



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Rol de la endomanosidasa de Golgi: rescate de
mutantes *Schizosaccharomyces pombe* que simulan
la enfermedad congénita de glicosilación CDG-IIb”**

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

Emiliana Etchegaray

Directora de Tesis de Licenciatura:
Dra. Cecilia D'Alessio

Laboratorio de Glicobiología, Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET y Laboratorio de
Glicobiología Celular y Genética Aplicada de Levaduras, Departamento de Fisiología,
Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Buenos Aires, 2019

Índice

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	4
LA GLICOBIOLOGÍA.....	5
N-GLICOSILACIÓN Y MADURACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS EN LA VÍA SECRETORIA	6
1) Síntesis del Dol-PP-glicano	7
2) N-glicosilación de proteínas	8
3) Procesamiento de los N-glicanos y control de calidad de plegamiento en el RE	9
4) Modificación de los N-glicanos en el aparato de Golgi	12
CDGs: DESÓRDENES CONGÉNITOS DE GLICOSILACIÓN	15
CDG tipo I y CDG tipo II.....	15
Síntomas, Diagnóstico y Tratamiento de las CDG	16
CDG-IIb (MOGS-CDG) Y GLUCOSIDASA I	17
CDG-IIb y su modelo en la levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19
LA ENDOMANOSIDASA.....	21
Actividad catalítica y localización subcelular	21
Mecanismo alternativo de deglucosilación en el procesamiento de N-glicanos.....	24
Rol de la endomanosidasa en la CDG-IIb.....	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	29
Objetivos Específicos	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
MATERIALES	31
CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO	31
PREPARACIÓN DE BACTERIAS <i>E. COLI</i> ELECTROCOMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN	31
PREPARACIÓN DE LEVADURAS <i>S. POMBE</i> ELECTROCOMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN	32
PROCEDIMIENTOS CON ADN	32
Extracción de ADN plasmídico de bacterias (Miniprep)	32
Preparación de ADN genómico de levaduras <i>S. pombe</i>	32
Reacciones de PCR.....	33
Otros procedimientos con ADN	34

PLÁSMIDOS.....	34
CLONADO DE LA ENDOMANOSIDASA HUMANA (HEM) EN <i>S. POMBE</i>	35
<i>A) Clonado y expresión de RE-hEM en el lumen del RE de S. pombe</i>	35
<i>B) Clonado y expresión de G-hEM en la membrana del aparato de Golgi de S. pombe</i>	36
PREPARACIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES ENRIQUECIDAS EN RE Y GOLGI (MICROSOMAS)	36
ENSAYO DE ACTIVIDAD DE ENDOMANOSIDASA.....	37
ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO	38
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL.....	38
TINCIÓN CON FM4-64	38
RESULTADOS.....	39
EXPRESIÓN DE HEM CON DESTINO A RE O GOLGI EN <i>S. POMBE</i>	40
MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE LA ENDOMANOSIDASA: RE-HEM Y G-HEM SON FUNCIONALES.....	42
LOCALIZACIÓN POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE RE-HEM EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO	45
G-HEM MUESTRA UNA LOCALIZACIÓN TÍPICA DEL APARATO DE GOLGI.....	46
LA PROTEÍNA DE FUSIÓN G-HEM RESCATA PARCIALMENTE EL FENOTIPO ABERRANTE DE LAS MUTANTES <i>S. POMBE</i> CARENTES DE GI.	48
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA	56

Resumen

“Rol de la endomanosidasa de Golgi: rescate de mutantes *Schizosaccharomyces pombe* que simulan la enfermedad congénita de glicosilación CDG-IIb”.

La *N*-glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más importantes en la síntesis de proteínas. Este proceso, sumamente complejo, comienza en el RE al unir covalentemente el glicano $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr ($X \neq \text{Pro}$) de las proteínas de la vía secretoria de forma co-traducciona. Luego de la adición de dicho glicano, el mismo es sujeto a múltiples modificaciones en el RE y en el aparato de Golgi, para adquirir una estructura más compleja. Los glicanos cumplen importantes funciones en la célula; cambian las propiedades bioquímicas intrínsecas de una proteína, les confieren estabilidad y actividad biológica; participan en el control de calidad de plegamiento del RE; intervienen en el tráfico intracelular de proteínas; actúan como ligandos en procesos de reconocimiento como la adhesión y la comunicación célula-célula y modulan la respuesta inmune. Se estima que un 40% de las proteínas de una célula eucariota se encuentran *N*-glicosiladas. Los desórdenes congénitos de glicosilación (CDG) son un grupo de enfermedades humanas causadas por defectos durante la síntesis o procesamiento de glicoproteínas o glicolípidos. Aunque la incidencia en la población suele ser muy baja, cuando ocurren pueden producir severas patologías. La deficiencia de glucosidasa I (GI) produce CDG-IIb, un síndrome con un cuadro clínico muy complejo, con serias dificultades en el desarrollo en el que los pacientes suelen fallecer a los pocos meses de vida por complicaciones multiorgánicas. La GI es la primera enzima que actúa en el remodelado del *N*-glicano en el RE, hidrolizando la glucosa más distal del glicano $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, acción esencial para los posteriores pasos del procesamiento. Dicha deficiencia provoca un bloqueo en el procesamiento de los *N*-glicanos. Los pacientes CDG-IIb presentan un perfil de *N*-glicosilación casi normal, un 80% de las *N*-glicoproteínas alcanza estructuras maduras normales mientras que un 16% quedan detenidas en estadio G3M9. En células deficientes de GI, la endomanosidasa de Golgi (EM) funciona como un mecanismo alternativo de deglicosilación que permite sobrellevar la falta de GI. La EM procesa las *N*-glicoproteínas provenientes del RE que han escapado del accionar de la GI y la glucosidasa II (GII). En el laboratorio utilizamos la levadura de fisión *S. pombe* carente de GI (Δgls1) como modelo para el estudio de la CDG-IIb. Las mutantes Δgls1 presentan una morfología alterada, crecimiento lento y acumulación de especies triglicosiladas G3M9. Se cree que la persistencia de estructuras G3M9 en la vía secretoria es en parte responsable del fenotipo aberrante observado en dichas células. La EM es de aparición tardía en la evolución y se encuentra ausente en levaduras. En este trabajo expresamos la endomanosidasa humana (hEM) en el RE y el aparato de Golgi de la cepa mutante *S. pombe* Δgls1 para evaluar un efecto de rescate, al eliminar la acumulación de *N*-glicoproteínas G3M9 en distintos compartimentos de la vía secretoria. Los resultados muestran una visible mejora del fenotipo de la mutante Δgls1 por la expresión de la hEM en el aparato de Golgi, lo que indicaría que la persistencia de tres Glc en las glicoproteínas es deletérea para las células. Los resultados de esta tesis fueron publicados en "Abrogation of glucosidase I-mediated glycoprotein deglycosylation results in a sick phenotype in fission yeasts: Model for the human MOGS-CDG disorder". Gallo, Valko, Aramburu, Etchegaray, Parodi y D'Alessio. *J Biol Chem* 2018. 293(52): 19957-19973.

Palabras clave: *N*-glicosilación, levadura de fisión, glucosidasa I, desórdenes congénitos de glicosilación, endomanosida.

Abreviaturas

ALG: genes involucrados en la biosíntesis del glicano sobre el Dolicol-PP
CNX: calnexina
CRT: calreticulina
CDG: Congenital Disorders of Glycosylation
OD: densidad óptica
Dol-P: dolicol monofosfato
Dol-PP: dolicol pirofosfato
Dol-PP-glicano: glicano unido a lípido dolicol pirofosfato
EM: endo- α -1,2-manosidasa
Endo H: endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa H
ERAD: degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico
GFP: Proteína verde fluorescente
GI: Glucosidasa I
GII: Glucosidasa II
Glc: Glucosa
gls1⁺: gen que codifica GI en *S. pombe*
gls2⁺: gen que codifica la subunidad α de GII en *S. pombe*
GlcNAc: *N*-acetilglucosamina
GXMY: oligosacárido de composición $\text{Glc}_x\text{Man}_y\text{GlcNAc}_2$
Man: Manosa
MOGS: *Mannosyl-oligosaccharide glucosidase syndrome* (equivalente a CDG-IIb)
N-glicano: glicano unido a proteína
OST: Oligosacariltransferasa
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PS: péptido señal de translocación al RE
QC: control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico
RE: Retículo endoplásmico
UGGT: UDP-Glc glicoproteína glucosiltransferasa
WT: Wild type (salvaje)

Introducción

La Glicobiología

La Glicobiología es el estudio de la estructura, función y biología de los carbohidratos, también llamados glicanos o polisacáridos. Se estima que un porcentaje significativo del genoma de todos los organismos codifica para enzimas involucradas en el procesamiento de azúcares y más aún, estos genes se encuentran altamente conservados a lo largo de las especies indicando la importancia de dichas vías en la evolución.

Uno de los campos de estudio de la Glicobiología es la modificación de lípidos y proteínas mediante la adición de glicanos, para formar glicoconjugados. Estos cumplen importantísimas e innumerables funciones en los sistemas biológicos; desde funciones físicas y de protección, metabólicas, estructurales, moduladoras, hasta funciones de reconocimiento e interacción entre macromoléculas, etc. Las proteínas pueden ser modificadas para formar O-glicoproteínas o N-glicoproteínas dependiendo del tipo de azúcar y de unión al glicano; pueden ser modificadas por la adhesión de cadenas de glicosaminoglicanos para formar proteoglicanos o por la adición de un fosfatidilinositol (ancla GPI). Los lípidos también pueden ser modificados mediante la adhesión de glicanos para formar glicolípidos (esfingolípidos). Estas son algunas de las modificaciones más comunes que pueden encontrarse en células eucariotas aunque existen muchas más (Figura 1).

De todos estos tipos de modificaciones, la N-glicosilación de proteínas es la más frecuente; se estima que alrededor del 2% del genoma humano codifica para proteínas involucradas en la N-glicosilación y que 1/3 de las proteínas de una célula humana se encuentran N-glicosiladas (Apweiler *et al.* 1999) (se utilizará la nomenclatura N-glicano en referencia al glicano unido a proteínas). En el presente trabajo se ahondará sobre los detalles de la N-glicosilación de proteínas, el procesamiento de N-glicanos y sobre una de las enfermedades congénitas de glicosilación humanas, la CDG-IIb, asociada a fallas en dicho procesamiento.

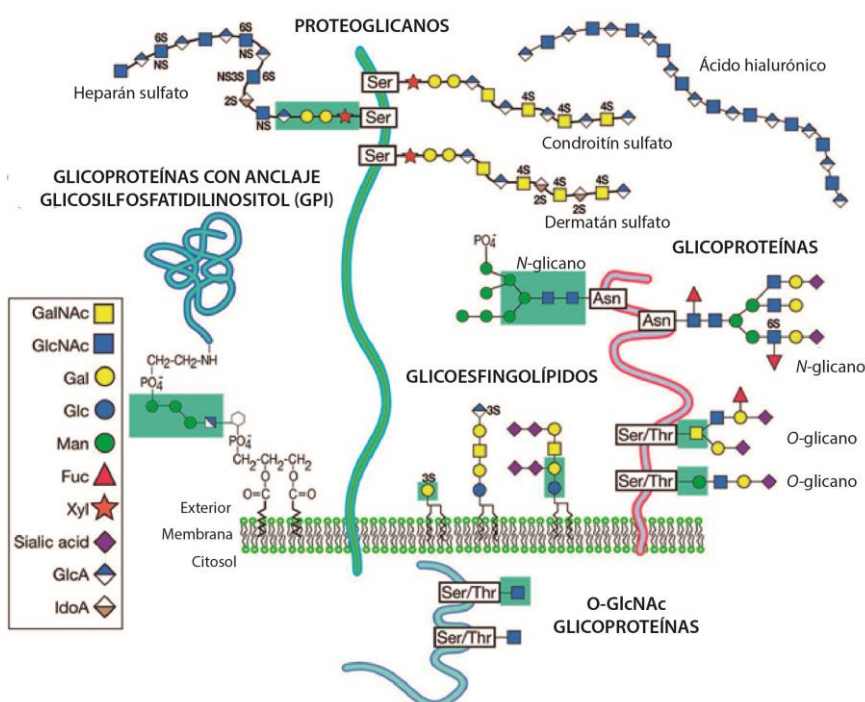


Figura 1. Diferentes tipos de glicoconjugados en células animales: N-glicoproteínas, O-glicoproteínas, proteínas con ancla GPI, proteoglicanos y glicoesfingolípidos. Figura obtenida de (Varki *et al.* 2015)

N-glicosilación y maduración de glicoproteínas en la vía secretoria

La N-glicosilación de proteínas es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución y con presencia en los tres grandes grupos filogenéticos: Bacteria, Archaea y Eukarya (Helenius *et al.* 2004, Aebi 2013). La síntesis de glicoproteínas en procariotas muestra similitudes sorprendentes con el proceso en células eucariotas, evidenciando el origen evolutivo común.

Las N-glicanos tienen múltiples y variadas funciones en organismos eucariotas unicelulares y organismos multicelulares más complejos. Por un lado, dicha modificación influye en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las proteínas: los N-glicanos, aumentan la solubilidad de las proteínas, les confieren rigidez estructural, ajustan su carga y punto isoeléctrico, facilitan su orientación en relación a las membranas, les confieren estabilidad al evitar su desnaturalización y degradación por proteasas, y regulan el recambio proteico. Por otro lado, intervienen en el control de calidad de plegamiento proteico en el RE (QC) (Parodi *et al.* 2015). Además, funcionan como ligandos en una multitud de procesos como la adhesión y la comunicación célula-célula, participan del tráfico intracelular de proteínas, modulan respuestas inmunitarias y median interacciones con patógenos (Helenius *et al.* 2004). No se conoce otra modificación proteica covalente tan ampliamente distribuida entre los distintos grupos filogenéticos y con tal variedad de funciones.

La biosíntesis y maduración de N-glicoproteínas de la vía secretoria puede dividirse en cuatro etapas:

- 1) Síntesis del Dol-PP-Glc₃Man₉NAC₂
- 2) Transferencia del glicano a las proteínas por la oligosacariltransferasa (OST)
- 3) Procesamiento de los N-glicanos y control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE
- 4) Maduración de glicanos en el Aparato de Golgi.

La síntesis de proteínas comienza con la translocación del péptido nascente hacia el lumen del RE. La N-glicosilación ocurre de forma simultánea a la síntesis proteica (Figura 2), aunque en algunos casos puede darse post-traduccionalmente. Dicha reacción es catalizada por la oligosacariltransferasa (OST) y consiste en la transferencia en bloque del glicano pre-ensamblado Glc₃Man₉GlcNAC₂ (G3M9) desde el dador lipídico dolicol pirofosfato (Dol-PP), a los residuos de Asparragina (Asn) de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (X≠Pro) (Cali *et al.* 2008). El glicano, luego de ser transferido a las proteínas, es procesado en el RE y las glicoproteínas sujetas a un control de calidad de plegamiento. Luego de que las glicoproteínas han alcanzado su conformación nativa, continúan su camino por la vía secretoria hacia el aparato de Golgi donde finalizan la maduración de sus glicanos (Stanley *et al.* 2015). Luego de este procesamiento en el RE y en el aparato de Golgi, la estructura del N-glicano maduro difiere enormemente de la estructura G3M9 inicialmente transferida. A continuación veremos en más detalle cada uno de estos procesos y ahondaremos en las fallas que pueden ocurrir en el proceso de N-glicosilación, y los desórdenes congénitos de glicosilación (CDG) asociados.

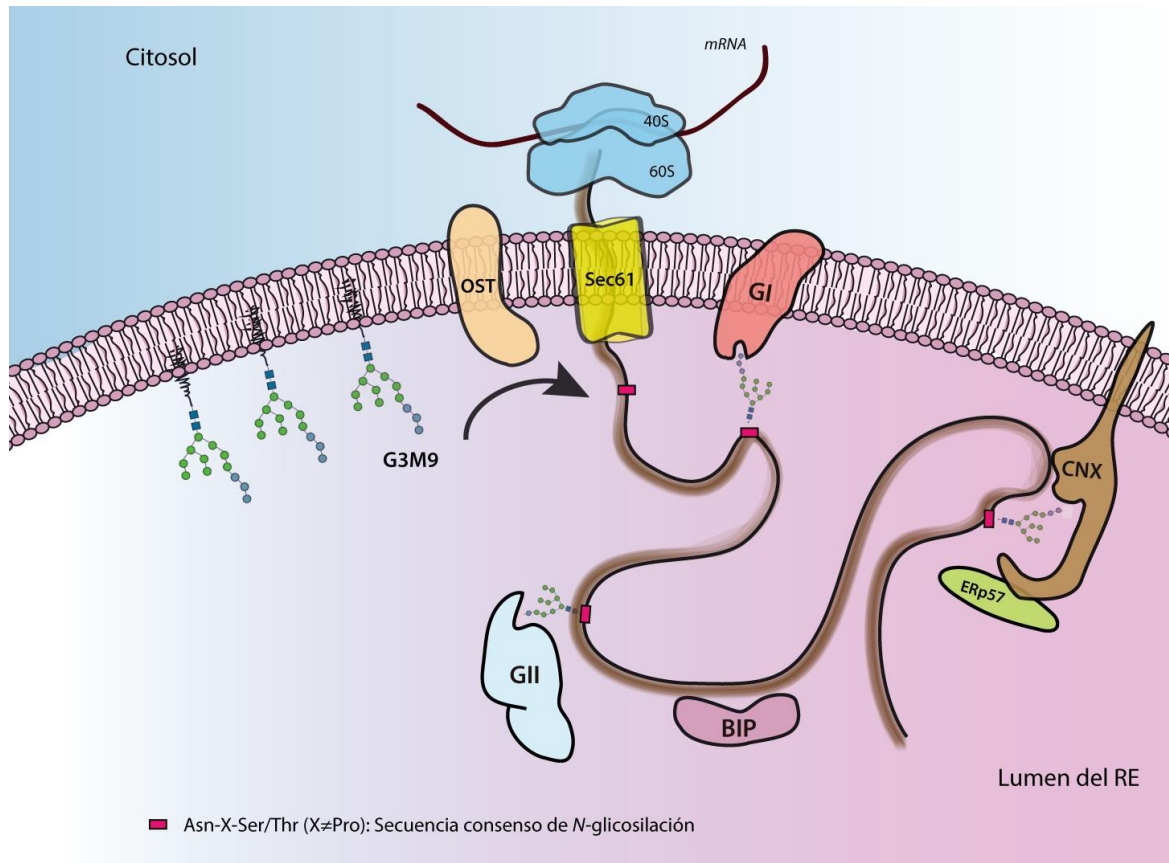


Figura 2. Translocación co-traduccional de proteínas al lumen del RE y N-glicosilación. Las cadenas polipeptídicas nacientes son transportadas co-traduccionalmente hacia el lumen del RE a través del complejo de translocación Sec61. Los residuos de Asn de los secuencias consenso de N-glicosilación son modificados por la OST con la adición covalente de un glicano G3M9 pre-ensamblado. A medida que emergen, se asocian con distintas chaperonas moleculares y enzimas del plegamiento residentes del RE; GI, GII, BIP, CNX y ERp57 (proteína disulfuro isomerasa); y son sustrato de diversas enzimas modificadoras. La subunidad ribosomal grande y pequeña se indican como 60S y 40S, respectivamente.

1) Síntesis del Dol-PP-glicano

La estructura del glicano G3M9, el oligosacárido transferido a las proteínas nacientes durante la N-glicosilación, se encuentra sumamente conservada en la mayoría de los organismos eucariotas (Helenius *et al.* 2004). Éste consiste en una unidad ramificada de tres glucosas (Glc), nueve manosas (Man) y dos N-acetilglucosaminas (GlcNAc) (Figura 3). Por simplicidad, se mencionarán únicamente las Glc y Man de la estructura del glicano y al lado se indicará su cantidad. Así, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ se abrevia G3M9; $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ se abrevia M9 y en general $\text{Glc}_x\text{Man}_y\text{GlcNAc}_2$ se abrevia GXMY. Durante la biosíntesis del Dol-PP-G3M9, los monosacáridos son agregados uno a uno a un derivado lipídico dolicol (Dol-PP) en una sucesión de reacciones catalizadas por glicosiltransferasas específicas codificadas por los genes *alg* (Figura 3 y 4) (Stanley *et al.* 2015). Esta síntesis es altamente ordenada y secuencial, lo que asegura la fidelidad del proceso. La síntesis correcta del Dol-PP-glicano es esencial para el reconocimiento por OST y la adecuada transferencia a las proteínas.

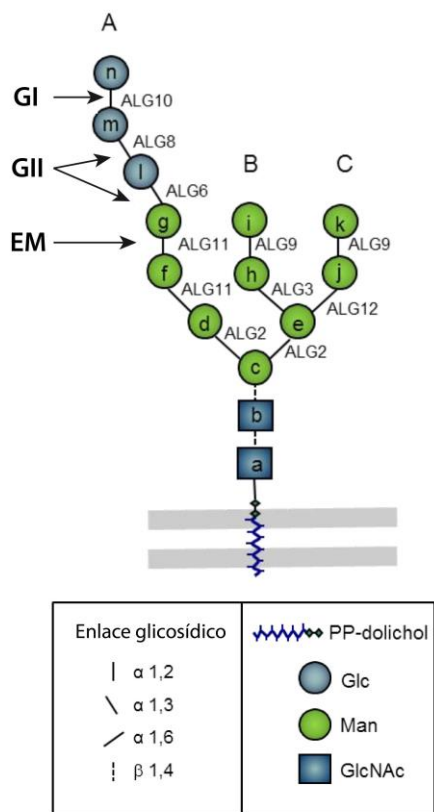


Figura 3. Estructura del glicano G3M9 transferido a las proteínas durante la N-glicosilación. Las letras (a, b, c,...) siguen el orden de adición de los monosacáridos durante la biosíntesis del Dol-PP-G3M9 por las glicosiltransferasas codificadas por los genes *alg*. Se indican la rama A (residuos f, g, l, m, n), la rama B (h, i) y la rama C (j, k); los sitios de corte de la GI y GII en el RE luego de la transferencia y el sitio de corte de la endomanosidasa (EM) en el aparato de Golgi. Los símbolos de los monosacáridos siguen el sistema de Nomenclatura de Símbolos para Glicanos (SNFG) (Varki *et al.* 2015). Figura extraída y adaptada de (Gallo *et al.* 2018).

2) N-glicosilación de proteínas

Las proteínas destinadas a la vía secretoria poseen un péptido señal (PS) en su secuencia primaria (30 aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal) que las dirigen hacia el RE. Esta señal, permite que la proteína se ancle a la cara citosólica de la membrana del RE y sea translocada al lumen de dicha organela a través del complejo translocón Sec61 (Figura 2). Un conjunto de proteínas asociadas al translocón reciben el polipéptido naciente, entre ellas, la peptidasa de señal que corta el PS, el complejo de la OST y varias chaperonas moleculares residentes del RE como calnexina (CNX) y calreticulina (CRT) (Cali *et al.* 2008). Las cadenas polipeptídicas emergen desplegadas del poro del translocón, y a medida que van ingresando hacia el lumen del RE son expuestas a las chaperonas moleculares que llevan adelante el plegamiento hasta que asumen su conformación tridimensional final.

La OST es la enzima más importante de la vía de N-glicosilación de proteínas. Este complejo multiproteico asociado al translocón, escanea el polipéptido naciente a medida que entra al lumen del RE en busca de sequones consenso Asn-X-Ser/Thr para glicosilar. Su función es catalizar la transferencia en bloque del glicano G3M9 pre-ensamblado desde el Dol-PP a la cadena lateral de los residuos de Asn de la secuencia consenso. La cercanía espacial de la OST con el translocón y otras proteínas asociadas evidencia que la translocación hacia el RE y la N-glicosilación son procesos que están acoplados espacial y temporalmente (Pfeffer *et al.* 2014).

No todos los sitios consenso de las proteínas son glicosilados: la eficiencia con que la OST transfiere glicanos a los sequones individuales es variable. Algunos sequones son ignorados, algunos glicosilados con eficiencia parcial y otros con eficiencia total. Numerosos factores afectan la eficiencia, incluyendo la composición de las subunidades del complejo OST, los aminoácidos en el propio sequon y adyacentes a él, la localización de éste en la

cadena polipeptídica, la disponibilidad del Dol-PP-glicano en el RE, la velocidad de translocación y la tasa de plegamiento proteico, entre otros (Kelleher *et al.* 2006).

