mucho más pequeña. Dicho requerimiento fue demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Figuras 20 y 23). En contraste con lo reportado en la referencia 44, que indicaba que en *S. cerevisiae* GII β sería requerida para la hidrólisis de G1M9 pero no para la hidrólisis de G2M9, los resultados obtenidos a partir de los experimentos de caza con CHX en células en crecimiento demostraron que en *S. pombe* GII α por sí sola es capaz de procesar ambos glicanos aunque a tasas muy reducidas. Esto no fue debido a un menor contenido de GII α en RE ya que las células Δ GII $\alpha\beta$ que expresaban GII α VDEL, las cuales contenían GII α en RE a niveles similares que levaduras *WT*, tampoco eran capaces de hidrolizar los sustratos normalmente. Posteriormente a la publicación de nuestros resultados, dichos autores confirmaron que en *S. cerevisiae* GII β también está involucrada en la hidrólisis de G2M9 (80).

La proteólisis selectiva de GII β purificada partir de hígado de rata redujo la capacidad de hidrolizar ambos sustratos fisiológicos pero no la de procesar pNPG. Esto indica que también en la enzima de mamíferos la subunidad GII β es requerida para un procesamiento eficiente de los *N*-glicanos (Figura 27).

Dominio MRH de GII β y modelos de reconocimiento del oligosacárido por GII

A partir de los resultados que confirman a GII β como un regulador del procesamiento de *N*-glicanos por GII, decidimos investigar cuales eran los determinantes presentes en GII β que mediaban el procesamiento de oligosacáridos. En particular, analizamos la influencia de los dominios MRH y G2B de GII β en el aumento de hidrólisis de oligosacáridos de alta manosa por parte de GII α mediado por GII β .

El dominio MRH fue identificado en primera instancia como un dominio lectina conservado entre los receptores de Man6P CD-MPR y CI-MPR. A través de este dominio los M6PR contactan glicanos conteniendo la señal Man6P presentes en hidrolasas ácidas y las envían a los lisosomas (85). Estudios cristalográficos del CD-MPR bovino complejado con Man6P mostraron que el bolsillo de binding contiene aminoácidos que unen Man con enlaces α 1,2 y aminoácidos que unen el grupo fosfato (86). En los alineamientos de secuencia de los dominios MRH de GII β con M6PRs se observa la misma distribución de aminoácidos involucrados en la unión de Man, pero no la de aquellos que unen el fosfato (ausentes en GII β) (35). Evaluamos la posibilidad, entonces, de que la hidrólisis eficiente de glicanos pueda estar mediada por la interacción del dominio MRH y de GII β con las Man de las ramas B y/o C de los *N*-glicanos de las glicoproteínas. Esta predicción resultó ser correcta, ya que mutaciones en el dominio MRH de GII β en los aminoácidos conservados entre varias proteínas que contienen dominios MRH (e involucrados en la interacción del M6PR con unidades de Man) redujeron significativamente la capacidad de GII de hidrolizar los sustratos G2M9 y G1M9 (Figuras 25 y 26).

Al menos dos mecanismos pueden ser propuestos para el aumento de las tasas de deglucosilación de glicanos mediadas por el dominio MRH. En el primer mecanismo, luego de hacer contacto con las Man en las ramas B y/o C del glicano, el dominio MRH presentaría los enlaces a ser hidrolizados al sitio catalítico de GII α (Figura 40 A). Esta posibilidad resulta poco probable si se toma en cuenta la estructura tridimensional del glicano Glc₃Man₉GlcNAc₂ determinada por RMN: el enlace a ser procesado en primer lugar (Glc α 1,3Glc) está expuesto en la cara externa de la rama A (residuos *d*, *f* y *g*, Figura 2), mientras que la segunda unión (Glc α 1,3Man) se dispone hacia el lado interno (es decir, se orienta hacia las ramas B y C, residuos *h*–*k* en la Figura 2) (87). La necesidad de reorientar el sustrato haría que el mecanismo propuesto anteriormente no sea el más adecuado, ya que los enlaces a ser procesados se posicionan distantes en el espacio y no pueden ser alcanzados concebiblemente por el único sitio catalítico de GII α sin alguna reorientación. Sin embargo,

este mecanismo no puede ser descartado ya que la flexibilidad de los enlaces que unen las Man *c*, *d*, *f*, y *g* podría permitir la presentación sucesiva de ambos enlaces del glicano unido al dominio MRH al sitio catalítico (88). Probablemente sea la reorientación del sustrato lo que previene los cortes consecutivos de ambos residuos, permitiendo así a la glicoproteína ingresar al ciclo de CNX/CRT cuando se haya en la forma monoglucosilada.

El segundo mecanismo fue propuesto por A. Helenius y colaboradores para explicar el requerimiento aparente por parte de la GII de mamíferos de dos glicanos en la misma glicoproteína para realizar el primer corte de modo eficiente (46). De acuerdo con este mecanismo (Figura 40 B y Figura 7 en la referencia 44), la unión del dominio MRH de GII β a un glicano no resultaría en la presentación del glicano al sitio catalítico sino que produciría un cambio conformacional en la subunidad GII β que a su vez modificaría la conformación de GII α , activando de esta manera el sitio activo. Debido a los motivos estructurales de los enlaces mencionados anteriormente, fue propuesto que el *binding* del dominio MRH de GII β a un glicano activaría el primer corte en un glicano “vecino”. El segundo corte de este último glicano sería activado por la unión de sus propias Man de las ramas B y C a un dominio MRH dado que dichas ramas y el enlace Glc α 1,3Man se encontrarían ahora en la misma orientación. La rotación necesaria de las ramas del glicano en el primer modelo es remplazada en el segundo modelo por la unión de dos glicanos diferentes a GII. Sin embargo, se han estudiado casos en los que glicoproteínas que portan sólo un *N*-glicano interaccionan con CNX y/o CRT, y son por lo tanto sustrato de GII. De acuerdo con lo propuesto por el segundo modelo, estos casos pueden deberse a la trans-activación del primer corte por un *N*-glicano presente en otra glicoproteína en el lumen del RE donde existe una alta concentración proteica, o a una actividad GII basal independiente de GII β para glicoproteínas que tienen un proceso de plegamiento más lento (Figura 6). Es interesante resaltar que la sugerencia de que existen dos actividades GII, una independiente (basal) y la otra dependiente de la presencia de GII β , y de que la activación de la deglucosilación del *N*-glicano se debía a la interacción de las Man del glicano de las ramas B y/o C con el dominio MRH de GII β , se realizó aunque no existían evidencias experimentales para todas las suposiciones que se hicieron al momento de dicho trabajo.

