

Tesis de Posgrado

La UDP-Glc : Glicoproteína glucosiltransferasa de Schizosaccharomyces pombe : Una proteína de stress e interviene en el mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplasmático

Fernández, Fabiana S.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Fernández, Fabiana S.. (1996). La UDP-Glc : Glicoproteína glucosiltransferasa de Schizosaccharomyces pombe : Una proteína de stress e interviene en el mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplasmático. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2860_Fernandez.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández, Fabiana S.. "La UDP-Glc : Glicoproteína glucosiltransferasa de Schizosaccharomyces pombe : Una proteína de stress e interviene en el mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplasmático". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2860_Fernandez.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA
DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*. UNA PROTEÍNA DE
STRESS QUE INTERVIENE EN EL MECANISMO DE
CONTROL DE CALIDAD DEL PLEGAMIENTO DE
GLICOPROTEÍNAS EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

AUTOR: Fabiana S. Fernández

DIRECTOR: Armando J. Parodi

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1996 -

42

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

*Al director de esta Tesis Dr. Armando J. Parodi por ABSOLUTAMENTE TODO.
Pero especialmente por haber confiado en mi a pesar de ser Mujer y Bióloga.*

A Sergio Trombetta por un parcial bochado "Injustamente".

A Marcelo Sousa por enseñarme a recurrir a los "Manuales".

A los profesores y miembros del Instituto que me brindaron su consejo y ayuda.

A los compañeros que me ayudaron y acompañaron durante estos años.

A la Comisión Directiva de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
El Retículo Endoplásmico (RE) como compartimiento de plegamiento de proteínas.....	4
Condiciones dentro del RE.....	4
Factores que facilitan el plegamiento de proteínas en el RE.....	5
N-Glicosilación de proteínas en el RE.....	8
La glicosilación y el procesamiento de los oligosacáridos afecta el plegamiento, secreción y degradación de proteínas en el RE.....	12
Los oligosacáridos unidos a proteína son transitoriamente glucosilados en el RE.....	14
Las glicoproteínas mal plegadas sufren ciclos de deglucosilación y reglucosilación en el RE.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Células y medios de cultivos.....	20
Standards radioactivos.....	20
Métodos.....	21
Preparación de glicopéptidos de tipo alta manosa.....	21
Preparación de lectinas.....	22
Desnaturalización de glicoproteínas.....	22
Degradaciones con tripsina.....	22
Ensayo de glucosiltransferasa.....	23
Marcación <i>in vivo</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
Preparación de microsomas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pombe</i> y mezclas de incubación usadas para la caracterización de los productos de reacción.....	24
Purificación de UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	24
Preparación de microsomas.....	24
Solubilización de la glucosiltransferasa.....	25
DEAE-celulosa.....	25
Con A-Sepharosa.....	25
Mono Q.....	26

Fenil-Superosa	26
Tamiz molecular	26
Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	26
Digestión en gel (SDS-PAGE) y aislamiento de péptidos.....	27
Preparación de DNA genómico de <i>S. pombe</i>	27
Preparación de RNA de <i>S. pombe</i> y su utilización.....	28
Procedimientos con DNA.....	29
Reacción de PCR.....	30
Screening de las bibliotecas de cDNA y genómica	30
Disrupción del gen de la glucosiltransferasa en <i>S. pombe</i>	31
Construcción de los plásmidos de expresión	32
RESULTADOS.....	34
Purificación a homogeneidad de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	34
La glucosiltransferasa de <i>S. pombe</i> requiere calcio para su actividad y el pH óptimo es cercano al neutro.....	36
La glucosiltransferasa usa UDP-Glc como dador de glucosa.....	37
La glucosiltransferasa utiliza como sustrato glicoproteínas desnaturalizadas pero no glicopéptidos.....	38
Caracterización de los productos de reacción formados por preparaciones crudas o puras de glucosiltransferasa.....	41
Clonado y secuenciación del gen de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	44
PCR con oligonucleótidos degenerados.....	44
Screening de una biblioteca de cDNA.....	47
Screening de una biblioteca genómica.....	47
La glucosiltransferasa de <i>S. pombe</i> contiene una nueva señal de retención para proteínas solubles del RE.....	51
La transcripción del mRNA de la glucosiltransferasa de <i>S. pombe</i> se induce frente a diferentes condiciones de crecimiento.....	56
Disrupción del gen de la glucosiltransferasa.....	59
PCR sobre el DNA de las células <i>gpt1</i> ⁺ y <i>gpt1</i> ⁻	62
Las células <i>gpt1</i> ⁻ no forman Glc ₁ Man _{7.9} GlcNAc ₂ -proteína por reglucosilación de Man _{7.9} GlcNAc ₂ -proteína.....	63
Caracterización fenotípica de las mutantes.....	64

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> no tiene actividad de UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa.....	66
Expresión del gen <i>gpt1</i> en <i>S. pombe</i> glucosiltransferasa menos.....	71
DISCUSIÓN.....	76
REFERENCIAS.....	85

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

BSA: seroalbúmina bovina

ConA: concanavalina A

DEAE: dietilaminoetil

DNJ: deoxinojirimicina

Dol: dolicol

Dol-P: dolicol fosfato

Dol-P-P: dolicol difosfato

DTT: ditioneitol

E-64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano

Endo H: Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H

Fig: figura

pb: pares de bases

PDI: proteína disulfuro isomerasa

PHA: aglutinina de porotos comunes

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

POPOP: 2,2-p-fenilenbis-5-fenil oxazol

PPO: 2,5-difeniloxazol

Prot: proteína

PVDF: polivinilidendivinilfluoruro

RE: retículo endoplásmico

RNAsa: ribonucleasa

SBA: aglutinina de porotos de soja

TCA: ácido tricloroacético

TFA: ácido trifluoroacético

TLCK: tosil-lisil-clorometilcetona

TPCK: tosil-fenilalanil-clorometilcetona

RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es el compartimiento de síntesis, modificación post-traducciona l y plegamiento de proteínas y glicoproteínas que serán destinadas a secreción, membrana plasmática o distintas organelas de los sistemas endocítico y exocítico. Una de las modificaciones post-traduccionales mas frecuentes, la N-glicosilación, está relacionada con el plegamiento de las proteínas ya que sin la adición de los oligosacáridos, numerosas proteínas son incapaces de alcanzar su conformación nativa. En general, los intermediarios de plegamiento, las proteínas no totalmente ensambladas, las proteínas mal plegadas y los agregados son selectivamente retenidos en el RE. El transporte hacia el aparato de Golgi ocurre solamente cuando las proteínas se han plegado correctamente y se han ensamblado para el caso de los multímeros. Este importante fenómeno, que asegura la integridad funcional de las proteínas que salen del RE, ha sido denominado "control de calidad del RE". Para el caso de las glicoproteínas la estructura o grado de procesamiento de sus oligosacáridos ha sido postulado como una señal para la retención o el transporte de las mismas.

La N-glicosilación comienza en la mayoría de los eucariotas con la transferencia de un oligosacárido de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde un intermediario lipídico (dolicol-P-P-oligosacárido), a proteínas nacientes en el RE. Inmediatamente luego de la transferencia, los tres residuos de glucosa son removidos por las glucosidasas I y II. Parodi y colaboradores demostraron que los oligosacáridos unidos a proteína son transitoriamente reglucosilados dentro del RE mediante la acción de la enzima UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. Esta enzima fue purificada a homogeneidad a partir de hígado de rata. La característica que hace única a esta enzima es que la glicoproteína aceptora, en un ensayo libre de células, debe estar desnaturalizada para ser un aceptor eficiente. El efecto de la desnaturalización no se debe a que vuelve accesibles los oligosacáridos que pudieran estar no disponibles en la estructura nativa. Por el contrario, la enzima reconoce en el esqueleto proteico elementos expuestos en las conformaciones desnaturalizadas pero no en las nativas de las glicoproteínas.

En este trabajo de tesis se purificó a homogeneidad la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de *Schizosaccharomyces pombe* Esta resultó ser, al igual que la glucosiltransferasa de hígado de rata, una proteína soluble del RE, que requiere Ca^{2+}

para su actividad, su pH óptimo es cercano al neutro, utiliza UDP-Glc como dador de azúcar y glucosila eficientemente glicoproteínas desnaturalizadas. La enzima pura formó $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ -proteína cuando se incubó con tiroglobulina desnaturalizada y UDP-Glc. Los mismos compuestos se formaron por glucosilación de aceptores endógenos en preparaciones crudas de microsomas de *S. pombe*. La misma actividad no pudo ser detectada en *Saccharomyces cerevisiae* siendo este el único organismo eucarionte conocido hasta el momento que carece de actividad de glucosiltransferasa. Se secuenció el gen de la glucosiltransferasa de *S. pombe* (*gpt1*). Este codifica para un polipéptido de 1429 aminoácidos (aa), en su extremo N-terminal posee un péptido señal de 18 aa, y en el C-terminal presenta el tetrapéptido PDEL que representaría una nueva señal de retención para proteínas solubles del RE en *S. pombe*. Se ha propuesto recientemente un modelo en el cual la calnexina (una proteína de membrana del RE), la glucosidasa II y la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa forman parte del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE. De acuerdo al mencionado modelo, las glicoproteínas serían deglucosiladas por la glucosidasa II y, si no se encuentran correctamente plegadas, sufrirían una reglucosilación catalizada por la glucosiltransferasa. La calnexina es capaz de unir glicoproteínas con oligosacáridos monoglucosilados, por lo tanto, las glicoproteínas no plegadas serían unidas por la calnexina siendo retenidas dentro del RE dado que la calnexina es una proteína de membrana. Este ciclo continuaría hasta que las glicoproteínas adquieren sus estructuras terciarias nativas. En estas condiciones dejarían de ser sustrato de la glucosiltransferasa y solo serían sustrato de la glucosidasa II que las liberaría del residuo de glucosa y por lo tanto de la interacción con la calnexina permitiendo su salida del RE. La glucosiltransferasa tendría un rol fundamental dentro de este modelo ya que sería el sensor de la estructura de las glicoproteínas, marcándolas o no con el residuo de glucosa que determinará su unión a la calnexina.

La síntesis del mRNA de *gpt1* fue aumentada entre 2 y 9 veces en condiciones que se sabe afectan el plegamiento de las proteínas en el RE. Esta fue la primera evidencia obtenida *in vivo* que estaría de acuerdo con la participación de la glucosiltransferasa en el mencionado mecanismo de control de calidad en el RE. Hasta el momento esto había sido inferido por la capacidad de glucosilar *in vitro* solo glicoproteínas desnaturalizadas. Sin embargo la disrupción del gen *gpt1* en *S. pombe* resultó no ser letal para las células. Las células *gpt1*⁻ pudieron crecer sin inconvenientes a las temperaturas ensayadas, solo presentaron una pequeña diferencia de tamaño.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en:

"Purification to Homogeneity of UDP-glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and Apparent Absence of the Enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*"

Fabiana S. Fernández, Sergio E. Trombetta, Ulf Hellman and Armando J. Parodi (1994) *The Journal of Biological Chemistry* 269, 30701-30706

"A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP-glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability"

Fabiana Fernández, Mehrdad Jannatipour, Ulf Hellman, Luis A. Rokeach and Armando J. Parodi (1996) *The EMBO Journal* 15, 705-713

INTRODUCCIÓN

El Retículo Endoplásmico como compartimento de plegamiento de proteínas.

En una célula eucariota la mayoría de los polipéptidos son traducidos en el citosol, sin embargo, varios de ellos se pliegan y ensamblan para dar proteínas funcionales solo luego de ser transportados a otros compartimentos subcelulares. Estos compartimentos incluyen mitocondria, cloroplasto, peroxisomas y el retículo endoplásmico (RE). Por lo general, el plegamiento ocurre en el compartimento que será la residencia final del polipéptido. En este aspecto el RE se presenta como una excepción ya que es responsable de la biosíntesis y del plegamiento de proteínas y glicoproteínas que serán destinadas a secreción, membrana plasmática o que serán transportadas a las distintas organelas de los sistemas endocíticos y exocíticos.

En algunos tipos celulares, la producción diaria de proteínas del RE excede la masa de la propia célula. Varias de estas proteínas son complejos multiméricos de varios cientos de kDa de masa molecular. El RE es responsable no solamente de la síntesis de estas proteínas, sino también de su plegamiento, ensamblado, modificación post-traduccional, transporte y eventualmente también de su degradación. El reciente progreso hecho en el campo del plegamiento de proteínas ha permitido la comprensión de algunos de los mecanismos a través de los cuales el RE lleva a cabo sus múltiples funciones.

Condiciones dentro del RE

El lumen del RE constituye un medio que es intermedio entre el citosol y el espacio extracelular. La concentración de Ca^{2+} es del orden milimolar, aproximándose a los valores medidos extracelularmente. La maduración de varias proteínas es dependiente del Ca^{2+} en el RE (Suzuki *et al*, 1991; Lodish y Kong 1990). La concentración de otros electrolitos es similar a la del citosol y el pH en el lumen sería cercano a la neutralidad. Las condiciones redox dentro del RE son de particular interés dada su relación con la formación de puentes disulfuro (Gilbert, 1990). A diferencia de las proteínas del citosol, las que se sintetizan en el RE suelen ser ricas en cisteínas y usualmente adquieren múltiples puentes disulfuro. El glutatión reducido/glutatión oxidado es probablemente el principal buffer redox dentro del RE. Estudios recientes realizados por Lodish y colaboradores (Hwang *et al*, 1992) sugieren que, en contraste con la relación de glutatión reducido a oxidado de 100:1 que existe

en el citosol, la relación en el RE es de 10:1. Experimentos *in vitro* han demostrado que este último es un valor óptimo para la formación espontánea de disulfuros durante el plegamiento de proteínas (Gilbert, 1990). Tanto el modo en que el glutatión entra al RE, como la manera en que el gradiente redox es mantenido son problemas que aún no han sido aclarados. Cuando agentes reductores como DTT o 2-mercaptoetanol, o agentes oxidantes como diamina son agregados a las células las condiciones redox en el RE cambian y el plegamiento, maduración y transporte de proteínas es afectado (Braakman *et al*, 1992 a). Al remover estos agentes, las condiciones redox normales se restablecen rápidamente, y esto resulta en el plegamiento post-traducciona l de las cadenas no plegadas.