A su vez, la OST tiene una clara preferencia por glicanos completamente ensamblados de estructura G3M9, y específicamente es de gran importancia la glucosa más externa de la rama A, mientras que los residuos de manosas más distales de las ramas B y C son de menor importancia (Spiro 2000). Esta especificidad por el sustrato G3M9, y no otro tipo de glicano, asegura la fidelidad de la *N*-glicosilación y que las proteínas reciban glicanos de estructura correcta. Los errores en su síntesis producen estructuras aberrantes que pueden disminuir la eficiencia de reconocimiento de la OST y resultar en la hipoglicosilación de proteínas (no se ocupan todos los sitios que normalmente lo hacen). Como se verá más adelante, las deficiencias en el proceso de síntesis del Dol-PP-glicano y/o en la transferencia del mismo a las proteínas están relacionadas con las enfermedades congénitas de glicosilación humanas CDG tipo I.

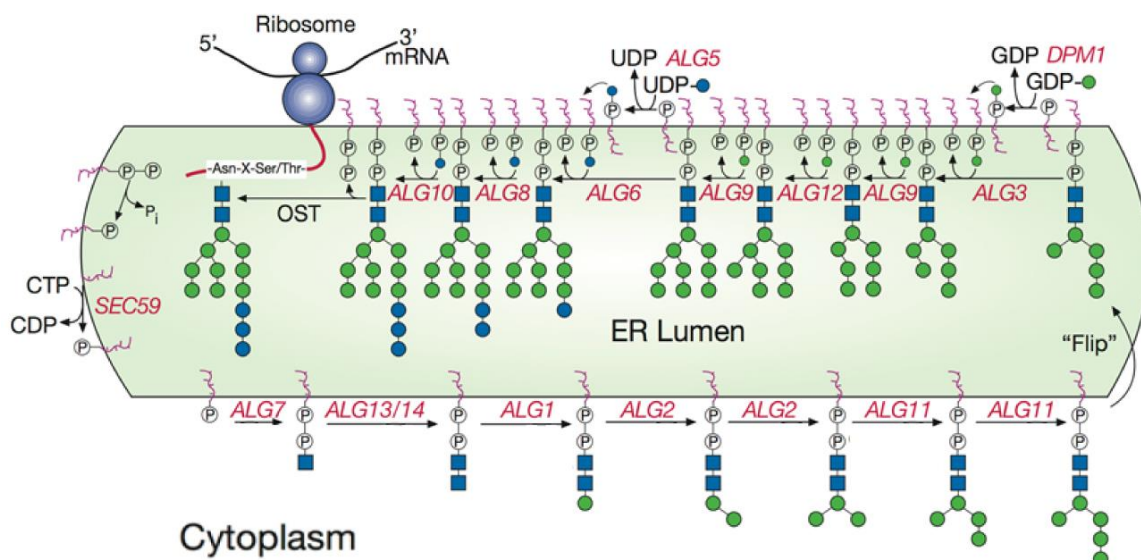


Figura 4. Síntesis del Dol-PP-G3M9 y *N*-glicosilación. La síntesis comienza en la cara citoplasmática de la membrana del RE con la transferencia de 2 residuos de GlcNAc y 5 Man a un Dol-PP. La estructura es translocada a través de la membrana del RE a la cara luminal y se adicionan cuatro residuos de Man y tres de Glc. En rojo se indican los nombres de los genes *alg* que codifican para las glicosiltransferasas involucradas en la transferencia secuencial de los residuos de monosacáridos. Una vez ensamblado, el oligosacárido es transferido a la cadena lateral de un residuo de Asn en el secuen consenso Asn-X-Ser/Thr por la OST. Los nombres de las enzimas fueron tomados del Comité de Nomenclatura del Genoma Humano (HGNC: Human Genome Nomenclature Committee). Figura extraída de (Stanley *et al.* 2015).

3) Procesamiento de los *N*-glicanos y control de calidad de plegamiento en el RE

Una vez que las proteínas han sido sintetizadas y modificadas por la adición de G3M9, comienza el proceso de remodelación del glicano en el RE. El primer paso del procesamiento de las *N*-glicoproteínas es llevado a cabo por la **glucosidasa I (GI)**. La GI actúa sobre *N*-glicanos de tipo G3M9, removiendo el residuo de Glc más externo (*n*) para producir *N*-glicanos G2M9. La reacción involucra la hidrólisis del enlace α 1,2-glucosídico entre el residuo de Glc más externo (*n*) y el intermedio (*m*) de la rama A del *N*-glicano (Figura 3). Dicha

reacción es inmediata y ocurre co-traduccionalmente con un tiempo medio inferior a los 2 minutos, lo que reafirma la hipótesis sobre la proximidad del sitio activo de la OST y la Gl (Figura 5).

Luego del accionar de la Gl, la **glucosidasa II (GII)** remueve el residuo de Glc *m* (Figura 3). Este procesamiento determina la formación de estructuras monoglucosiladas G1M9, las cuales pueden ser reconocidas por las lectinas-chaperonas no convencionales **CNX y/o CRT**. La formación de este complejo glicoproteína-chaperona aumenta la eficiencia de plegamiento de la parte proteica ya que previene la agregación de las glicoproteínas, facilita la acción de la proteína disulfuro isomerasa ERp57 y retiene en el RE a aquellas proteínas que aún no han alcanzado su estructura nativa. Luego, la GII libera el complejo formado al remover el residuo de Glc más interno (residuo *l*), generando M9, glicano que ya no es reconocido por CNX ni CRT (Figura 5). Esta reacción implica la ruptura del enlace $\alpha 1,3$ -glucosídico entre el residuo de Glc más interno y el de Man *g* (Roth and Zuber 2017). La primera reacción catalizada por la GII que produce *N*-glicanos del tipo G1M9 ocurre con un tiempo medio de 5 minutos; la segunda reacción catalizada por la GII que produce M9 ocurre más lentamente con un tiempo medio de 20 minutos. Se cree que esta diferencia en las velocidades cinéticas de reacción es sumamente importante, ya que le otorga el tiempo necesario a las *N*-glicoproteínas G1M9 en ser reconocidos por CNX y CRT.

Si la proteína se encuentra mal plegada, el *N*-glicano será re-glucosilado por la **UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT)**, una enzima bifuncional que contiene un sensor de plegamiento de proteínas y un dominio catalítico glucosiltransferasa. Esta enzima reconoce la rama A de *N*-glicanos M9 exclusivamente en proteínas mal plegadas y transfiere un único residuo de Glc al residuo de Man terminal *g* (Trombetta *et al.* 1989, Sousa *et al.* 1992). La presencia de este residuo de Glc y la formación de G1M9 permite que la glicoproteína pueda volver a interactuar con las chaperonas CNX y CRT y de esta manera prolongar su permanencia en el RE hasta adquirir su conformación nativa (D'Alessio *et al.* 2010, Roth *et al.* 2017).

Las proteínas pasan por varios ciclos de deglucosilación/reglucosilación mediados por la actividad antagónica de GII y UGGT, en este proceso conocido como **“control de calidad de plegamiento de proteínas” (QC)**. Este ciclo permite la interacción repetida de las glicoproteínas con las chaperonas CNX/CRT, le confieren tiempo para plegarse correctamente y continúa hasta que la glicoproteína se pliegue correctamente o sea destinada a degradación (D'Alessio *et al.* 2010, Parodi *et al.* 2015) (Figura 5).

Si el plegamiento resulta irreversiblemente defectuoso, la permanencia prolongada de las proteínas en el RE expone a los *N*-glicanos a las α 1,2-manosidasas ER Man I y EDEM 1, 2 y 3 que remueven los residuos terminales de Man, disminuyendo la afinidad con CNX, CRT y la GII. A su vez, son reconocidas por las lectinas OS9 y XTP3-B que las retrotranslocan al citosol, donde son poli-ubiquitinadas y degradadas por proteasomas en un proceso conocido como **“degradación de proteínas asociada al RE” (ERAD)** (Parodi *et al.* 2015, Roth *et al.* 2017). La demanosilación es un proceso lento en comparación con las reacciones de deglucosilación, lo cual funciona como un “temporizador” para que solo las glicoproteínas mal plegadas, y no los intermediarios de plegamiento, sean direccionados hacia ERAD luego de

una residencia relativamente prolongada en el RE. Por otro lado, el recorte adicional del residuo de Man de la rama A previene la reglicosilación por UGGT, generando la salida definitiva de la glicoproteína del ciclo CNX/CRT.

De esta manera, los *N*-glicanos cumplen importantes funciones en el procesamiento de las proteínas en el RE. Por un lado, la adición de *N*-glicanos *per se* provee grupos voluminosos hidrofílicos que incrementan la solubilidad de los intermediarios de plegamiento, evitan interacciones inespecíficas y modulan la estructura local. Y, por el otro lado, funcionan como señales codificadoras del estado de plegamiento de las proteínas.

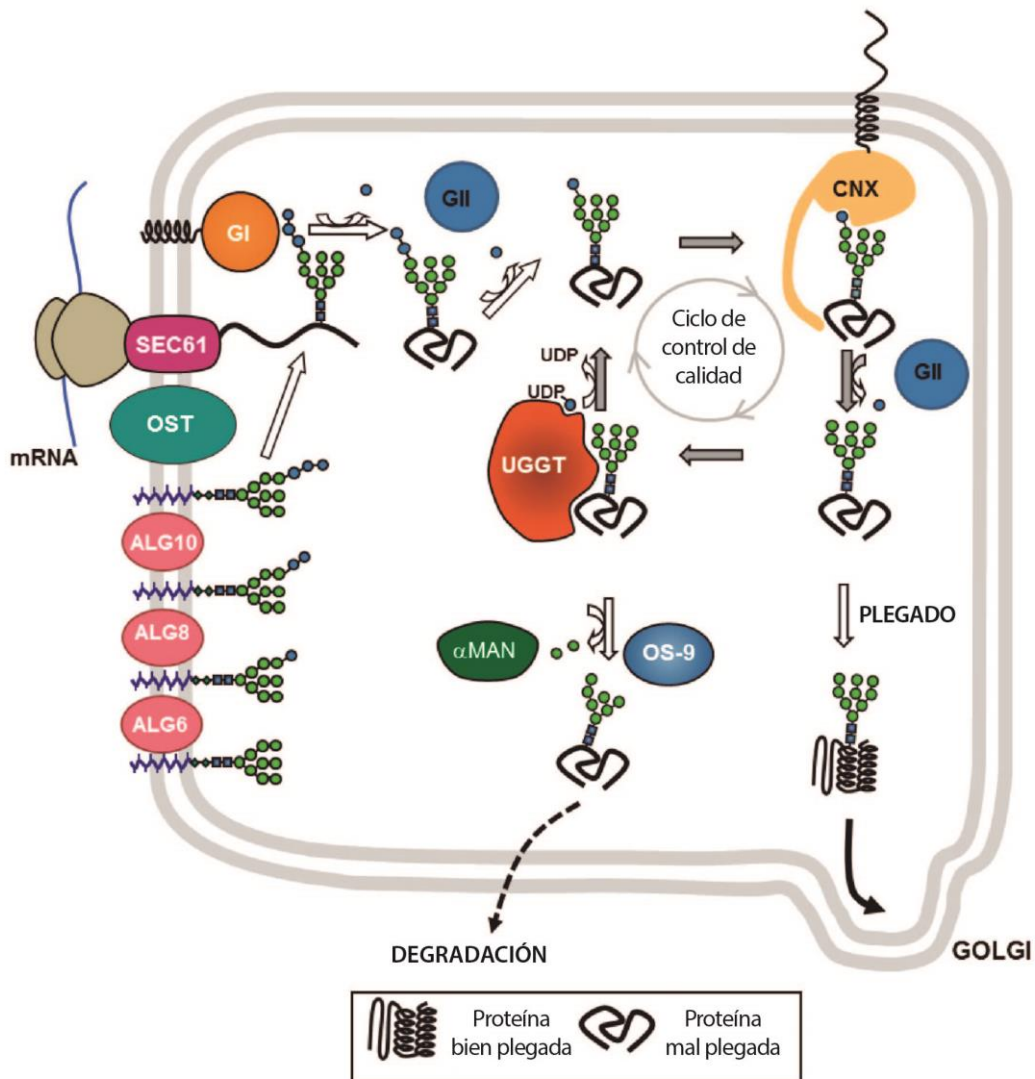


Figura 5. Procesamiento del *N*-glicano y QC de glicoproteínas en el RE. Las proteínas que ingresan al RE son glicosiladas por la OST a medida que emergen del translocón Sec61. Dos residuos de Glc se eliminan por la acción secuencial de GI y GII para generar especies monoglucosiladas G1M9 que son reconocidas por las chaperonas CNX y/o CRT. La GII remueve el residuo de Glc más interno, y las glicoproteínas mal plegadas son reconocidas por la UGGT que agrega nuevamente un residuo de Glc. La GII hidroliza la Glc nuevamente y libera a la glicoproteína de los anclajes de CNX. Las especies que han alcanzado su estructura nativa son transportadas al aparato de Golgi, y aquellas que permanecen en conformaciones mal plegadas y pasan por varios ciclos GII/UGGT son demanosiladas por α MAN, reconocidas por la lectina OS9 y retrotranslocadas al citoplasma, donde son deglicosiladas y degradadas por los proteasomas (ERAD). Figura extraída de (Gallo *et al.* 2018)

4) Modificación de los N-glicanos en el aparato de Golgi

Una vez que las glicoproteínas se han plegado correctamente y oligomerizado en el RE, continúan su tránsito por la vía secretoria hacia el aparato de Golgi. La mayoría de las glicoproteínas salen del RE con N-glicanos de tipo M9 o M8, y a partir de allí continúan su tránsito por la vía secretoria para ser modificados por las enzimas que residen en el aparato de Golgi. Es de suma importancia que los glicoproteínas sean deglucosiladas en el RE dado que las manosidasas y glicosiltransferasas del aparato de Golgi no pueden actuar sobre N-glicanos glucosilados (G3M9, G2M9 o G1M9).

Mientras que la síntesis de Dol-PP-glicano, la N-glicosilación y el procesamiento de N-glicanos en el RE se encuentran altamente conservados en la evolución, la remodelación de las estructuras en el aparato de Golgi ha divergido considerablemente y podemos encontrar una gran diversidad entre los distintos organismos eucariotas (Helenius *et al.* 2004, Parodi *et al.* 2015). Las enzimas que realizan esta serie de modificaciones son glicosiltransferasas y glicosidasas residentes de los distintos compartimentos del aparato de Golgi (*cis-medial-trans*). Las mismas deben llevar a cabo la compleja tarea de actuar sobre los glicoconjugados en el lugar y momento correcto, para lo cual el complejo de Golgi está provisto de compartimentos de membrana especializados donde estas enzimas residen y funcionan, permitiendo que las reacciones se realicen secuencialmente (Zhang *et al.* 2016) (Figura 6).

Luego de haber sido procesados en el aparato de Golgi, las estructuras finales de los N-glicanos maduros pueden clasificarse en tres tipos: “Alta Man”, “complejos” e “híbridos” (Figura 7A). Los N-glicanos de tipo “**alta Man**” incorporan residuos de Man a la estructura tal como fue exportada del RE. Se encuentran principalmente en eucariotas inferiores como levaduras, y en algunas proteínas especializadas de mamíferos. En levaduras, las especies M8 que ingresan al *cis*-Golgi son modificadas por la adición de residuos de manosas para formar grandes estructuras de oligomanosas ramificadas (Figura 7B). Estas estructuras de oligomanosas también llamadas mananos, son un componente principal de la pared celular de levaduras. Los N-glicanos de tipo “**complejo**”, se pueden encontrar principalmente en vertebrados y plantas superiores. Los N-glicanos M8 que llegan al *cis*-Golgi sufren un recorte de sus residuos de manosas hasta M3 y luego se le agregan residuos de GlcNAc en compartimentos intermedios. En plantas, el núcleo basal M3 es modificado por la adición de residuos de xilosa (Xyl) y fucosa (Fuc). Las plantas presentan similitudes con los vertebrados en las etapas iniciales del procesamiento de Golgi, pero terminan produciendo oligosacáridos de menor complejidad y diversidad. En mamíferos, además son adicionados residuos de galactosa (Gal) y ácido siálico (Neu5Ac); y son comunes las ramificaciones (antenas) de tres o cuatro brazos. Los N-glicanos “**híbridos**”, como su nombre lo indica, poseen características de “alta Man” y de tipo “complejo” (Ungar 2009). Los glicanos correspondientes a las hidrolasas ácidas que van a formar parte de los lisosomas son modificados también secuencialmente en el aparato de Golgi hasta adquirir la señal Man-6-P, lo que les permite ser reconocidos por un receptor específico y ser empaquetadas en vesículas.

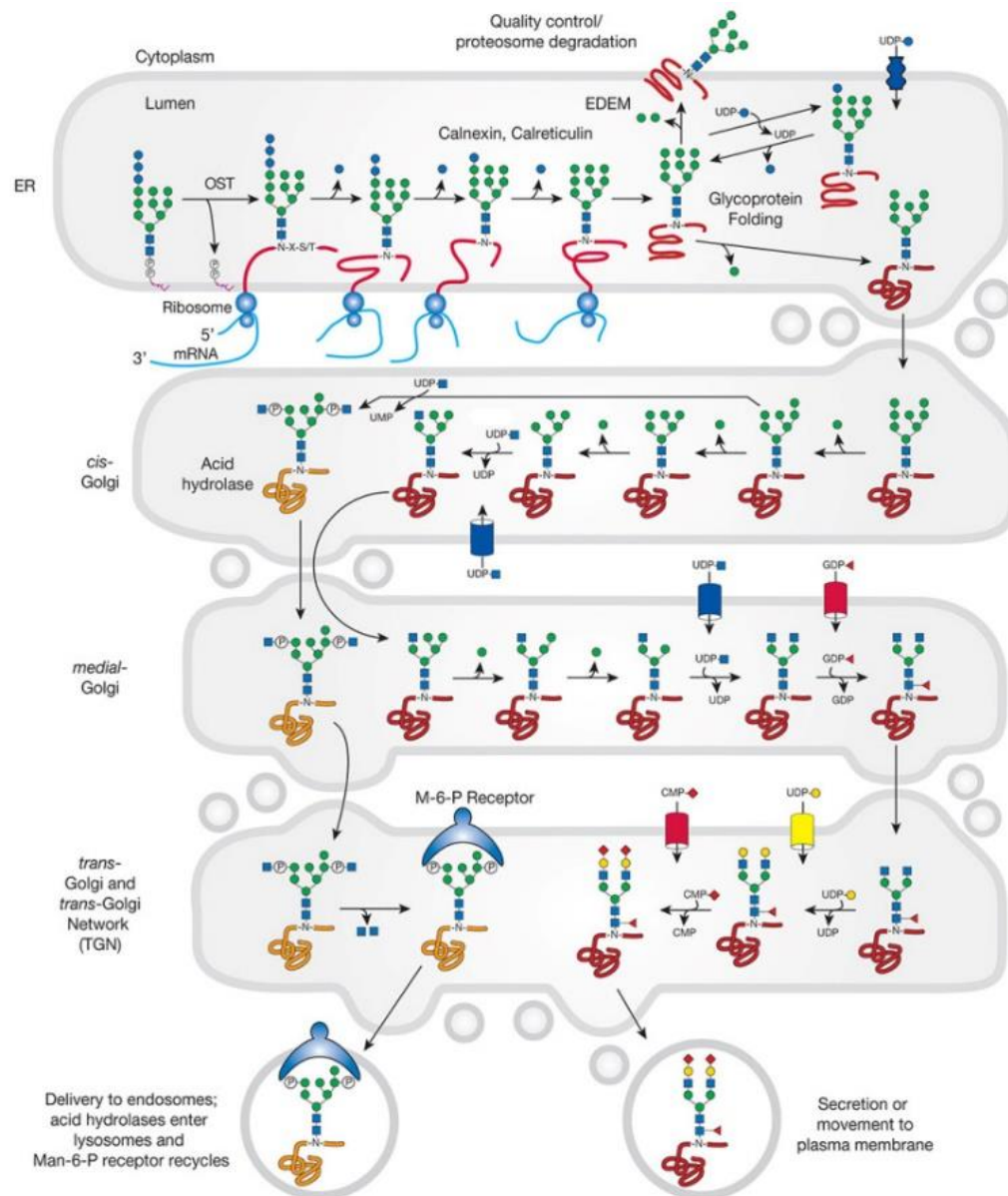


Figura 6. Procesamiento y maduración de N-glicanos en el aparato de Golgi de mamíferos. Una vez que atraviesan el QC en el RE, las glicoproteínas que han adquirido su estructura nativa continúan su camino hacia el aparato de Golgi, donde los N-glicanos son extensamente modificados. En el *cis*-Golgi, diferentes manosidasas eliminan los residuos de Man de la mayoría de las glicoproteínas, hasta llegar a la estructura $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Luego, en los compartimentos intermedios y en el *trans*-Golgi ocurre la extensión del N-glicano, lo que involucra la acción de numerosas glicosiltransferasas que adicionan residuos de Gal, NeuAc y Fuc, generando ramificaciones adicionales y N-glicanos con estructuras complejas y diversas. En *S. pombe*, se adicionan principalmente Man y algunas Gal. Figura extraída y modificada de (Stanley et al., 2015).

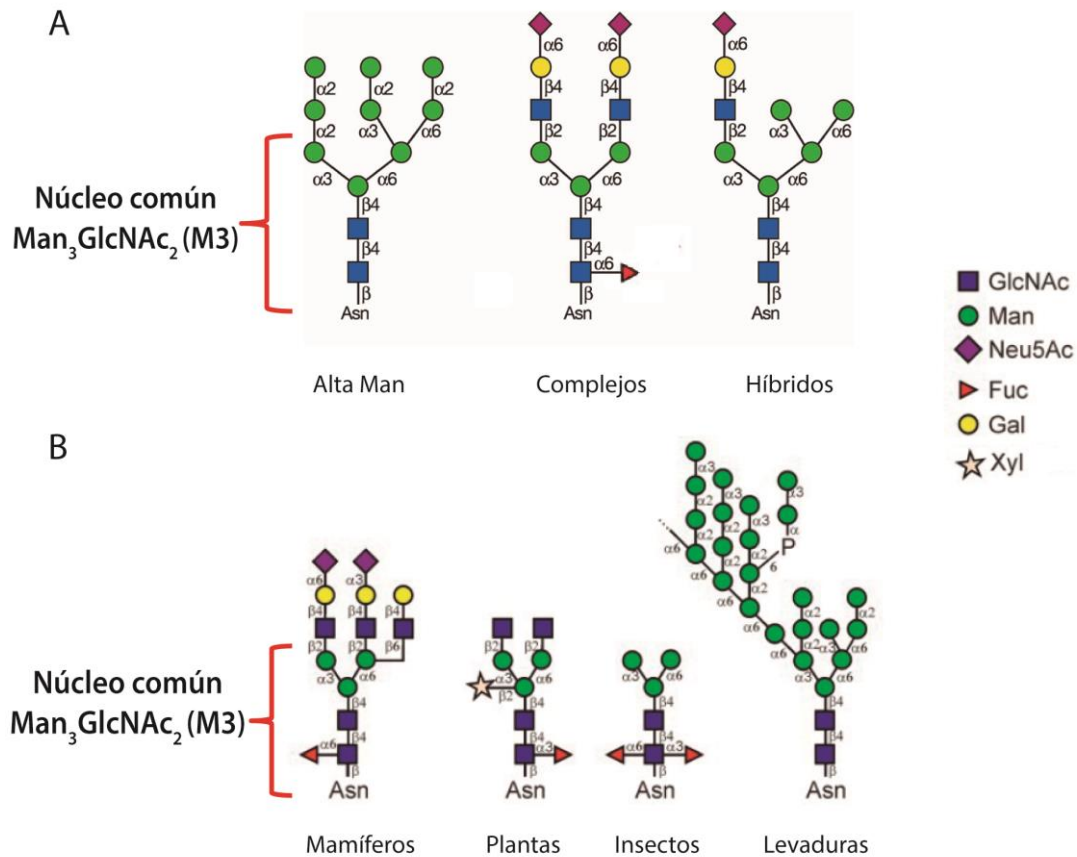


Figura 7. (A) Tipos de N-glicanos maduros. Los N-glicanos transferidos a las proteínas en los secuencias Asn-X-Ser/Thr son modificados en el RE y en el aparato de Golgi y adquieren una estructura madura que puede clasificarse en tres tipos: “alta Man”, “complejos” e “híbridos”. **(B) Estructuras típicas de N-glicanos encontrados en mamíferos, plantas, insectos y levaduras (*S. cerevisiae*).** Cada N-glicano contiene el núcleo común M3 proveniente de la estructura G3M9 inicialmente transferida. (Stanley et al. 2015).