El presente trabajo demuestra que GII tiene de hecho una actividad basal que se pone de manifiesto cuando se utiliza como sustrato a pNPG en ausencia de GII β . Además, en *S. pombe* y en células de mamífero, la subunidad GII β permite un procesamiento eficiente de los glicanos mediante la interacción de su dominio MRH con las Man presentes en las ramas B y/o C de los *N*-glicanos (actividad dependiente de GII β).

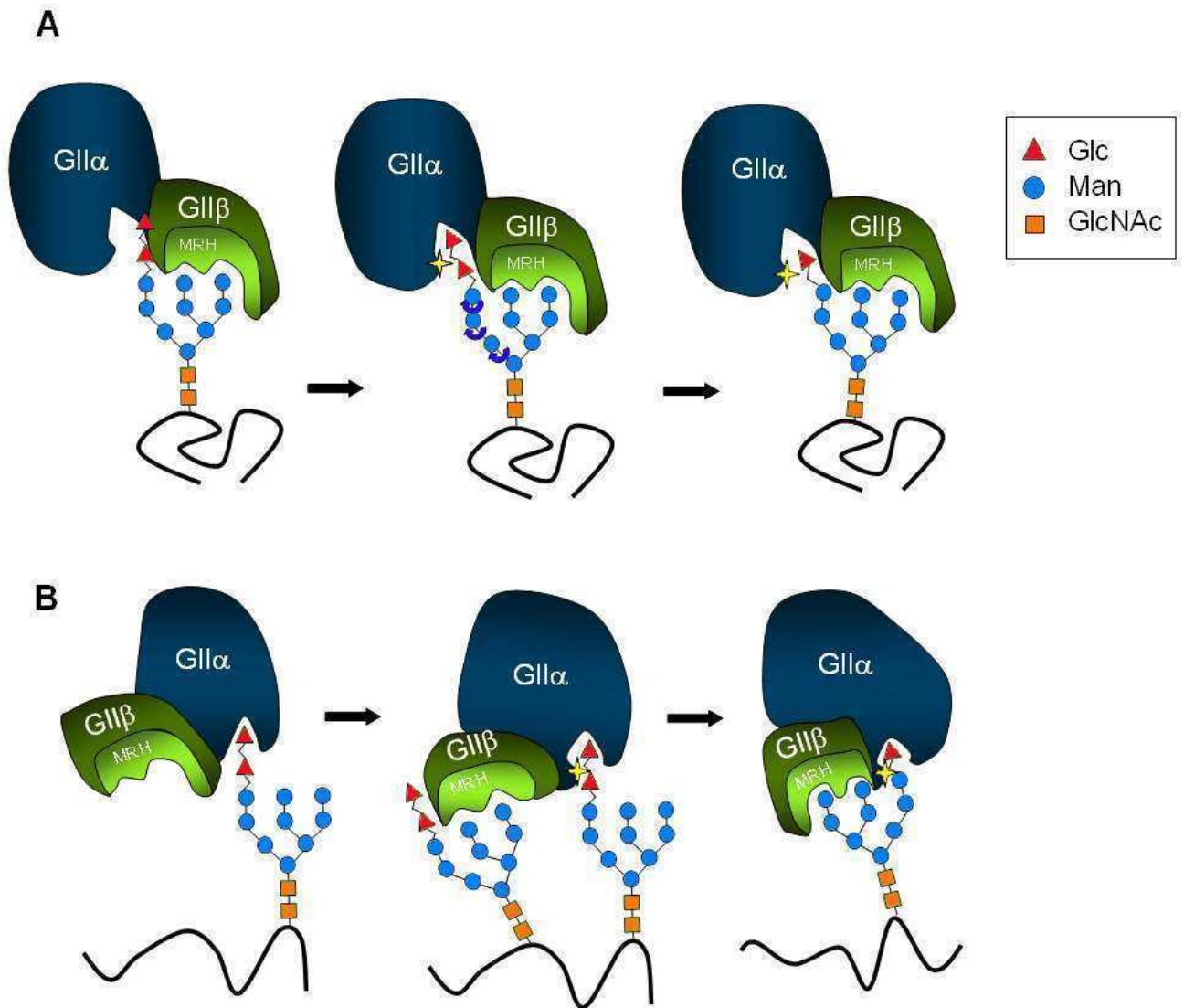


Figura 40. Modelos propuestos para la estimulación de la deglucosilación de N-glicanos mediada por GIIβ. (A) Al unirse las unidades de Man en las ramas B y/o C del glicano, el dominio MRH presente en GIIβ presenta los enlaces a ser procesados al sitio catalítico de GIIα (estrella). Notar que este modelo requiere la rotación de la rama A para que ambos cortes puedan proceder. (B) La unión de un glicano al dominio MRH de GIIβ resultaría en un cambio conformacional en GIIβ que a su vez modificaría la estructura de la subunidad GIIα activando de esta manera al sitio catalítico y permitiendo la hidrólisis de la primera Glc en un segundo glicano. El procesamiento de la Glc mas interna en este último glicano estaría mediado por la interacción de las Man en sus propias ramas B y/o C con el dominio MRH.