Estudios recientes de Clairmont y colaboradores (Clairmont *et al*, 1992), han demostrado que el RE contiene ATP. Este es translocado desde el citosol al RE mediante un transportador específico. La presencia de ATP en el lumen del RE es importante ya que algunos de los factores que facilitan el plegamiento de proteínas como la BiP o Grp78 (immunoglobulin heavy chain binding protein), dependen del ATP para su función (Rothman, 1989).

Cuando las células son privadas de ATP se inhibe el plegamiento de proteínas en el RE. En lugar de plegarse normalmente las proteínas tienden a agregarse. El ATP es también necesario para mantener algunas proteínas en su estado plegado dentro del RE y para rescatar y replegar las proteínas mal plegadas o agregadas generadas por la privación de ATP.

Factores que facilitan el plegamiento de proteínas en el RE.

El plegamiento de proteínas en soluciones acuosas ha sido exhaustivamente estudiado desnaturalizando las mismas y siguiendo el replegamiento *in vitro* luego de remover el desnaturalizante (Anfisen y Scheraga, 1975; Creighton, 1986; Jaenicke, 1991). De estos estudios surgen las siguientes generalizaciones: (a) la estructura tridimensional de las proteínas está determinada por su secuencia de aminoácidos; (b) las proteínas pueden plegarse espontáneamente, es decir no requieren *a priori* de la asistencia de otras macromoléculas; (c) el plegamiento no ocurre al azar, sino siguiendo caminos específicos y con intermediarios definidos; (d) en las proteínas con más de un dominio, éstos se pliegan independientemente; (e) el plegamiento comienza con reacciones rápidas que conducen a la formación de intermediarios compactos con estructura secundaria similar a la nativa pero con una estructura terciaria no bien definida. Este es el estado llamado "glóbulo fundido" (molten globule); a esto sigue un número de reacciones más lentas que involucran la

isomerización de prolinas, la formación de puentes disulfuro y la adaptación conformacional entre dominios. Si bien estos principios son importantes para entender el mecanismo de plegamiento de las proteínas en la célula, los mismos no son suficientes para explicar el proceso *in vivo* ya que el medio intracelular difiere muy significativamente de aquellos usados para obtener un plegamiento eficiente *in vitro*. Un número muy grande de estudios han hecho evidente que el plegamiento *in vivo* es asistido. El pasaje de los polipéptidos a través de las vías de plegamiento depende de la acción de proteínas celulares llamadas chaperones moleculares y de algunas enzimas de plegamiento (Pelham, 1986; Ellis y Van Der Vies, 1991; Braakman *et al*, 1992 b; Gething y Sambrook, 1992). Estas proteínas son necesarias para aumentar la eficiencia del plegamiento intracelular de polipéptidos, especialmente durante las reacciones tardías que conducen desde el estado de glóbulo fundido al estado final correctamente plegado. La función de los chaperones no es impartir información sobre el plegamiento, ya que la misma está contenida en la secuencia de aminoácidos de cada proteína, sino prevenir interacciones intra e intermoleculares inapropiadas o no productivas para la reacción de plegamiento.

Consistentemente con su rol de punto central de biogénesis de proteínas, el RE es rico en chaperones moleculares y factores de plegamiento. De hecho casi todas las proteínas residentes del lumen del RE parecen tener funciones relacionadas de uno u otro modo con el plegamiento de proteínas. La chaperona mas importante del RE es un miembro de la familia de chaperones de 70 kDa llamado BiP (Bole *et al*, 1986). En condiciones de crecimiento normal, la BiP es sintetizada constitutivamente y representa el 5 % del contenido total del lumen del RE. Su síntesis puede ser aún mayor por inducción a través de una serie de condiciones de stress (Lee, 1987) que conducen a la acumulación de polipéptidos mal plegados (Kozutsumi *et al*, 1988). La BiP se asocia transitoriamente con una gama muy amplia de proteínas nacientes y en forma mas permanente con proteínas mal plegadas o no ensambladas cuyo transporte fuera del RE se encuentra bloqueado (Bole *et al*, 1986; Gething *et al*, 1986). Los complejos de BiP con proteínas de secreción nacientes, aislados de extractos de células de mamífero, pueden disociarse *in vitro* por el agregado de ATP, pero no por análogos no hidrolizables ni por ADP (Munro y Pelham, 1986). Se ha demostrado también que la BiP es una proteína esencial para las levaduras (Normington *et al*, 1989). Por todos estos datos, se supone que esta proteína tiene un rol en el plegamiento y ensamblado de proteínas en el lumen del RE bajo condiciones normales de crecimiento celular y no solamente como respuesta a un determinado stress (Bole *et al*, 1986; Gething *et al*, 1986; Pelham, 1986; Hendershot *et al*, 1987).

El RE contiene, además, peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas (PPI) similares a las encontradas en el citosol. Si bien su rol en el plegamiento de proteínas dentro del RE ha sido demostrado sin ambigüedad solo para un grupo de rodopsinas en *Drosophila*, (Stamnes *et al*, 1991) numerosos estudios sugieren que su actividad específica es efectivamente la de un factor de plegamiento (Fisher y Schmid, 1990). Este actuaría catalizando uno de los pasos limitantes de la reacción de plegamiento, la interconversión de los rotámeros *cis* y *trans* de los polipéptidos que contienen prolina (Schreiber, 1991). El tratamiento de fibroblastos de embrión de pollo con ciclosporina A, inhibidor de las PPI, retardó el plegamiento de la triple hélice del colágeno tipo I, indicando un rol fisiológico para esta enzima en el plegamiento de proteínas dentro del RE (Bachinger y Compton, 1991).

También existen enzimas de plegamiento que se encuentran únicamente en el RE como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Freedman, 1989; Noiva y Lennarz, 1992). Esta enzima está involucrada en la formación y reacomodamiento de los puentes disulfuro durante el proceso de plegamiento. Estudios bioquímicos de la PDI han demostrado que puede servir como reductasa, isomerasa o como oxidasa, dependiendo de las condiciones redox del medio. Experimentos de plegamiento en microsomas han demostrado que la PDI es requerida para el plegamiento y la formación de puentes disulfuro (Bulleid y Freedman, 1988). La disrupción del gen que codifica para la PDI en levaduras resulta letal para la célula (Lamantia *et al*, 1991).

Si bien la oligosacariltransferasa, la enzima encargada de transferir oligosacáridos a residuos de asparagina en proteínas, no puede ser categorizada como una enzima de plegamiento, esta juega un papel importante en facilitar el plegamiento de muchas proteínas en el RE. Sin la adición de los oligosacáridos a asparagina, numerosas proteínas son incapaces de alcanzar su estado nativo (Paulson, 1989). Los oligosacáridos que se agregan cotraduccionalmente son polares y voluminosos, y podrían tener tres funciones potenciales facilitando el plegamiento de proteínas: (1) podrían asegurar el correcto posicionamiento local de los segmentos polipeptídicos a los cuales se hallan unidos, por ejemplo, dirigiéndolos hacia la superficie en el estado de glóbulo fundido; (2) podrían evitar la unión de chaperones a sitios específicos de los polipéptidos y (3) dada su naturaleza hidrofílica podrían aumentar la solubilidad de los intermediarios de plegamiento, disminuyendo la probabilidad de que se agreguen irreversiblemente (Marquardt y Helenius, 1992). Si la función principal de los oligosacáridos unidos a asparagina fuera, de hecho, facilitar el plegamiento, esto explicaría el porqué las células agregan estos oligosacáridos a las cadenas nacientes,

antes de que se plieguen. También explicaría el porqué la célula desarrolló una elaborada maquinaria de glicosilación en el RE separada de la que existe en el aparato de Golgi.

En general, los intermediarios de plegamiento, las proteínas no totalmente ensambladas (aquellas en que sus monómeros no están asociados correctamente formando el multímero final), las proteínas mal plegadas y los agregados son selectivamente retenidos en el RE. El transporte hacia el aparato de Golgi ocurre solamente cuando las proteínas se han plegado correctamente y se han ensamblado para el caso de los multímeros. Este importante fenómeno, que asegura la integridad funcional de las proteínas que salen del RE, ha sido denominado "control de calidad" del RE (Hurtley y Helenius, 1989).

Las señales moleculares y los mecanismos que inducen retención o transporte durante el control de calidad, son pobremente entendidos. Aparentemente las proteínas asociadas con la chaperona BiP no son transportadas. Los sulfhidrilos libres también podrían estar involucrados en el mecanismo de retención. Para el caso de las glicoproteínas la estructura o grado de procesamiento de sus oligosacáridos ha sido postulado como una señal para la retención o el transporte de estas glicoproteínas (Fitting y Kabat, 1982; Olden *et al*, 1982).

N-Glicosilación de proteínas en el RE

Las estructuras encontradas en los oligosacáridos unidos a los restos de asparagina de las glicoproteínas de células de mamífero se pueden dividir en tres grandes grupos (Fig. 1) (Kornfeld y Kornfeld, 1976; Montreuil, 1980). Los de alta manosa o polimansosa, compuestos de N-acetilglucosamina y manosa. Los complejos, compuestos de N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, ácido siálico y fucosa formando una familia de estructuras muy variadas. Por último, los híbridos tienen algunas características de los de alta manosa y de los complejos. Los oligosacáridos unidos a asparagina de las glicoproteínas de eucariotas inferiores o plantas presentan además otras estructuras conteniendo ramnosa, xilosa etc.

oligosacárido completo es transferido en bloque desde el lípido a los residuos de asparagina de las proteínas nacientes en el RE mediante una oligosacariltransferasa. A continuación la acción ordenada de glicosidasas y glicosiltransferasas da origen a las estructuras encontradas en las glicoproteínas maduras.

En 1972 se describió por primera vez la síntesis *in vitro* de un oligosacárido glucosilado unido a un lípido y su transferencia a proteínas (Parodi *et al*, 1972). A partir de entonces, se elucidó la secuencia detallada de reacciones que conduce a la formación del intermediario, su transferencia a proteína y posterior procesamiento (Parodi y Leloir, 1979; Hubbard y Ivatt, 1981; Kornfeld y Kornfeld, 1985). El lípido al cual está unido el oligosacárido por un puente pirofosfato es el dolicol (Dol), compuesto de 18-21 unidades de isopreno en mamíferos (Keller, 1987; Chojnacki y Dallner, 1988). El Dol-P actúa como transportador de manosa y de glucosa, y el Dol-P-P participa como transportador del oligosacárido intermediario.

En la Fig. 2 se detalla la secuencia y topología de reacciones que conduce a la formación del oligosacárido transferido en las reacciones de N-glicosilación. Los primeros siete monosacáridos son transferidos directamente desde sus correspondientes nucleótido-azúcares. Con la transferencia de GlcNAc-P a Dol-P a partir de UDP-GlcNAc, se forma Dol-P-P-GlcNAc al que se le agrega otro resto de N-acetilglucosamina también a partir de UDP-GlcNAc (Fig. 2, reacciones 1 y 2). Luego se transfieren cinco restos de manosa a partir de GDP-Man (Fig. 2, reacción 3). Estas reacciones utilizan los nucleótido azúcares disponibles en el citoplasma y son catalizadas por glicosiltransferasas situadas en la cara citoplasmática del RE (Hirschberg y Snider, 1987; Abeijón y Hirschberg, 1992).

El intermediario $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ se transloca hacia el interior del RE donde continúa la adición de restos de manosa (Fig. 2, reacción 4). El dador de los 4 últimos restos de manosa es el Dol-P-Man. El agregado secuencial de tres restos de glucosa utilizando Dol-P-Glc como dador de glucosa completa la síntesis del $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Fig. 2, reacción 5). Los sustratos dadores de manosa y glucosa en estas reacciones de glicosilación que ocurren en el interior del RE, Dol-P-Man y Dol-P-Glc, son sintetizados en la cara externa del RE a partir de Dol-P y los correspondientes nucleótido azúcares. Luego son translocados hacia el interior del RE donde son utilizados como dadores de manosa y glucosa (Hirschberg y Snider, 1987; Abeijón y Hirschberg, 1992).

La transferencia del oligosacárido precursor a las proteínas tiene lugar en forma cotraduccional en el interior del RE y es catalizada por la dolicol difosfato oligosacárido:proteína oligosacariltransferasa (Fig 2, reacción 6) (Kaplan *et al*, 1987;

La glicosilación y el procesamiento de los oligosacáridos afecta el plegamiento, secreción y degradación de proteínas en el RE.

Si bien los oligosacáridos unidos a asparagina no son necesarios para mantener la estructura nativa de la mayoría de las glicoproteínas maduras, los mismos suelen ser cruciales para el correcto plegamiento y oligomerización de estas glicoproteínas. Se encuentra bien documentado en la bibliografía que cuando la N-glicosilación es inhibida usando tunicamicina (un inhibidor de la síntesis del Dol-P-P-oligosacárido precursor) o por una mutación que elimina la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, numerosas glicoproteínas son incapaces de adquirir su estructura terciaria correcta (Leavitt *et al*, 1977; Gibson *et al*, 1978; Morrison *et al*, 1978; Machamer y Rosé, 1988 a; Gallagher *et al*, 1992). Tipicamente, dichas proteínas se agregan rápidamente luego de la síntesis y se asocian no covalentemente con la proteína BiP, la chaperona de RE (Leavitt *et al*, 1977; Hurtley y Helenius, 1989; Gallagher *et al*, 1992). El destino final de estas proteínas es la degradación, que tiene lugar en el RE o algún otro compartimento pre-Golgi, unas pocas horas luego de la síntesis (Klausner, 1989). Las proteínas mal plegadas están frecuentemente unidas covalentemente unas con otras, mediante la formación de puentes disulfuro aberrantes (Machamer y Rose, 1988 a; Marquardt y Helenius, 1992).