Luego de pasar por los tres compartimentos del Golgi (*cis*, *medial* y *trans*), las proteínas son dirigidas al Trans-Golgi- Network (TGN). Esta cisterna funciona como una plataforma donde las proteínas son finalmente direccionadas y distribuidas hacia su localización final.

CDGs: Desórdenes congénitos de glicosilación

Como hemos mencionado, la glicosilación es un proceso extremadamente complejo, vital e indispensable para la homeostasis celular, que involucra numerosas vías metabólicas y pasos de reacción. Las CDG, por ***Congenital Disorders of Glycosylation***, son un grupo de enfermedades genéticas hereditarias que afectan las vías de glicosilación: *N*-glicosilación, *O*-glicosilación, síntesis de proteoglicanos, anclas glicosilfosfatidilinositol (GPI) y síntesis de glicolípidos por mencionar las más importantes. Hasta la fecha, han sido identificados más de 125 tipos de CDG y el número crece paulatinamente. La mayoría de estos trastornos han sido identificados recientemente gracias al avance de nuevas tecnologías como Next Generation Sequencing (NGS) (Figura 8) (Jaeken *et al.* 2017, Ng *et al.* 2018). Si bien la mayoría de las CDG se presentan como enfermedades autosómicas recesivas, también han sido identificados en menor medida, casos con mutaciones autosómicas dominantes, mutaciones *de novo* y mutaciones ligadas al X (Ng *et al.* 2018).

De todos los defectos que pueden darse en las vías de glicosilación, las fallas en la *N*-glicosilación son las más frecuentes. Alrededor del 70% de las CDGs se producen exclusivamente por deficiencias en la *N*-glicosilación (ilustradas en naranja en la Figura 8) y estas a su vez pueden clasificarse en CDG de tipo I o tipo II.

CDG tipo I y CDG tipo II

Las CDG de tipo I son causadas por defectos en la biosíntesis del DoI-PP-glicano o durante la transferencia del mismo a las proteínas. La deficiencia en cualquiera de los pasos requeridos para la biosíntesis del DoI-PP-glicano produce una estructura aberrante o incompleta. La OST tiene preferencia por DoI-PP-glicanos de tamaño completo (G3M9), por lo que la enzima tiende a saltarse algunas reacciones de transferencia si la síntesis del glicano no es correcta, debido a una pérdida de eficiencia en el reconocimiento del sustrato. Esto trae como consecuencia la ausencia de unidades enteras de *N*-glicanos en sitios normalmente ocupados, es decir, la hipoglicosilación de glicoproteínas. Sin embargo, la estructura de los glicanos remanentes es normal. Se han reportado CDG por mutaciones en prácticamente todos los genes *alg*. La CDG-Ia, o PMM2-CDG, causada por la deficiencia de fosfomanomutasa 2, es la más común entre todos los tipos de CDG, con más de 800 pacientes reportados.

Las CDG de tipo II son causadas por deficiencias en el procesamiento de los *N*-glicanos luego de haber sido transferidos a las proteínas. La deficiencia en alguno de los pasos del procesamiento de *N*-glicanos provoca una alteración en la estructura de los glicanos de las glicoproteínas (Freeze *et al.* 2015). El DoI-PP-glicano es sintetizado y transferido de forma normal (G3M9), y los sitios de *N*-glicosilación de las proteínas se encuentran normalmente ocupados, pero los *N*-glicanos maduros finales presentan una estructura alterada debido a un procesamiento fallido en el RE o el aparato de Golgi.

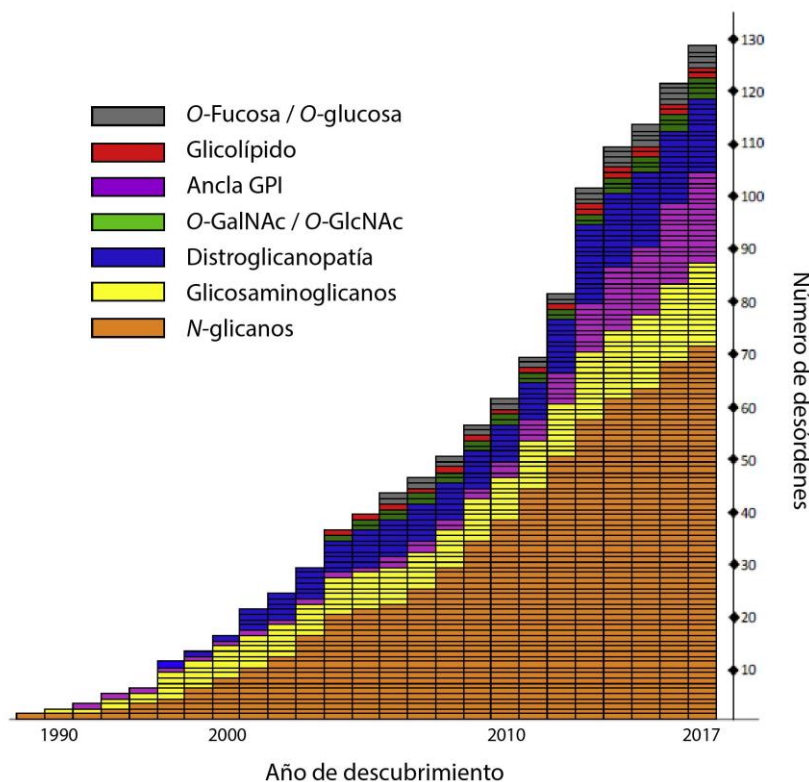


Figura 8. Desórdenes Congénitos de Glicosilación. Se muestra la distribución de las CDG según la vía de glicosilación a la que afectan y el año en que fueron identificadas. Se observa que año a año se descubren nuevos desórdenes y que la mayoría corresponde a desórdenes relacionados con la vía de N-glicosilación. Datos actualizados hasta el final de 2017. Figura extraída de (Ng *et al.* 2018)

Síntomas, Diagnóstico y Tratamiento de las CDG

Dado que la glicosilación es un proceso esencial para muchos procesos biológicos, los pacientes presentan características clínicas muy heterogéneas, de síntomas y fenotipos variables, desde relativamente leves a extremadamente severos. Cada tipo de CDG presenta diferentes patologías, pero pueden mencionarse algunos puntos en común.

Las CDGs más severas suelen ser evidentes desde el nacimiento o la infancia temprana, debido a la gravedad de los síntomas y consecuencias sobre el organismo. La mayoría de las CDGs presentan un componente neurológico importante que involucra el sistema nervioso central; disminución en el tono muscular (hipotonía), diferentes grados de discapacidad cognitiva, y subdesarrollo del cerebelo (hipoplasia cerebelar). Otros síntomas comunes incluyen distribución anormal de la grasa, defectos de coagulación, síntomas gastrointestinales como vómitos y diarrea, anomalías oculares, degeneración de la retina, rasgos faciales anormales (dimorfismo facial), anomalías hepáticas, coronarias (ej.: cardiomiopatía), convulsiones, excesiva pérdida de proteínas del tracto gastrointestinal (enteropatía), entre otros. Dificultades en la alimentación y dificultades para prosperar también son comunes.

Como se mencionó anteriormente, la variabilidad de síntomas y fenotipos que presentan estos desórdenes, hace que sean difíciles de diagnosticar. El isoelectroenfoque de transferrina sérica es una de las técnicas más utilizadas en la detección de CDGs. La transferrina es una glicoproteína (con dos sitios de N-glicosilación) presente en el plasma sanguíneo y esencial para el transporte de hierro en el cuerpo. Los pacientes CDG tipo I, tienen sitios de glicosilación desocupados. Sin embargo, los N-glicanos que permanecen en la

proteína tienen una estructura normal. En los pacientes CDG tipo II, los dos sitios de glicosilación de la transferrina se encuentran ocupados, pero la estructura del glicano se encuentra alterada. Aun así, no todas las CDG pueden ser detectadas por este método, y 25% de los pacientes CDGs pueden mostrar un perfil de transferrina normal, como es el caso de la CDG-IIb. En los últimos tiempos se han incorporado métodos de “glicómica clínica”, como la electroforesis en gel y la espectrometría de masa, que junto con técnicas genómicas, han mejorado la precisión en el diagnóstico de las CDGs (Abu Bakar *et al.* 2018)

Existen muy pocas opciones de tratamiento para las CDG. Solo en algunos casos pueden implementarse terapias potencialmente curativas, como la suplementación dietaria (ej.: galactosa para PGM1-CDG y fucosa para SLC35C1-CDG) y el trasplante de órganos (ej.: corazón para DLK-CDG e hígado para MPI-CDG). Sin embargo, la mayoría de los pacientes solo recibe tratamientos sintomáticos y/o preventivos (Ng *et al.* 2018).

CDG-IIb (MOGS-CDG) y glucosidasa I

La CDG-IIb, también llamada MOGS-CDG es un síndrome causado por la pérdida de función del gen MOGS (OMIM 606056), el cual codifica para la GI (Figura 2 y 5). Esta enzima es responsable del primer paso en el procesamiento del *N*-glicano una vez que este ha sido transferido a las proteínas. La GI es una proteína integral de membrana tipo II, miembro de la familia 63 de las glicosilhidrolasas (GH63). Es una α 1,2-exoglucosidasa compuesta por una cola citosólica N-terminal de 35 aminoácidos, un dominio transmembrana de 20 aminoácidos y un dominio catalítico grande C-terminal que se extiende hacia el lumen del RE (Faridmoayer *et al.* 2007). A pesar de catalizar un paso clave en la maduración de las glicoproteínas, es una de las enzimas procesadoras del *N*-glicano menos caracterizadas.

La CDG-IIb es un síndrome poco frecuente y de baja incidencia en la población humana, con pocos casos reportados en la bibliografía médica. Los pacientes presentan un cuadro extremadamente severo con afectaciones a nivel multisistémico, con pocas probabilidades de supervivencia y la mayoría no supera el año de vida. El cuadro clínico se caracteriza por una hipotonía generalizada, dismorfismo craneofacial (occipucio prominente, fisuras palpebrales cortas, pestañas largas, nariz ancha, paladar arqueado, retrognatia mandibular, etc.) genitales hipoplásicos, convulsiones, dificultades en la alimentación, hipoventilación, hipogammaglobulinemia severa y edema generalizado. El síndrome tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y los pacientes suelen ser heterocigotas compuestas, siendo ambos padres del paciente portadores de uno de los alelos recesivos.

El primer caso fue reportado en un neonato con hipotonía severa generalizada y rasgos dismórficos. Nació a las 36 semanas de gestación y tuvo un desenlace fatal a los 74 días del nacimiento (De Praeter *et al.* 2000). Estudios enzimológicos en varios tejidos del paciente (hepático y fibroblastos de la piel) revelaron una deficiencia severa de la GI, con una actividad residual menor al 3% respecto del control. Fibroblastos provenientes de los progenitores presentaron un 50% de actividad enzimática en relación al control, evidenciando una pre-deficiencia en los padres.

Otros dos pacientes, hermanos entre sí, fueron reportados con mutaciones heterocigotas compuestas en el gen MOGS (Sadat *et al.* 2014). Ambos pacientes sobrevivieron hasta las 6 y 11 años de edad respectivamente; su cuadro presentaba características clínicas de menor severidad, lo que permitió que progresen hasta una edad más avanzada. Según fue reportado, la recombinación mitótica en ciertos tejidos de estos pacientes (mosaicismo) permitió un rescate del gen MOGS y cierta expresión de la GI. El cuarto paciente presentó un cuadro clínico similar al resto y falleció a los 4 meses de edad por una falla multiorgánica. Un hermano de este mismo paciente había fallecido previamente a los 7 meses de edad por una falla renal (Kim *et al.* 2018), aunque no fue diagnosticado. El último caso reportado, fue de dos hermanos con heterocigosis compuesta del gen MOGS, presentaron complicaciones similares y fallecieron a los 9 y 10 meses de edad respectivamente (Li *et al.* 2019).

Estudios realizados sobre el primer paciente reportado revelaron interesantes resultados y observaciones sobre la deficiencia de GI. Al analizar el estado de *N*-glicosilación del paciente se observó un 80% de *N*-glicanos con estructuras maduras “normales” y un 16% de *N*-glicanos detenidos en el estadio G3M9. A pesar de poseer en su mayoría *N*-glicanos de estructura normal, la patología de los pacientes sigue siendo extremadamente severa. También fue reportado un aumento en la expresión y actividad de la endomanosidasa de Golgi (EM), la cual corta el *N*-glicano G3M9 entre los residuos de manosas *f* y *g* (Figura 3). La actividad de esta enzima, como veremos más adelante, podría explicar la presencia de *N*-glicanos maduros normales a pesar de la deficiencia de GI. En orina del paciente también se reportó una excreción anormal de carbohidratos, con excesiva cantidad del tetrasacárido Glc₃Man, producto de reacción de la EM (Figura 3) (De Praeter *et al.* 2000, Volker *et al.* 2002).

CDG-IIb y su modelo en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*

Como se ha mencionado, los pasos iniciales del procesamiento de *N*-glicanos en el RE presentan grandes similitudes entre levaduras y eucariotas superiores. En la levadura de fisión *S. pombe* se encuentran conservados el proceso de síntesis del Dol-PP-glicano (catalizado por los productos de los genes *alg*), la estructura G3M9 que se transfiere, las características de la reacción catalizada por la OST, el procesamiento de las glicoproteínas por GI y GII, el control de calidad del plegamiento y la UGGT. Teniendo todo esto en cuenta, *S. pombe* resulta un excelente modelo experimental para reproducir las alteraciones genéticas observadas en las CDGs.

El gen de la GI, llamado GCS1 en humanos, presenta su homólogo *gls1*⁺ en *S. pombe* (UniProtKB-O14255; GCS1_SCHPO). Con el objetivo de estudiar las características moleculares que presentan los pacientes CDG-IIb, se procedió a reproducir la deficiencia de GI en *S. pombe*. En el laboratorio se pudo obtener una cepa haploide carente completamente del gen codificante de la GI (Δ *gls1*) por meiosis y esporulación de una cepa diploide heterocigota para dicho gen (Δ *gls1*/+) obtenida de una colección comercial (Kim *et al.* 2010) (Figura 9).

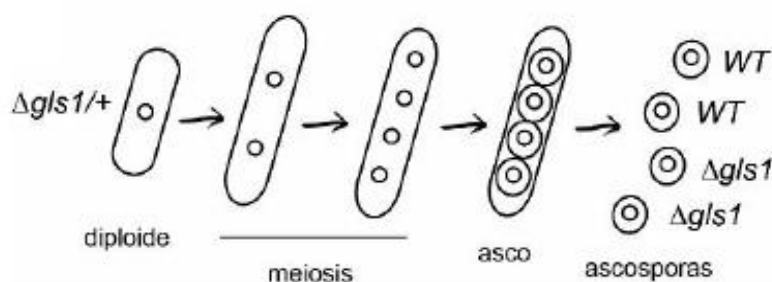


Figura 9. Esquema representativo de la obtención de la cepa Δ *gls1*. Meiosis y esporulación de una cepa diploide heterocigota Δ *gls1*/+, para dar dos cepas haploides *WT* y dos cepas haploides Δ *gls1* mutantes.

Una vez que se obtuvo la cepa haploide Δ *gls1*, se analizaron en detenimiento las características morfológicas y moleculares que presentaba dicha mutante. Resumiendo brevemente varios años de trabajo y recopilando toda la información obtenida, la mutante Δ *gls1* presentaba un fenotipo aberrante, con serias dificultades de crecimiento, bajo metabolismo y una capacidad replicativa muy baja. Estos efectos tan adversos para la célula no fueron sorprendentes, dada la severidad de los síntomas en pacientes humanos, los cuales presentan graves patologías.

Los ensayos de crecimiento en medio líquido mostraron parámetros alterados y disminuidos (DO máxima, duración de fase *lag*, tiempo de duplicación y tiempo $\frac{1}{2}$). En medio sólido, las levaduras Δ *gls1* mostraron amplias diferencias con la cepa *WT*, con colonias de menor tamaño y con dificultades para proliferar (Figura 10A). La complementación de la mutante Δ *gls1* con el gen *gls1*⁺ restauró el crecimiento normal, verificando que el fenotipo puede ser rescatado por la presencia de GI.

El estudio morfológico de la mutante $\Delta gls1$ por microscopía de transmisión mostró células redondeadas, pequeñas y con cierta tendencia a agruparse (Figura 10B). La medición de la longitud promedio de las células en fase exponencial también verificó la diferencia de tamaño entre las distintas cepas.

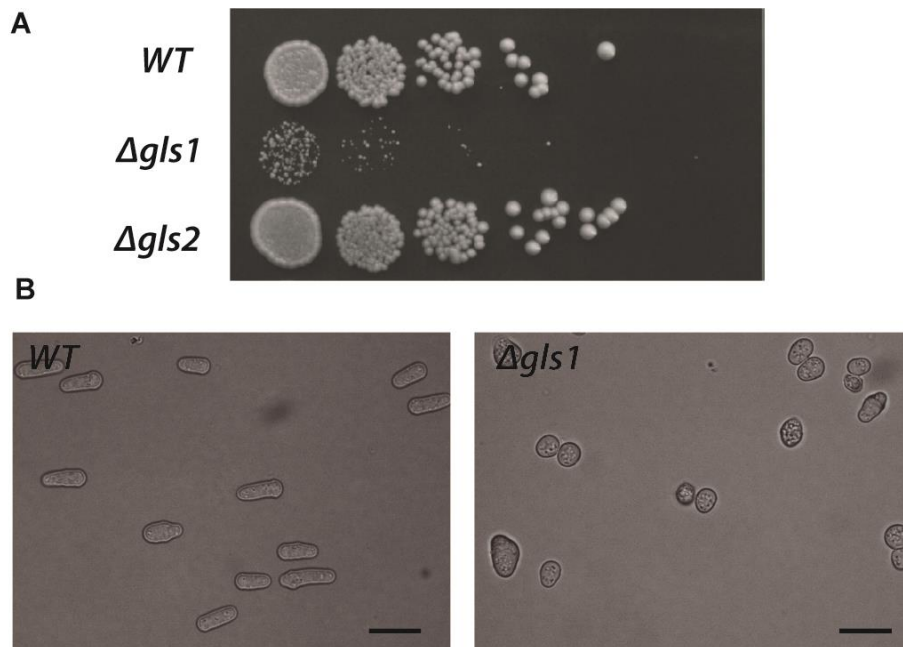


Figura 10. La mutante $\Delta gls1$ presenta severos defectos morfológicos y de crecimiento. (A) Ensayo de crecimiento en medio sólido. Las cepas indicadas fueron crecidas hasta $OD_{600}=1$. Se realizaron diluciones seriadas al décimo y 5 μ l del cultivo fueron sembrados en medio YEA. Las placas fueron incubadas 72 h a 28°C. **(B) Morfología de las cepas WT y $\Delta gls1$.** Las células fueron crecidas en medio YEA líquido hasta $OD_{600}=1$ y se tomaron imágenes de los cultivos frescos por microscopía de transmisión en un microscopio Olympus BX60 y cámara Olympus DP71. Barra de escala = 5 μ m. Estos resultados formaron parte de la tesis doctoral de la Dra. Giovanna Gallo y fueron publicados en (Gallo *et al.* 2018).

Como se ha demostrado en varios modelos animales y en pacientes CDG-IIb, las células deficientes en Gl tienden a acumular *N*-glicoproteínas triglucosiladas con glicanos del tipo G3M9. Para analizar el estado de glicosilación de las proteínas en la cepa mutante $\Delta gls1$, se estudiaron los perfiles de *N*-glicosilación (NLOs) *in vivo*, en la vía secretoria temprana (*N*-glicoproteínas presentes en el RE). Para las cepas WT, se obtuvo un perfil de glicosilación normal con especies del tipo M9 (acción sucesiva de Gl y GII) (Figura 11A). Contrariamente, en la cepa $\Delta gls1$ se encontraron mayoritariamente *N*-glicoproteínas de la especie G3M9, lo cual es consistente con una deficiencia de Gl y por lo tanto un bloqueo en el procesamiento de los *N*-glicanos (Figura 11B).

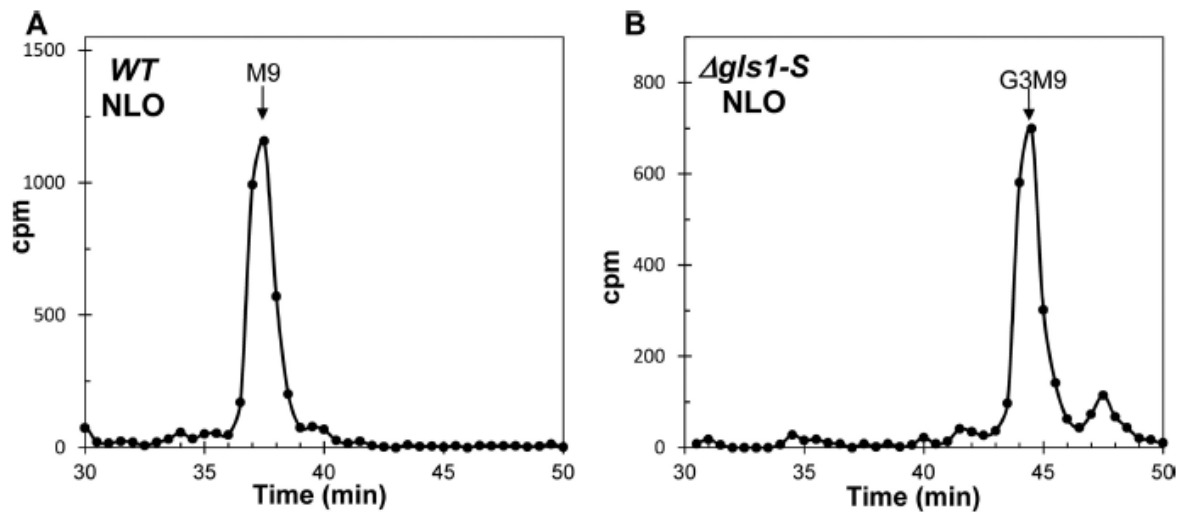


Figura 11. Síntesis *in vivo* de *N*-oligosacáridos (NLOs) en *S. pombe*. Cultivos en fase exponencial de cepas (A) WT y (B) $\Delta gls1$ fueron lavados y marcados con 5 mM [^{14}C -Glc] por 15 min en presencia de 5 mM DTT (evita la salida de las glicoproteínas del RE) y 3.5 mM kifunensina (inhibidor de α -manosidasas de RE). Los *N*-glicanos sensibles a Endo H fueron purificados, separados por cromatografía en papel, eluidos y resueltos por HPLC. Se indican con un flecha la posición de los estándares.

En el laboratorio se consideraron un conjunto de hipótesis que pudieran dar una explicación al fenotipo observado en la mutante *S. pombe* $\Delta gls1$. La deficiencia de GI podría estar afectando y comprometiendo varias vías metabólicas que actúan en el RE, como puede ser el funcionamiento de la OST, el control de calidad de plegamiento (QC) y la degradación asociada al RE (ERAD). Para poner a prueba estas hipótesis, se construyeron mutantes con dichas vías de procesamiento truncadas, y se analizó su fenotipo de crecimiento. Los resultados constataron que ninguna de estas mutantes poseía un fenotipo igualmente aberrante al de la $\Delta gls1$, por lo que los defectos observados en dicha mutante no pueden ser explicados por un mal funcionamiento de estas vías (Gallo *et al.* 2018).

La Endomanosidasa

Actividad catalítica y localización subcelular

La endo- α -1,2-manosidasa (EM), es una proteína residente de Golgi perteneciente al grupo de Glycoside Hydrolase Family 99 (GH99). La EM es el único miembro de esta familia debido a su particular secuencia aminoacídica y actividad catalítica, y es la única enzima conocida de la vía de procesamiento de *N*-glicanos capaz de cortar internamente (endoglicosidasa) el *N*-glicano y liberar más de un monosacárido a la vez. El resto de las enzimas conocidas son exoglicosidasas, procesan secuencialmente el monosacárido más exterior de la rama y liberan una unidad de azúcar a la vez. La EM hidroliza el enlace interno α -1,2 entre el último (*g*) y penúltimo (*f*) residuo de manosa del brazo A del *N*-glicano (Figura 3). Tiene cierta promiscuidad en cuanto a la especificidad de sustratos y estructura de *N*-glicanos que reconoce; puede actuar en *N*-glicanos mono, di y triglicosilados, y con diferentes grados de procesamiento del árbol de manosas ($Glc_{1-3}Man_{4-9}$). Aun así, se ha comprobado su preferencia por *N*-glicanos monoglucosilados y con previo procesamiento de manosas de la rama B y C, siendo su sustrato preferido $Glc_1Man_4GlcNAc_2$ (*in vitro*) (Lubas *et al.* 1987). Como

producto puede liberar manosas mono, di o triglucosiladas dependiendo del sustrato inicial ($G_{1-3}M$) (Figura 12). También han sido analizados ciertos parámetros bioquímicos de la enzima, posee un pH óptimo de 6.2, una temperatura óptima de 37°C, valores acordes a su actividad en el lumen del aparato de Golgi, y no posee ningún requerimiento catiónico especial (Lubas *et al.* 1987, Bause *et al.* 1996).