El dominio G2B está involucrado en la interacción GII α -GII β

Reportes previos han propuesto que el dominio G2B localizado próximo al N-terminal de GII β (Figura 28) se haya involucrado en la interacción GII α -GII β (36) o, adicionalmente, en la deglucosilación de G2M9 (80). Nuestros resultados apoyan la primera observación, ya que si bien microsomas de células carentes de GII β pero que expresan GII β con mutaciones en el dominio G2B no son capaces de restablecer la capacidad de GII α de deglucosilar el sustrato G1M9, las causas de este resultado subyacen en el bajo contenido de GII α en RE (Figura 29 C). Estos niveles, a su vez, apoyan el rol de GII β como responsable parcial de la retención de GII α en RE (Figura 29 C). Además, los patrones de glicanos unidos a proteínas de cepas que transfieren G2M9 y G2M6, carentes de GII β pero que expresaban GII β con mutaciones en el dominio G2B fueron similares a aquellos que se observaron en células Δ GII β (71, datos no mostrados). Nuestra interpretación es que la ausencia de interacción GII α -GII β no permitió el aumento de deglucosilación mediado por el dominio MRH debido a una disminución del contenido de GII α en el RE. Todos estos resultados demuestran que el dominio G2B no está directamente involucrado en la deglucosilación de G2M9 o G2M6 en *S. pombe*.

Efecto de la estructura del N-glicano en la actividad de enzimas que procesan glicanos en el RE

La segunda parte del trabajo se centra en identificar los determinantes presentes en el sustrato de GII que permiten una eficiente deglucosilación del oligosacárido *in vivo*. Adicionalmente, se estudió en el laboratorio el rol que cumplían dichos determinantes en la actividad de las enzimas que participan en el procesamiento del N-oligosacárido durante el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE.

La demanosilación del sustrato reduce su reconocimiento por GII in vitro

En una primera aproximación *in vitro*, en este trabajo pudimos confirmar la observación previa de Grinna y Robbins (31) que sugería que la tasa de procesamiento de glicanos de la GII de mamíferos decrecía en función del grado de demanosilación que presentaban los sustratos G2M9 y G1M9. Esto resultó cierto también para la enzima de *S. pombe*: tanto la remoción enzimática de unidades de Man de las ramas B y/o C del N-glicano (Figura 30), la mutagénesis del dominio MRH en GII β (Figura 25 A) o la interrupción del gen que codifica para la subunidad GII β (Figura 20) redujeron las tasas de hidrólisis de N-glicanos.

La disminución del contenido de Man del N-glicano reduce la actividad GII in vivo: Influencia del dominio MRH

En función de los resultados que se discuten en la sección anterior, decidimos analizar los requerimientos estructurales del N-glicano para una deglucosilación eficiente *in vivo* por GII. Se emplearon cepas mutantes que transfieren oligosacáridos truncados de estructura G2M9, G2M7, G2M6 y G2M5 a las proteínas (Tabla 4). Los glicanos con mayores niveles de deglucosilación *in vivo* en la levadura *S. pombe* fueron G2M9 y G1M9 ya que no se hallaron trazas de dichos glicanos luego de los 15 min de marcación de oligosacáridos (Figura 32 A). La deglucosilación decreció progresivamente en glicanos con siete, seis o cinco Man: se comenzaron a observar mayores cantidades de sus derivados di y monoglucosilados a medida que se reducía el contenido de Man (Figura 32 B–E). No obstante, aún el glicano más pequeño fue reconocido *in vivo* por el dominio MRH dado que la expresión en células $\Delta GII\beta$ de GII β exógena, pero no la de GII β con mutaciones en el dominio MRH, restauró por completo los patrones comparados con aquellos de células que expresan GII β endógena (Figura 35). Este resultado sugiere que a pesar de que la afinidad del dominio MRH por G1M9 es aproximadamente siete veces mayor que por G1M5, el reconocimiento del residuo e además de los residuos *i* y *k* por parte del dominio MRH (Ver Figura 2 y referencia 89) podría influenciar las tasas catalíticas cuando se hayan expuestos en un glicano como en el caso de G1M5 (Figura 2).

Inesperadamente, a pesar de que la deglucosilación *in vivo* de G2M7, G2M6 y G2M5 fue similar para las cepas que expresaban GII α pero no GII β (levaduras $\Delta GII\beta$ que transferían glicanos truncados), el procesamiento por GII de G2M9 fue significativamente menor en el último caso (Figura 34). Este resultado sugiere que existe una interacción entre los residuos *j* y/o *k* con el sitio catalítico o con las Glc que disminuiría la deglucosilación de G2M9 en ausencia de GII β . En una holoenzima operativa, la interacción entre el dominio MRH de GII β y el glicano completo podría no solo presentar a este último al sitio catalítico (acelerando la deglucosilación) sino también suprimir los efectos inhibitorios de los residuos *j* y/o *k*.

El contenido de Man del N-glicano no influye en la actividad de la GI in vivo

Experimentos *in vivo* realizados en levaduras *S. pombe* que transfieren G3M9, G3M7, G3M6 y G3M5 demostraron que una reducción del contenido de Man no influyó en el procesamiento de la Glc mas externa del N-glicano (residuo *n*, Figura 2). Dicho efecto no existe en *S. pombe*, o bien el efecto es mucho menor que el que se ejerce sobre la actividad

GII. También es posible que los niveles de actividad GI sean mucho más altos que aquellos observados para GII (Resultados obtenidos en la tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas de la Lic. Solana Alculumbre, FCEN, UBA).