Si bien es entonces cierto que la mayoría de las glicoproteínas necesitan de su oligosacárido para el correcto plegamiento, el grado de dependencia que muestran varía ampliamente. En algunos casos, una fracción de la proteína se pliega correctamente y es transportada normalmente fuera del RE, mientras que el resto se agrega y permanece dentro del RE (Hickman y Kornfeld, 1978; Miyazaki *et al*, 1986). En otras ocasiones, se observa una dependencia con la temperatura. En estos casos, la proteína se agrega a 37 °C pero es capaz de plegarse adecuadamente a temperaturas reducidas aún en ausencia de los oligosacáridos (Gibson *et al*, 1978). Finalmente, existen también numerosos casos en los que la presencia de N-oligosacáridos no parece ser requerida para el plegamiento correcto de los polipéptidos (Hickman y Kornfeld, 1978; Olden *et al*, 1978). El motivo por el cual el comportamiento de las glicoproteínas difiere de este modo se desconoce. La única regla que ha podido establecerse es que aquellas glicoproteínas que tienen dificultades para plegarse cuando tienen los oligosacáridos en su lugar, muestran aún mas problemas para adquirir su estructura correcta cuando los mismos están ausentes o modificados. Por el contrario las glicoproteínas que se pliegan fácilmente, son menos sensibles a la ausencia de los oligosacáridos.

Cuando el efecto de la N-glicosilación es analizado mediante la eliminación de una secuencia consenso de glicosilación en glicoproteínas con mas de un oligosacárido, es frecuentemente observado que ningún sitio en particular es esencial para que el plegamiento se lleve a cabo. Solamente aparecen problemas cuando mas de un sitio es eliminado al mismo tiempo (Gallagher *et al*, 1992; Roberts *et al*, 1993). Sin embargo, algunos sitios suelen ser mas importantes que otros, no siendo sorprendente que estos sitios tiendan a ser conservados. Ha sido sugerido que este tipo de oligosacáridos particularmente importantes pueden funcionar de modo cooperativo, aumentando las chances de una proteína de alcanzar un estado conformacional correcto y estable (Roberts *et al*, 1993). También se ha informado que la creación de sitios de glicosilación en ubicaciones completamente nuevas dentro de un polipéptido ha podido, en algunos casos, reemplazar la necesidad de los oligosacáridos constitutivos normales (Machamer y Rose, 1988 b). Esto sugiere un alto grado de flexibilidad en las posiciones que resultan aceptables para los oligosacáridos, siendo su presencia mas importante que su ubicación específica. Los oligosacáridos parecen tener, por lo tanto, un rol mas global que local en el plegamiento de glicoproteínas.

Es importante notar sin embargo, que no solo la presencia de los oligosacáridos sino también su grado de procesamiento parecen ser importantes en el plegamiento y transporte de glicoproteínas. Los inhibidores de las glucosidasas I y II como castanospermina, deoxinojirimicina (DNJ) y bromoconduritol frecuentemente retardan o evitan el plegamiento y/o transporte intracelular de las glicoproteínas recién sintetizadas (Robins *et al*, 1977; Lodish y Kong, 1984; Machamer y Rose, 1988 b). Nuevamente, la magnitud de este efecto varia ampliamente entre las distintas glicoproteínas. El bromoconduritol, un inhibidor de glucosidasas que bloquea preferentemente la remoción del residuo mas interno de glucosa, parece ser mas eficiente en la inhibición de la secreción de glicoproteínas que la castanospermina y DNJ (Datema *et al*, 1982). En el caso de la hemoaglutinina del virus de la influenza (HA), la inhibición de la remoción de las glucosas mas externas no tiene efecto alguno sobre la maduración del virus, mientras que la inhibición de la remoción del residuo de glucosa mas interno de los oligosacáridos con bromoconduritol, genera una glicoproteína que no puede ser transportada fuera del RE (Datema *et al*, 1982). Esto sugiere que el residuo de glucosa mas interno es, de alguna manera, mas importante para la maduración de la HA, que los dos residuos de glucosa mas externos.

Es interesante mencionar que la inmunoglobulina (Ig) D no es secretada en presencia de DNJ (Peyrieras *et al*, 1983), mientras si lo es en presencia de tunicamicina (Sidman, 1981). Esto implica que la IgD se pliega o es transportada mas eficientemente cuando no posee ningún N-oligosacárido que cuando tiene uno no procesado.

En base a los efectos observados con estos inhibidores, numerosos investigadores han sugerido que el transporte hacia afuera del RE podría estar regulado por lectinas (Fitting y Kabat, 1982; Olden *et al*, 1982). Se ha especulado que estas lectinas se unirían específicamente a los oligosacáridos procesados de las glicoproteínas y facilitarían su salida del RE. Una de ellas, la calnexina, ha sido muy bien caracterizada. Es una proteína integral de la membrana del RE, posee un dominio citosólico con varios sitios de fosforilación y un dominio hacia el lumen del RE con regiones de unión a calcio. Es capaz de unir glicoproteínas monoglucosiladas. La función de la calnexina es desconocida hasta el momento, pero se sugiere que actuaría como una chaperona del RE. Se demostró que se une transitoriamente a un gran número de proteínas recientemente sintetizadas. Esta unión se mantendría hasta tanto las proteínas adquieren sus estructuras terciarias o cuaternarias nativas. Sin embargo, su rol parece estar relacionado con la retención mas que con el transporte activo de proteínas fuera del RE.

En contraste con los inhibidores de las glucosidasas, los inhibidores de manosidasas no parecen tener un efecto significativo en el plegamiento y secreción de glicoproteínas (Bosch *et al*, 1985; Hammond *et al*, 1994). Esto sugiere que el procesamiento de las glicoproteínas dentro del RE, que involucra la remoción de residuos de glucosa, podría estar relacionado con el mecanismo de control de calidad y degradación que funciona dentro del RE.

Los oligosacáridos unidos a proteína son transitoriamente glucosilados en el RE.

Como ya se menciono anteriormente, la N-glicosilación de proteínas es iniciada, en la mayoría de los eucariotes, por la transferencia de un oligosacárido de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde un derivado unido a Dol-P-P hacia residuos de asparagina de polipéptidos nacientes en el lumen del RE. El procesamiento de los oligosacáridos comienza inmediatamente luego de la transferencia y es iniciado por la remoción de los tres residuos de glucosa por dos glucosidasas específicas. La glucosidasa I remueve la glucosa mas externa ligada en unión $\alpha(1-2)$ y luego la glucosidasa II remueve los otros dos residuos de glucosa ligados en unión $\alpha(1-3)$. Además, algunos residuos de

manosa también pueden ser removidos dentro del RE mediante la acción de α -manosidasas específicas.

Los tripanosomátidos poseen una característica única en su mecanismo de N-glicosilación, ya que transfieren a proteína oligosacáridos no glucosilados (Parodi y Quesada-Allué, 1982). Estos microorganismos son incapaces de sintetizar Dol-P-Glc que es el dador de glucosa para la síntesis del precursor glucosilado en células de mamífero, aves, hongos y plantas. A pesar del hecho que oligosacáridos no glucosilados son transferidos a proteína en estos microorganismos, Parodi y colaboradores detectaron la presencia de oligosacáridos tipo alta manosa unidos a proteína transitoriamente glucosilados en células incubadas con [14 C]glucosa ($\text{Glc}_1\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$ dependiendo de las especies) (Parodi y Cazzulo, 1982). La formación transitoria de $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$ también fue detectada en células de mamífero incubadas con el mismo precursor radioactivo (Parodi *et al*, 1983 b; Parodi *et al*, 1984). En todos los tipos celulares, los compuestos glucosilados radioactivos desaparecieron por "chase" con glucosa no marcada. Como se muestra en la Fig. 3, dos caminos biosintéticos podrían postularse para la formación de estos compuestos. De acuerdo al camino A, podrían generarse por deglucosilación y demanosilación sucesivas de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ o alternativamente, una glucosilación directa de los compuestos no glucosilados podría tener lugar (camino B). Se obtuvieron evidencias con ensayos *in vitro* en células de tiroides de vaca (Parodi *et al*, 1983 b), que mostraron que los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína se generaron por glucosilación directa de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ respectivamente (Fig. 3 camino B) y no por demanosilación sucesiva de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 3 camino A). Entre estas evidencias se encontraba el hecho de que luego de la incubación de las células con [14 C]glucosa, la marca en los residuos de glucosa de los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína aparecía en forma prácticamente instantánea. En cambio, la marca en los residuos de manosa en los oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_{7,8}\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína, apareció mucho más lentamente luego que la marca hubiese aparecido en los mismos residuos de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. El intervalo de tiempo requerido para la marcación de los residuos de manosa y glucosa en los oligosacáridos glucosilados debería haber sido el mismo si estos compuestos se hubieran formado a través del camino A. Un análisis similar realizado con células de *Trypanosoma cruzi* (Parodi *et al*, 1983 a) también mostró que los oligosacáridos monoglucosilados se formaban por el mecanismo delineado en la Fig. 3 camino B.

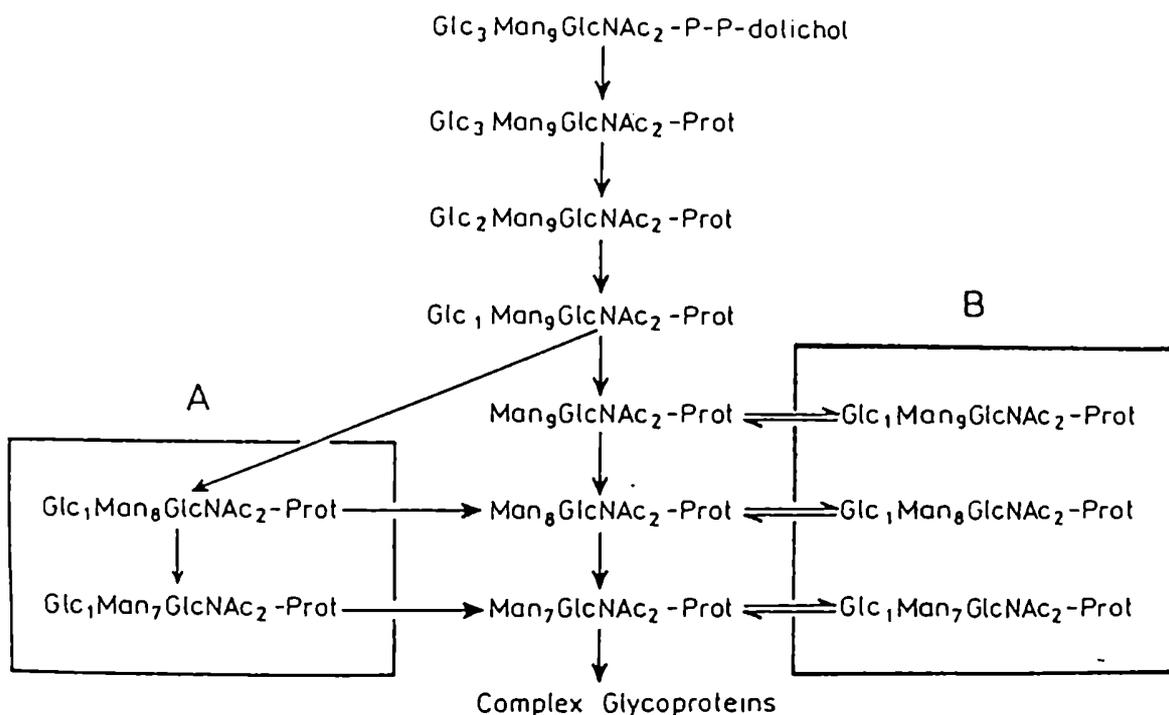


Figura 3. Mecanismos posibles para la formación de compuestos glucosilados

La reacción de glucosilación fue luego detectada en células de hígado de rata (Parodi *et al*, 1984), lo que permitió un fraccionamiento celular que ubicó la actividad en el RE. Utilizando estas membranas microsomales como sistema, se demostró la no intervención de derivados del dolicol en la reacción de glucosilación y se obtuvieron evidencias que señalaban al UDP-Glc como el dador de glucosa en dicha reacción. Se observó además que la presencia de iones Ca^{2+} era estrictamente requerida para que la reacción tuviera lugar (Trombetta *et al*, 1989).

El desarrollo posterior de un ensayo *in vitro* libre de células, permitió la detección de esta actividad glucosilante en fracciones microsomales de células de mamíferos, plantas, hongos y protozoos. Este ensayo libre de células utilizaba una proteína exógena, la tiroglobulina bovina (una glicoproteína con oligosacáridos tipo alta manosa) como sustrato aceptor de glucosa y UDP-Glc como sustrato dador (Trombetta *et al*, 1989). Es importante mencionar que se ha descrito un

transportador de UDP Glc que transloca el nucleótido azúcar desde el citosol al lumen del RE (Pérez y Hirschberg, 1986 a; Pérez y Hirschberg, 1986 b).

Fue durante el desarrollo del ensayo *in vitro* que se hizo la interesante observación de que la tiroglobulina debía ser previamente desnaturalizada para servir eficientemente como sustrato aceptor. La tiroglobulina nativa era muy pobremente glucosilada.