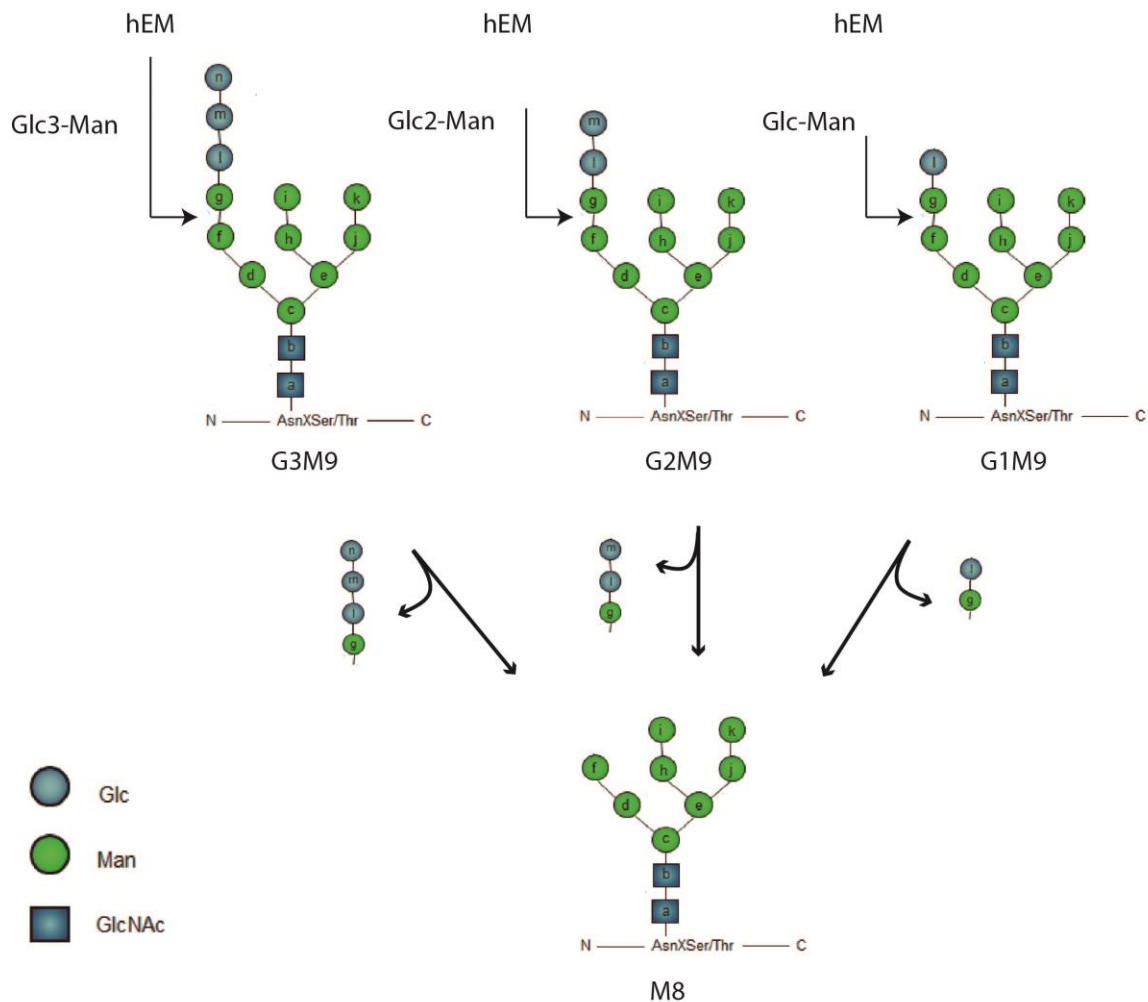


Figura 12. Sustratos y sitio de corte de la endomanosidasa. La EM reconoce *N*-glicanos mono, di y triglucosilados y corta el enlace interno Man(*g*)-(*f*)Man para liberar el correspondiente producto. También presenta cierta promiscuidad en cuanto a la cantidad de manosas de los brazos B y C.

La endomanosidasa es una proteína transmembrana tipo II y se la puede encontrar en compartimentos intermedios de pre-Golgi (15%) pero mayoritariamente en el cis y medial Golgi (84%) (Zuber *et al.* 2000). No se ha detectado su presencia en los compartimentos del trans Golgi ni en el TGN. La mayoría de las enzimas de glicosilación del aparato de Golgi son proteínas transmembrana tipo II consistente de tres dominios: una cola citosólica, seguida de una región transmembrana (TMD), y una región luminal grande con actividad catalítica. La topología tipo II de estas enzimas de Golgi coloca el dominio catalítico en el lumen, donde

pueden participar del procesamiento de las glicoproteínas durante su tránsito por la vía secretoria. La endomanosidasa, siendo una proteína transmembrana tipo II, presenta un cola citosólica corta (1-8 aa) en su N-terminal, un dominio transmembrana (TMD: 9-27 aa), y un dominio catalítico C-terminal que mira hacia el lumen del aparato de Golgi (CD: 28-462 aa) (Figura 13). Se ha demostrado que el dominio N-terminal (cola citosólica + TMD) es esencial para la localización de la proteína en la membrana del aparato de Golgi; aunque es innecesario para la actividad catalítica de la enzima. El CD puede expresarse de forma soluble, se pliega correctamente y posee funcionalidad independientemente del dominio N-terminal (Hamilton *et al.* 2005, Stehli *et al.* 2008).

La endomanosidasa apareció tardíamente en la evolución, en el phylum Chordata, y se encuentra ausente en protozoos, invertebrados, plantas superiores y levaduras (Dairaku *et al.* 1997). Su ausencia en el genoma de la levadura de fisión, nuestro modelo de estudio, es de particular interés ya que nos permitirá expresarla de forma episomal y evaluar el impacto de su actividad en dicho organismo.

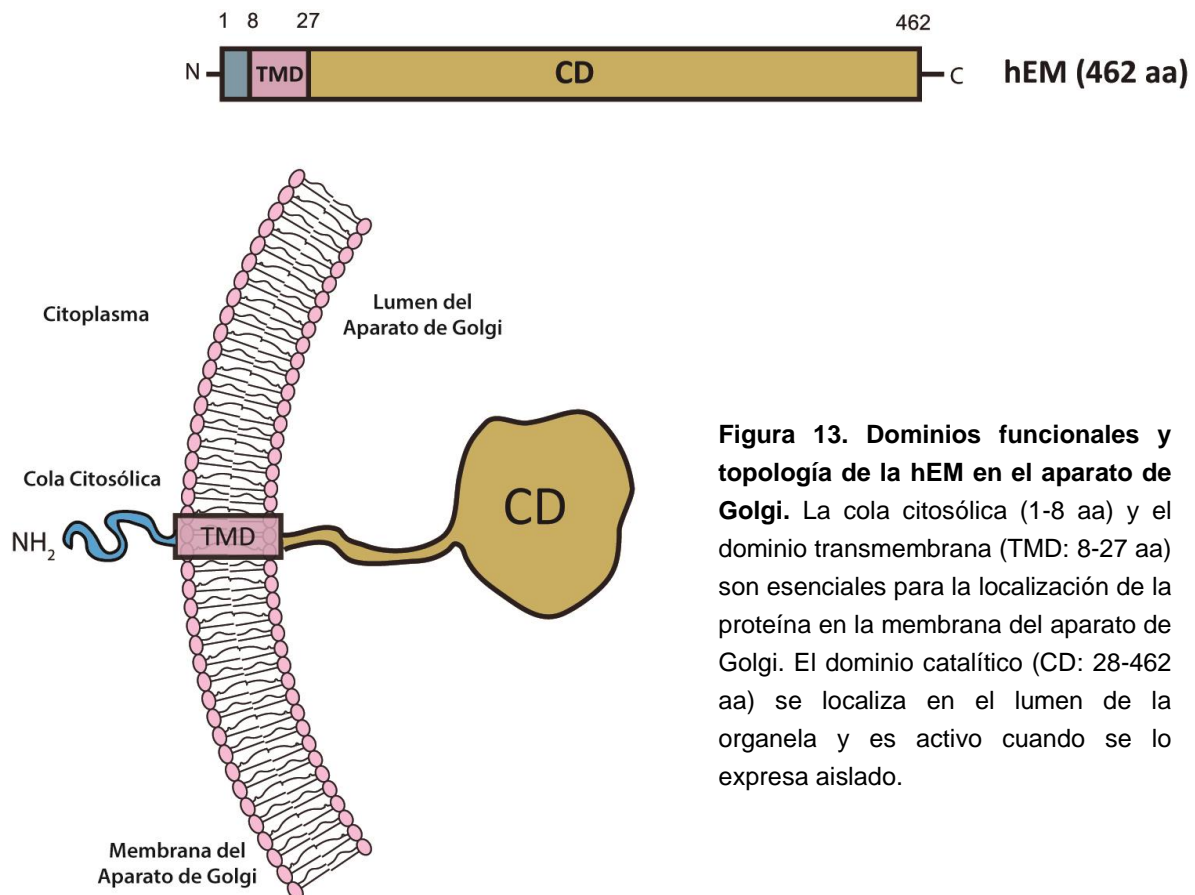


Figura 13. Dominios funcionales y topología de la hEM en el aparato de Golgi. La cola citosólica (1-8 aa) y el dominio transmembrana (TMD: 8-27 aa) son esenciales para la localización de la proteína en la membrana del aparato de Golgi. El dominio catalítico (CD: 28-462 aa) se localiza en el lumen de la organela y es activo cuando se lo expresa aislado.

Mecanismo alternativo de deglucosilación en el procesamiento de N-glicanos.

El rol de la EM en el aparato de Golgi y en el proceso de N-glicosilación no se comprende en su totalidad pero varios resultados permiten tener una idea de su función. Desde el momento en que la EM fue descrita por primera vez y se caracterizó su actividad catalítica (Lubas *et al.* 1987), se le fue asignado un posible rol como mecanismo “back-up” de las glucosidasas de RE y estudios posteriores apoyaron esta hipótesis.

La vía canónica de deglucosilación de N-glicanos establece que las glucosidasas de RE (GI y GII) deben procesar el glicano para producir N-glicoproteínas del tipo M9 y que las mismas puedan continuar su maduración por la vía secretoria. La presencia de glucosas en la estructura del N-glicano (G3M9, G2M9 y G1M9) impide que el mismo sea procesado por las manosidasas y glicosiltransferasas de Golgi. En la práctica, esta teoría parecía contradecirse puesto que al bloquear el accionar de GI y GII, igualmente podían encontrarse N-glicanos maduros (complejos e híbridos). Por ejemplo, en células HepG2 se comprobó que, aun utilizando inhibidores de α -glucosidasas de RE como castanospermina (CST) y 1-desoxinojirimicina (DMJ-1), un 50% de los N-glicanos lograban ser procesados por las enzimas residentes de Golgi y adquirirían estructuras de tipo complejo (Moore *et al.* 1990). Por otro lado, células de linfoma de ratón PHA₂.7 deficientes en GII también lograban procesar los N-glicanos maduros hacia estructuras complejas (Fujimoto *et al.* 1991). Esta capacidad de las células de sortear (“bypassear”) el accionar de las glucosidasas de RE (GI y GII) se le atribuye a la endomanosidasa de Golgi. Esta enzima forma parte de un mecanismo alternativo de deglucosilación de N-glicoproteínas y permitiría suplir en parte la función de GI y GII (Figura 14).

También se demostró en células MDCK y células de linfoma de ratón BW5147.3 que, al administrar conjuntamente un inhibidor de glucosidasas (CST) y un inhibidor de la EM (Glc α 1 \rightarrow 3DMJ; análogo del disacárido Glc α 1 \rightarrow 3Man), se puede bloquear completamente el procesamiento de las N-glicoproteínas. De esta manera, al inhibir tanto la vía canónica (GI y GII) como la vía alternativa deglucosilación (EM), se puede bloquear la formación de N-glicanos maduros (Hiraizumi *et al.* 1993). Por otro lado, se ha comprobado que la EM no sólo opera bajo condiciones de inhibición o deficiencia de los glucosidasas de RE, sino que es responsable de cierto procesamiento de N-glicanos bajo condiciones fisiológicas normales (Weng *et al.* 1996).

Los resultados obtenidos hasta la fecha apuntan a que la EM formaría parte de un mecanismo “back-up” residente de Golgi, capaz de suplir la falta de acción de las α -glucosidasas de RE, tanto de la GI como de la GII. Como se mencionó anteriormente, la deglucosilación del N-glicano en el RE es esencial para su posterior remodelación en el aparato de Golgi, y la presencia de las glucosas imposibilita el accionar de las enzimas residentes en dicha organela. Dicho esto, la EM residente de Golgi permitiría la deglucosilación de los N-glicanos que no hayan sido procesados en el RE, ya sea por haber escapado el procesamiento de la GI y la GII, o por una deficiencia o bloqueo de las mismas.

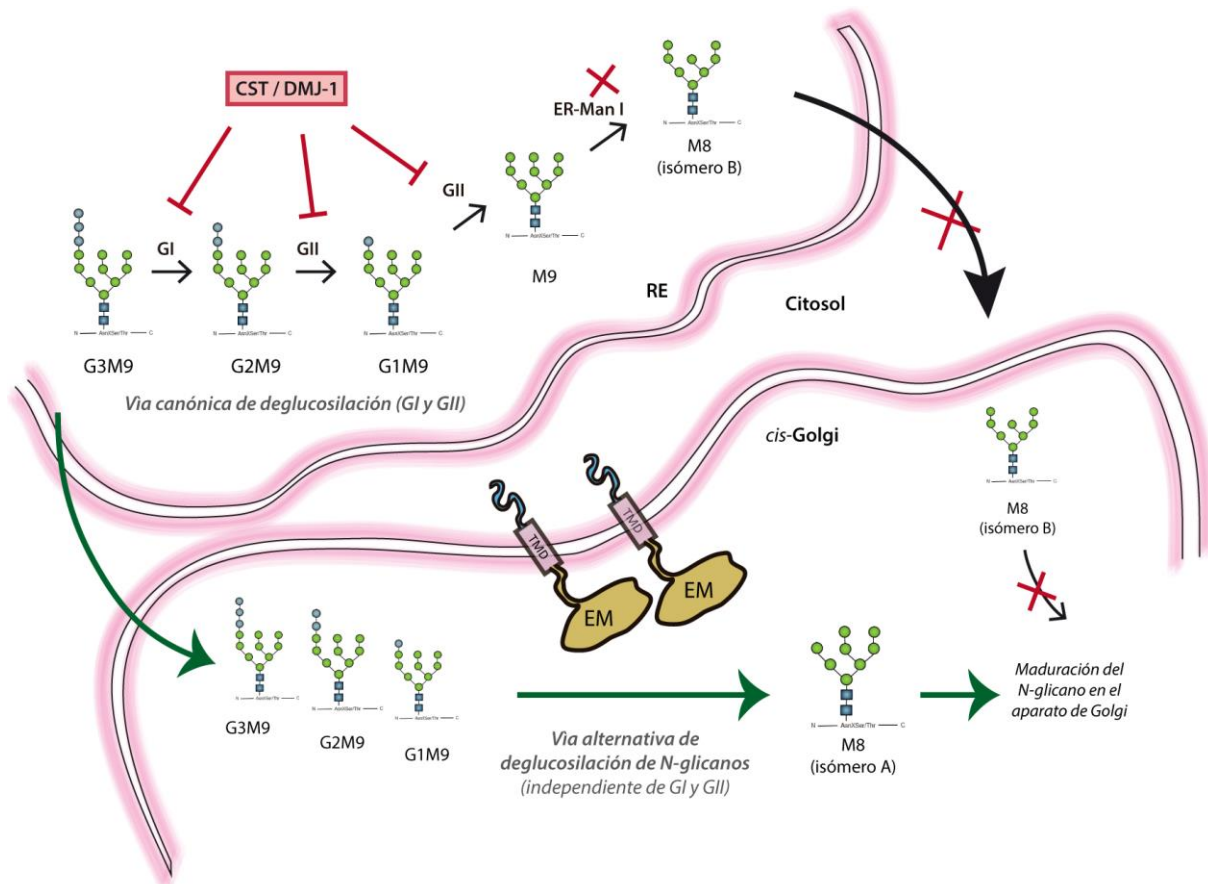


Figura 14. Vías de deglicosilación de N-glicanos. En el RE, la GI, GII y ER-Man I forman parte de la vía canónica de deglicosilación de N-glicanos para formar M8 (isómero B). Bajo inhibición o deficiencia de glucosidasas (CST/DNJ-1, en rojo), la EM permite la deglicosilación de los N-glicanos mediante una vía alternativa (en verde) para dar M8 (isómero A). Ambos isómeros M8 pueden ser procesados por las enzimas residentes de Golgi y continuar su maduración por la vía secretoria.

Rol de la endomanosidasa en la CDG-IIb

Como se mencionó anteriormente, ciertos indicios apuntan a que la endomanosidasa cumpliría un rol interesante en pacientes con CDG-IIb. La remoción del residuo distal de Glc (n en Figura 3) por la GI, es un paso del procesamiento de N-glicanos sumamente específico que no puede ser realizado por otras α -glucosidasas y esencial para la maduración de las glicoproteínas. La deficiencia de GI provoca un bloqueo en el procesamiento de los N-glicanos y por consiguiente una acumulación de especies G3M9. La teoría indicaría que la deficiencia severa de GI es incompatible con el desarrollo normal de un organismo, pero sin embargo, los pacientes logran sobrevivir hasta los 4-9 meses de edad aproximadamente.

Esta capacidad de sobrellevar la ausencia de GI podría deberse a la inducción de la EM. Esta enzima lograría procesar las N-glicoproteínas G3M9 provenientes del RE, revirtiendo su acumulación y permitiendo que continúen su procesamiento por la vía secretoria. Como fue reportado, uno de los pacientes CDG-IIb presentó un perfil de N-glicosilación aparentemente "normal", con 80% de los N-glicanos procesados correctamente, un 16% de N-glicanos detenidos en el estadio G3M9 e inducción de la EM (aumento del transcripto) (Volker *et al.* 2002).

Otras observaciones también apoyan esta hipótesis de la endomanosidasa como enzima “back-up” del proceso de deglucosilación. Fue reportado en pacientes CDG-IIb un patrón de excreción de carbohidratos de orina anormal, con una excesiva excreción de Glc₃-Man, el producto de reacción de la EM al cortar el glicano G3M9. Por otro lado, estudios en fibroblastos de dichos pacientes detectaron un incremento en la actividad de la EM entre 2 y 3 veces respecto al control, asociado a un incremento en el transcripto de la misma. Este incremento en la actividad de la EM en células deficientes de GI podría indicar que ambas vías de procesamiento no son enteramente independientes, y que existiría algún tipo de regulación transcripcional sobre la enzima y vías de señalización asociadas (Volker, De Praeter et al. 2002).

Aun así, la persistencia de un 16% de *N*-glicanos G3M9 indicaría que la EM es incapaz de compensar totalmente la deficiencia de GI. Varios mecanismos podrían explicar esto: por un lado, la capacidad de procesamiento de la EM podría ser insuficiente para procesar la totalidad de los *N*-glicanos de la vía secretoria; ciertas *N*-glicoproteínas podrían no ser reconocidas y aceptadas como sustrato; o cierta fracción de ellas podría quedar retenida en el RE y no ser accesible para la EM localizada en el aparato de Golgi.

Resumiendo, estos resultados y observaciones apuntan a la existencia de una vía alternativa de procesamiento de *N*-glicanos, protagonizada por la EM de Golgi, donde los *N*-glicanos glucosilados que salen del RE y escapan al procesamiento de la GI y la GII, podrían ser deglucosilados y continuar su maduración.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La deficiencia de Gl produce en humanos la enfermedad congénita de glicosilación CDG-IIb, en donde los pacientes presentan una grave patología y anomalías en el desarrollo. Aún no se sabe con exactitud cuáles son las causas y bases moleculares de dicha enfermedad. Como se ha demostrado en varios modelos de estudio, la deficiencia de Gl provoca un bloqueo en el procesamiento de *N*-glicanos y la acumulación de *N*-glicoproteínas con estructura G3M9 en la vía secretoria de las células (Moore *et al.* 1990, Ray *et al.* 1991, Katoh *et al.* 2013). En nuestro laboratorio utilizamos levaduras mutantes *S. pombe* carentes de Gl ($\Delta gls1$) como modelo de estudio de CDG-IIb. Las células muestran un fenotipo aberrante, serias dificultades de crecimiento, y acumulación de *N*-glicoproteínas triglucosiladas G3M9. Si bien mutantes *S. pombe* carentes de GlII ($\Delta gls2$) acumulan glicoproteínas con glicanos G2M9, las mismas presentan un fenotipo de crecimiento normal y no parecerían ser afectadas por la persistencia de estas estructuras (Figura 10A). Esto descarta que el fenotipo resultante de la deficiencia de Gl sea debido al impedimento de las glicoproteínas para entrar en los ciclos de QC. Asimismo, la falta de OS9 no produjo defectos de crecimiento, por lo que el fenotipo no se debería a una potencial disminución del ERAD. La hipótesis de trabajo es que la persistencia de *N*-glicoproteínas triglucosiladas (G3M9) resulta tóxica en *S. pombe* y es la responsable de los defectos de crecimiento y morfológicos observados. Si nuestra hipótesis es correcta, la expresión de la EM humana (hEM) debería revertir el fenotipo aberrante de las mutantes, al eliminar las especies *N*-glicoproteínas G3M9 acumuladas en la vía secretoria.

Estudios previos mostraron que en pacientes CDG-IIb se encuentra inducida la endomannosidasa de Golgi (EM), la cual puede suplir en parte la falta de actividad de Gl. En dichos pacientes 80% de los *N*-glicanos alcanza estructuras maduras normales, mientras que sólo un 16% de los *N*-glicanos queda detenido en el estadio G3M9. Sin embargo, dichos pacientes presentan severas patologías. Esto podría deberse a que el 80% de proteínas normales es insuficiente y que entre las proteínas remanentes con glicanos G3M9 hay alguna glicoproteína cuya estructura de glicanos es esencial en el Golgi o más adelante en la vía secretoria, o a que la persistencia de las proteínas con G3M9 en el RE es nociva. En ese caso se debería obtener un efecto diferente si la hEM es expresada en RE que en Golgi, su localización natural. Para poder establecer si esta acumulación de *N*-glicoproteínas G3M9 en la vía secretoria ocurre específicamente en el RE, en el aparato de Golgi, o en ambas organelas, se expresará una endomannosidasa con destino a RE (RE-hEM) y otra con destino a Golgi (G-hEM). Si la acumulación perniciosa de glicoproteínas triglucosiladas ocurre específicamente en el RE, la expresión de RE-hEM debería ser más ventajosa para las células que la de G-hEM; o viceversa.

Objetivo General

Expresar la endomanosidasa humana (hEM) en la levadura *S. pombe* carente de Gl ($\Delta gls1$) y analizar el impacto de su expresión en el fenotipo de dicha mutante.

Objetivos Específicos

1. Expresar la endomanosidasa humana (hEM) fusionada a GFP en la levadura de fisión: construir una proteína de fusión con destino a RE (RE-hEM) y otra con destino a Golgi (G-hEM).
2. Comprobar la actividad de las construcciones mediante un ensayo de actividad *in vitro*.
3. Comprobar la correcta localización de RE-hEM y G-hEM por microscopía confocal, en RE y Golgi respectivamente.
4. Analizar el impacto de su expresión en el fenotipo de la mutante $\Delta gls1$ mediante un ensayo de crecimiento.

Materiales y Métodos

Materiales

El extracto de levadura fue de Difco. Los inhibidores de proteasas, los aminoácidos y suplementos para medios de cultivo fueron de Sigma. La Clonasa Gateway LR fue de Invitrogen. Las demás drogas utilizadas fueron de Anedra o Sintorgan. Las enzimas utilizadas en procedimientos de ADN recombinante fueron de *New England BioLabs*.