El contenido de Man del N-glicano no influye en la actividad UGGT in vivo

La Lic. Solana Alculumbre durante su tesis de grado obtuvo mutantes de *S. pombe* que transfieren, durante la *N*-glicosilación, oligosacáridos completamente deglucosilados con distinto contenido de Man. Esto permitió realizar experimentos de marcación y estudiar la influencia *in vivo* de la estructura de los glicanos sobre la actividad de UGGT, enzima clave en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE. Los resultados mostraron que, en oposición a los datos que se habían reportado previamente en ensayos de actividad de UGGT *in vitro* (22), no existe influencia del contenido de Man del glicano en la actividad enzimática de UGGT *in vivo* (Figura 37). En los ensayos realizados previamente en la referencia 22 se habían utilizado glicanos deglucosilados unidos a un único aminoácido (Asn) como aceptores del residuo de Glc y no glicoproteínas desnaturalizadas que son el sustrato natural de la UGGT. Esto pone de manifiesto la relevancia de los ensayos realizados *in vivo* para definir la especificidad de la proteína. Los resultados obtenidos en ausencia del inhibidor de GII, muestran nuevamente la influencia del contenido de Man en la actividad GII en concordancia con los resultados presentados en este trabajo.

Glicanos de biosíntesis vs. Glicanos de degradación

La formación *in vivo* de glicanos unidos a proteínas de estructura G1M9, G1M8, G1M7, y G1M6 ha sido detectada en hígado de rata (90). Sin embargo, el orden en el que las Man son removidas en el RE no es exactamente el inverso que la adición de Man en la biosíntesis del $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (descrito en Figura 2) ya que existe una hidrólisis preferencial del primer residuo, *i*, seguido por el residuo *k* en *S. pombe* como también en otros tipos celulares (91). De tal modo, los glicanos que transfieren las cepas mutantes, analizadas en este trabajo, no son exactamente iguales a aquellos producidos durante la degradación de *N*-oligosacáridos *in vivo*. De todos modos, las afinidades reportadas del dominio MRH por glicanos producidos por procesamiento en el RE indican que el dominio MRH reconoce primariamente el residuo *k*, seguido del residuo *i*. Por lo tanto el G1M7 producido por el procesamiento en RE (sin los residuos *i* y *k*) es, tal vez, deglucosilado a niveles más bajos que el G1M7 utilizado en el presente trabajo (sin los residuos *j* y *k*) dado que el primero de estos glicanos no posee el residuo *i*, el cual es el segundo residuo más

importante reconocido por el dominio MRH. Se espera, entonces, que la remoción adicional de Man con enlaces α 1,2 que ocurre en el RE reduzca la afinidad del dominio MRH por dichos glicanos y en consecuencia las tasas de deglucosilación por GII.

Con respecto a la UGGT nuestros resultados indican que todos los glicanos que contiene el residuo *g* serán glucosilados de igual modo independientemente de su contenido de Man (Figura 37).

La relevancia de poseer un mecanismo de deglucosilación lento para aumentar la franja temporal en la que un glicano en particular exhibe un epítoto monoglucosilado se sustenta en los resultados obtenidos con el parásito *L. mexicana*. Dicho protista transfiere M6 a sus glicoproteínas, no posee actividad manosidasa en su RE y aun así ha conservado a su GII β con una mayor afinidad por glicanos con alto contenido de Man derivada de ancestros (Figura 39), lo que le permite mantener niveles bajos de deglucosilación para las especies mal/lentamente plegadas. Nuestros resultados proveen de un nuevo enfoque a los elementos que regulan el control de calidad del plegamiento de las glicoproteínas en el RE.

Modelo propuesto para la función regulatoria de la GII en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE

Basándonos en la observación de que existe una disminución de la actividad GII y que no existen cambios en la actividad de UGGT cuando se disminuye el contenido de Man del *N*-glicano de las proteínas, podemos especular que a medida que ocurre la demanosilación en el RE de glicoproteínas mal/lentamente plegadas, el contenido de glicanos monoglucosilados aumenta relativamente. Este aumento previene la salida prematura de especies mal/lentamente plegadas hacia el Golgi y aumenta su probabilidad de plegarse correctamente interaccionando con CNX y/o CRT (Figura 41). El descenso en la afinidad de CRT (y probablemente de CNX) por *N*-glicanos con menor contenido de Man (la afinidad por G1M5 es un 65% que por G1M9) está, aparentemente, más que compensada por la reducción en la capacidad de GII de deglucosilar especies monoglucosiladas (la actividad respecto de G1M5 es aproximadamente un 3% la de G1M9 *in vitro*) (31, 92).

La presencia del dominio MRH le confiere a GII β un rol fundamental en procesamiento de *N*-glicanos, ya que convierte a GII en una proteína capaz de sensor el grado de demanosilación de los oligosacáridos, modulando la actividad hidrolítica de GII α . La disminución de la actividad GII respecto de oligosacáridos con menor contenido de Man y su capacidad de desplazar el equilibrio hacia la existencia prolongada de especies

monoglucosiladas convierten a GII β en una proteína de gran relevancia en el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE.

El mal funcionamiento de GII β podría provocar cambios ubicuos en la célula, lo que podría explicar por qué mutaciones en esta subunidad afectan diversas funciones celulares. Las observaciones que indican que GII β está involucrada en el desarrollo neural, que es capaz de asociarse a moléculas de RNA y que participa en otros procesos aquí descritos indican que esta proteína no solo estaría involucrada en eventos del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas sino también en procesos celulares aún desconocidos.