La proteína responsable de la actividad glucosilante, la UDP-Glc:glcoproteína glucosiltransferasa fue posteriormente purificada a homogeneidad a partir de hígado de rata (Trombetta y Parodi, 1992). La enzima resultó ser una proteína soluble del RE (Trombetta *et al*, 1991) conformada por dos subunidades idénticas de aproximadamente 150 kDa de peso molecular (Trombetta y Parodi, 1992). La actividad fue estrictamente dependiente de Ca^{2+} . El único dador de azúcar eficiente fue el UDP-Glc (TDP-Glc, ADP-Glc y UDP-Gal fueron ineficientes). La máxima actividad se registró a pH neutro y los productos de reacción formados por la preparación homogénea de enzima resultaron ser los mismos descriptos para las preparaciones crudas, es decir $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ que se generaron a partir de las correspondientes especies no glucosiladas unidas a proteína (Trombetta y Parodi, 1992). En todos los casos el resto de glucosa se une con el mismo tipo de unión $\alpha(1-3)$ y al mismo residuo de manosa que en el intermediario $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-dolico}$ (Fig. 4 y Fig 2). Este y otros resultados indican que la glucosidasa II es la enzima que hidroliza *in vivo* los residuos de glucosa transferidos por este mecanismo. Posteriormente se demostró que el efecto de la desnaturalización no se debe a que esta vuelve accesibles los oligosacáridos que pudieran estar no disponibles en la estructura nativa. Un estudio detallado de las bases moleculares del reconocimiento de glicoproteínas desnaturalizadas por la glucosiltransferasa permitió establecer que: (a) No existe ninguna secuencia consenso de aminoácidos que sea reconocida por la enzima. (b) La glucosiltransferasa reconoce el residuo mas interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos de las glicoproteínas sustrato. Esto le permite distinguir entre glicoproteínas desnaturalizadas y proteínas desnaturalizadas dado que las proteínas no contienen este residuo. (c) La glucosiltransferasa interactúa con aminoácidos hidrofóbicos. Esto y otros datos mostrados, sugiere que los residuos hidrofóbicos expuestos en las conformaciones no nativas de las glicoproteínas podrían ser el otro elemento reconocido por la enzima para seleccionar estas estructuras. (d) La enzima requiere que la N-acetilglucosamina y los amino ácidos estén unidos covalentemente (Sousa y Parodi, 1995).

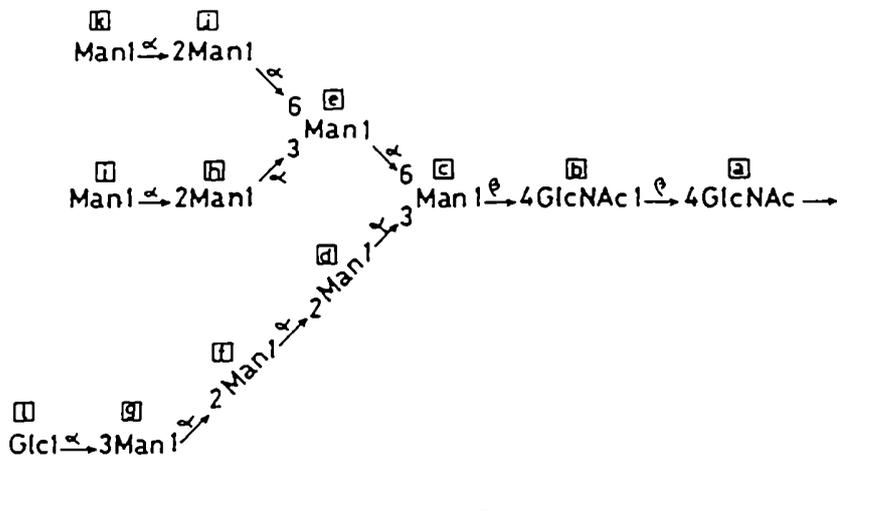


Figura 4. Estructura del producto $Glc_1Man_9GlcNAc_2$

Las glicoproteínas mal plegadas sufren ciclos de deglucosilación y reglucosilación en el RE.

Como se mencionó anteriormente, la remoción de los residuos de glucosa de los oligosacáridos transferidos a proteína ocurre en los primeros minutos luego de la síntesis. Sin embargo, cuando las glicoproteínas permanecen mal plegadas son incompetentes para el transporte, y permanecen retenidas dentro del RE. Suh y colaboradores (Suh *et al*, 1989) demostraron que una mutante termosensible de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, quedaba retenida dentro del RE a la temperatura no permisiva debido a que su estructura aberrante no permitía la trimerización. El ensamblado de esta glicoproteína en un trímero era requerido para el pasaje al aparato de Golgi. El estudio de los oligosacáridos de la proteína G mostró que dichos oligosacáridos permanecen en un estado monoglucosilado ($Glc_1Man_{7-9}GlcNAc_2$) a la temperatura no permisiva. El residuo de glucosa está sometido a rápido recambio debido a una continua deglucosilación y reglucosilación (Suh *et al*, 1989). La deglucosilación es causada por la glucosidasa II y la reglucosilación por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa.

La particularidad de la glucosiltransferasa de reconocer glicoproteínas desnaturalizadas como sustratos *in vitro* hizo especular sobre la posibilidad de que esta enzima estuviera involucrada en los mecanismos mediante los cuales las glicoproteínas se pliegan en el RE o los que permiten el reconocimiento y la

degradación de las estructuras mal plegadas. De esta manera se propuso que la glucosiltransferasa sería un integrante fundamental del llamado mecanismo de control de calidad de glicoproteínas en el RE. En base a este mecanismo las glicoproteínas que no adquiriesen su plegamiento correcto serían reglucosiladas por la glucosiltransferasa. En este estado monoglucosilado serían reconocidas por la calnexina/calreticulina. Sin embargo podrían ser deglucosiladas por la glucosidasa II. Este ciclo de reglucosilación y deglucosilación se mantendría hasta tanto las glicoproteínas adquieren su conformación nativa. Recién entonces dejarían de ser sustrato de la glucosiltransferasa pero mantendrían la capacidad de ser deglucosiladas por la glucosidasa II. En este estado ya no serían reconocidas por la calnexina/calreticulina y así podrían ser secretadas del RE. Si bien los datos bioquímicos obtenidos hasta el momento apoyaban la hipótesis discutida más arriba, no había evidencias *in vivo* que la soportaran. Entonces se buscó un organismo que permitiera hacer una serie de estudios a nivel genético. Fue así que se recurrió a las levaduras. Estas tienen la ventaja de poder aislar mutantes con facilidad y que el efecto de las mutaciones puede ser estudiado *in vivo* sin la interferencia del producto del gen salvaje. Se detectó actividad de glucosiltransferasa en *Schizosaccharomyces pombe*. Este organismo permite realizar toda serie de experimentos de genética clásica y además presenta una serie de ventajas con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*. Ellas son: i) tiene mejor definidas las estructuras del RE y aparato de Golgi, ii) el control del ciclo celular es semejante al de los eucariontes superiores, iii) La maquinaria de síntesis de proteínas de *S. pombe* reconoce varios promotores de mamíferos, iv) es capaz de reconocer y procesar correctamente intrones de genes de mamíferos, v) se han expresado una serie de genes de eucariontes superiores en estas levaduras y han resultado ser funcionales, vi) como se demostrará en este trabajo de tesis, *S. cerevisiae* parece no tener actividad de glucosiltransferasa.

El objetivo de este trabajo de tesis fue caracterizar bioquímicamente la glucosiltransferasa de *Schizosaccharomyces pombe*, y aprovechando las ventajas que ofrecen las levaduras, hacer estudios *in vivo* con el fin de comprender el rol que tiene esta enzima en el metabolismo de las glicoproteínas en el RE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y medios de cultivo

Schizosaccharomyces pombe (PRY208) cepa salvaje fue cedida por el Dr. Carlos Hirshberg, (University of Massachusetts Medical Center, Worcester, MA, USA); *Saccharomyces cerevisiae* cepa salvaje X2180-1B α fue cedida por el Dr. C. E. Ballou, (University of California, Berkeley, CA, USA); las cepas mutantes *alg 5* (PRY98) y *alg 6* (PRY103) fueron cedidas por el Dr. P. Robbins (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA). *S. pombe* SP13 (h⁺/h⁻, ade6-M210/ade6-M216, leu1-32/leu1-32, ura4-D18/ura4-D18) fue del laboratorio del Dr. L. Rokeach de la Université de Montréal, Québec, Canada.

Se usó *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) para todos los procesos de clonado, *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) se usó para el screening de las bibliotecas de cDNA o genómica. Estas estaban construidas en λ ZAP express vector (Stratagene). *Escherichia coli* SOLR (Stratagene) fue usada para plaquear los fagémidos.

Las levaduras fueron crecidas en medio YE: glucosa 3 %, extracto de levadura 0.5 %; Medio YPD: glucosa 3 %, proteosa peptona 3 %, extracto de levadura 1 %; en medio mínimo (MM): KH ftalato 14.7 mM, Na₂HPO₄ 15.5 mM, NH₄Cl 94 mM, glucosa 2 %, sales, minerales y vitaminas (con los suplementos que se indican en cada experimento) o en medio ELN ("extremely low nitrogen") tiene la misma composición que el medio mínimo excepto que la concentración de NH₄Cl fue 50 mg/l.

Las bacterias fueron crecidas en medio LB: NaCl 1 %, triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %; o en medio NZY: NaCl 0.5 %, MgSO₄ 0.2 %, extracto de levadura 0.5 %, caseína hidrolizada 1.0 %.

Standards radioactivos

[*glucosa*¹⁴C]Glc₃Man₉GlcNAc y [*glucosa*¹⁴C]Glc₂Man₉GlcNAc : se obtuvieron a partir de los dolicol-P-P derivados formados por incubación de microsomas de hígado de rata con UDP-[¹⁴C]Glc (Parodi *et al*, 1973), seguidos de una hidrólisis ácida suave, 15 min a 100 °C en HCl 0.01 N y degradación con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) (Sigma).

[*glucosa*¹⁴C]Glc₁Man_{7.9}GlcNAc: fueron preparados incubando tiroglobulina bovina (Sigma) desnaturalizada en urea 8 M con UDP-[¹⁴C]Glc y glucosiltransferasa de hígado de rata purificada parcialmente. Seguido por tratamiento con proteasa de *Streptomyces griseus* tipo XIV (Pronasa) (Sigma) y Endo H como fue descrito anteriormente (Trombetta *et al*, 1989; Trombetta y Parodi, 1992).

[¹⁴C]Man_{5.9}GlcNAc se obtuvieron por incubación de crestas de oviductos de gallina ponedora con [¹⁴C]glucosa como fue descrito anteriormente (Parodi *et al*, 1981). Por degradación con *Jack bean* α -manosidasa (α -manosidasa) (Sigma) de los oligosacáridos glucosilados se obtuvieron Glc₁Man₄GlcNAc y Glc₁Man₅GlcNAc y por degradación de los no glucosilados se obtuvo Man₁GlcNAc.

Métodos

La hidrólisis ácida fuerte fue hecha en HCl 1 N por 4 h a 100 °C. Las cromatografías y las electroforesis se desarrollaron en papel Whatman 1. Los solventes utilizados fueron: A : 1-propanol/nitrometano/agua (5:4:2); B: 1-butanol/piridina/agua (4:3:4) y C: 1-butanol/etanol/agua (4:1:1). La degradación de oligosacáridos con α -manosidasa se realizó como se describió previamente (Engel y Parodi, 1985). La tiroglobulina y/o glicoproteínas microsomales endógenas marcadas *in vitro* con UDP-[¹⁴C]Glc, se degradaron con Pronasa y los glicopéptidos obtenidos se trataron con Endo H como fue descrito previamente (Trombetta *et al*, 1989; Sousa *et al*, 1992). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951) con albúmina de suero bovino (BSA) como standard.

Preparación de Glicopéptidos de tipo alta manosa

Se incubaron 100 mg de tiroglobulina bovina en 3.5 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 8.0, CaCl₂ 2 mM, 2 mg de Pronasa durante 4 días a 37 °C en atmósfera de tolueno. La reacción se calentó 5 min a 100 °C y se sembró en una columna de Concanavalina A-Sepharosa (Con A) (Pharmacia) de 0.5 x 7 cm equilibrada en buffer Con A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM). La columna se lavó con 20 ml del mismo buffer y luego con 15 ml de buffer Con A conteniendo α -metilglucósido (Sigma) 10 mM. Los glicopéptidos de tipo polimansosa se eluyeron con 20 ml de buffer Con A conteniendo

α -metilmanósido 0.1 M. Este eluido se dividió en dos, cada una de las mitades se concentró a 0.5 ml y se pasaron por una columna de Sephadex G-10 fino (Pharmacia) equilibrada y corrida en isopropanol 7 %. Se reunieron los excluidos conteniendo glicopéptidos, se concentraron y se determinó la concentración de azúcares. El rendimiento en glicopéptidos (mg de azúcar en los glicopéptidos/mg proteína) estimado usando [^{14}C]Glc₁Man₉GlcNAc como standard interno, fue de 1.5-2 % y concuerda bien con lo descripto (Arima *et al*, 1972).

Preparación de lectinas

La aglutinina de porotos de soja (SBA) fue preparada como se describió anteriormente (Gordon *et al*, 1972). La lectina fue luego purificada por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B (Sigma). La fitohemaglutinina (PHA) se preparó esencialmente según lo descripto por Felsted (Felsted *et al*, 1975). El paso final de purificación fue una cromatografía de afinidad en tiroglobulina-Sepharosa. Ambas lectinas resultaron purificadas a homogeneidad a juzgar por el análisis en SDS-PAGE.

Desnaturalización de glicoproteínas

Las glicoproteínas (tiroglobulina, PHA o SBA) fueron disueltas en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.0, urea 8 M y calentadas a 60 °C durante 4 h. Luego se dializó la solución contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 8.0.

Degradaciones con tripsina

Las mezclas de reacción contenían, en un volumen total de 0.4 ml, 3.5 mg de la correspondiente glicoproteína desnaturalizada, CaCl₂ 10 mM, 0.2 mg de tripsina de páncreas bovino (Sigma) libre de quimotripsina y buffer Tris-HCl 100 mM pH 8.0. El inhibidor de tripsina de porotos de soja tipo I-S (Sigma) (0.5 mg) se agregó luego de 4 h a 37 °C. En los controles sin digerir, el inhibidor se agregó antes que la tripsina.