Cepas y medios de cultivo

La cepa de bacterias *Escherichia coli* utilizada para procedimientos de clonado fue JA226 (*hsdR*, *hsdM*, *trpE5*, *fecAI*, *LeuB6*, *ZopII*, *thil*, *recBC*, *strR*). Las bacterias fueron crecidas a 37°C en medio LB (NaCl 0.5%, bacto triptona 1% y extracto de levadura 0.5%) con ampicilina 200 mg/L o kanamicina 50 mg/L según el requerimiento. En todos los casos los medios sólidos se hicieron con agar 2% m/v. 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), en medio mínimo MM (KH ftalato 0.3%, Na₂HPO₄ 0.22%, NH₄Cl 0.5%, Glc 2%), o MMG (donde el NH₄Cl es reemplazado por glutamato monosódico 0.374%), con agregado de sales, vitaminas y minerales (Hagan 2016). Los medios mínimos fueron suplementados además con adenina (75 mg/L) y uracilo (75 mg/L).

Cepa (Nombre coloquial)	Genotipo	Origen
ADm (WT)	<i>h⁻</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>ura4-D18</i>	Stock del laboratorio (D'Alessio <i>et al.</i> 1999)
Sp611Iα (<i>Δgls2</i>)	<i>h⁻</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6-M210</i> , <i>ade1</i> , <i>ura4-D18</i> , <i>Δgls2α::ura4+</i>	Stock del laboratorio (Soussilane <i>et al.</i> 2009)
ΔGI-10A (<i>Δgls1</i>)	<i>h⁺</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ade6-M216</i> , <i>ura4-D18</i> , <i>Δgls1::NatMX4</i>	Tesis Doctoral, Dra. Giovanna Gallo (Gallo <i>et al.</i> 2018)

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

Preparación de bacterias *E. coli* electrocompetentes y transformación

A partir de un stock de glicerol de bacterias *E. coli* JA226 se inocularon 10 ml de medio LB y se incubó overnight (16hs) en agitación a 250 rpm y 37°C. Dicho cultivo se utilizó para inocular 1 L de medio LB (dilución 1/100), pre-calentado a 37°C, y luego incubado durante 2 hs adicionales hasta OD₆₀₀=0.5-0.6. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Las bacterias se resuspendieron en agua Milli-Q fría (125 ml aprox), realizándose 3 lavados y centrifugando a 8000 rpm por 10 min cada vez. Las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10%, se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min, se resuspendieron en un volumen de glicerol 10% y se alícuotaron de a 50 µl en glicerol 10%. Las alícuotas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

Para la transformación se tomaron 50 µl de las células electrocompetentes y se incubaron con 10 pg de ADN por 3 min en hielo. Se electroporaron a 2.5 kV, 200 Ohm y 25 µF en un electroporador Biorad. Las células fueron recuperadas en 1 ml de LB durante 1 hora a 37°C y se plaquearon diluciones en el medio selectivo adecuado.

Preparación de levaduras *S. pombe* electrocompetentes y transformación

Se inocularon 20 ml de medio YEA con una colonia de *S. pombe* y se crecieron ON a 28°C en agitación hasta alcanzar una $OD_{600}=0.8-1.5$. Se enfriaron los cultivos en hielo y se cosecharon las células por centrifugación a 3000 xg durante 5 min. Se realizaron dos lavados con un volumen de agua y otro con un volumen de sorbitol 1 M a 4°C sucesivamente. Se resuspendieron las células en 200 μ l de sorbitol 1 M y se separaron alícuotas de 50 μ l, para luego ser almacenadas en ultrafreezer a -80°C.

Para la transformación se incubaron 50 μ l de células electrocompetentes con 1 μ g de ADN por 3 min. Se electroporaron a 1.5 kV, 200 Ohm y 25 μ F en un electroporador Biorad. Las células fueron recuperadas en 1 ml de sorbitol 1M y se plaquearon diluciones en el medio selectivo adecuado. Finalmente, se incubó a 28°C hasta la aparición de colonias.

Procedimientos con ADN

Extracción de ADN plasmídico de bacterias (Miniprep)

Se partió de un cultivo de bacterias *E. coli* (3-5 ml) crecido en LB con antibiótico adecuado a 37°C en agitación durante toda la noche, se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendió el pellet en 200 μ l de P1 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8). Luego se agregaron 300 μ l de P2 (NaOH 2 N, SDS 1 % p/v) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Se le agregaron 300 μ l de P3 (KAcO 3 M pH 4.8), se centrifugó a velocidad máxima durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, al que se le agregaron 5 μ l de RNAsa 10 mg/ml. Se incubó a 37°C durante 10 minutos, se le agregaron 400 μ l de cloroformo, se homogeneizó y se centrifugó la muestra durante 5 minutos. Se recuperó la fase superior, se le agregó 1 volumen de isopropanol y se incubó durante 25 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 13000 xg durante 25 minutos a 4°C, se lavó el pellet con 500 μ l de etanol 70%, se dejó evaporar el etanol residual y se resuspendió el pellet en 25-30 μ l de agua Milli-Q. Los plásmidos fueron analizados por gel de agarosa y su concentración cuantificada con Nanodrop.

Preparación de ADN genómico de levaduras *S. pombe*

La extracción de ADN de levaduras se realizó como se describe en la referencia (Hoffman *et al.* 1987). Se cosecharon por centrifugación 15 ml de cultivo de levaduras crecidas en medio apropiado hasta fase exponencial ($OD_{600}=2$) a 6000 xg durante 5 min y se resuspendieron las células en 200 μ l de agua bidestilada. Se agregaron 200 μ l de buffer Extracto (Tris-HCl 10mM pH=8.0, Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, EDTA 1mM) y 200 μ l de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Las células se rompieron por agitación en vórtex con 300 mg de bolitas de vidrio durante 4 min y luego se agregaron 200 μ l de buffer TE pH=8.0 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). Se centrifugó la muestra a 10000 xg y se recuperó la fase acuosa. Se agregó 1 ml de etanol 100% para precipitar el ADN, se centrifugó y se resuspendió el pellet en 400 μ l de buffer TE con 3 μ g de RNAsa A. Se incubó 5 min a 37°C. Se agregó un volumen de cloroformo, se centrifugó a 10000 xg durante 5 min y se conservó la fase acuosa. Se precipitó el ADN agregando 1 ml de etanol 100% y 10 μ l de

acetato de amonio 4M. Se centrifugó, se lavó el pellet con etanol 70% y luego se resuspendió en 20 µl de agua Milli-Q. Para las reacciones de PCR se utilizó 1 µl de una dilución 1/5 de la preparación obtenida.

Reacciones de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó como templado ADN genómico aislado de *S. pombe*, plásmidos, y colonias de bacterias o levaduras (“*colony PCR*”). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo 0,2 mM de cada nucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgSO₄ 2 mM y 0.4 µM de cada oligonucleótido primer (Tabla 2). La polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Invitrogen) se utilizó para verificaciones de genotipo, mientras que la polimerasa KOD (Merck) con actividad correctora 5'→3' y 3'→5' se empleó para la generación de construcciones genéticas debido a su mayor fidelidad. El templado fue desnaturalizado a 95°C y se llevaron a cabo 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión. La temperatura de hibridación fue entre 50°C y 55°C según el caso; y la temperatura de extensión 70°C y 72°C para la KOD y Taq Polimerasa respectivamente. Luego de 30 ciclos se incubó por 10 min adicionales a 72°C y se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa 1% m/v en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8).

Identificación primer	Secuencia del oligonucleótido
pDONORs	5'-TTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
pDONORa	5'-CATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
pREP-fw	5'-AGGAAGAGGAATCCTGGC-3'
pREP-fw2 (alt)	5'-CCGGATAATGGACCTGTTAATCG-3'
pREP-rev	5'-TATGCAGCTTGAATGGGCTTC-3'
hEM-CD fw	5'-ATGCTGAGACCAAATACAGC-3'
hEM-CD rev	5'-AGAAACAGGCAGCTGGCGATC-3'
GFP fw-linker	5'-ggcggctcgggcggatccATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
PS Rev	5'-ggatccTGCAGCATTTACTG-3'
pREP3X- XhoI-fEGFP	5'TTCTCACTTTCTGACTTATAGTCGCTTTGTTAAATGGCctcga gATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
hEM-SmaI-pREP3X	5'AACCCTAGCAGTACTGGCAAGGGAGACATTCTTTTACCC GGGTTAAGAAACAGGCAGCTGGCG-3'
fEGFP-CR-REV	5'-CTCGTCCATGCCGAGAGTG-3'
hEM-mid-fw	5'-GCCCTCTCTTGGTACCCACCTG-3'
hEM-mid-rev	5'-CCTGAGGTGGTTAACAGATTGGC-3'

Tabla 2. Primers utilizados en las reacciones de PCR de este trabajo y su correspondiente secuencia.

Para realizar “*colony PCR*” de bacterias se resuspendió una colonia individual directamente en 25 µl de la mezcla de reacción de PCR y se realizó un paso de desnaturalización por 5 min a 95°C previo al protocolo de PCR explicitado anteriormente. Para

la realización de “colony PCR” de levaduras se incubó una colonia en 40 µl de NaOH 10 mM a 100°C durante 10 min y luego se introdujo en hielo por 1 min aproximadamente. Se utilizó 1.5 µl de la suspensión como templado de la reacción de PCR.

Otros procedimientos con ADN

Los cortes con enzimas de restricción, ligaciones, fosforilaciones y purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa fueron realizados como se describe en la referencia (Sambrook *et al.* 2001).

Plásmidos

El plásmido pDONR201-ER-GFP-VDEL (Figura 15A), fue utilizado para la clonación de la endomanosidasa humana (hEM) en *E. coli*. El vector pREP1-ccdB2 (Figura 15B) fue utilizado para la expresión de RE-hEM en levaduras. Los vectores pREPs utilizados están diseñados para la expresión en levaduras y poseen el marcador de selección LEU2 (permitiendo el crecimiento en medios sin leucina). Además, contienen el promotor *nmt* (no message in thiamine), el cual permite regular la expresión mediante la adición de tiamina (5-15 µM). El pREP3X (Figura 15C) fue utilizado para la expresión de G-hEM en levaduras. El plásmido pREP41 (Figura 15D) fue utilizado como control de transformación en varios de los ensayos realizados dado que es casi idéntico al pREP1 y pREP3X.

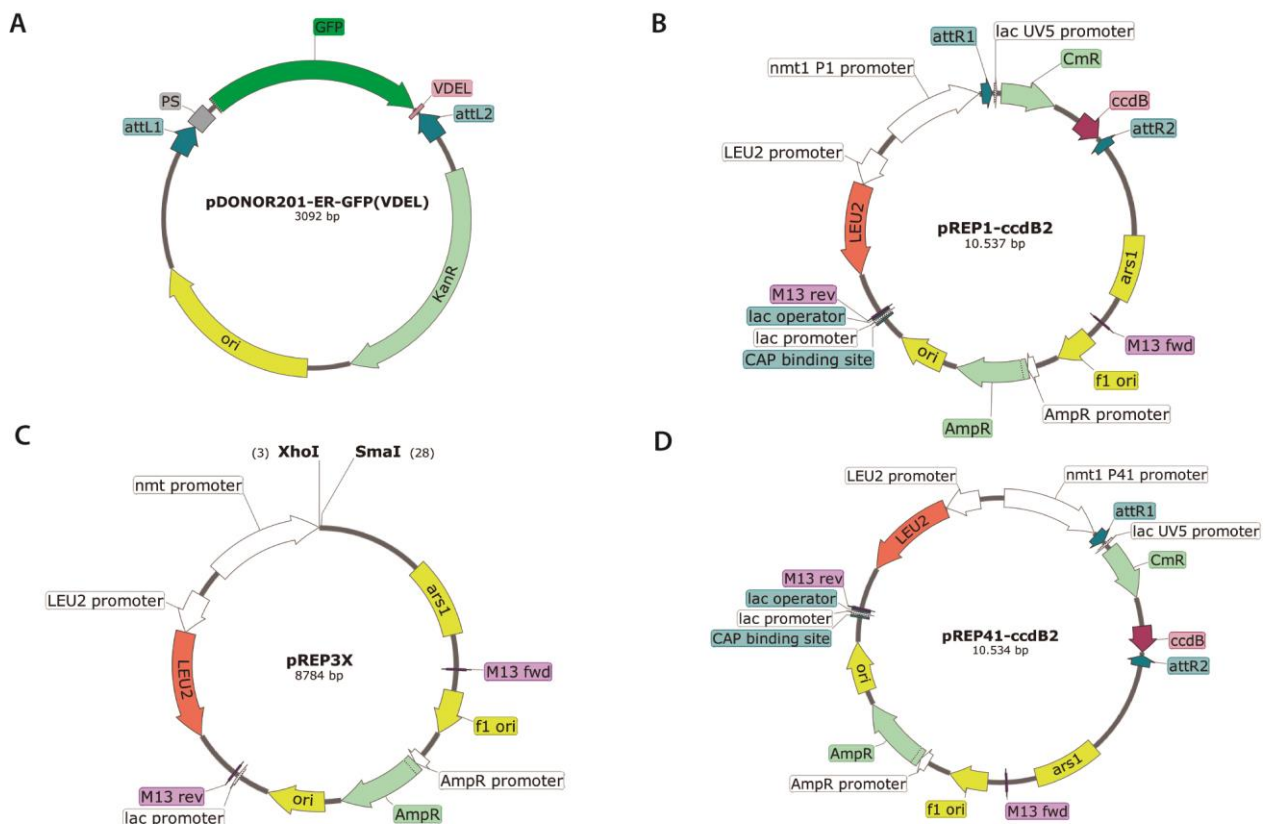


Figura 15. Mapa de los vectores plasmídicos utilizados en esta trabajo. A) pDONR201-ER-GFP, vector dador del sistema Gateway™ de expresión en bacterias. **(B) pREP1-ccdB2**, Vector destino del sistema Gateway™ de expresión en *S. pombe*. **(C) pREP3X**, de expresión en levaduras. **(D) pREP41-ccdB2**, de expresión en levaduras.

Clonado de la endomanosidasa humana (hEM) en *S. pombe*

A) Clonado y expresión de RE-hEM en el lumen del RE de *S. pombe*

El dominio catalítico de la endomanosidasa humana (hEM-CD: 82-1305 pb) (Figura 13) fue obtenido por PCR utilizando la Polimerasa KOD (Merck) a partir del plásmido pSV-GFP-hEM (Hardt *et al.* 2005), utilizando los primers hEM-CD fw y hEM-CD rev (Tabla 2). Se obtuvo un producto sin dominio transmembrana (TMD), para expresarla en forma soluble, y sin codón stop de terminación. Por otro lado se obtuvo el plásmido Gateway pDONR-ER-GFP-VDEL (Figura 15A) por PCR inversa utilizando Polimerasa KOD y los primers GFP fw-linker y PS Rev. Ambos productos de PCR fueron purificados por precipitación, el inserto tratado con la kinasa PNK (para adicionar fosfatos 5' que permitan su ligación) y el plásmido tratado con la nucleasa DpnI (para eliminar el templado bacteriano, metilado y por lo tanto sensible a la enzima). Se procedió a realizar la reacción de ligación *en blunt* entre el inserto y el plásmido utilizando la Ligasa DNA T4 (NEB), como indica el fabricante. La mezcla de ligación fue purificada por diálisis. Se transformaron cepas *E. coli* con la mezcla de ligación obtenida y posteriormente se plaquearon las transformantes en medio selectivo *LB+Kan*. La construcción resultante en el plásmido dador pDONR-RE-hEM (conteniendo un péptido señal seguido del dominio catalítico de la hEM fusionado a la GFP con la señal de retención VDEL) fue transferida al plásmido de destino de expresión en levaduras pREP1-*ccdB2* mediante el sistema de recombinación Invitrogen™ Gateway™ (Figura 16). El plásmido resultante pREP1-RE-hEM fue amplificado y recuperado en la cepa de *E. coli* JA226 (mediante selección positiva de Amp) y secuenciado. Luego se electroporaron células *S. pombe* Δ *gls1* competentes y fueron seleccionadas en medio mínimo por auxotrofia de leucina.

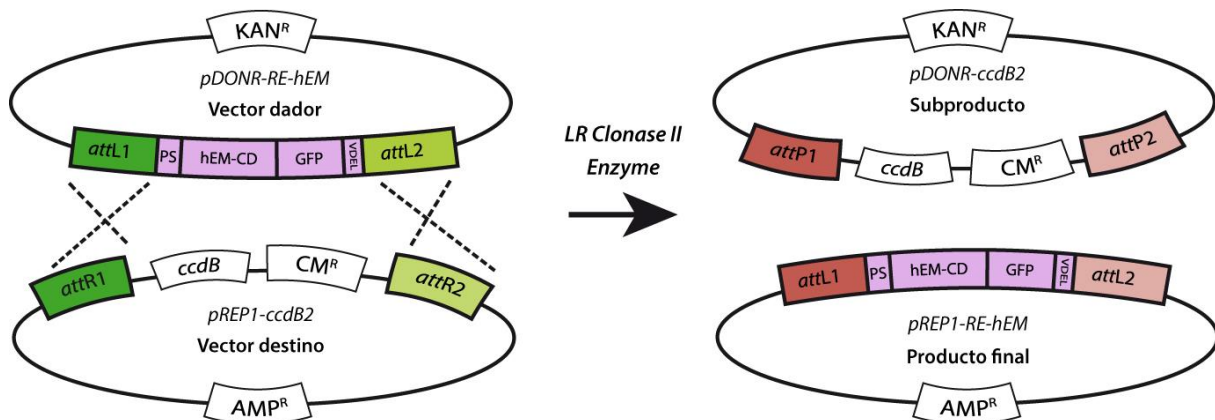


Figura 16. Esquema de la reacción de clonado de RE-hEM por sistema Gateway™. Se incubaron 50 ng del vector dador pDONR-ER-hEM-GFP-VDEL con 75 ng del vector destino pREP1-*ccdB2* en presencia de Buffer TE pH 8,0 y 1 μ l de "LR Clonase II Enzyme Mix". La reacción fue detenida con 0.5 μ l de Proteinasas K durante 10 min a 37°C. El kit comercial de enzimas cataliza la reacción de recombinación entre los sitios *attL* y *attR* en el cual el inserto (el vector dador) se transfiere al vector de destino. Figura adaptada de (Magnani *et al.* 2006).

B) Clonado y expresión de G-hEM en la membrana del aparato de Golgi de *S. pombe*

La endomanosidasa humana completa fusionada a GFP (GFP-hEM) fue obtenida por PCR utilizando la Polimerasa KOD (Merck) a partir del plásmido pSV-GFP-hEM (Hardt *et al.* 2005), utilizando los primers pREP3X-XhoI-fEGFP y hEM-SmaI-pREP3X; que introdujeron en el inserto 40 pb de homología con el vector de destino pREP3X. El vector pREP3X fue digerido con las enzimas de restricción *Sma I* y *Xho I* y luego tratado con la fosfatasa CIP (para evitar su religación). Tanto el inserto como el plásmido fueron luego purificados por precipitación.

Se prepararon células *S. pombe* ADm (*WT*) como se indica en (Hagan 2016) y se realizó una clonación *in vivo* mediante el método de “Gap Repair” transformando dichas células con 1 µg del plásmido pREP3X abierto y 5 µg del inserto GFP-hEM (Chino *et al.* 2010). Las recombinantes fueron seleccionadas en medio mínimo por auxotrofia de leucina y verificadas por PCR para confirmar la presencia del plásmido resultante pREP3X-GFP-hEM (G-hEM) producido por recombinación homóloga. Se realizó una extracción de ADN total de las células positivas y luego se transformaron bacterias *E. coli* para recuperar el plásmido y secuenciarlo. El mismo clon fue introducido luego en cepas *S. pombe* Δ *gls1* y Δ *gls2*.

Preparación de fracciones subcelulares enriquecidas en RE y Golgi (Microsomas)

La preparación de fracciones microsomales de *S. pombe* se realizó como se describe en (Stigliano *et al.* 2011). Brevemente, se cosecharon 250 ml de cultivo de *S. pombe* en fase exponencial ($OD_{600}=1-1.5$) por centrifugación a 3000 xg durante 5 min. Se lavó el pellet con 100 ml de NaN_3 5mM y se centrifugó por 5 minutos a 3000 xg. El pellet se resuspendió en 2 ml de Solución A (sacarosa 0.25M, imidazol 20mM, EDTA 5mM pH=8.0) en presencia de inhibidores de proteasas (Inh: fluoruro de fenilmetilsulfonilo {PMSF} 100 µM, L-1-tosilamida-2-feniletíl-clorometilcetona {TPCK} 10 µM, *N* α -*p*-tosil-L-lisina clorometil cetona {TLCK} 10 µM, leupeptina 10 µM, pepstatina 10 µM y E64 10 µM). Se adicionó un volumen de bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y se realizaron 10 ciclos de ruptura consistentes en 1 min de vórtex seguido de 1 min de incubación en hielo. El homogenato obtenido se centrifugó a 4000 xg durante 10 min a 4°C, se guardó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en Solución A + Inh y se repitieron los 10 ciclos de ruptura. Se centrifugó a 4000 xg durante 10 min a 4°C. Se juntaron ambos sobrenadantes y se ultracentrifugaron a 100000 xg por 1h a 4°C. El pellet resultante (fracción microsomal, conteniendo vesículas membranosas de RE y Golgi) fue resuspendido en 50 µl de Buffer de resuspensión (Buffer fosfato 100 mM pH 6.8, Sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM) con agregado de inhibidores de proteasas. Se utilizó un tip de punta ancha para preservar la integridad de las membranas. La determinación de la concentración proteica en las fracciones microsomales se realizó mediante el kit *Bio-Rad Protein Assay* como indica el fabricante. Alícuotas de microsomas fueron congeladas a -80°C hasta su utilización.

Ensayo de Actividad de Endomanosidasa

La actividad fue determinada en fracciones microsomales de *S. pombe*, utilizando [^{14}C]Glc₁Man₉GlcNAc ([^{14}C]G1M9) como sustrato radioactivo. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 50 μl , con 100 μg de proteínas totales de la fracción microsomal, 2000 cpm del sustrato radioactivo en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 6.8 y Tritón X-100 0.5% a 37°C durante 30 min (se realizó una pre-incubación de 5 min sin el sustrato para maximizar la acción del Tritón en la permeabilización de las membranas. Las reacciones fueron detenidas con 50 μl de etanol e incubadas a 65°C por 5 min. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 14000 xg (los glicanos quedan solubles en el sobrenadante). El disacárido hidrolizado fue separado del sustrato remanente por cromatografía ascendente en papel usando como solvente 2-propanol:ácido acético:agua (25:4:9) en papel Whatman 1 de 2.5 x 12 cm. Durante la corrida, el disacárido hidrolizado ([^{14}C]Glc-Man) asciende por el papel, el sustrato no procesado ([^{14}C]G1M9) y el producto M8 permanecen en la línea de siembra. La radioactividad en el papel fue medida utilizando un contador de centelleo líquido y Tolueno PPO-POPOP. La actividad de la endomanosidasa se determinó como el porcentaje de [^{14}C]Glc-Man liberado con respecto al total (el total corresponde al conteo radioactivo en el origen más el conteo radioactivo de [^{14}C]Glc-Man que migró). Para realizar un control de corrida, se eluyeron los picos de radioactividad obtenidos de los papeles de cromatografía en agua bidestilada y se evaporaron para concentrar la muestra. Dicha muestra fue analizada nuevamente en cromatografía en papel en paralelo con estándares de Glucosa y Maltosa con solvente 1-butanol/etanol/agua (10:1:2). La distancia recorrida por los estándares no radioactivos fue revelada mediante una reacción de NO_3Ag 1% m/v en acetona y NaOH 0.5 M en etanol 96%, mientras que el disacárido radioactivo ([^{14}C]Glc-Man) fue analizado como se especificó previamente.