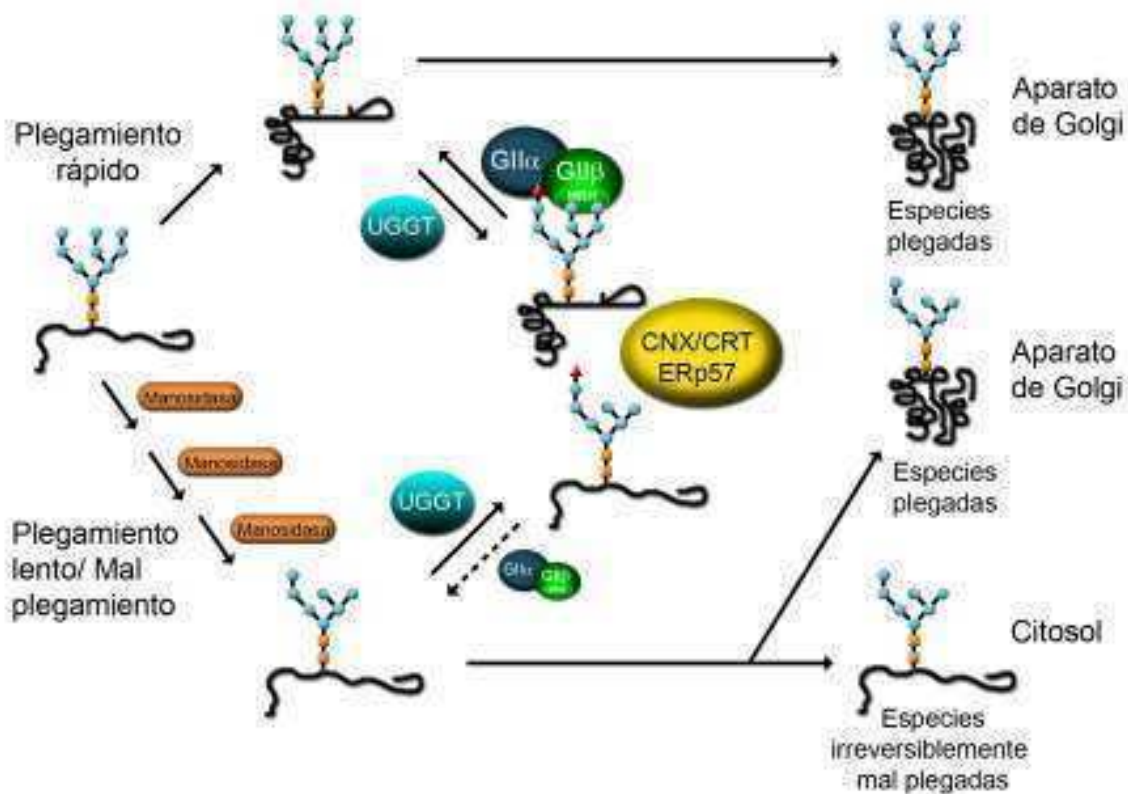


Figura 41. Modelo propuesto de GII como un regulador *in vivo* de la permanencia de glicoproteínas mal plegadas o de lento plegamiento en el RE. Las especies que permanecen mucho tiempo en el RE se caracterizan por una demanosilación de sus N-glicanos por manosidasas residentes del RE. La reducción del contenido de Man disminuye la actividad glucosidasa de GII *in vivo* mientras que no influencia la glucosilación mediada por UGGT *in vivo*. Esta diferencia aumentaría la probabilidad de las glicoproteínas de encontrarse en un estado monoglucosilado que permitiría la asociación con CNX/CRT durante períodos más largos.

Conclusiones

La estructura tanto de la parte proteica como la del glicano determina si una glicoproteína es retenida en el RE, enviada a su destino final o bien retrotranslocada al citosol y degradada por los proteasomas. Por lo tanto, es de gran importancia entender los mecanismos que regulan el procesamiento de los glicanos en las distintas etapas del plegamiento de las glicoproteínas.

En el presente trabajo demostramos que:

- 1) GII β cumple un rol en la retención del heterodímero GII en el RE de *S. pombe* tanto por su señal C-terminal VDEL como por otros elementos aún desconocidos.
- 2) En ausencia de GII β , GII α se pliega de manera correcta y es capaz de hidrolizar el análogo de sustrato pNPG.
- 3) La subunidad GII β es requerida para una eficiente deglucosilación de los sustratos fisiológicos G2M9 y G1M9 tanto *in vitro* como *in vivo* en *S. pombe*.
- 4) GII β también está involucrada en el procesamiento de glicanos en mamíferos.
- 5) El dominio MRH presente en el extremo C-terminal de GII β interacciona con Man presentes en las ramas B y/o C del glicano, mediando la hidrólisis del sustrato por GII α .
- 6) GII β posee un dominio N-terminal (G2B) esencial para la interacción GII α -GII β .
- 7) Una reducción en el contenido de manosas de los *N*-glicanos disminuye significativamente la deglucosilación *in vivo* mediada por GII pero no afecta la glucosilación *in vivo* mediada por UGGT. Esto sugiere que GII funcionaría como un regulador de la permanencia en los ciclos de CNX/CRT de las glicoproteínas que se pliegan muy lentamente, y por lo tanto han sido demanosiladas, otorgando más oportunidades de plegamiento a las proteínas antes de enviarlas a degradación.

Los estudios realizados en esta tesis fueron realizados primordialmente en la levadura de fisión *S. pombe*, pero las conclusiones que de aquí se desprenden se presumen aplicables a células de mamíferos (19, 79, 93).