Ensayo de Glucosiltransferasa

En un ensayo típico la actividad de glucosiltransferasa se midió en un volumen de 50 μ l de una mezcla conteniendo buffer Imidazol-HCl 10 mM pH 7.2, CaCl_2 10 mM, UDP-[^{14}C]Glc 4 μ M, 200 mg de tiroglobulina bovina, SBA o PHA desnaturalizadas y la preparación a ser ensayada. Si es necesario, como en el caso de usar membranas no permeabilizadas como fuente de enzima, se incluyó Lubrol o Triton X-100 0.5 % en las mezclas de reacción. Se incubaron por 10 minutos a 28 °C y se detuvo la reacción con 1 ml de TCA 10 %. El precipitado proteico se lavó 3 veces con 1 ml de TCA 10 %. El precipitado del último lavado se disolvió en 0.5 ml de una mezcla solubilizadora (Hyamina[®] o Protosol[®]), se calentó a 100 °C por un 1 min y luego se agregaron 3 ml de la solución centelladora (tolueno/PPO/POPOP), 15 μ l de acético glacial y se contó por centelleo líquido.

Marcación in vivo de Saccharomyces cerevisiae

Se crecieron células de *S. cerevisiae* (aproximadamente 2.0 g) en medio YE hasta fase exponencial, se lavaron tres veces con 40 ml de MM y se incubaron por 15 min a 28 °C en un volumen total de 4.7 ml de MM mas DNJ (Sigma) 3.6 mM. Se agregaron 500 μ Ci de [^{14}C]glucosa, luego de 15 min a 28 °C se agregaron 10 ml de metanol, el precipitado fue resuspendido en 1 ml de agua, luego se agregaron 2 ml de metanol y 3 ml de cloroformo. Las mezclas fueron agitadas vigorosamente y centrifugadas a baja velocidad. Se retiraron las interfases y se lavaron tres veces con 4 ml de metanol y una vez con 1 ml de agua. Las proteínas así obtenidas fueron incubadas toda la noche a 37 °C en 3 ml de buffer Tris-HCl 0.15 M pH 8.0, CaCl_2 5mM y 50 mg de Pronasa. Las soluciones fueron concentradas a un volumen final de 1 ml, luego se centrifugó a baja velocidad y los sobrenadantes fueron desalados a través de una columna de Sephadex G-10 (1.2 x 57 cm), equilibrada con 2-propanol 7 %. El material obtenido en el volumen de exclusión fue sometido a electroforesis en papel en de ácido fórmico 10 % por tres horas a 25 V/cm. Las sustancias cargadas positivamente que migraron entre 8-20 cm hacia el cátodo, fueron eluidas y tratadas con Endo H (0.01 Unidades) en 0.3 ml de buffer acetato de trietilamina 75 mM pH 5.5 por 16 h a 37 °C. Esta reacción se corrió nuevamente en electroforesis en papel en ácido fórmico 10 % a 25 V/cm durante tres horas. El pico neutro corresponde a los oligosacáridos liberados por la Endo H.

Preparación de microsomas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* y mezclas de incubación usadas para la caracterización de los productos de reacción.

Los microsomas de *S. cerevisiae* se prepararon como se indica para el primer paso de la purificación de la glucosiltransferasa de *S. pombe*. Las mezclas de incubación contenían: 6.5 mg de proteína microsomal, CaCl₂ 12.5 mM, buffer Tris-HCl 2.5 mM pH 8.0, Triton X-100 0.75 %, DNJ 1.25 mM, UDP-[¹⁴C]Glc 1 μCi y 2.6 mg de tiroglobulina desnaturalizada donde corresponde. Las incubaciones se hicieron a 28 °C por 30 min. La reacción se detuvo por el agregado de 3 volúmenes de metanol y se calentaron a 50 °C durante 5 min. El precipitado proteico se degradó en 3 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, CaCl₂ 2 mM y 2 mg de Pronasa por 48 h a 37 °C bajo atmósfera de tolueno y se procesó como se describe mas arriba.

Purificación de UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de Schizosaccharomyces pombe

Preparación de microsomas

Se crecieron células de *S. pombe* en medio YE, se cosecharon las células por centrifugación, obteniéndose aproximadamente 10 g de células por litro de medio de cultivo. Se obtuvieron un total de 350 g de células. Se lavaron con agua, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 volumen de imidazol-HCl 20 mM pH 7.2, sacarosa 0.25 M, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 5 mM pH 7.5 (solución A) conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas, TLCK 1 mM, TPCK 1 mM, PMSF 1 mM, E-64 1 μM, leupeptina 10 μM, pepstatina 1 μM. Las células se rompieron por 10 pulsos de 1 minuto cada uno en un Bead Beater (Biospec Products). El homogenato se centrifugó 10 min a 15.000 x *g* a 4 °C. El sobrenadante se guardó y el precipitado se resuspendió en la solución A en presencia de los inhibidores de proteasas. Se lo trató de la misma manera que antes con el Bead Beater y se centrifugó nuevamente. Se juntaron los dos sobrenadantes y se ultracentrifugaron 1 h a 100.000 x *g* a 4 °C.

Solubilización de la glucosiltransferasa

El precipitado obtenido en el paso anterior se resuspendió en el mínimo volumen posible de la solución A con ayuda de un homogeneizador (Potter) vidrio- *Teflon*[®]. Se diluyó hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 8-10 mg/ml con imidazol-HCl 20 mM pH 7.2, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 5 mM pH 7.5 (solución B) y saponina 0.5 % en presencia de los inhibidores de proteasas. Se incubó la preparación a 4 °C durante 30 min con agitación y luego se ultracentrifugó 1 h a 100.000 x *g* a 4 °C.

DEAE-celulosa:

El sobrenadante del material solubilizado se sembró en una columna de DEAE-celulosa pre-equilibrada en imidazol-HCl 20 mM pH 7.2, 2-mercaptoetanol 5 mM (solución B). El 2-mercaptoetanol resultó necesario para aumentar la estabilidad de la enzima y para permitir una buena resolución en las sucesivas cromatografías, por lo que se lo incluyó en los buffers de todos los pasos de purificación. Generalmente se utilizó una columna de 1.8 x 20 cm en la que se cargaron hasta 400 mg de proteínas totales. Luego de lavarla con un volumen de columna de solución B, se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 250 ml entre 0 y 0.5 M en solución B. Se utilizaron distintos tipos de soportes con iguales resultados: DE-52 (Whatman), DEAE-Sephacel o DEAE-Sepharosa Fast Flow (Pharmacia). Dependiendo de la cantidad de muestra a cromatografiar, se emplearon columnas de diferentes dimensiones con resultados semejantes, eluyendo siempre con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M de 5 volúmenes de columna.

Con A-Sepharosa:

El pico de actividad eluído de la DEAE se llevó a CaCl₂ 2 mM, MnCl₂ 2 mM y MgCl₂ 2 mM. Se lo pasó 2 veces por una columna de Con A de 1.6 x 2 cm equilibrada en buffer Con A (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM). Se lavó con buffer Con A hasta absorbancia a 280 nm = 0 y luego se pasaron por la columna 5 ml de buffer Con A conteniendo α -metilmanósido 0.8 M a 0 °C. Luego se dejó la columna a 37 °C durante 30-60 min al cabo de los cuales se eluyó a 37 °C con buffer Con A conteniendo α -metilmanósido 0.8 M.

Mono Q:

Se utilizó una columna Mono Q[®] HR 5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 1 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. El pico de actividad eluido de la Con A se diluyó a la mitad con Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 2-mercaptoetanol 5 mM (solución B) y se sembró en la columna equilibrada en la misma solución. Se eluyó con un gradiente de NaCl en solución B, de 0 a 0.25 M en 5 min y luego de 0.25 M a 0.45 M en otros 20 min (25 min en total). En algunas ocasiones el pico de actividad eluido de esta primera Mono Q se recromatografió en idénticas condiciones (se diluyó con 4 volúmenes de solución B para sembrarlo en la columna).

Phenyl-Superose:

Se utilizó una columna Phenyl-Superose[®]; HR 5/5 (Pharmacia) corrida a un flujo de 0.5 ml/min en un equipo de FPLC o de HPLC con monitoreo continuo a 280 nm. El pico de actividad eluido de la Mono Q se diluyó con 10 volúmenes de sulfato de amonio 0.5 M, 2-mercaptoetanol 5 mM, Imidazol-HCl 10 mM pH 7.0 (solución C) y se sembró en la columna equilibrada en el mismo buffer. Se eluyó con un gradiente lineal de 20 ml desde 100 % solución C hasta 100 % solución D (sacarosa 5 %, 2-mercaptoetanol 5 mM, Imidazol-HCl 10 mM pH 7.0) y luego se continuó la elución con solución D.

Tamiz molecular:

Las fracciones con mayor actividad de glucosiltransferasa obtenidas en la Phenyl-Superose del paso anterior, fueron sembradas en una columna Bio-Sil SEC 250 (Bio-Rad) y eluidas con Imidazol HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.1 M, 2-mercaptoetanol 5 mM, sacarosa 5 % (solución F).

Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Se utilizaron geles de poliacrilamida de 8 x 10 x 0.1 cm con sistema de buffer discontinuo. Los geles se fijaron con metanol/ácido acético/agua (50:10:40), luego se tñieron con Coomassie Blue R-250 (Sigma) al 0.1 % en la misma solución y se destñieron en la solución de fijación.

Para transferir las proteínas se corrió la muestra en SDS-PAGE y luego se transfirió en un aparato de electrotransferencia semisecca *Semipor*[™] TE 77 (Hoefer). Se utilizó el

buffer de electroforesis conteniendo metanol 10 % y se transfirió durante 30 min a 80 mA (10 volts iniciales) a una membrana de PDVF (*ProBlot*™, Applied Biosystems). La membrana se tiñó con Coomassie Blue R-250 al 0.1 % en metanol/ácido acético/agua (50:10:40) por 1 min y se destiñó en la misma solución pero sin colorante y luego se enjuagó con agua destilada. Se recortó la banda correspondiente a la glucosiltransferasa y se utilizó para obtener la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína.

Digestión en gel (SDS-PAGE) y aislamiento de péptidos

Se purificó la glucosiltransferasa hasta la columna de Mono Q, siguiendo el protocolo que se describe mas arriba. Las fracciones con mas actividad se incubaron con 1 µl de vinilpiridina (Sigma) y se analizaron en un SDS-PAGE al 7.5 %. Se identificaron por tinción con Coomassie blue las bandas correspondientes a la enzima y se cortaron del gel. Estas se lavaron 2 veces con 200 µl de acetonitrilo 50 % en carbonato de amonio 200 mM pH 8.9, durante 20 min a 30 °C. Los fragmentos de gel se secaron completamente con N₂ y se rehidrataron con 3 µl de carbonato de amonio 200 mM pH 8.9 conteniendo 0.02 % de Tween-20. Se agregaron 2 µl de tripsina (250 mg/ml en carbonato de amonio 200 mM pH 8.9) se continuó la hidratación con el agregado de buffer carbonato hasta aproximadamente 30 µl finales y se incubó toda la noche a 30 °C. Para detener la reacción se agregó 1/10 vol de TFA 10 %. Se tomó el sobrenadante (donde se encuentran los productos de la digestión) y se extrajeron nuevamente los fragmentos del gel por el agregado de 150 µl de TFA 0.1 %, acetonitrilo 60 %. Se combinaron los sobrenadantes y se evaporó la fase orgánica. Los péptidos generados se separaron en una columna Aquapore Butyl (Brownlee™ RP-butyl 300, 7 micrones, Applied Biosystems) de 2.1 x 30 mm. Esta fue eluída con un gradiente lineal de isopropanol-TFA 0.1 % y se microsecuenciaron de acuerdo a Hellman *et al*, (1995).

Preparación de DNA genómico de S. pombe

Se transfirió una colonia de *S. pombe* SP 13 a 10 ml de medio YE suplementado con adenina (20 mg/l) y se creció a 28 °C toda la noche. Con 1 ml de este precultivo se inocularon 50 ml del mismo medio y se creció por 6 horas mas. Se cosecharon las

células por centrifugación (10 min a 5000 rpm) y se lavaron con solución SP1 (sorbitol 1.2 M, citrato de sodio 50 mM, fosfato de sodio 50 mM, EDTA 40 mM, pH final 5.6). Se centrifugó para eliminar la solución SP1 y el precipitado se resuspendió en 10 ml de SP2 (sorbitol 1.2 M, citrato de sodio 50 mM, fosfato de sodio 50 mM, pH final 5.6) conteniendo 20 mg de Novozym 234 (Sigma). Se incubó la suspensión de células por 1 h a 37 °C. Se centrifugó por 5 min a 3000 rpm. Se resuspendió el precipitado en 7.5 ml de buffer TE 5X (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM) y se agregaron 0.75 ml de SDS 10 %. Se agregaron 2.5 ml de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó para eliminar los restos celulares y se agregaron al sobrenadante 10 ml de isopropanol a 4 °C. Se mantuvo a esa temperatura durante 15 min. Se centrifugó por 15 min a 8000 rpm para precipitar los ácidos nucleicos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Se resuspendió el material en 3.0 ml de TE 5X y se agregó RNAsa hasta una concentración final de 0.02 mg/ml. Se incubó con esta enzima durante 1 h a 37 °C. Luego de este tiempo se agregó 0.1 ml de SDS 10 % y proteinasa K (Sigma) (concentración final 0.05 mg/ml), se incubó en estas condiciones a 50 °C por lo menos durante una hora. Se agregaron 3.0 ml de fenol equilibrado en TE 5X, se agitó con cuidado y se centrifugó. Se descartó la fase fenólica y la fase acuosa se extrajo con fenol, de la misma manera, tres veces mas. Se precipitó el DNA agregando 1/10 vol de NaCl 5 M y 2.5 vol de etanol 100 % y efectuando un suave movimiento del tubo. Se centrifugó a 8000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con etanol 75 % y se secó al vacío. Se resuspendió el DNA en 0.2 ml de agua y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 280 nm.