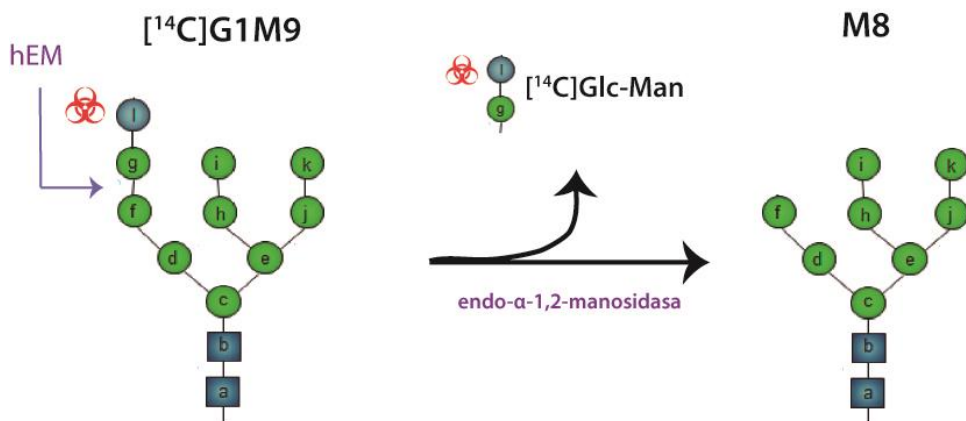


Figura 17. Hidrólisis del sustrato [^{14}C]G1M9 por la endomanosidasa. El sustrato radioactivo [^{14}C]G1M9 es hidrolizado por la EM en el enlace Man(g)-(f)Man del brazo A, liberando el disacárido radioactivo [^{14}C]Glc-Man y M8. Los productos de reacción pueden ser separados por cromatografía ascendente en papel.

Ensayos de crecimiento en medio sólido

Cultivos líquidos de levaduras fueron crecidos hasta fase estacionaria (sin dejarlos envejecer demasiado tiempo) y diluidos a $OD_{600}=1$. A partir de allí se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron 5 μ l de cada dilución en placas de MM o MMG y se incubaron a 28°C durante el tiempo necesario. Se tomaron imágenes de las placas cada 24 hs. con cámara de fotos Olympus C-610 durante los subsiguientes días.

Microscopía de fluorescencia confocal

A partir de cultivos líquidos crecidos en MM o MMG hasta $OD_{600}=1-1.5$, se colectaron 200 μ l de células en fase exponencial, se centrifugaron (3000 xg, 1 min), se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μ l de YEA. Se montaron 4 μ l del cultivo para su posterior observación en el microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se fotografiaron campos de células al azar utilizando un objetivo 63x Zeiss Plan-Apochromat (NA 1.4). Mediante el software Fiji, se separaron las imágenes en sus canales fluorescentes constitutivos, se umbralizaron y mediante el plugin *coloc 2* se calculó el PCC.

Tinción con FM4-64

Para la marcación de la vía endocítica de *S. pombe*, se tomaron 20 μ l de cultivo en fase exponencial, se centrifugaron y resuspendieron en 20 μ l de YEA. Dicha alícuota se incubó con 0.1 mg/ml de FM4-64 a 28°C por 30 min. Las células fueron montadas para su observación al microscopio confocal y las imágenes fueron adquiridas como se describió anteriormente.

Resultados

Los organismos eucariotas inferiores, como la levadura de fisión *S. pombe*, carecen del gen de la endomanosidasa. El objetivo de este trabajo es expresar la hEM en el RE (RE-hEM) y el aparato de Golgi (G-hEM) de las levaduras mutantes *S. pombe* $\Delta gls1$ de forma exógena para evaluar si dicha/s expresión/es son capaces de revertir el fenotipo enfermo. Nuestra hipótesis de trabajo establece que la acumulación de proteínas con glicanos del tipo G3M9 es nociva para la supervivencia de la célula, lo que podría explicar los defectos encontrados en pacientes CDG-IIb. Por otro lado, se desconoce la localización subcelular de dicha acumulación. Si esta hipótesis es correcta la expresión de la hEM en RE y/o Golgi debería revertir los defectos observados en las mutantes $\Delta gls1$. Por un lado, se describirá brevemente la construcción de las proteínas de fusión RE-hEM y G-hEM. Por otro lado, se comprobará la funcionalidad de dichas construcciones mediante ensayos de actividad de la endomanosidasa. Luego, se comprobará la localización de ambas construcciones mediante microscopía confocal (ambas tienen adicionado la proteína GFP). Por último, se analizará el impacto de la expresión de RE-hEM y G-hEM sobre el fenotipo de la mutante $\Delta gls1$ mediante un ensayo de crecimiento.

Expresión de hEM con destino a RE o Golgi en *S. pombe*

En un primer paso, se realizó el clonado de la endomanosidasa humana (hEM) en vectores de expresión de *S. pombe*. Se realizaron dos construcciones de hEM, una con destino a RE (RE-hEM) y otra con destino a Golgi (G-hEM), ambas fusionadas a GFP para su visualización por microscopía confocal.

La endomanosidasa presenta una cola citosólica (1-8 aa) y un dominio transmembrana (TMD: 9-27 aa) responsable de la localización de la proteína en la membrana del aparato de Golgi (Figura 18A). Estudios previos han comprobado que este dominio N-terminal (cola citosólica + TMD), es esencial para la localización de la enzima y que al ser deletados la misma se deslocaliza (Stehli *et al.* 2008). Por otro lado, se ha comprobado que el dominio luminal (hEM-CD₂₈₋₄₆₂) puede ser expresado de forma soluble independientemente del dominio N-terminal y es catalíticamente activo (Hamilton *et al.* 2005). El DNA de la endomanosidasa fue solicitado al Dr. Christof Völker, del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, en la Universidad de Bonn, Alemania. Su grupo de trabajo había previamente publicado un trabajo en el que comprobaban la funcionalidad y la correcta localización de la proteína de fusión GFP-hEM en el aparato de Golgi de células COS 1 (Hardt *et al.* 2005). Esta evidencia previa nos indicó que era factible adicionarle una GFP en su extremo N-terminal sin alterar su plegamiento, localización ni actividad.

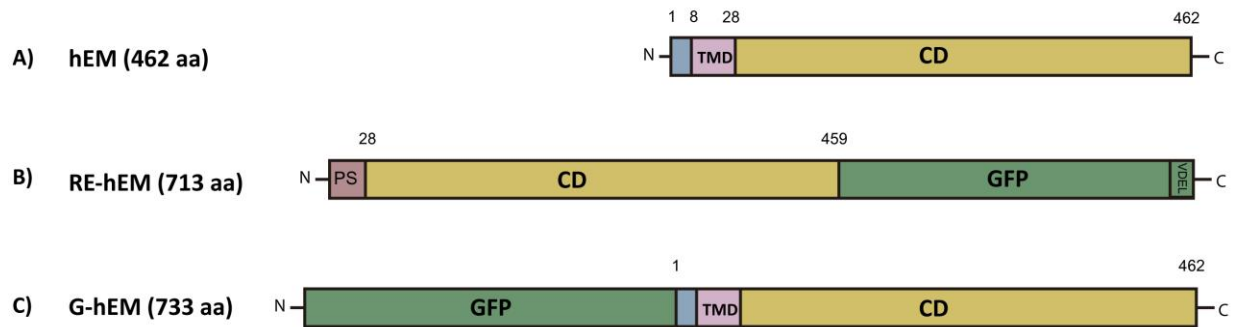


Figura 18. Esquema representativo de las construcciones realizadas para la expresión de hEM en *S. pombe*. (A) hEM, endomanosidasa humana, contiene una cola citosólica (1-8 aa) y un dominio transmembrana (TMD: 9-27 aa) en su N-terminal, el dominio catalítico (CD: 28-462 aa) mira hacia el lumen del aparato de Golgi. (B) RE-hEM; proteína de fusión con destino a RE, contiene un péptido señal (PS), el dominio catalítico de la endomanosidasa (hEM-CD) y una GFP con señal de retención en RE (VDEL) en el C-terminal. (C) G-hEM; proteína de fusión destinada a Golgi, contiene una GFP en el N-terminal seguida de la secuencia completa de la hEM en el C-terminal. Las secuencias de las GFPs utilizadas en estas construcciones difieren levemente entre sí; la secuencia GFP en RE-hEM proviene de (Losfeld *et al.* 2012) mientras que la de G-hEM proviene de (Hardt *et al.* 2005). Construcciones detalladas en Materiales y Métodos.

Para la construcción de RE-hEM, se obtuvo únicamente el dominio catalítico (hEM-CD₂₈₋₄₅₉) de la hEM a partir del DNA (vector plasmídico pSV-GFP-hEM) brindado por el Dr. Völker (Hardt *et al.* 2005). Este fragmento se clonó en el vector dador de la reacción Gateway™ pDONR-PS-GFP-VDEL entre PS y GFP mediante enzimas de restricción y se obtuvo el vector PDONR-PS-hEM-GFP-VDEL (pDONR-RE-hEM). Mediante el sistema de recombinación Gateway™ se transfirió el fragmento de fusión desde el vector dador a un vector destino de expresión en *S. pombe*, dando como producto final el plásmido pREP1-PS-hEM-GFP-VDEL (pREP-RE-hEM) (Figura 16). El mismo presenta un péptido señal (PS), para dirigir la proteína al RE, el dominio catalítico de la endomanosidasa (hEM-CD₂₈₋₄₅₉) seguido de GFP y en el C-terminal la señal de retención en RE (VDEL). De esta manera se pudo construir una endomanosidasa soluble de expresión en el lumen del RE (RE-hEM) (Figura 18B).

Por otro lado, se procedió en la construcción de una endomanosidasa destinada a Golgi (G-hEM). Se obtuvo mediante una reacción de PCR el DNA completo de GFP-hEM (vector plasmídico pSV-GFP-hEM brindado por el Dr. Völker), y se clonó por recombinación homóloga *in vivo* en un vector de expresión de levaduras. Se obtuvo el producto resultante pREP3X-GFP-hEM, el cual expresa una proteína de fusión con la GFP N-terminal y endomanosidasa humana completa en el C-terminal de localización en la membrana del aparato de Golgi (G-hEM) (Figura 18C).

Medición de actividad de la Endomanosidasa: RE-hEM y G-hEM son funcionales

Una vez comprobada la correcta secuencia de las proteínas de fusión mediante secuenciación de los vectores, se procedió a verificar la expresión y actividad de las mismas. En trabajos previos se habían realizado ensayos de actividad de la endomanosidasa por lo que se procedió a adaptar dichos protocolos a nuestro organismo de trabajo (Lubas *et al.* 1988, Karaivanova *et al.* 1998, Hamilton *et al.* 2005, Hardt *et al.* 2005, Kukushkin *et al.* 2012).

Para poder realizar el ensayo enzimático es necesario expresar ambas variantes de hEM en *S. pombe* y recuperar la enzima a partir de extractos microsomales. Los microsomas son vesículas heterogéneas de 20 a 200 nm diámetro formados a partir del RE y Golgi, y pueden ser concentrados y separados por centrifugación diferencial del resto del debris celular. Luego, dichos extractos son incubados con un glicano radioactivo sensible a la endomanosidasa. Como se ha mencionado, la hEM tiene actividad en *N*-glicanos mono, di y triglicosilados con cierta preferencia por los glicanos monoglucosilados (G1M9) (Figura 12). En el laboratorio se contaba con disponibilidad del compuesto radioactivo [¹⁴C]G1M9, un sustrato adecuado para este fin. Habiendo dicho esto, lo ideal hubiera sido medir la actividad catalítica de las construcciones con microsomas provenientes de nuestra cepa de interés $\Delta gls1$ expresando las variantes RE-hEM y G-hEM con el sustrato radioactivo pero, las cepas $\Delta gls1$ expresan activamente GII, enzima que puede cortar el sustrato [¹⁴C]G1M9. Esto puede interferir con el resultado ya que es dificultoso discernir entre el monosacárido liberado por la GII, [¹⁴C]Glc, y el disacárido liberado por la hEM, [¹⁴C]Glc-Man (Figura 3). Por estas razones, se decidió expresar RE-hEM y G-hEM en la cepa $\Delta gls2$ y utilizar esta cepa para determinar si nuestras construcciones eran activas. De esta manera pudo obtenerse un extracto enzimático sin GII, para que el sustrato [¹⁴C]G1M9 solo sea procesado por la EM. Asumimos que los resultados de actividad de las construcciones son invariables entre las cepas $\Delta gls1$ y $\Delta gls2$.

Retomando con el ensayo de actividad, se obtuvieron fracciones microsomales de levaduras carentes de GII ($\Delta gls2$), expresando RE-hEM o G-hEM. Se partió de cultivos líquidos en fase exponencial y mediante sucesivas centrifugaciones y lavados en frío, utilizando inhibidores de proteasas, se logró obtener fracciones enriquecidas en microsomas. Luego de medir la concentración proteica total en dichas alícuotas por el método de Bradford, se procedió a realizar el ensayo de actividad endomanosidasa. Se realizó una reacción enzimática *in vitro* utilizando 2000 cpm de sustrato [¹⁴C]G1M9 y 100 μ g de proteínas microsomales durante 30 min a 37°C. La mezcla de reacción en su totalidad fue sembrada en papel y resuelta por cromatografía ascendente. De haber actividad endomanosidasa, el sustrato [¹⁴C]G1M9 será procesado a M8 liberando [¹⁴C]Glc-Man; el M8 quedará en la línea de siembra junto con el sustrato [¹⁴C]G1M9 no procesado, mientras que el disacárido [¹⁴C]Glc-Man migrará hacia arriba.

Es importante destacar que el sustrato utilizado está marcado radioactivamente con [¹⁴C] en la última Glc del brazo A (Figura 19A). Por este motivo, mientras el sustrato permanezca en su forma original, todo el compuesto [¹⁴C]G1M9 presentará radioactividad. Una vez que haya sido procesado por la EM, el producto de reacción [¹⁴C]Glc-Man será el que posea radioactividad, mientras que el otro producto M8 no podrá leerse por centelleo y permanecerá en la línea de siembra. El sustrato [¹⁴C]G1M9 que no haya sido hidrolizado

también permanecerá en la línea de siembra y poseerá radioactividad. Es por esto que todo producto radioactivo que muestre algún tipo de migración ascendente en el papel de cromatografía puede leerse como actividad de parte de la endomanosidasa. Luego de finalizada la corrida los papeles se retiran del solvente, se dejan secar y se cuenta la radioactividad cada 1 cm (ver Materiales y Métodos).

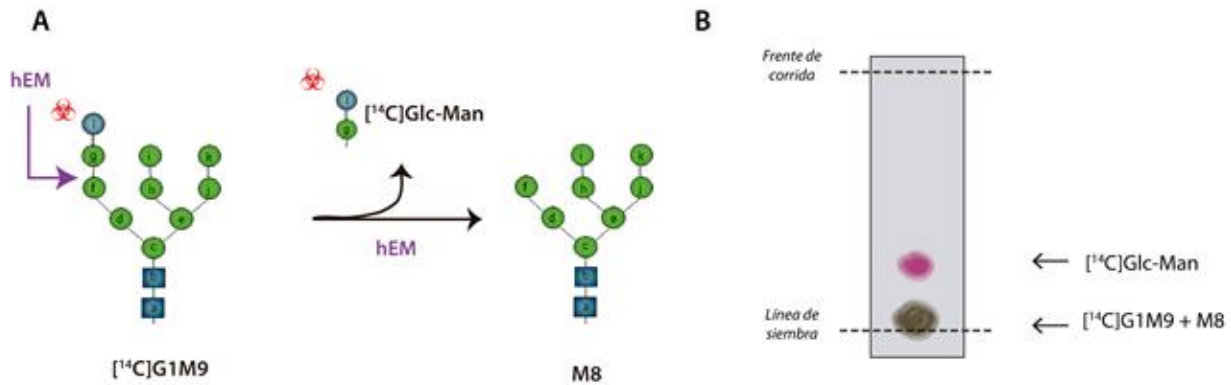


Figura 19. (A) Esquema de la reacción de la endomanosidasa (EM). La EM corta el sustrato $[^{14}\text{C}]\text{G1M9}$ en el enlace $\text{Man}(g)\text{-}(f)\text{Man}$ para liberar $[^{14}\text{C}]\text{Glc-Man}$ y M8. **(B) Representación esquemática de la cromatografía ascendente en papel y la distancia recorrida por los compuestos.** El disacárido $[^{14}\text{C}]\text{Glc-Man}$ es separado de los demás compuestos. El sustrato $[^{14}\text{C}]\text{G1M9}$ y el producto M8, permanecen en la línea de siembra. Se utilizó un papel Whatman-1 de 12 cm y solvente 2-propanol/acético/ H_2O (24:4:9).

Como puede observarse en los resultados de la Figura 20A y 20B, las muestras control presentan un pico de radioactividad en la línea de siembra y luego la misma decae rápidamente a valores casi nulos. Por el contrario, las muestras testeadas de los clones de RE-hEM y G-hEM, presentan un pico en la línea de siembra y otro nuevo pico a los 3 cm del origen. Los ensayos con la cepa control no evidenciaron ningún tipo de procesamiento del sustrato ni liberación del disacárido por lo que podemos asegurar que no hay actividad endomanosidasa en dicha cepa, lo que concuerda con la ausencia reportada de la EM en el genoma de *S. pombe*. Por el contrario, todos los clones $\Delta\text{gls2}+\text{RE-hEM}$ y $\Delta\text{gls2}+\text{G-hEM}$ testeados presentaron corte del sustrato y por lo tanto actividad positiva de las endomanosidasas construidas.

Si bien existen muchas formas de calcular la actividad de una enzima, en este caso se calculó el % de Actividad, es decir la proporción de sustrato hidrolizado por 100 μg de proteínas microsomales totales en un lapso de 30 min a 37°C (y demás condiciones de reacción) (Figura 20C). Puede observarse que todos los clones con expresión de endomanosidasa, ya sea RE-hEM o G-hEM, presentaron una actividad considerablemente mayor respecto del control. Todos las alícuotas microsomales lograron hidrolizar aproximadamente el 50% del sustrato brindado. Las diferencias entre los distintos clones pueden deberse a varias razones, ya sea por errores en la cuantificación proteica total en los extractos microsomales (Método de Bradford) o a una variación en la proporción de la endomanosidasa dentro de las proteínas microsomales totales; aun así la variación sigue siendo mínima.

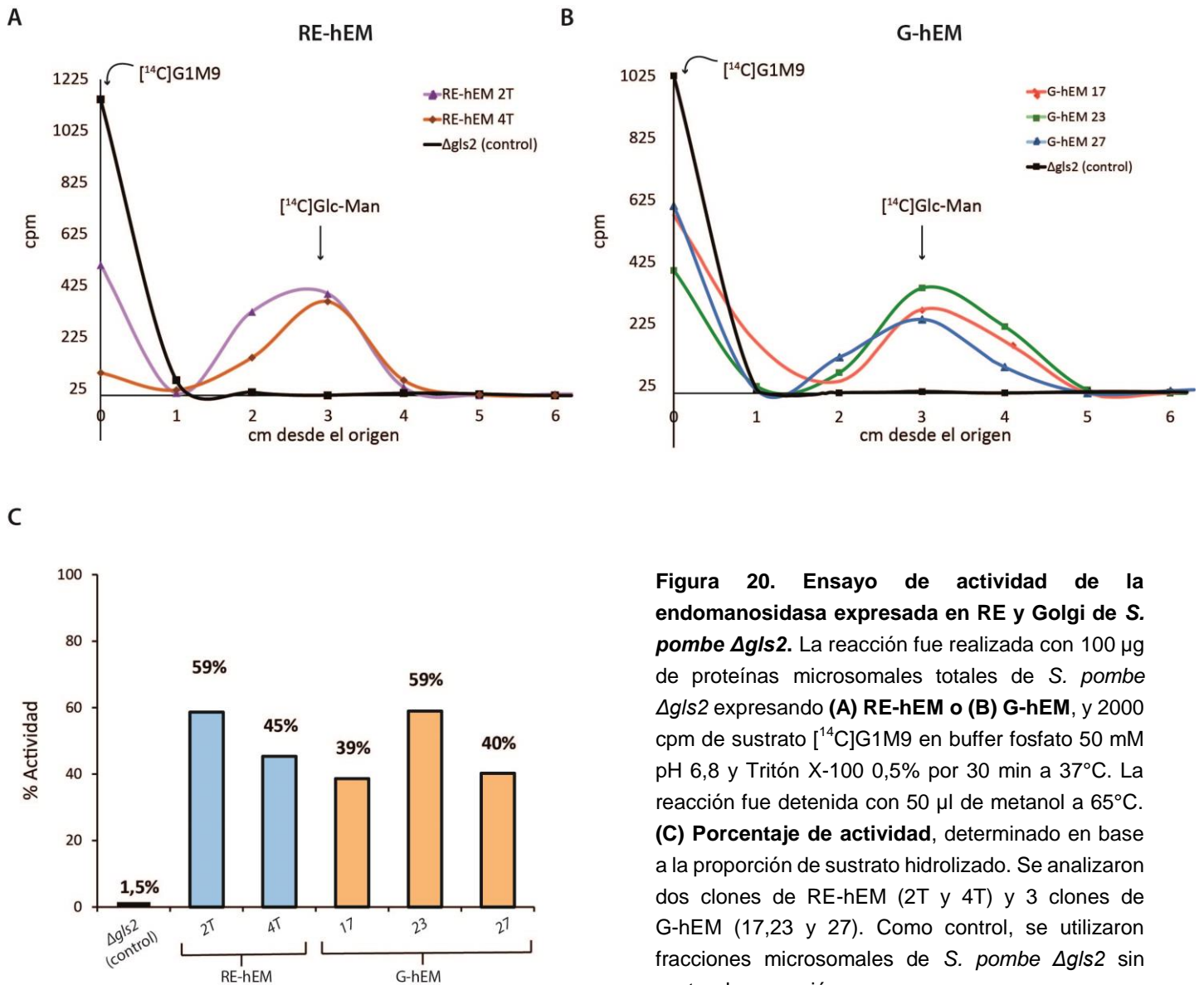


Figura 20. Ensayo de actividad de la endomanosidasa expresada en RE y Golgi de *S. pombe* Δgls2. La reacción fue realizada con 100 μg de proteínas microsomales totales de *S. pombe* Δgls2 expresando (A) RE-hEM o (B) G-hEM, y 2000 cpm de sustrato [14C]G1M9 en buffer fosfato 50 mM pH 6,8 y Tritón X-100 0,5% por 30 min a 37°C. La reacción fue detenida con 50 μl de metanol a 65°C. (C) **Porcentaje de actividad**, determinado en base a la proporción de sustrato hidrolizado. Se analizaron dos clones de RE-hEM (2T y 4T) y 3 clones de G-hEM (17,23 y 27). Como control, se utilizaron fracciones microsomales de *S. pombe* Δgls2 sin vector de expresión.

Para verificar que el compuesto obtenido en la reacción corresponda verdaderamente al disacárido [14C]Glc-Man y no a un monosacárido, los picos de la reacción enzimática mostrados en la Figura 20A y 20B fueron eluidos y analizados por cromatografía en papel junto con compuestos estándar, glucosa y maltosa, un monosacárido y disacárido respectivamente (Figura 21). Puede observarse que el compuesto radioactivo que se obtuvo en el ensayo anterior recorre la misma distancia que el disacárido maltosa, ambos con un Rf de 0.03. La glucosa, al ser un monosacárido, es el compuesto que más distancia recorre con un Rf de 0.12. La maltosa y [14C]Glc-Man, ambos disacáridos, migran una menor distancia. Esto nos permite aseverar que el compuesto liberado por la endomanosidasa es efectivamente el producto esperado.

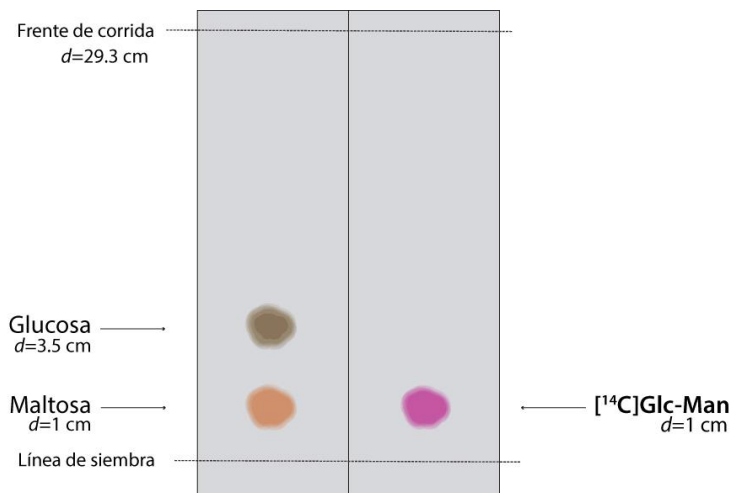


Figura 21. Representación esquemática de la cromatografía ascendente en papel y la distancia recorrida por los compuestos. Control de corrida de [^{14}C]Glc-Man con compuestos estándares. Se sembró en el mismo papel el compuesto obtenido en la reacción enzimática ([^{14}C]Glc-Man) junto con estándares de Glucosa y Maltosa. Se utilizó un papel Whatman-1 de 12 cm y solvente 2-propanol/acético/ H_2O (24:4:9). *Nota:* la figura es un esquema representativo. Se indican las distancias migradas. R_f Glc=0.12; R_f Maltosa=0.03; R_f compuesto hidrolizado por EM=0.03.