REFERENCIAS

- 1 Calì, T., Vanoni, O. y Molinari, M. (2008). The endoplasmic reticulum: crossroads for newly synthesized polypeptides chains. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **83**, 135-179.
- 2 Connolly, T. y Gilmore, R. (1986). Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. *J. Cell Biol.* **103**, 36-44.
- 3 Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. y Molinari, M. (2010). *N*-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* **35**, 74-82.
- 4 Johnson, A.E. y Van Waes, M.A. (1999). The translocon: a dynamic Gateway at the ER membrane. *Ann. Rev. Cell Dev Biol.* **15**, 799-842.
- 5 Anelli, T. y Sitia, R. (2008). Protein quality control in the secretory pathway. *EMBO J.* **27**, 315-327.
- 6 Helenius, A. y Aebi, M. (2004). Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019-1049.
- 7 Herscovics, A. (1999). Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1473**, 96-107.
- 8 Helenius, A. y Aebi, M. (2001). Intracellular functions of *N*-linked glycans. *Science.* **291**, 2364-2369.
- 9 Wildt, S. y Gerngross, T.U. (2005). The humanization of *N*-glycosylation pathways in yeast. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 119-128.
- 10 Parodi, A. J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69-95.
- 11 Trombetta, E. S. y Parodi, A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 649-76.
- 12 D'Alessio, C., Caramelo, J. J. y Parodi, A. J. (2010). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control. *Sem. Cell Dev. Biol.* **21**, 491-499.
- 13 Kelleher, D.J. y Gilmore, R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology.* **16**, 47R-62R.
- 14 Knauer, R. y Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 17249-17256.
- 15 Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W. y Aebi, M. (2002). *N*-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science.* **29**, 1790-1793.
- 16 Schallus, T., Jaekch, C., Fehér, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feii, T., Pieler, T. y Muhle-Goll, C. (2008). Malectin: A novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein *N*-glycosylation. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 3404-14.
- 17 Trombetta, E. S., Bosch, M. y Parodi, A. J. (1989). Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry.* **28**, 8108-8116.
- 18 Taylor, S.C., Thibault, P., Tessier, D.C., Bergeron, J.J.M. y Thomas, D.Y. (2003). Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase. *EMBO Rep.* **4**, 405-11.
- 19 Fernández, F. S., Trombetta, S. E., Hellman, U. y Parodi, A. J. (1994). Purification to homogeneity of

- UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 30701–30706.
- 20 Guerin, M. y Parodi A.J. (2003). The UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase is organized in at least two tightly bound domains from yeast to mammals. *J. Biol. Chem.* **278**, 20540-6.
- 21 Caramelo, J.J., Castro, O.A., de Prat-Gay, G. y Parodi, A.J. (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J. Biol. Chem.* **279**, 46280–5.
- 22 Sousa, M., Ferrero-García, M. A. y Parodi, A. J. (1992). Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry.* **31**, 97-105.
- 23 Alonso, J.M., Santa-Cecilia, A. y Calvo, P. (1993). Effect of bromoconduritol on glucosidase II from rat liver. A new kinetic model for the binding and hydrolysis of the substrate. *Eur. J. Biochem.* **215**, 37-42.
- 24 Alonso, J.M., Santa-Cecilia, A. y Calvo, P. (1991). Glucosidase II from rat liver microsomes. Kinetic model for binding and hydrolysis. *Biochem. J.* **278**, 272-7.
- 25 Cumpstey, I., Butters, T.D., Tennant-Eyles, R.J., Fairbanks, A.J., France, R.R. y Wormald, M.R. (2003). Synthesis of fluorescence-labelled disaccharide substrates of glucosidase II. *Carbohydr. Res.* **338**, 1937-49.
- 26 Trombetta, E.S., Simons, J.F. y Helenius, A. (1996). Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 27509-16.
- 27 D'Alessio, C., Fernández, F., Trombetta, E.S. y Parodi, A.J. (1999). Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunit-encoding genes on glycoprotein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 25899–25905.
- 28 Ugalde, R.A., Staneloni, R.J., Leloir, L.F., (1979). Microsomal glucosidases acting on the saccharide moiety of the glucose-containing dolichyl diphosphate oligosaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1174-81.
- 29 Herscovics, A. y Jelinek-Kelly, S. (1987). A rapid method for assay of glucosidases involved in glycoprotein biosynthesis. *Anal Biochem.* **166**, 85-9.
- 30 Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I. e Ito, Y. (2006). Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using syntetic high mannose-type glycans. *J Biol Chem.* **281**, 31502-8.
- 31 Grinna, L.S. y Robbins, P.W. (1980). Substrates specificities of rat liver microsomal glucosidases wich process glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **255**, 2255-8.
- 32 Trombetta, E.S., Fleming, K.G. y Helenius, A. (2001). Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II. *Biochemistry.* **40**, 10717-22.
- 33 Arendt, C.W., Dawicki, W. y Ostergaard, H.L. (1999). Alternative splicing of transcripts encoding the alpha- and beta-subunits of mouse glucosidase II in T lymphocytes. *Glycobiology.* **9**(3), 277-83.
- 34 Drenth, J.P., te Morsche, R.H., Smink, R., Bonifacino, J.S. y Jansen, J.B. (2003). Germline mutations in PRKCSH are associated with autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat. Genet.* **33**, 345-7.
- 35 Munro, S. (2001). The MRH domain suggests a shared ancestry for the mannose 6-phosphate