Preparación de RNA de S. pombe y su utilización

Se transfirió una colonia de *S. pombe* a 10 ml de medio YE y se creció hasta una $DO_{600\text{ nm}} = 1.0$. Se centrifugó por 5 min a 7000 rpm a 4 °C, el precipitado se lavó con agua a 4 °C y se centrifugó nuevamente. Las células se resuspendieron en 0.3 ml de buffer RNA (NaCl 0.5 M, Tris-HCl 200 mM pH 7.5, EDTA 10 mM), se agregó el equivalente a 0.2 ml de bolitas de vidrio (de aproximadamente 0.5 mm de diámetro) y 0.3 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1). Se rompieron las células mediante agitación en un vortex (10 ciclos de 1 min cada uno con interrupciones de 2 min a 4 °C). Se centrifugó a temperatura ambiente 1 min y se retiró la fase acuosa. Se agregó 1 vol de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1), se agitó y se

centrifugó nuevamente por 1 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se le agregó 2 vol de etanol 100 %. Se mantuvo el tubo a -20 °C por 1 h. Se centrifugó 10 min a 4 °C y el precipitado se lavó dos veces con etanol 70 %. El precipitado se resuspendió en 0.1 ml de agua y se trató con DNAsa por una hora. Se extrajo la DNAsa y el RNA se precipitó nuevamente. Este RNA fue utilizado para las reacciones de obtención de cDNA como para la realización del Northern blot.

cDNA: Se incubaron 5 µg de RNA total con 1 µl de oligo dT (Gibco) en un volumen de 13 µl a 70 °C por 10 min, se transfirió la mezcla a 4 °C y se agregaron los siguientes reactivos: 2 µl de buffer de síntesis 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM, MgCl₂ 25 mM, BSA 1 mg/ml), 1µl dNTP 100 mM, 2 µl DTT 0.1 M, 1 µl SUPERSRIPT II RT (200 U/ml) (Gibco). Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y luego a 42 °C por 50 min. Se detuvo la reacción por calentamiento a 70 °C durante 15 min. Finalmente se agregó 1 µl de RNAsa H (Gibco) y se incubó a 37 °C por 20 min. Para las reacciones de PCR se utilizaron 1 o 2 µl de esta reacción.

Northern blot: Cultivos de *S. pombe* SP 13 crecidos en medio mínimo (MM) suplementado con adenina (ade) 20 mg/l, uracilo (ura) 20 mg/l y leucina (leu) 30 mg/l a 28 °C hasta fase exponencial fueron sometidos a diferentes tratamientos. En el caso de las células control se incubaron por 2 h a 28 °C. Los cultivos utilizados para el shock térmico se incubaron por 5, 10 o 60 min a 39 °C. En otros casos las células fueron crecidas en presencia de tunicamicina 10 µg/ml, A231187 10 µM o 2-mercaptoetanol 15 mM por 2 h a 28 °C. Para el análisis del efecto de otros compuestos las células se centrifugaron, se lavaron y resuspendieron en medio mínimo sin glucosa, suplementado con glicerol 3 % y ácido láctico 2 % en presencia o ausencia de 2-deoxiglucosa 10 mM. Luego de esto la incubación se prolongó por dos horas mas. Se extrajo el RNA de las células como se indica mas arriba. Se sembraron 3.0 µg de RNA total de cada uno de los tratamientos.

Procedimientos con DNA

Las sondas se marcaron usando el kit Prime-a-Gene[®] Labeling System (Promega) . El DNA doble cadena se secuenció usando Sequenase version 2.0 (USB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las enzimas de restricción y modificadoras (New England Biolabs) fueron usadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de las reacciones de PCR se ligaron al vector pGEM[®]-T VECTOR SYSTEM

1 (Promega) (vector T). Las técnicas de Southern y Northern blot fueron realizadas como fue descrito por Sambrook *et al*, 1989.

Reacción de PCR

Se utilizó como templado DNA genómico o cDNA. El templado fue calentado a 95 °C por 5 minutos en un volumen final de 45 µl conteniendo 250 mM de cada uno de los dNTP, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM y 5 µg de cada oligonucleótido o lo que corresponda en cada caso, luego de los 5 min a 95 °C se agregaron 5 µl que contenían 2.5 unidades de Taq polimerasa (Perkin Elmer) y se realizaron de 25 a 30 ciclos. La temperatura de hibridización utilizada se detalla en cada caso en particular. Luego se incubó por 10 min a 72 °C y se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa.

Screening de las bibliotecas de cDNA y genómica

Se transfirió 1 colonia de *E. coli* XL1-Blue MRF^r a 50 ml de LB suplementado con de maltosa 0.2% (v/v) y MgSO₄ 10 mM, se creció toda la noche a 30 °C. Se centrifugaron las células a 2000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió suavemente en aproximadamente 25 ml de MgSO₄ 10 mM hasta una OD_{600nm}=0.5. Se inocularon 0.6 ml de las células resuspendidas en MgSO₄ con 1 ml de una dilución apropiada de fagos (30000 ufp/ml) y se incubó a 37 °C por 15 min para permitir que los fagos se adhieran a las células. Luego se agregaron 7.0 ml de Top Agarosa (medio NZY con agarosa 0.7 %) que había sido precalentado a 42 °C y se plaqueó sobre cajas de Petri que contenían medio NZY. Se incubó a 37 °C por 8 h. Transcurrido este tiempo las cajas se enfriaron a 4 °C por dos horas. Se transfirieron los fagos a membranas de nitrocelulosa, las membranas fueron mantenidas sobre las cajas de Petri por 2 min la primera y por 4 min el duplicado, luego se desnaturalizó el DNA adsorbido sumergiéndolas en NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M por 2 min. Se neutralizó en NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 por 5 min y se lavó en Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, 2X SSC (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.04 M pH 7.0) por 30 seg. Seguidamente las membranas fueron homeadas a 80 °C por 2 h.

Prehibridización: Las membranas de nitrocelulosa fueron prehibridizadas a 42 °C por 2 h en una solución que contenía: buffer Pipes 2X (NaCl 0.8 M, Pipes 20 mM

pH 6.5), formamida deionizada 50 %, SDS 0.5 %, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml. Se utilizaron a razón de 3 ml de solución de prehibridización por membrana.

Hibridización: Se marcaron con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP diferentes fragmentos de DNA (ver cada experimento en particular) por random priming. La sonda radioactiva se hirvió durante 5 min y se agregó a la solución de prehibridización que contenía las membranas. Se incubó a 42 °C durante toda la noche.

Lavados: Las membranas se lavaron con una solución de SSC 0.1X y SDS 0.1 % a 65 °C durante 30 min. Esto se repitió 3 veces y luego se expusieron con una placa radiográfica Kodak X-OMat-AR por 24 h a -80 °C.

Se revelaron las placas radiográficas y se aislaron los fagos positivos. Se sometieron a tres rondas de screening de la misma manera que antes. Una vez aislados los fagos de interés se escindieron en forma de plásmido. Para ello se creció un cultivo de *E. coli* XL1-Blue MRF' toda la noche en medio LB. Se centrifugó y las células se resuspendieron en MgSO₄ 10 mM hasta una OD_{600nm}=1.0. También se creció un cultivo de *E. coli* SOLR en medio LB hasta una OD_{600nm}=0.5. Se combinaron en un tubo 0.2 ml de las células XL1-Blue MRF' con 0.25 ml de cada uno de los fagos aislados en el screening y 1 µl de ExAssist helper phage (Stratagene) y se incubó por 15 min a 37 °C. Se agregaron 3 ml de medio LB y se incubó por tres horas más a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las células y el sobrenadante se calentó a 70 °C por 15 min. Con 0.1 ml de este sobrenadante se inocularon 0.2 ml de las células SOLR y se incubó por 15 min a 37 °C. Luego se sembraron 20 µl de estas células sobre placas de Petri conteniendo LB-ampicilina (50 µg/ml). Las colonias que crecen en este medio contienen el cDNA como un inserto en el plásmido pBluescript® SK. Para el caso de la biblioteca genómica los 20 µl se sembraron sobre placas de Petri conteniendo LB-kanamicina (50 µg/ml). Las colonias que crecen en este medio contienen el DNA genómico como un inserto en el plásmido pBK-CMV.

Disrupción del gen gpt1

El fragmento del gen *gpt1* de 2903 pb obtenido por PCR que estaba clonado en el vector T fue digerido con Nhe I y Eco RV. De esta manera se eliminaron 966 pb y fueron reemplazadas por 1700 pb correspondientes al gen *ura 4*. El plásmido fue posteriormente cortado con Xba I y Sal I. Así se obtuvo un fragmento lineal de 3100 pb que contenía al gen *ura 4* flanqueado por 400 pb hacia el 5' y 1000 pb hacia

el 3' correspondientes al gen *gpt1*. Con esta construcción se transformó la cepa diploide SP13 (ura⁻) de *S. pombe* y se seleccionaron las células ura⁺. Se extrajo el DNA cromosomal de las células transformadas y de las células parentales, se los digirió con Bgl II y se los analizó por Southern blot. Se los hibridizó con una sonda de 1200 pb correspondiente al gen *gpt1* y con una sonda que comprendía al gen *ura 4*. Las células heterocigotas que llevaban la disrupción en el gen *gpt1* fueron crecidas en medio ELN (bajo en nitrógeno) para inducir la esporulación. Luego de dos días las células fueron incubadas en 1ml de acetato de sodio 100 mM pH 5.5 conteniendo 10 µl de β-glucuronidasa (Sigma) durante 12 h a temperatura ambiente. La digestión se examinó con un microscopio. Aproximadamente 250 esporas fueron lavadas y plaqueadas en medio mínimo con y sin uracilo para determinar el genotipo de la progenie.

Construcción de los plásmidos de expresión

El plásmido pBluescript SK que tiene el cDNA del gen *gpt1* aislado del screening de la biblioteca de cDNA fue cortado con Xho I. Se trató con Klenow para generar un extremo romo y posteriormente se cortó con BamH I. De esta manera se liberó un fragmento de DNA que contiene al gen *gpt1*. Este tenía el sitio Bam H I en el 5' y el Xho I modificado en el 3'. Cada uno de los plásmidos (pREP 3x, pREP 41x y pREP 81x) fue digerido con Sma I por 2 h a 30 °C. Fueron corridos en un gel de agarosa al 0.7 % en TAE y posteriormente fueron aislados del gel. Luego fueron cortados con Bam H I por 2 h a 37 °C. Se ligó el cDNA de *gpt1* a cada uno de los diferentes plásmidos por 18 h a 16 °C. Se transformó *E. coli* XLI Blue y se seleccionaron las colonias que fueron resistentes a ampicilina. Se extrajo el DNA plasmidico y con él se transformó la cepa de *S. pombe* glucosiltransferasa⁻ según el método de Broker, 1993. Se crecieron las células en medio mínimo suplementado con tiamina 10 µg/ml y adenina 20 mg/l. Luego de 4 días se aislaron algunas colonias positivas. Cada una de ellas se creció en 10 ml de medio mínimo suplementado con tiamina 10 µg/ml y adenina 20 mg/l durante 18 h. Los cultivos se centrifugaron y las células se resuspendieron en 3 ml de medio mínimo sin suplementar. Se tomaron 0.5 ml de esta suspensión y se inocularon en 50 ml de medio mínimo suplementado con adenina 20 mg/l (promotor desreprimido) o 50 ml de medio mínimo suplementado con adenina 20 mg/l y tiamina 10 µg/ml (promotor reprimido). Se crecieron los cultivos por 2 días y se prepararon microsomas como se describió anteriormente. La concentración

final de proteínas de todas las preparaciones fue 25 mg/ml. Se midió actividad de glucosiltransferasa y se analizaron las proteínas en un SDS-PAGE para cada uno de los clones.

RESULTADOS

Purificación a homogeneidad de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de Schizosaccharomyces pombe

Los pasos de purificación utilizados se describen en MATERIALES Y MÉTODOS. El procedimiento seguido es parecido pero no igual al empleado para la purificación de la glucosiltransferasa de hígado de rata (Trombetta y Parodi, 1992). Fue de crucial importancia el agregado de E-64 a las soluciones utilizadas para romper las células y en las que se solubilizó la enzima, dado que la omisión de este inhibidor reduce el rendimiento final y hace prácticamente imposible obtener suficiente cantidad de enzima activa y homogénea. Los perfiles obtenidos en las columnas de Mono Q y Phenyl-Superose se muestran en la Fig. 5 A y B. Como puede verse en el perfil obtenido en Phenyl-Superose se detecta un solo pico de proteína (absorbancia a 280 nm) que coincide con la actividad. Sin embargo en un SDS-PAGE estas fracciones presentaban contaminantes de bajo peso molecular, por lo que se recurrió a un nuevo paso de purificación que consistió en un columna de tamiz molecular. Las fracciones con actividad provenientes de la columna de tamiz molecular Bio-Sil SEC 250 fueron corridas en un SDS-PAGE como se muestra en la Fig. 5 C. Los contaminantes de bajo peso molecular aparecen en la fracción 8 y están ausentes en la fracción 7, donde se obtuvo la mayor actividad de glucosiltransferasa. En las distintas fracciones de esta última columna, como también en los pasos de purificación anteriores se obtuvieron dos bandas de proteínas que coincidían con la actividad (Fig. 5 C). Los pesos moleculares de ambas bandas fueron 158 y 141 KDa. Se secuenció el extremo amino terminal de cada una de estos dos polipéptidos y resultó ser: Ala-Ser/Lys-X-Leu-Asp-X-Lys-Ile-Ala-Ala-X-X-X-Ala para la de mayor peso molecular, y Ala-Lys-Pro-Leu-Asp-Val-Lys-Ile-Ala-Ala-Thr-Phe-Asn para la menor. Esto indicaría que ambas bandas corresponden a la misma proteína. La banda de menor peso molecular posiblemente se produce como un producto proteolítico de la mayor.