Localización por microscopia de fluorescencia de RE-hEM en el retículo endoplásmico

Una vez que se comprobó que todos los clones de *S. pombe* expresando RE-hEM o G-hEM presentaban actividad catalítica, se procedió a verificar la localización de dichas proteínas de fusión. Primeramente, se obtuvieron imágenes de fluorescencia por microscopia confocal de las cepas $\Delta gls2$ y $\Delta gls1$, expresando la construcción RE-hEM. La cepa $\Delta gls2$, carente de la GII, fue previamente caracterizada en el laboratorio y presenta un fenotipo muy similar al *WT*, de morfología y crecimiento normal. En este caso, la cepa $\Delta gls2$ representa una herramienta útil para poder comparar y contrastar los fenotipos entre las dos cepas.

En la Figura 22B, se observa que la cepa $\Delta gls2$ tiene una morfología normal y presenta una forma típica de bacilo, similar a una cepa de *S. pombe WT*. Por el contrario y como se detalla en la tesis doctoral de la Dra. Gallo, la cepa $\Delta gls1$ tiene una morfología redondeada y con tendencia a la agregación entre las células, como también se ha indicado en la Figura 10 (Gallo *et al.* 2018). Si bien pareciera que las células $\Delta gls1$ en proceso de división adquieren forma de bacilo, luego vuelven a su forma redondeada.

A diferencia de otros organismos eucariotas donde el RE se localiza exclusivamente alrededor de la envoltura nuclear, en levaduras, el RE forma una estructura continua alrededor del núcleo (RE perinuclear) y por debajo de la membrana plasmática (RE cortical) (Figura 22A) (Zhang *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2012). Como puede verse en las imágenes, tanto la cepa $\Delta gls1$ como $\Delta gls2$ presentan un patrón de fluorescencia típico de RE, por lo que podemos afirmar que la endomanosidasa destinada a RE (RE-hEM) se localiza efectivamente en dicho compartimento (Figura 22B). Además, la cepa $\Delta gls2$ pareciera presentar cierto patrón punteado, que podría atribuirse a una localización en Golgi. Esto podría ser causado por una sobreexpresión de RE-hEM, y que fuera tal la carga de proteína que cierta fracción de ella se fuera al Golgi, a lisosoma u otros compartimentos de la vía secretoria.

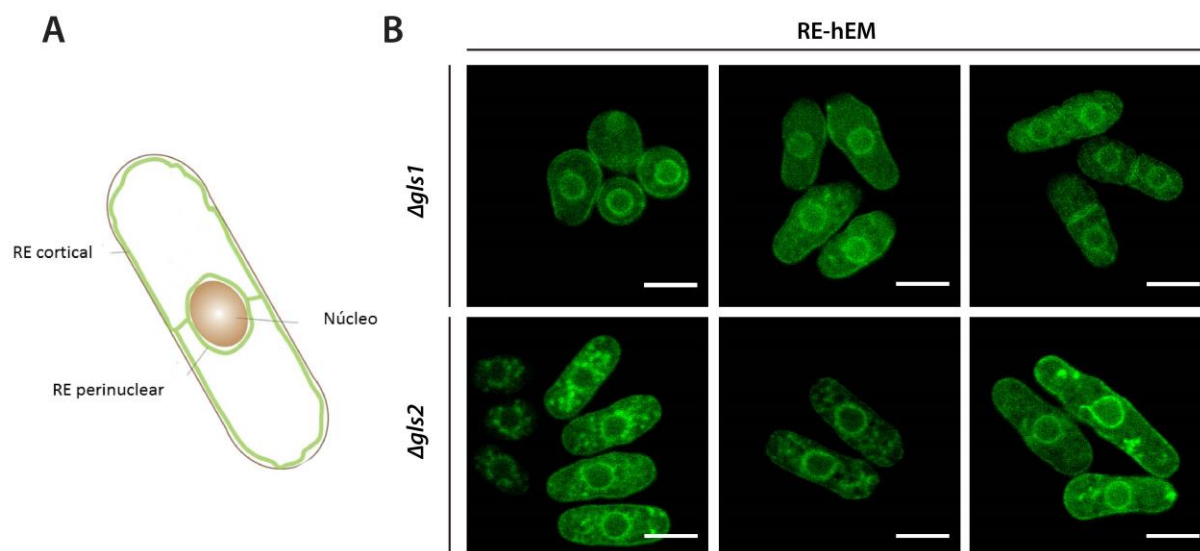


Figura 22. La proteína de fusión RE-hEM muestra una distribución típica de RE en *S. pombe*. (A) Esquema representativo de la estructura del RE en *S. pombe*. El RE perinuclear se distribuye alrededor del núcleo de la célula y el RE cortical bordea la pared celular, ambos conectados entre sí (imagen tomada y adaptada de Nakayama et al. 2014). (B) Imágenes de fluorescencia de las cepas indicadas expresando RE-hEM. Células $\Delta gls1$ y $\Delta gls2$ expresando RE-hEM fueron crecidas entre 2-8 días en medio mínimo líquido sin leucina. Se muestran tres campos representativos de una misma cepa. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Canal verde: GFP. Barra de escala: 5 μm .

G-hEM muestra una localización típica del aparato de Golgi

En levaduras, al igual que en mamíferos, el Golgi existe como un sistema de cisternas, el *cis*, *medial* y *trans Golgi* y el Trans-Golgi-Network (TGN). Los compartimentos del *trans Golgi*, el TGN y los EEs (early endosomes) pasan por una maduración progresiva y continuos eventos de fusión y fisión que producen límites difusos y poco definidos entre sí. Además, las vías de tráfico entre estas organelas son complejas y se encuentran interconectadas. Debido a estas razones, suele ser difícil determinar con precisión la localización de una proteína y los patrones de localización suelen contrastarse con marcadores o tintes específicos de las organelas en cuestión (Hoya et al. 2017).

En este caso, al no contar con un marcador específico de Golgi, se utilizó el colorante FM4-64, el cual ha sido utilizado extensamente como marcador de la vía endocítica (Vida et al. 1995, Takegawa et al. 2003). El FM4-64 es un tinte lipofílico que entra a la célula a través de la vía endocítica, tiñe selectivamente las membranas de los compartimentos vacuolares y endosomales con fluorescencia roja (excitación/emisión máxima ~515/640nm), donde se acumula. Se cree que por vía retrógrada, el marcador puede moverse desde la vía endocítica hasta el TGN y el *trans Golgi* inclusive (Ma et al. 2009). En este caso, la tinción de la vía secretoria tardía con FM4-64 (vacuolas, endosomas, TGN y *trans Golgi* inclusive) permite diferenciar por contratinción el patrón de localización de G-hEM. De esta manera, podemos establecer con mayor confianza la localización de dicha proteína en los compartimentos tempranos del aparato de Golgi (*cis*, *medial*).

Como puede verse en las imágenes confocales (Figura 23), las cepas $\Delta gls1$ y $\Delta gls2$ expresando la proteína de fusión G-hEM presentan un patrón de fluorescencia típico del

aparato de Golgi. La proteína de fusión muestra un patrón punteado estrellado que se distribuye a lo largo de todo el citoplasma (Suda *et al.* 2012, Hoya *et al.* 2017). En el caso del tinte FM4-64, se observa una tinción selectiva de membranas de estructuras redondeadas que muy posiblemente correspondan a los compartimentos vacuolares. A simple vista se ven amplias diferencias entre el patrón de fluorescencia de G-hEM y FM4-64. El coeficiente de correlación de Pearson (PCC), también llamado Pearson R's, cuantifica el grado de colocalización de las señales de fluorescencia; valores cercanos a cero indican no colocalización, mientras que valores cercanos a 1 indican colocalización total. En este caso se obtuvieron valores cercanos a cero para las dos imágenes analizadas, lo que demuestra que la señal de G-hEM difiere ampliamente de la señal proveniente del FM4-64. Esto nos permite afirmar que la endomanosidasa destinada al aparato de Golgi (G-hEM) muy posiblemente se localice allí. Estos resultados son congruentes con la localización reportada por microscopía electrónica para la EM, con presencia de la enzima minoritariamente en intermediarios de pre-Golgi (15%) y mayoritariamente en el *cis* y *medial* Golgi (84%), sin marcación del RE, del *trans* Golgi ni del TGN (Zuber *et al.* 2000).

Llamativamente, las células observadas de la cepa $\Delta gls1$ no mostraron una morfología redondeada, como es común en esta cepa mutante, sino alargada y más parecida a la forma de bacilo que presentan la cepa *WT* y $\Delta gls2$. Esto podría representar un indicio de que la proteína de fusión G-hEM expresada podría estar revirtiendo el fenotipo aberrante y cumpliendo alguna función en el procesamiento de *N*-glicanos, como se esperaba (Figura 23).

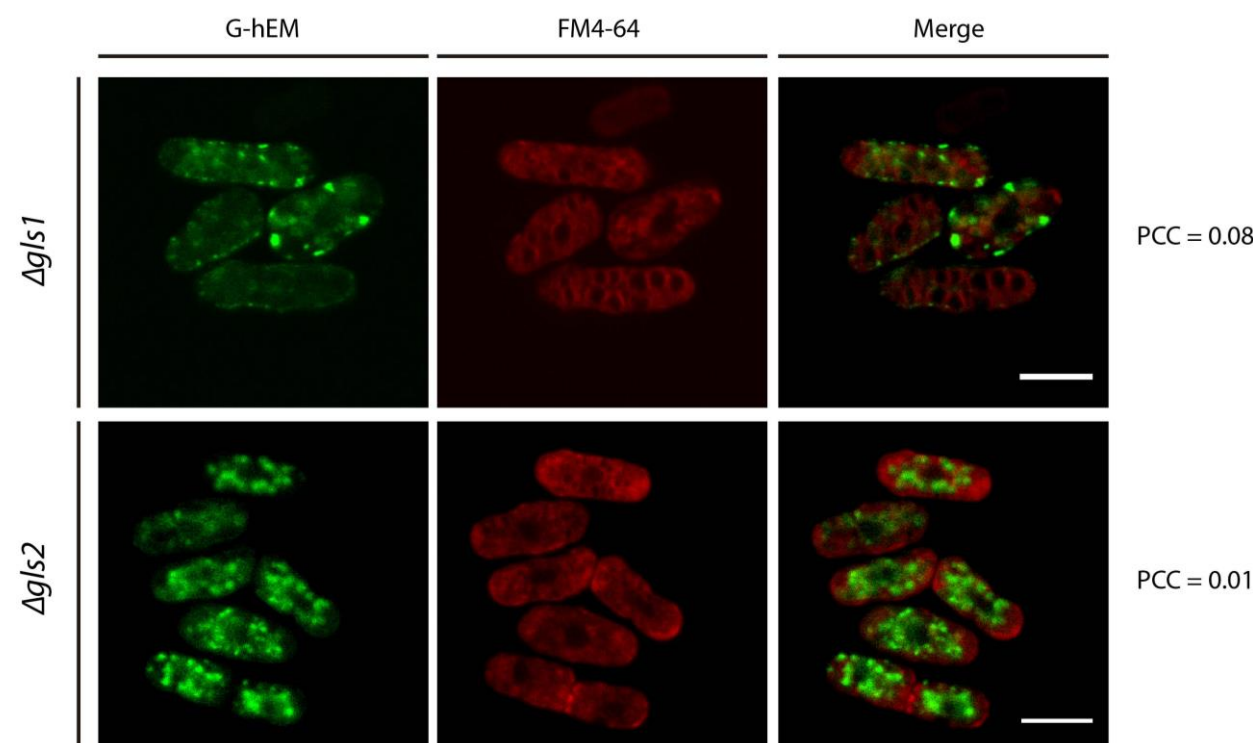


Figura 23. G-hEM muestra una distribución típica de Golgi y es excluida de los compartimentos endocíticos y vacuolares. Imágenes de microscopía confocal de las cepas $\Delta gls1$ y $\Delta gls2$ expresando G-hEM. Las células fueron incubadas con el colorante FM4-64 para teñir las membranas vacuolares de la vía endocítica. Barra de escala: 5 μ m. PCC: Pearson's correlation coefficient.

En definitiva, podemos afirmar que las respectivas construcciones de la endomanosidasa se localizan en las organelas esperadas; RE-hEM presenta una localización en RE y G-hEM se localiza en el aparato de Golgi.

La proteína de fusión G-hEM rescata parcialmente el fenotipo aberrante de las mutantes *S. pombe* carentes de GI.

Luego de comprobar la correcta localización y la funcionalidad de las proteínas de fusión, se prosiguió a comprobar si la expresión de la endomanosidasa de RE (RE-hEM) o de Golgi (G-hEM), podía rescatar el fenotipo aberrante de la mutante *S. pombe* $\Delta gls1$.

Las células fueron crecidas en medio mínimo por 4 días aproximadamente dependiendo de la cepa, hasta fase estacionaria. Luego, fueron llevadas a $OD_{600}=0.1$ y a partir de allí se realizaron diluciones seriadas al décimo que fueron plaqueadas en medio mínimo. Las placas fueron incubadas por 5 días aproximadamente a 28°C y se tomaron fotografías a distintos tiempos, para poder evaluar el crecimiento de las células.

Como se ve en los resultados del ensayo (Figura 24), la cepa $\Delta gls1$ transformada con un vector control ($\Delta gls1 + \text{vector}$) tiene un fenotipo de crecimiento lento, como era de esperar para esta mutante (Figura 10). Por otro lado, la cepa $\Delta gls1 + gls1^{+}$ complementada con la enzima GI salvaje, muestra niveles de crecimiento normales. Al expresar la endomanosidasa de Golgi (G-hEM), se observa una importante mejora en los niveles de crecimiento de la mutante. Si bien la expresión de G-hEM mejora visiblemente el fenotipo de crecimiento de la mutante, no alcanza los mismos niveles de crecimiento que la cepa complementada con GI ($\Delta gls1 + gls1^{+}$). En primera instancia y a grandes rasgos, estos resultados parecerían coincidir con las observaciones realizadas en pacientes CDG-IIb en los cuales la inducción de la endomanosidasa alivia parcialmente la carencia de GI (Volker *et al.* 2002).

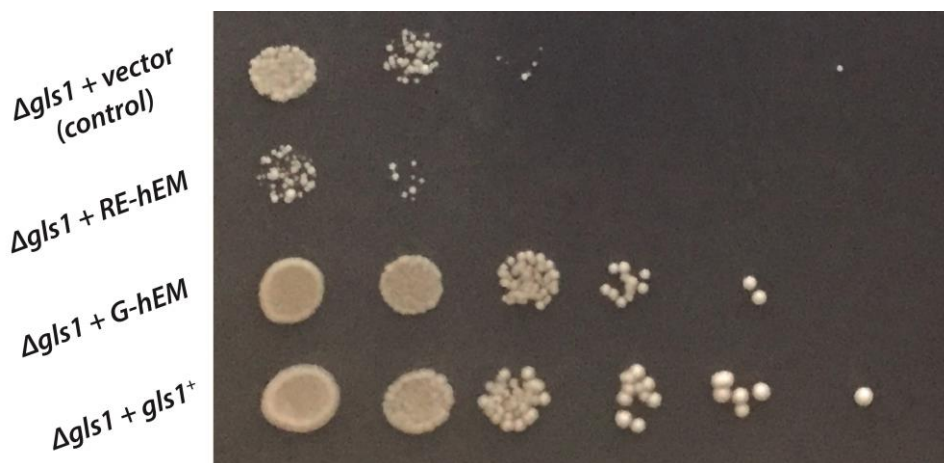


Figura 24. Fenotipo de crecimiento de las distintas cepas $\Delta gls1$. Las cepas indicadas fueron crecidas en medio líquido hasta $OD_{600}=2$ (fase estacionaria), luego diluidas hasta $OD_{600}=1$ y plaqueadas en diluciones seriadas al décimo, empezando con una $OD_{600}=0.1$. Dichas diluciones fueron plaqueadas ($5 \mu\text{l}$) en MMG e incubadas 5 días a 28°C .

Por otro lado, puede verse que la cepa $\Delta gls1$ expresando la endomanosidasa de RE ($\Delta gls1+RE-hEM$) tiene un fenotipo visiblemente alterado y de bajo crecimiento, incluso peor que el crecimiento de la cepa $\Delta gls1$ (control). Esto estaría evidenciando que, no solo la expresión de RE-hEM no mejora el fenotipo de las $\Delta gls1$ sino que tiene un efecto negativo sobre las células y por algún motivo su expresión resulta tóxica para el microorganismo.

Desde el comienzo de los ensayos, la cepa $\Delta gls1+RE-hEM$ resultó ser particularmente difícil de manipular, con serios problemas de crecimiento, tanto en medio líquido como en medio sólido. Estos inconvenientes fueron un indicio temprano de una posible toxicidad de dicha proteína para las células. Para la realización del ensayo de la Figura 24, se intentó crecer repetidas veces la cepa $\Delta gls1+RE-hEM$ en medio líquido con resultados fallidos. Finalmente se decidió crecer la cepa en medio suplementado con tiamina, para inhibir la expresión de RE-hEM. Como se ve en el mapa de los plásmidos utilizados (Figura 16), la EM se encuentra bajo control del promotor *nmt* (no message in thiamine), por lo que se puede bloquear su expresión con el agregado de tiamina. Al cultivar la cepa en un medio suplementado con tiamina, se pudo obtener un cultivo en fase estacionaria (saturación) con el volumen de células adecuado para realizar los ensayos. Luego se realizaron sucesivos repiques de este cultivo a un medio libre de tiamina durante 3 días, para eliminar el efecto del represor y reactivar la expresión de RE-hEM. Estos pasos permitieron obtener el volumen de células adecuado para realizar los ensayos de crecimiento con expresión activa de RE-hEM. Aunque no se muestra en este trabajo, la expresión de RE-hEM también resultó ser tóxica para otras cepas de *S. pombe*.

Las mutaciones extremadamente deletéreas con un impacto severo en el fenotipo de la levadura tienden a ser revertidas por mutaciones espontáneas. En este caso, la cepa $\Delta gls1$ tiene una tendencia a generar mutaciones espontáneas que revierten el fenotipo aberrante y mejoran su crecimiento. Esto se analizó en detalle en una de las publicaciones del laboratorio, donde se verificó una mutación espontánea en la vía de síntesis de *N*-glicanos de la cepa $\Delta gls1$. Dicha mutación eludía la necesidad de GI, generando una cepa con fenotipo de crecimiento más normal a la cual se llamó $\Delta gls1-H$ (*healthy*). Para corroborar que los resultados observados en la figura anterior se deban al efecto de G-hEM, y no a una reversión espontánea de la cepa, se realizó otro ensayo de crecimiento para observar el comportamiento de las transformantes $\Delta gls1$ a nivel poblacional. De esta manera, se puede observar el crecimiento de un mayor número de colonias transformantes (Figura 25).

Se prepararon levaduras electrocompetentes a partir de un mismo cultivo y se utilizó el mismo *batch* para las tres transformaciones realizadas. De esta manera podemos estar seguros que el estado metabólico y genético de las levaduras utilizadas para las diferentes transformaciones sea el mismo. Se transformaron dichas levaduras con los tres plásmidos correspondientes, vector control, RE-hEM y G-hEM. Las colonias transformantes que aparecieron fueron repicadas inmediatamente en las placas que se observan en la Figura 25; la misma colonia fue repicada en medio MMG y MMG+tiamina para poder hacer una comparación entre ambos (cada estría representa un evento individual de transformación).

Los resultados indican inequívocamente que la cepa $\Delta gls1+G-hEM$ presenta un mayor crecimiento que la cepa $\Delta gls1+vector$ (control). El mismo patrón de crecimiento puede

observarse en cada una de las colonias repicadas, lo que respalda los resultados obtenidos en la Figura 24. Estos resultados además confirman la necesidad de expresión de G-hEM para que el crecimiento mejore. Por otro lado, la cepa $\Delta gls1$ +RE-hEM muestra un crecimiento extremadamente lento con estrías apenas visibles en ausencia de represor, haciendo evidente la toxicidad de la RE-hEM. Al inhibir la expresión de RE-hEM, las colonias alcanzan mayores niveles de crecimiento y se observan estrías de mayor tamaño. La actividad endomanosidasa podría estar interfiriendo en varios procesos y vías metabólicas que ocurren en el RE, dado que no fue seleccionada naturalmente para residir allí. Una explicación posible, como se discutirá más adelante, es que la RE-hEM clive el Dol-PP-glicano que es sintetizado en la cara luminal del RE, interfiriendo con la transferencia a las proteínas por la OST.

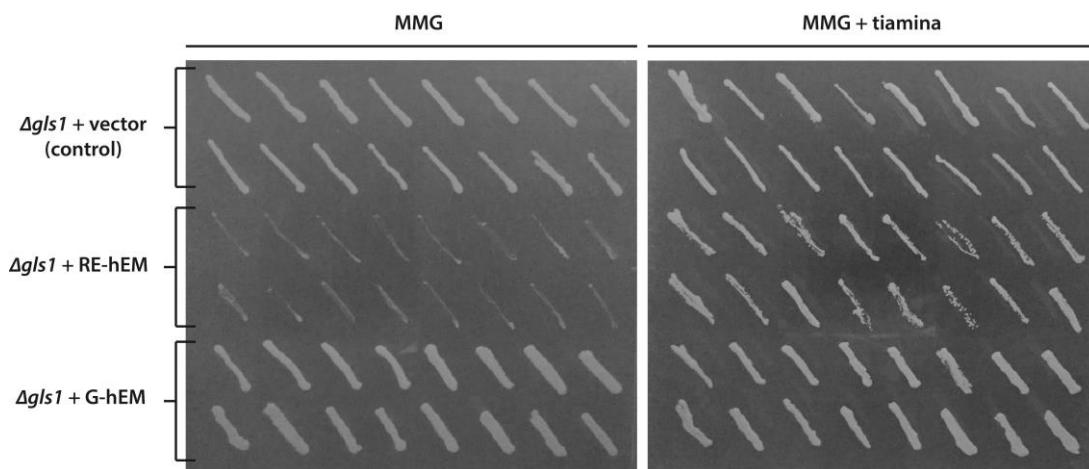


Figura 25. Fenotipo de crecimiento de las cepas $\Delta gls1$ transformadas con RE-hEM o G-hEM. Levaduras $\Delta gls1$ fueron transformadas con los plásmidos indicados y plaqueadas en MMG. Las colonias transformantes que aparecieron fueron inmediatamente repicadas en MMG y MMG+tiamina e incubadas por 4 días a 28°C. Cada estría corresponde a un evento de transformación independiente.

En conjunto, estos resultados demuestran efectivamente que la endomanosidasa de Golgi (G-hEM) es capaz de mejorar visiblemente el fenotipo de crecimiento de la mutante $\Delta gls1$ y confirman que la expresión de la endomanosidasa de RE (RE-hEM) resulta tóxica para el microorganismo.

Hemos logrado expresar la endomanosidasa humana tanto en el RE (RE-hEM) como en el aparato de Golgi (G-hEM) de *S. pombe*, hemos comprobado la correcta localización en dichas organelas y hemos comprobado que ambas construcciones son catalíticamente activas. Según resultados obtenidos en este laboratorio, las mutantes *S. pombe* $\Delta gls1$, carentes de Gl, presentan una acumulación de *N*-glicoproteínas triglicosiladas (G3M9), una morfología aberrante y un crecimiento extremadamente lento. La hipótesis planteada en este trabajo establece que la acumulación de especies G3M9 resulta nociva para la célula y afecta el crecimiento del *S. pombe*, fenotipo que puede ser revertido por la hEM.

Discusión y Conclusiones

En este trabajo hemos intentando profundizar en el conocimiento de la enfermedad congénita de glicosilación CDG-IIb y las bases moleculares que la definen. Esta enfermedad causada por la deficiencia de glucosidasa I (GI) provoca graves consecuencias sobre el organismo y los pacientes fallecen a los pocos meses de vida. Al igual que muchos otros tipos de CDGs, la CDG-IIb aún no es comprendida en su totalidad. Si bien se conocen muchos detalles sobre la función y la importancia de la GI en el proceso de *N*-glicosilación, aún se desconocen los alcances de su deficiencia y qué procesos desencadenan tan graves patologías en los pacientes.