- receptors and other *N*-glycan-recognising proteins. *Curr. Biol.* *11*, 499–501.
- 36 Arendt, C.W. y Ostergaard, H.L. (2000). Two distinct domains of the beta-subunit of glucosidase II interact with the catalytic alpha-subunit. *Glycobiology.* *10*, 487-92.
- 37 Gomord, V., Wee, E. y Faye, L. (1999). Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Biochimie.* *81*, 1–12.
- 38 Munro, S. y Pelham, H.R.B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER protein. *Cell.* *48*, 899–907.
- 39 Rose, J.K. y Doms, R.W. (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol.* *4*, 257–288.
- 40 Denecke, J., De Rycke, R. y Botterman, J. (1992). Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* *11*, 2345–2355.
- 41 Pelham, H.R.B. (1988). Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* *4*, 913–918.
- 42 Lewis, M.J. y Pelham, H.R.B. (1996). SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell.* *88*, 205–215.
- 43 Pelletier, M. F., Marcil, A., Sevigny, G., Jakob, C. A., Tessier, D. C., Chevet, E., Menard, R., Bergeron, J. J. y Thomas, D. Y. (2000). The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization *in vivo*. *Glycobiology.* *10*, 815–827
- 44 Wilkinson, B. M., Purswani, J. y Stirling, C. J. (2006). Yeast GTB1 encodes a subunit of glucosidase II required for glycoprotein processing in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* *10*, 6325–6333.
- 45 Trembl, K., Meimaroglou, D., Hentges, A. y Bause, E. (2000). The alpha- and beta-subunits are required for expression of catalytic activity in the heterodimeric glucosidase II complex from human liver. *Glycobiology.* *10*, 493–502.
- 46 Deprez, P., Gautschi, M. y Helenius A. (2005). More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle. *Mol. Cell.* *19*, 183-95.
- 47 Drickamer, K. y Taylor, M.E. *Biology of animal lectins.* (1993). *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 237–264.
- 48 Castonguay, A.C., Olson, L.J. y Dahms, N.M. (2011). Mannose 6-phosphate receptor homology (MRH) domain-containing lectins in the secretory pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* *1810(9)*, 815-26.
- 49 Olson, L. J., Hancock, M. K., Dix, D., Kim, J. J. y Dahms, N. M. (1999). Mutational analysis of the binding site residues of the bovine cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 36905–36911.
- 50 Sun, G., Zhao, H., Kalyanaraman, B. y Dahms, N. M. (2005). Identification of residues essential for carbohydrate recognition and cation dependence of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor. *Glycobiology.* *15*, 1136–1149.
- 51 Kim, J. J., Olson, L.J. y Dahms, N. M. (2009) Carbohydrate Recognition by the Mannose 6-phosphate Receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19(5)*, 534–542.
- 52 Reynolds, D.M., Falk, C.T., Li, A., King, B.F., Kamath, P.S., Huston, J. III y Shub, C. (2000) Identification of a locus for autosomal dominant polycystic liver disease, on chromosome 19p13.2-13.1. *Am J Hum Genet.* *67*, 1598–1604.
- 53 Qian, Q., Li, A., King, B.F., Kamath, P.S., Lager, D.J., Huston, J. III y Shub, C. (2003). Clinical profile of