El rendimiento obtenido se muestra en la Tabla I. La enzima de *S. pombe* y la de hígado de rata tienen un peso molecular semejante y ambas son eluidas de una columna de intercambio iónico a la misma concentración de NaCl (0.3 M). La glucosiltransferasa sería una proteína soluble del RE, dado que las concentraciones de detergentes que se utilizaron para su extracción no son suficientes para desagregar las

membranas que forman el RE. Esto se confirmó luego al secuenciarse el gen que codifica para la enzima (ver mas adelante). La enzima resultó ser una glicoproteína con oligosacáridos de alta manosa a juzgar por el hecho de quedar retenida en una columna de Con A-Sepharose de la que fue eluída con α -metilmanósido.

TABLA I.
PURIFICACIÓN DE LA GLUCOSILTRANSFERASA

Paso	Proteína	Actividad		Purificación	Rendimiento %
	mg/ml	cpm/10 μ l	cpm/mg (x 10 ⁻³)		
Microsomas	58	6300	108		100
Soluble	12	6200	516	4.8	88
DEAE	4.5	9200	2040	19	68
Con A	0.8	8500	10625	98	40
Mono-Q	0.68	30500	44853	415	8
Phenyl-Sup.	0.35	18500	52853	489	2
Bio-Sil SEC	0.06	5940	99000	916	0.5

Los procedimientos experimentales se detallan en MATERIALES Y MÉTODOS.

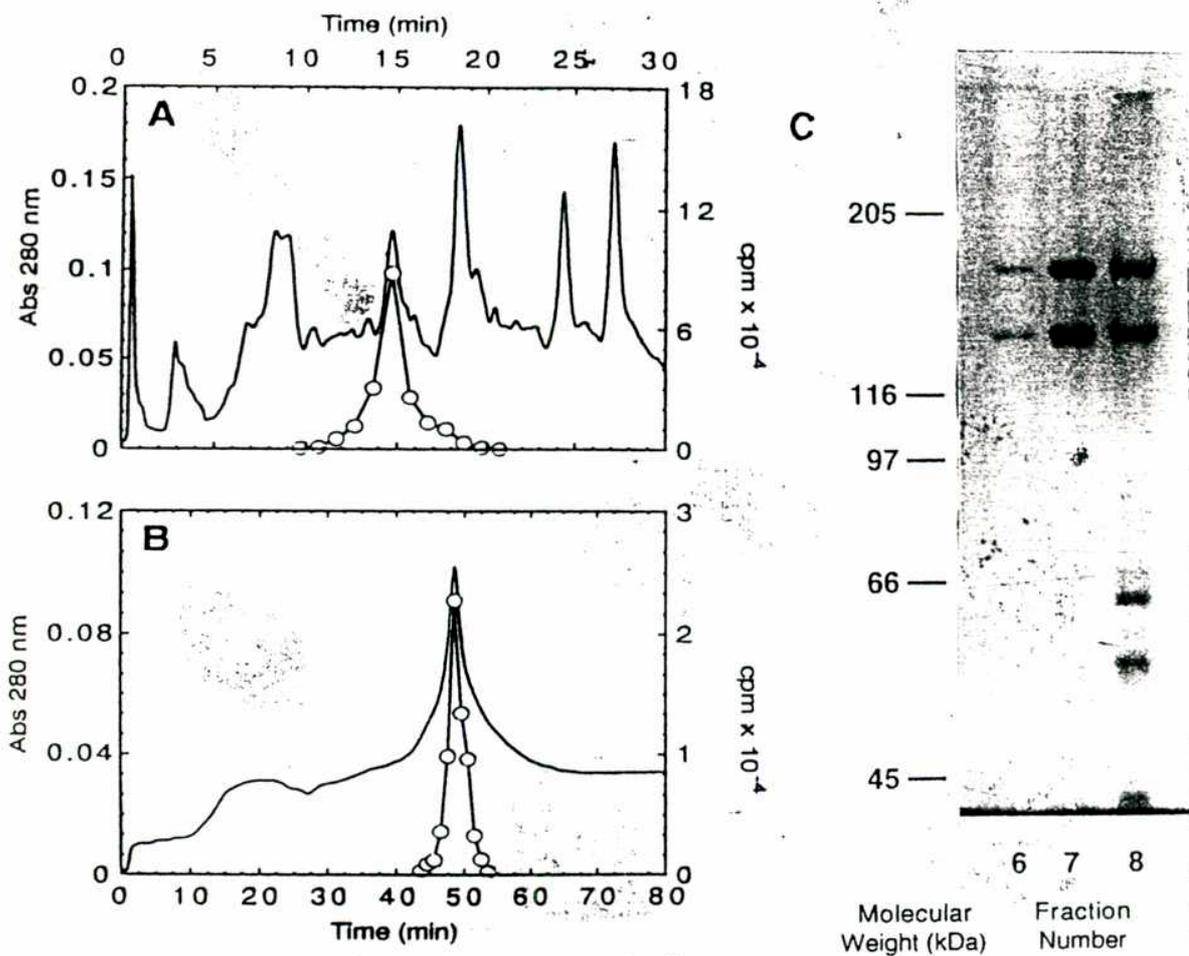


Figura 5. Purificación de la glucosiltransferasa de *S. pombe*

Los paneles A y B corresponden a los perfiles obtenidos en las cromatografías en Mono Q y Phenyl-Superose. Con o-o se representa la actividad enzimática y con línea llena la absorbancia a 280 nm. El panel C corresponde a una electroforesis en gel de poliacrilamida (7.5 %) con SDS y teñido con nitrato de plata. En él se sembraron las fracciones activas de la columna BioSil SEC 250. La actividad enzimática en las fracciones 6, 7 y 8 fueron 5088, 15787 y 9980 cpm respectivamente. Para más detalles ver MATERIALES Y MÉTODOS.

La glucosiltransferasa de S. pombe requiere calcio para su actividad y el pH óptimo es cercano al neutro

La actividad requirió CaCl_2 . La concentración óptima de este ion resultó ser alrededor de 10 mM. Este no pudo ser reemplazado por MgCl_2 o MnCl_2 (Fig. 6 A). La disminución de actividad a altas concentraciones de CaCl_2 pudo deberse a la insolubilización de la tiroglobulina desnaturalizada (apreciable visualmente).

El pH óptimo para la actividad fue cercano al neutro como puede verse en la Fig. 6 B, compatible con la localización subcelular propuesta.

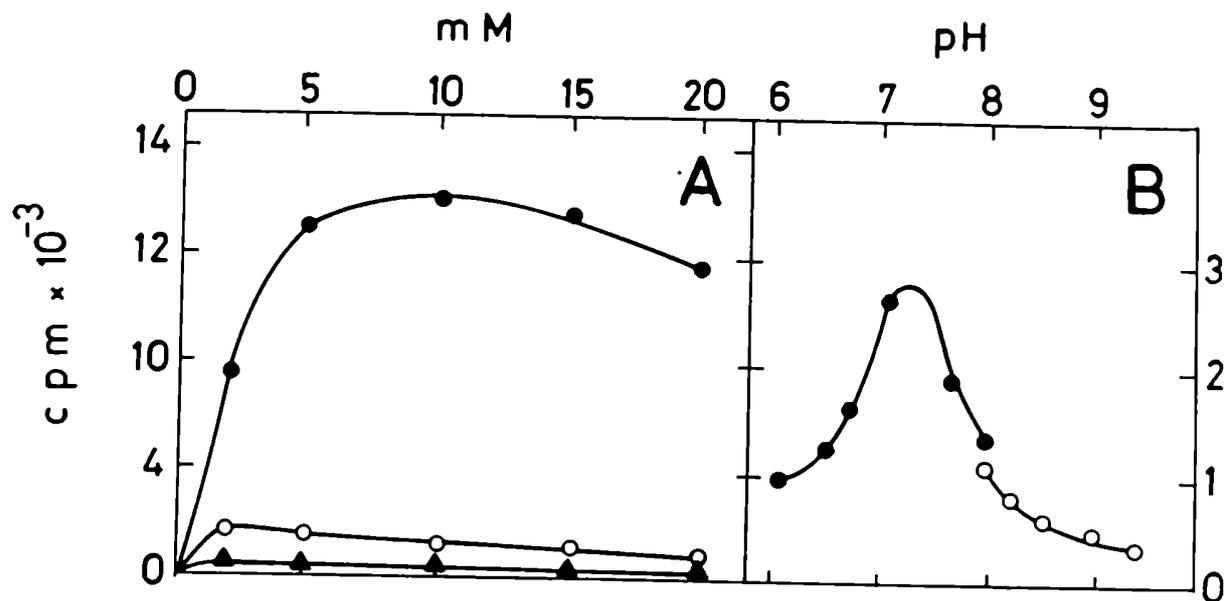


Figura 6. Requerimiento de cationes y curva de pH de la glucosiltransferasa de S. pombe

Panel A. La actividad se ensayó como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" cambiando los cationes y sus concentraciones según el caso. ●-●, CaCl_2 ; ○-○, MgCl_2 ; ▲-▲, MnCl_2 .

Panel B. La actividad se ensayó como se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" cambiando los buffers y los pH según el caso. ●-●, buffer imidazol-HCl 20 mM; ○-○, buffer Tris-HCl 20 mM.

La glucosiltransferasa usa UDP-Glc como dador de Glucosa

El único dador de azúcar efectivo de los ensayados resultó ser UDP-Glc (Fig. 7 A). ADP-Glc, TDP-Glc o UDP-Gal no pudieron actuar como dadores de sus monosacáridos (Fig. 7 A). En el caso del UDP-Gal una hidrólisis ácida fuerte (HCl 1 N a 100 °C durante 4 h) del producto marcado y posterior cromatografía en papel en 1-butanol/piridina/agua (10:3:3), reveló que toda la marca correspondía a glucosa (Fig. 7 B). Esto se debe a que la fuente de enzima utilizada para realizar estos ensayos fue una fracción proveniente de la columna de DEAE que esta posiblemente impurificada con la UDP-Glc-4-epimerasa.

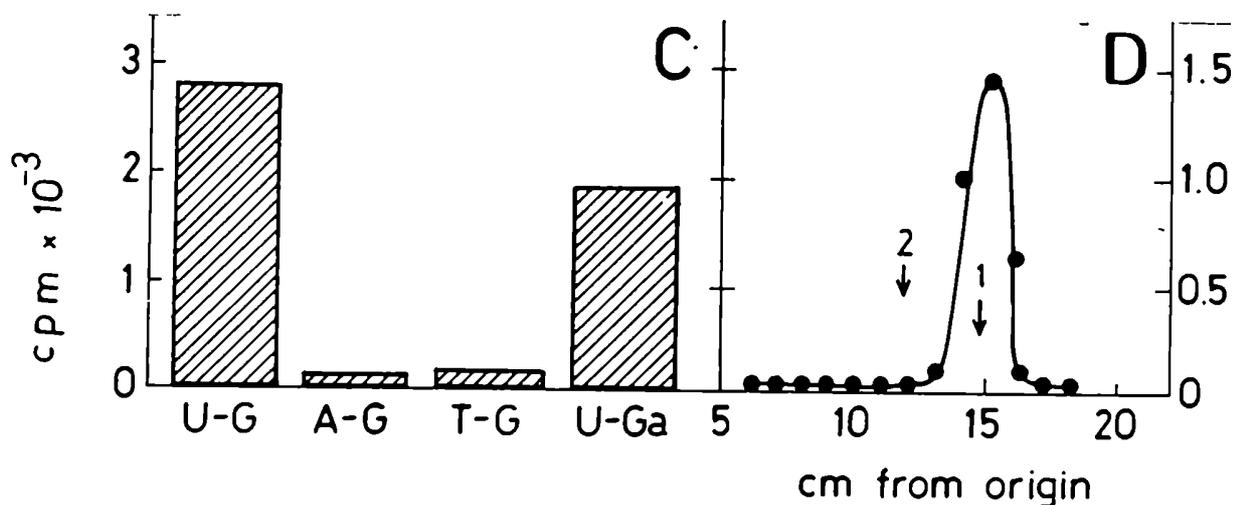


Figura 7. Especificidad de nucleótido azúcares dadores.

Panel A. Los distintos nucleótido azúcares estaban marcados en Glucosa o Galactosa. Se ensayaron en concentración 2.5 μ M como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS, utilizando una fracción de glucosiltransferasa proveniente de la columna de DEAE. U-G, A-G, T-G y U-Ga significan UDP-glc, ADP-glc, TDP-glc y UDP-gal respectivamente. Panel B. Cromatografía en papel del producto obtenido al usar como dador de azúcar UDP-gal. La marca corresponde a glucosa. Standards: 1, Glucosa y 2, Manosa.