En el laboratorio se ha utilizado como modelo de estudio de la CDG-IIb, la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* carente de GI ($\Delta gls1$). Al analizar esta cepa, se pudo constatar un fenotipo muy diferente al de una cepa *S. pombe WT*, con una morfología redondeada, en vez de la forma típica de bacilo, y un crecimiento extremadamente lento, con parámetros de vitalidad y viabilidad comprometidos.

La principal característica que se observa en células deficientes de GI es la acumulación del sustrato de dicha enzima, es decir, la acumulación de *N*-glicoproteínas triglucosiladas G3M9. Esto pudo constatare en varios organismos modelo deficientes de GI como en células CHO Lec23, en pacientes CDG-IIb, en *C. elegans* y también en nuestra cepa mutante *S. pombe* $\Delta gls1$ (Ray *et al.* 1991, Volker *et al.* 2002, Katoh *et al.* 2013, Gallo *et al.* 2018). Tal acumulación también puede observarse al inhibir farmacológicamente las glucosidasas de RE (GI y GII), provocando un resultado similar al que se produce por ausencia total de la enzima (Durrant *et al.* 2002, Mellor *et al.* 2004). Si bien es evidente que la deficiencia de GI provoca una acumulación de especies G3M9 en las células, todavía no se ha podido establecer una relación entre este hecho y las consecuencias que se observan en el organismo de los pacientes CDG-IIb. Nuestra principal hipótesis radica en que la persistencia de estructuras G3M9 en las glicoproteínas es de por sí tóxica y perjudicial para las células, al interferir y perjudicar algún proceso celular del organismo.

En un principio, en el laboratorio se planteó que el bloqueo en el procesamiento de *N*-glicanos en el RE y la acumulación de *N*-glicoproteínas con glicanos del tipo G3M9 podría estar interfiriendo con alguna de las vías involucradas en la biosíntesis de glicoproteínas. Por un lado, se hipotetizó que el bloqueo en el estadio G3M9 imposibilitaría la entrada de las glicoproteínas al ciclo de control de calidad de plegamiento del RE (QC) al no poder ser procesadas hasta G1M9, glicano reconocido por CNX. Por este motivo se construyó una levadura mutante *S. pombe* carente de la subunidad catalítica de GII ($\Delta gls2$), y que por lo tanto acumulan proteínas diglucosiladas (con G2M9) y se observó que las mismas presentaban un crecimiento normal, similar al de una cepa *WT*. Esto indicaría que si bien las glicoproteínas tampoco entrarían al ciclo de QC del RE, al igual que sucede con la cepa $\Delta gls1$, las células $\Delta gls2$ no se verían afectadas por este hecho.

Por otro lado, se pensó que la presencia de las tres glucosas (Glc) en los *N*-glicoproteínas no permitiría que las mismas sean procesadas por el sistema de degradación

asociado al RE (ERAD). Al construir la mutante *S. pombe* $\Delta yos9$, deficiente en la vía de ERAD, se observó que dicha cepa también presentaba un fenotipo de crecimiento normal, y nuevamente esta hipótesis no podría explicar las deficiencias observadas en la cepa $\Delta gls1$ (Gallo et al. 2018).

La endomanosidasa de Golgi (EM), funciona como una vía de deglucosilación alternativa en humanos, independiente de las glucosidasas de RE, y se encuentra ausente en levaduras. Con el objetivo de comprobar fehacientemente que la presencia de G3M9 en las glicoproteínas resulta perjudicial para el organismo, se expresó la endomanosidasa humana (hEM) en la cepa mutante $\Delta gls1$. Nuestra hipótesis, establece que la acumulación de glicoproteínas triglucosiladas (G3M9) es en parte responsable del fenotipo observado en las mutantes $\Delta gls1$ y por lo tanto, la expresión de la EM debería revertir este fenotipo. De esta manera, la actividad catalítica de dicha enzima debería eliminar la acumulación de especies G3M9 al procesarlas a M8 y permitir que las glicoproteínas sigan su maduración por la vía secretoria. Estudios en pacientes CDG-IIb han revelado que los mismos presentan una inducción de la EM, y sorprendentemente presentan un perfil de *N*-glicosilación “casi normal” o más normal de lo que se esperaría para una deficiencia en GI. Gracias a la EM de Golgi los pacientes logran procesar una gran parte de las *N*-glicoproteínas hacia estructuras maduras en un 80% de los casos. Igualmente, persiste cierta presencia de especies G3M9 en las glicoproteínas de la vía secretoria (16% del total de *N*-glicanos) (Volker et al. 2002).

Con el objetivo de expresar la hEM en la levadura de fisión se realizaron dos versiones de la misma, una con destino a RE (RE-hEM) y otra con destino a Golgi (G-hEM). Al medir la actividad enzimática de la EM ambas construcciones resultaron ser funcionales. Si bien existía la posibilidad de afectar la estructura y actividad de la proteína al fusionarla con GFP al N-terminal (G-hEM) o C-terminal (RE-hEM), este no fue el caso. El análisis de la localización de la proteína de fusión por microscopía de fluorescencia también arrojó resultados satisfactorios, y RE-hEM mostró un patrón de fluorescencia típico de RE mientras que G-hEM un patrón típico de Golgi.

Para poder analizar el efecto de la hEM en las mutantes $\Delta gls1$, se analizó el fenotipo de crecimiento. La expresión de G-hEM resultó tener efectos positivos sobre el crecimiento de la mutante $\Delta gls1$. Por el contrario, la expresión de RE-hEM resultó ser extremadamente tóxica para la célula empeorando aún más el fenotipo de crecimiento ya afectado de la cepa control ($\Delta gls1$). Luego de observar los resultados tóxicos de la RE-hEM sobre la cepa $\Delta gls1$ y realizar una búsqueda bibliográfica se encontró que la EM también posee actividad sobre glicanos unidos a lípidos (Spiro et al. 2000). Esto quiere decir que el Dol-PP-glicano que es sintetizado en la cara luminal del RE podría estar procesado por la RE-hEM. Como se vio anteriormente, la OST transfiere preferentemente glicanos de estructura completa (G3M9). El *trimming* del Dol-PP-G3M9 por la RE-hEM podría estar disminuyendo la eficiencia de transferencia del glicano a las proteínas, o incluso bloqueando la reacción de *N*-glicosilación por completo. Esto podría explicar el fenotipo tan aberrante y de bajo crecimiento observado en las cepas

$\Delta gls1+RE-hEM$, lo cual impide definir si existe un efecto tóxico por la acumulación de *N*-glicoproteínas G3M9 en el RE.

Se pueden encontrar algunas características en común entre nuestros resultados y ciertas observaciones hechas en pacientes CDG-IIb. Si bien se cree que la EM cumple un rol sumamente importante en el procesamiento de *N*-glicanos y logra suplir en gran medida la deficiencia de GI, los pacientes igualmente presentan patologías severas, anormalidades clínicas y tienen un desenlace fatal. Por otro lado, como ya se ha mencionado, si bien los pacientes CDG-IIb logran procesar la mayoría de los *N*-glicanos correctamente (80%), aún persiste un 16% de ellos con estructura G3M9 en la vía secretoria (Volker *et al.* 2002). Esta persistencia de *N*-glicanos G3M9 podría ser una de las causas que contribuyan a las patologías observadas de los pacientes. La incapacidad de la endomanosidasa de Golgi para procesar dichas glicoproteínas podría deberse a muchos factores: la capacidad procesadora de la EM podría ser insuficiente para procesar todo los glicanos que pasen por el aparato de Golgi, dichas proteínas podrían quedar retenidas en el RE y no ser alcanzables por la EM de Golgi (restricción espacial), o las mismas podrían no ser reconocidas como sustrato por algún motivo. En nuestros resultados, si bien la G-hEM logra aliviar el fenotipo de crecimiento lento, no logra equiparar los niveles de crecimiento de una levadura *WT*, indicando que aún persisten ciertas anormalidades dentro de la célula. Esto podría indicar que la GI cumple algún tipo de función que la EM no es capaz de suplir ya sea por su diferente localización o actividad catalítica.

Algunos trabajos han reportado que las células no dispondrían de mecanismos eficientes para deshacerse de las *N*-glicoproteínas G3M9 acumuladas. El mecanismo de degradación de *N*-glicoproteínas asociado al RE (ERAD), es un proceso esencial para la eliminación de proteínas aberrantes y mal plegadas producidas en el lumen del RE y se encuentra muy relacionado con el proceso de control de calidad (QC). Según el modelo establecido de ERAD, las *N*-glicoproteínas mal plegadas del tipo M6-9 son translocadas al citoplasma donde una PNGasa citosólica corta la glicoproteína, separando el glicano, ahora llamado FOS (*Free Oligosaccharide*) de la proteína. Mientras que la proteína es dirigida al proteasoma, los FOS son dirigidos al lisosoma para su degradación. Los FOS son translocados del citosol al lisosoma por transportadores específicos que reconocen estructuras del tipo M5 (FOS pequeños). Diferentes trabajos han establecido que la eficiencia de estos transportadores es inversamente proporcional al tamaño del FOS (Durrant *et al.* 2002, Alonzi *et al.* 2008). De esta manera, los FOS de estructuras más grandes como G3M9, se acumularían en el citosol y podrían resultar deletéreos para la célula. Esta acumulación de *N*-glicoproteínas G3M9 en el RE junto con la acumulación de G3M9-FOS en el citoplasma y su incapacidad para ser degradados podría contribuir al fenotipo observado en los modelos deficientes de GI.

En conclusión, la expresión de la endomanosidasa de Golgi (G-hEM) efectivamente alivió el fenotipo enfermo de la cepa mutante $\Delta gls1$, mejorando visiblemente su crecimiento. Esto respalda nuestra hipótesis de que la acumulación de especies G3M9 en la vía secretoria es nociva para la célula ya que pudo ser suprimida en gran parte por la expresión de hEM, que al procesar los *N*-glicanos a M8, permite que continúen su maduración. Esto además apoyaría el rol de la EM como mecanismo alternativo de deglucosilación y respaldaría la importancia del rol que cumple en pacientes CDG-IIb. La ausencia de la EM en invertebrados, levaduras, varios protozoos y plantas superiores, sugiere que la necesidad de un mecanismo de deglucosilación alternativo nació paralelamente con la aparición de oligosacáridos complejos en animales superiores (Dairaku *et al.* 1997). Efectivamente, tanto nuestros resultados como la bibliografía reportada, indican que este mecanismo “back-up” es sumamente beneficioso para la célula, dada la importancia de tener un vía de deglucosilación activa y funcional. Sin embargo, dicho mecanismo no es suficiente para evitar la patología CDG-IIb y nuestros resultados indicarían que la falta de GI podría tener algún efecto adicional en las células, aún no determinado.

Bibliografía

Abu Bakar, N., D. J. Lefeber and M. van Scherpenzeel (2018). "Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation." *J Inherit Metab Dis* **41**(3): 499-513.

Aebi, M. (2013). "N-linked protein glycosylation in the ER." *Biochim Biophys Acta* **1833**(11): 2430-2437.

Alonzi, D. S., D. C. Neville, R. H. Lachmann, R. A. Dwek and T. D. Butters (2008). "Glycosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition." *Biochem J* **409**(2): 571-580.

Apweiler, R., H. Hermjakob and N. Sharon (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." *Biochim Biophys Acta* **1473**(1): 4-8.

Bause, E. and M. Burbach (1996). "Purification and enzymatic properties of endo-alpha 1, 2-mannosidase from pig liver involved in oligosaccharide processing." *Biol Chem* **377**(10): 639-646.

Cali, T., O. Vanoni and M. Molinari (2008). "The endoplasmic reticulum crossroads for newly synthesized polypeptide chains." *Prog Mol Biol Transl Sci* **83**: 135-179.

Chino, A., K. Watanabe and H. Moriya (2010). "Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *PLoS One* **5**(3): e9652.

D'Alessio, C., J. J. Caramelo and A. J. Parodi (2010). "UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control." *Semin Cell Dev Biol* **21**(5): 491-499.

D'Alessio, C., F. Fernandez, E. S. Trombetta and A. J. Parodi (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**(36): 25899-25905.

Dairaku, K. and R. G. Spiro (1997). "Phylogenetic survey of endomannosidase indicates late evolutionary appearance of this N-linked oligosaccharide processing enzyme." *Glycobiology* **7**(4): 579-586.

De Praeter, C. M., G. J. Gerwig, E. Bause, L. K. Nuytinck, J. F. Vliegenthart, W. Breuer, J. P. Kamerling, M. F. Espeel, J. J. Martin, A. M. De Paepe, N. W. Chan, G. A. Dacremont and R. N. Van Coster (2000). "A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency." *Am J Hum Genet* **66**(6): 1744-1756.

Durrant, C. and S. E. Moore (2002). "Perturbation of free oligosaccharide trafficking in endoplasmic reticulum glucosidase I-deficient and castanospermine-treated cells." *Biochem J* **365**(Pt 1): 239-247.

Faridmoayer, A. and C. H. Scaman (2007). "Truncations and functional carboxylic acid residues of yeast processing alpha-glucosidase I." *Glycoconj J* **24**(8): 429-437.

Freeze, H. H., H. Schachter and T. Kinoshita (2015). Genetic Disorders of Glycosylation. *Essentials of Glycobiology*. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 569-582.

Fujimoto, K. and R. Kornfeld (1991). "alpha-Glucosidase II-deficient cells use endo alpha-mannosidase as a bypass route for N-linked oligosaccharide processing." *J Biol Chem* **266**(6): 3571-3578.

Gallo, G. L., A. Valko, S. I. Aramburu, E. Etcheagaray, C. Volker, A. J. Parodi and C. D'Alessio (2018). "Abrogation of glucosidase I-mediated glycoprotein deglycosylation results in a sick phenotype in fission yeasts: Model for the human MOGS-CDG disorder." *J Biol Chem* **293**(52): 19957-19973.

Hagan, I. M. C., A. M.; Grallert, A.; Nurse. P. (2016). *Fission Yeast. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hamilton, S. R., H. Li, H. Wischnewski, A. Prasad, J. S. Kerley-Hamilton, T. Mitchell, A. J. Walling, R. C. Davidson, S. Wildt and T. U. Gerngross (2005). "Intact {alpha}-1,2-endomannosidase is a typical type II

membrane protein." *Glycobiology* **15**(6): 615-624.

Hardt, B., C. Volker, S. Mundt, M. Salska-Navarro, M. Hauptmann and E. Bause (2005). "Human endo-alpha1,2-mannosidase is a Golgi-resident type II membrane protein." *Biochimie* **87**(2): 169-179.

Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049.

Hiraizumi, S., U. Spohr and R. G. Spiro (1993). "Characterization of endomannosidase inhibitors and evaluation of their effect on N-linked oligosaccharide processing during glycoprotein biosynthesis." *J Biol Chem* **268**(13): 9927-9935.

Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." *Gene* **57**(2-3): 267-272.

Hoya, M., F. Yanguas, S. Moro, C. Prescianotto-Baschong, C. Doncel, N. de Leon, M. A. Curto, A. Spang and M. H. Valdivieso (2017). "Traffic Through the Trans-Golgi Network and the Endosomal System Requires Collaboration Between Exomer and Clathrin Adaptors in Fission Yeast." *Genetics* **205**(2): 673-690.

Jaeken, J. and R. Peanne (2017). "What is new in CDG?" *J Inherit Metab Dis* **40**(4): 569-586.

Karaivanova, V. K., P. Luan and R. G. Spiro (1998). "Processing of viral envelope glycoprotein by the endomannosidase pathway: evaluation of host cell specificity." *Glycobiology* **8**(7): 725-730.

Katoh, T., J. Takase, Y. Tani, R. Amamoto, N. Aoshima, M. Tiemeyer, K. Yamamoto and H. Ashida (2013). "Deficiency of alpha-glucosidase I alters glycoprotein glycosylation and lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Glycobiology* **23**(10): 1142-1151.

Kelleher, D. J. and R. Gilmore (2006). "An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase." *Glycobiology* **16**(4): 47R-62R.

Kim, D. U., J. Hayles, D. Kim, V. Wood, H. O. Park, M. Won, H. S. Yoo, T. Duhig, M. Nam, G. Palmer, S. Han, L. Jeffery, S. T. Baek, H. Lee, Y. S. Shim, M. Lee, L. Kim, K. S. Heo, E. J. Noh, A. R. Lee, Y. J. Jang, K. S. Chung, S. J. Choi, J. Y. Park, Y. Park, H. M. Kim, S. K. Park, H. J. Park, E. J. Kang, H. B. Kim, H. S. Kang, H. M. Park, K. Kim, K. Song, K. B. Song, P. Nurse and K. L. Hoe (2010). "Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Nat Biotechnol* **28**(6): 617-623.

Kim, Y. M., G. H. Seo, E. Jung, J. H. Jang, S. Z. Kim and B. H. Lee (2018). "Characteristic dysmorphic features in congenital disorders of glycosylation type IIb." *J Hum Genet* **63**(3): 383-386.

Kukushkin, N. V., I. S. Easthope, D. S. Alonzi and T. D. Butters (2012). "Restricted processing of glycans by endomannosidase in mammalian cells." *Glycobiology* **22**(10): 1282-1288.

Li, M., Y. Xu, Y. Wang, X. A. Yang and D. Jin (2019). "Compound heterozygous variants in MOGS inducing congenital disorders of glycosylation (CDG) IIb." *J Hum Genet* **64**(3): 265-268.

Losfeld, M. E., F. Soncin, B. G. Ng, I. Singec and H. H. Freeze (2012). "A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy." *FASEB J* **26**(10): 4210-4217.

Lubas, W. A. and R. G. Spiro (1987). "Golgi endo-alpha-D-mannosidase from rat liver, a novel N-linked carbohydrate unit processing enzyme." *J Biol Chem* **262**(8): 3775-3781.

Lubas, W. A. and R. G. Spiro (1988). "Evaluation of the role of rat liver Golgi endo-alpha-D-mannosidase in processing N-linked oligosaccharides." *J Biol Chem* **263**(8): 3990-3998.

Ma, Y., M. Takeuchi, R. Sugiura, S. O. Sio and T. Kuno (2009). "Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast." *Genes Cells* **14**(8): 1015-1028.

Magnani, E., L. Bartling and S. Hake (2006). "From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event." BMC Mol Biol **7**: 46.

Mellor, H. R., D. C. Neville, D. J. Harvey, F. M. Platt, R. A. Dwek and T. D. Butters (2004). "Cellular effects of deoxynojirimycin analogues: inhibition of N-linked oligosaccharide processing and generation of free glucosylated oligosaccharides." Biochem J **381**(Pt 3): 867-875.

Moore, S. E. and R. G. Spiro (1990). "Demonstration that Golgi endo-alpha-D-mannosidase provides a glucosidase-independent pathway for the formation of complex N-linked oligosaccharides of glycoproteins." J Biol Chem **265**(22): 13104-13112.

Ng, B. G. and H. H. Freeze (2018). "Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders." Trends Genet **34**(6): 466-476.

Parodi, A., R. D. Cummings and M. Aebi (2015). Glycans in Glycoprotein Quality Control. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 503-511.

Pfeffer, S., J. Dudek, M. Gogala, S. Schorr, J. Linxweiler, S. Lang, T. Becker, R. Beckmann, R. Zimmermann and F. Forster (2014). "Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon." Nat Commun **5**: 3072.

Ray, M. K., J. Yang, S. Sundaram and P. Stanley (1991). "A novel glycosylation phenotype expressed by Lec23, a Chinese hamster ovary mutant deficient in alpha-glucosidase I." J Biol Chem **266**(34): 22818-22825.

Roth, J. and C. Zuber (2017). "Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9." Histochem Cell Biol **147**(2): 269-284.

Sadat, M. A., S. Moir, T. W. Chun, P. Lusso, G. Kaplan, L. Wolfe, M. J. Memoli, M. He, H. Vega, L. J. Y. Kim, Y. Huang, N. Hussein, E. Nievas, R. Mitchell, M. Garofalo, A. Louie, D. C. Ireland, C. Grunes, R. Cimbri, V. Patel, G. Holzappel, D. Salahuddin, T. Bristol, D. Adams, B. E. Marciano, M. Hegde, Y. Li, K. R. Calvo, J. Stoddard, J. S. Justement, J. Jacques, D. A. L. Priel, D. Murray, P. Sun, D. B. Kuhns, C. F. Boerkoel, J. A. Chiorini, G. Di Pasquale, D. Verthelyi and S. D. Rosenzweig (2014). "Glycosylation, hypogammaglobulinemia, and resistance to viral infections." N Engl J Med **370**(17): 1615-1625.

Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia and A. J. Parodi (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Biochemistry **31**(1): 97-105.

Soussilane, P., C. D'Alessio, T. Paccalet, A. C. Fitchette, A. J. Parodi, R. Williamson, C. Plasson, L. Faye and V. Gomord (2009). "N-glycan trimming by glucosidase II is essential for Arabidopsis development." Glycoconj J **26**(5): 597-607.

Spiro, M. J. and R. G. Spiro (2000). "Use of recombinant endomannosidase for evaluation of the processing of N-linked oligosaccharides of glycoproteins and their oligosaccharide-lipid precursors." Glycobiology **10**(5): 521-529.

Spiro, R. G. (2000). "Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with N-linked oligosaccharides." J Biol Chem **275**(46): 35657-35660.

Stanley, P. and R. D. Cummings (2015). Structures Common to Different Glycans. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 161-178.

Stanley, P., N. Taniguchi and M. Aebi (2015). N-Glycans. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 99-111.

- Stehli, J., T. Torossi and M. Ziak (2008). "Triple arginines in the cytoplasmic tail of endomannosidase are not essential for type II membrane topology and Golgi localization." Cell Mol Life Sci **65**(10): 1609-1619.
- Stigliano, I. D., S. G. Alculumbre, C. A. Labriola, A. J. Parodi and C. D'Alessio (2011). "Glucosidase II and N-glycan mannose content regulate the half-lives of monoglucosylated species *in vivo*." Mol Biol Cell **22**(11): 1810-1823.
- Suda, Y. and A. Nakano (2012). "The yeast Golgi apparatus." Traffic **13**(4): 505-510.
- Takegawa, K., S. Tokudomi, M. S. Bhuiyan, M. Tabuchi, Y. Fujita, T. Iwaki, S. Utsumi and N. Tanaka (2003). "Heterologous expression and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* vacuolar carboxypeptidase Y in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **42**(5): 252-259.
- Trombetta, S. E., M. Bosch and A. J. Parodi (1989). "Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes." Biochemistry **28**(20): 8108-8116.
- Ungar, D. (2009). "Golgi linked protein glycosylation and associated diseases." Semin Cell Dev Biol **20**(7): 762-769.
- Varki, A., R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J. J. Prestegard, R. L. Schnaar, H. H. Freeze, J. D. Marth, C. R. Bertozzi, M. E. Etzler, M. Frank, J. F. Vliegthart, T. Lutteke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa, P. Toukach, K. F. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi and S. Kornfeld (2015). "Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans." Glycobiology **25**(12): 1323-1324.
- Varki, A. and S. Kornfeld (2015). Historical Background and Overview. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 1-18.
- Vida, T. A. and S. D. Emr (1995). "A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast." J Cell Biol **128**(5): 779-792.
- Volker, C., C. M. De Praeter, B. Hardt, W. Breuer, B. Kalz-Fuller, R. N. Van Coster and E. Bause (2002). "Processing of N-linked carbohydrate chains in a patient with glucosidase I deficiency (CDG type IIb)." Glycobiology **12**(8): 473-483.
- Weng, S. and R. G. Spiro (1996). "Evaluation of the early processing routes of N-linked oligosaccharides of glycoproteins through the characterization of Man8GlcNAc2 isomers: evidence that endomannosidase functions *in vivo* in the absence of a glucosidase blockade." Glycobiology **6**(8): 861-868.
- Zhang, D., A. Vjestica and S. Oliferenko (2010). "The cortical ER network limits the permissive zone for actomyosin ring assembly." Curr Biol **20**(11): 1029-1034.
- Zhang, D., A. Vjestica and S. Oliferenko (2012). "Plasma membrane tethering of the cortical ER necessitates its finely reticulated architecture." Curr Biol **22**(21): 2048-2052.
- Zhang, X. and Y. Wang (2016). "Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure." J Mol Biol **428**(16): 3183-3193.
- Zuber, C., M. J. Spiro, B. Guhl, R. G. Spiro and J. Roth (2000). "Golgi apparatus immunolocalization of endomannosidase suggests post-endoplasmic reticulum glucose trimming: implications for quality control." Mol Biol Cell **11**(12): 4227-4240.