- autosomal dominant polycystic liver disease. *Hepatology*. 37, 164–171.
- 54 Igarashi, P. y Somlo, S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. (2002). *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2384–2398.
- 55 Waanders, E., Te Morsche, R. H., de Man, R. A., Jansen, J. B. y Drenth, J. P. (2006). Extensive mutational analysis of PRKCSH y SEC63 broadens the spectrum of polycystic liver disease. *Hum. Mutat.* 27(8), 830.
- 56 Drenth, J. P., Martina, J. A., Te Morsche, R. H., Jansen, J. B. y Bonifacino, J. S. (2004). Molecular characterization of hepatocystin, the protein that is defective in autosomal dominant polycystic liver disease. *Gastroenterology*. 126(7), 1819–1827.
- 57 Waanders, E., Lameris, A.L., Op den Camp, H.J., Pluk, W., Gloerich, J., Strijk, S.P. y Drenth, J.P. (2008) Hepatocystin Is Not Secreted in Cyst Fluid of Hepatocystin Mutant Polycystic Liver Patients. *Journal of Proteome Research*. 7, 2490–2495.
- 58 Hoffrogge, R., Beyer, S., Hübner, R., Mikkat, S., Mix, E., Scharf, C., Schmitz, U., Pauleweit, S., Berth, M., Zubrzycki, I.Z., Christoph, H., Pahnke, J., Wolkenhauer, O., Uhrmacher, A., Völker, U. y Rolfs, A. (2007). 2-DE profiling of GDNF overexpression-related proteome changes in differentiating ST14A rat progenitor cells. *Proteomics*. 7, 33-46.
- 59 Anji, A. y Kumari, M. (2006). A novel RNA binding protein that interacts with NMDA R1 mRNA: regulation by ethanol. *European Journal of Neuroscience*. 23, 2339–2350.
- 60 Decca, M.B., Carpio, M.A., Bosc, C., Galiano, M.R., Job, D., Andrieux, A. y Hallak, M.E. (2007). Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of Calreticulin component of stress granules. *J. Biol. Chem.* 282, 8237-45.
- 61 Villamil-Giraldo, A.M., Lopez Medus, M., Gonzalez Lebrero, M., Pagano, R. S., Labriola, C.A., Landolfo, L., Delfino, L.M., Parodi, A.J. y Caramelo, J.J. (2010). The Structure of Calreticulin C-terminal Domain Is Modulated by Physiological Variations of Calcium Concentration. *J. Biol. Chem.* 285, 4544–4553.
- 62 Gkika, D., Mahieu, F., Nilius, B., Hoenderop, J.G.J. y Bindels, R.J. (2004). 80K-H as a New Ca^{2+} Sensor Regulating the Activity of the Epithelial Ca^{2+} Channel Transient Receptor Potential Cation Channel V5 (TRPV5) *J. Biol. Chem.* 279, 26351–26357.
- 63 Bernasconi, R. y Molinari, M. (2010). ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 176-83.
- 64 Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. y Wabrik, E. (1993). Experiments with fission yeast: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 65 Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795–823.
- 66 Parodi, A.J., Martín-Barrientos, J. y Engel, J.C. (1984). Glycoprotein assembly in *Leishmania mexicana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 1–7.
- 67 Magnani, E., Bartling, L. y Hake, S. (2006) From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Mol. Biol.* 7: 46.
- 68 Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3ra ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 69 Sato, M., Dhut, S. y Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. *22*, 583–591.
- 70 Fanchiotti, S., Fernández, F., D'Alessio, C. y Parodi, A. J. (1998). The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J. Cell Biol.* *143*, 625-635.
- 71 Stigliano, I. D., Alculumbre, S.G., Labriola, C. A., Parodi, A.J. y D'Alessio, C. (2011). Glucosidase II and *N*-glycan mannose content regulate the half-lives of monoglucosylated species *in vivo*. *Mol Biol Cell.* *22*, 1810-1823.
- 72 Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S. y Yoshida, M. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* *24*, 841–847.
- 73 Labriola, C.A., Cazzulo, J.J. y Parodi, A.J. (1995). Retention of the glucose unit added by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* *130*, 771–779.
- 74 Parodi, A. J., Staneloni, R. J., Cantarella, A. I., Leloir, L. F., Behrens, N. H., Carminatti, H. y Levy, J. (1973). Further studies on a glycolipid formed from dolichyl-D-glucosyl monophosphate. *Carbohydr. Res.* *26*, 393-400.
- 75 Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A. J., Armstrong, J. y Rokeach, L. A. (1998). Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry.* *37*, 17253–17261.
- 76 Trombetta, E. S. y Parodi, A. J. (2005). Glycoprotein reglucosylation. *Methods.* *35*, 328–337.
- 77 Fernández, F., D'Alessio, C., Fanchiotti, S. y Parodi, A. J. (1998). A misfolded protein conformation is not a sufficient condition for *in vivo* glucosylation by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* *17*, 5877–5886.
- 78 Totani, K., Ihara, Y., Matsuo, I. e Ito, Y. (2008). Effects of macromolecular crowding on glycoprotein processing enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 2101–2107.
- 79 Stigliano, I.D., Caramelo, J.J., Labriola, C.A., Parodi, A.J. y D'Alessio, C. (2009). Glucosidase II β subunit modulates *N*-glycan trimming in fission yeasts and mammals. *Mol Biol Cell.* *20*, 3974–3984.
- 80 Quinn, R.P., Mahoney, S.J., Wilkinson, B.M., Thornton, D.J. y Stirling, C.J. (2009). A novel role for Gtb1p in glucose trimming of *N*-linked glycans. *Glycobiology.* *19*, 1408–1416.
- 81 Parodi, A.J. (1993). *N*-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology.* *3*, 193–199.
- 82 De la Canal, L. y Parodi, A.J. (1987). Synthesis of dolichol derivatives in trypanosomatids. Characterization of enzymatic patterns. *J. Biol. Chem.* *262*, 11128–11133.
- 83 Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R. y Robbins, P.W. (2005). The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci.* *102*, 1548–1553.
- 84 Sonnichsen, B., Fullekrug, J., Nguyen Van, P., Diekmann, W., Robinson, D. G. y Mieskes, G. (1994). Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* *107*, 2705–2717.

-
- 85 Ghosh, P., Dahms, N.M. y Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: New twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 202–212.
- 86 Roberts, D.L., Weix, D.J., Dahms, N.M. y Kim, J.J. (1998). Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: Three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell.* 93, 639–648.
- 87 Petrescu, A. J., Butters, T. D., Reinkensmeier, G., Petrescu, S., Platt, F. M., Dwek, R .A. y Wormald, M. R. (1997). The solution NMR structure of glucosylated *N*-glycans involved in the early stages of glycoprotein biosynthesis and folding. *EMBO J.* 16, 4302–4310.
- 88 Woods, R. J., Pathiaseril, A., Wormald, M. R., Edge, C. J. y Dwek, R. A. (1998). The high degree of internal flexibility observed for an oligomannose oligosaccharide does not alter the overall topology of the molecule. *Eur.J. Biochem.* 258, 372–386.
- 89 Hu, D., Kamiya, Y., Totani, K., Kamiya, D., Kawasaki, N., Yamaguchi, D., Matsuo, N., Ito, Y., Kato, K. y Yamamoto, K. (2009). Sugar-binding activity of the MRH domain in the ER α -glucosidase GII β subunit is important for efficient glucose trimming. *Glycobiology.* 19, 1127–1135.
- 90 Parodi, A.J., Mendelzon, D.H., Lederkremer, G.Z. y Martín-Barrientos, J (1984). Evidence that transient glucosylation of protein-linked Man9GlcNAc2, Man8GlcNAc2, and Man7GlcNAc2 occurs in rat liver and *Phaseolus vulgaris* cells. *J Biol. Chem.* 259, 6351–6357.
- 91 Movsichoff, F., Castro, O.A. y Parodi, A.J. (2005). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* ER α -mannosidase. A re-evaluation of the role of the enzyme on ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell.* 16, 4714–4724.
- 92 Spiro, R.G., Zhu, Q., Bhoyroo, V. y Soling, H.D. (1996). Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J Biol Chem.* 271, 11588–11594.
- 93 Trombetta, S.E. y Parodi, A.J. (1992). Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem.* 267, 9236–9240.