La Glucosiltransferasa utiliza como sustrato glicoproteínas desnaturalizadas pero no glicopéptidos

Como se mencionó anteriormente la propiedad mas interesante de la glucosiltransferasa de hígado de rata es que en ensayos *in vitro* solo reconoce como sustrato aceptor a glicoproteínas desnaturalizadas pero no a las mismas glicoproteínas nativas o glicopéptidos (Trombetta *et al*, 1989; Sousa *et al*, 1992; Sousa y Parodi, 1995). Con el fin de determinar si lo mismo ocurría con la glucosiltransferasa de *S. pombe* se ensayó la actividad de esta enzima utilizando como sustratos distintas glicoproteínas en sus formas nativas y desnaturalizadas como así también distintos glicopéptidos. Cuando se incubó una fracción parcialmente purificada de la glucosiltransferasa de *S. pombe* proveniente de la columna de DEAE, se observó que fue capaz de glucosilar tiroglobulina en su forma desnaturalizada pero no la forma nativa (Fig. 8 A). Una fracción de enzima altamente purificada, como es la que se obtiene de la columna de Phenyl-Superose, es capaz de glucosilar eficientemente SBA desnaturalizada pero no la misma glicoproteína en su forma nativa (Fig. 8 B). Se sabe, por experimentos realizados en nuestro laboratorio (Sousa *et al*, 1992), que si bien solo las formas desnaturalizadas de la tiroglobulina, PHA y SBA son glucosiladas por la glucosiltransferasa, tanto en la forma nativa como la desnaturalizada de estas glicoproteínas los oligosacáridos son accesibles sondas macromoleculares como Con A y α -manosidasa. La glucosiltransferasa de *S. pombe* tampoco puede utilizar como sustrato glicopéptidos de la misma glicoproteína obtenidos por digestión con Pronasa. En la Fig. 8 A se observa la comparación entre la glucosilación de glicopéptidos y la misma cantidad de oligosacáridos de alta manosa pero unidos a la tiroglobulina desnaturalizada sin digerir. Se ha determinado que aproximadamente el 2 % del peso total de la tiroglobulina bovina es aportado por oligosacáridos de alta manosa (Arima *et al*, 1972). En base a este dato se calculó la cantidad de tiroglobulina equivalente a los glicopéptidos para cada caso. El tratamiento con Pronasa genera glicopéptidos con un solo amino ácido, es decir, el oligosacárido unido a la asparagina (Yamashita *et al*, 1978). Existe, por lo tanto, la posibilidad de que estos glicopéptidos no sean eficientemente glucosilados debido a que la enzima requiera sustituciones amino acídicas en la asparagina para poder utilizar un glicopéptido como sustrato. Para ensayar esta posibilidad, se prepararon glicopéptidos por tratamiento de PHA con tripsina libre de quimotripsina y éstos fueron utilizados como sustratos de la reacción de glucosilación. Como puede verse en la Fig. 8 A (recuadro interno) los

glicopéptidos trípticos no son glucosilados eficientemente por la glucosiltransferasa. Esta lectina tiene solo un oligosacárido de tipo alta manosa por molécula. De acuerdo a la secuencia de amino ácidos, en un fragmento tríptico de esta proteína, la asparagina que lleva el oligosacárido posee 1 amino ácido unido al grupo amino y 8 al carboxilo. Los resultados que se observan en la Fig. 8 A (recuadro interno) demuestran que la falta de glucosilación de los glicopéptidos obtenidos por tratamiento con Pronasa, no se debe a que la asparagina que lleva el oligosacárido no esté sustituida en sus grupos amino y carboxilo.

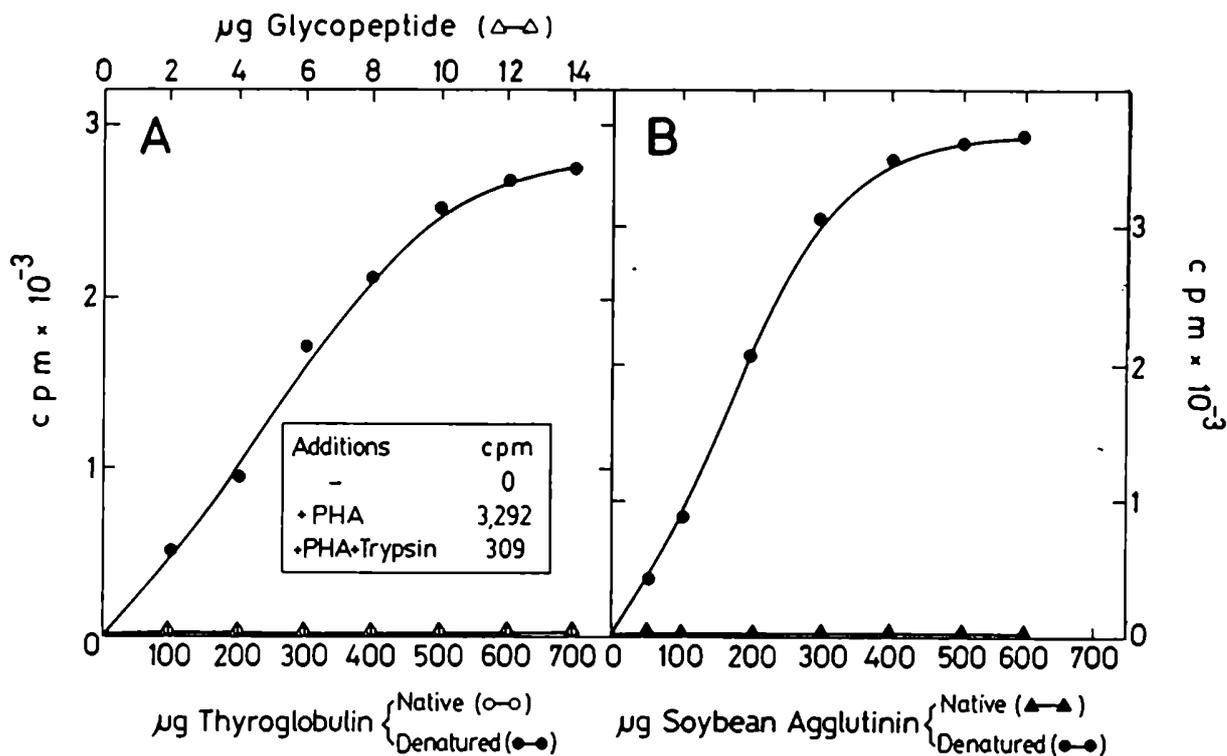


Figura 8. Glucosilación de glicoproteínas nativas y desnaturalizadas y de glicopéptidos.

Panel A. Se ensayaron como aceptores de glucosa de la glucosiltransferasa purificada hasta la columna de DEAE-Sepharosa, Tiroglobulina nativa o-o, Tiroglobulina desnaturalizada ●-● y glicopéptidos Δ-Δ obtenidos por tratamiento con Pronasa de la misma glicoproteína. Recuadro interno. Se testeó la capacidad aceptora de la PHA desnaturalizada o tratada con tripsina.

Panel B. Capacidad aceptora de la SBA en su forma nativa ▲-▲ o desnaturalizada ●-●, en este caso la fuente de enzima fue un fracción obtenida de la columna de Phenyl-Superosa con alto grado de pureza. El ensayo enzimático se describe en "ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA" en MATERIALES Y MÉTODOS.

Recientemente se ha demostrado para la glucosiltransferasa de hígado de rata que no existe ninguna secuencia consenso de amino ácidos que sea reconocida por la enzima, que reconoce el residuo mas interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos de las glicoproteínas sustrato y que la enzima interactúa con amino ácidos hidrofóbicos expuestos en la glicoproteína a glucosilar (Sousa y Parodi, 1995).

Caracterización de los productos de reacción formados por preparaciones crudas o puras de glucosiltransferasa

Se incubaron microsomas de *S. pombe* con UDP-[¹⁴C]Glc y los productos obtenidos se trataron con Pronasa y luego con Endo H. Se analizaron por cromatografía en papel y se obtuvieron Glc₁Man₇GlcNAc, Glc₁Man₈GlcNAc, y Glc₁Man₉GlcNAc tal como se observa en la Fig. 9 A y B. La adición de tiroglobulina desnaturalizada en urea 8 M a la mezcla de reacción conteniendo los microsomas, estimula la formación de los tres tipos de oligosacáridos Fig. 9 B. La glucosilación de glicoproteínas endógenas fue nula cuando se usaron como fuente de enzima preparaciones obtenidas de la cromatografía en DEAE o pasos posteriores en la purificación. La enzima obtenida de la columna de Phenyl-Superose produce también como productos de reacción Glc₁Man₇GlcNAc, Glc₁Man₈GlcNAc, y Glc₁Man₉GlcNAc, cuando se incuba con tiroglobulina desnaturalizada (Fig. 9 C).

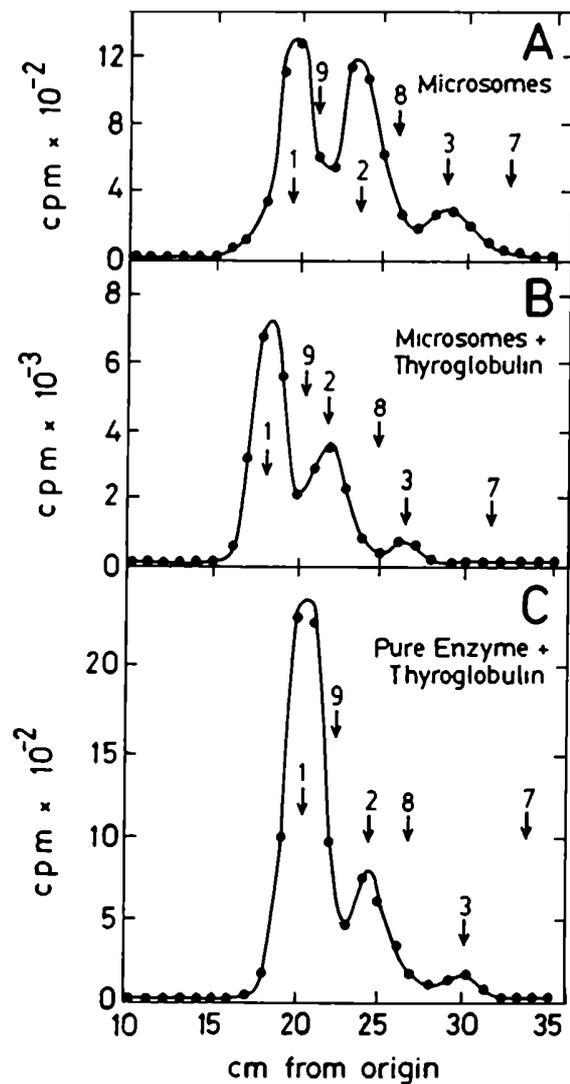


Figura 9. Caracterización de los productos de reacción obtenidos con preparaciones de enzima cruda y purificada.

Se incubaron microsomas de *S. pombe* con UDP-[^{14}C]Glc en ausencia (panel A) o presencia (panel B) de tiroglobulina desnaturalizada. Panel C. En este caso se usó una fracción de glucosiltransferasa proveniente de la columna de Phenyl-Superose y se incubó con tiroglobulina desnaturalizada como sustrato aceptor. Los oligosacáridos liberados por tratamiento con Pronasa y Endo H se corrieron en una cromatografía en papel en solvente A. Para mas detalles ver MATERIALES Y MÉTODOS. Las posiciones indicadas con números corresponden a, 1: $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$; 2: $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}$; 3: $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}$; 7: $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$; 8: $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$; 9: $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$.

Estos datos en su conjunto demuestran que la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa de *S. pombe* es muy similar en cuanto a sus propiedades a la de hígado de rata que fue muy bien caracterizada bioquímicamente (Trombetta y Parodi, 1992; Sousa *et al*, 1992; Sousa y Parodi, 1995). Sin embargo poco se sabía hasta el momento con respecto a la función biológica de esta actividad y el porque las células desarrollaron un mecanismo de reglucosilación en el RE. El tener la proteína purificada nos permitió microsecuenciar el extremo N-terminal y algunos péptidos internos, diseñar oligonucleótidos degenerados y mediante técnicas de biología molecular obtener la secuencia del gen que codifica para la enzima. Esto a su vez nos permitió hacer la disrupción de dicho gen y analizar los cambios en la transcripción del mRNA cuando se someten las células a diferentes condiciones de stress.

Clonado y secuenciación del gen de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de Schizosaccharomyces pombe

PCR con oligonucleótidos degenerados:

Con la idea de obtener la secuencia del gen que codifica para la glucosiltransferasa de *S. pombe* se purificó parcialmente la enzima. Fracciones provenientes de la columna de Mono Q fueron reducidas, alquiladas con 4-vinilpiridina y analizadas en un SDS-PAGE. Las bandas correspondientes a la enzima fueron digeridas con tripsina y los péptidos resultantes se microsecuenciaron como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS.

Se obtuvieron las secuencias de los siguientes péptidos:

1	FHCQDDIEDWR/K
2	DAWTVMQK
3	DLSSSFFDHYMS
4	RKPGFESADIMDE
5	N/L-H/Y-V/S-V/K-P/N-P-L-F/D-Y-E-V-V
6	C-D/Y-C/Y/K-D/L-T/P-W/Q-L/V-Q/I-L/V-D-E

Anteriormente se reportó la secuencia del extremo amino terminal que también fue utilizada para el diseño de oligonucleótidos.

N-terminal **AKPLDVKIAATFN**

A partir de la secuencia de los péptidos se eligieron las regiones de amino ácidos que permitieron diseñar oligonucleótidos con la menor degeneración posible (Tabla II) y se utilizaron para llevar a cabo reacciones de PCR.

TABLA II.
PÉPTIDOS DE LA GLUCOSILTRANSFERASA Y OLIGONUCLEÓTIDOS
DEGENERADOS

Péptido	Oligonucleótido	
	Sense	Antisense
DVKIAAT	GAYGTNAARATHGCGCXAC	-----
FHCQDDI	TTYCAYTGYCARGAYGAYAT	-----
QDDIEDW	CCARTCYTCDATRTCRTCYTG	
WTVMQK	YTTYTG CATNACXGTCCA	

El péptido DVKIAAT corresponde a un fragmento de la secuencia del N-terminal, FHCQDDI y QDDIEDW corresponden al péptido 1 y WTVMQK es un fragmento del 2, (ver mas arriba).

Siendo: Y= C o T; R= A o G; D= A o G o T; N= A o C o T o G; H= A o C o T; X= I

Con los oligonucleótidos provenientes de los péptidos 1 y 2 (1 Sense y 2 Antisense) se realizaron reacciones de PCR usando como templado tanto DNA genómico como cDNA de *S. pombe*. La temperatura de hibridización en este caso fue 55 °C. Como resultado de esta reacción de PCR se obtuvo un fragmento de DNA de 1764 pares de bases (pb) que fue ligado al vector T y fue secuenciado. Se realizó una nueva reacción de PCR usando como templado DNA genómico con un oligonucleótido derivado del N-ter y el oligonucleótido 2 Antisense. Esta generó un fragmento de 2903 pb (Fig. 10 A y B) que también fue secuenciado. Se comprobó que este fragmento contenía al anterior (1764 pb) demostrando que ambos péptidos de los que habían derivado provenían de la misma proteína.

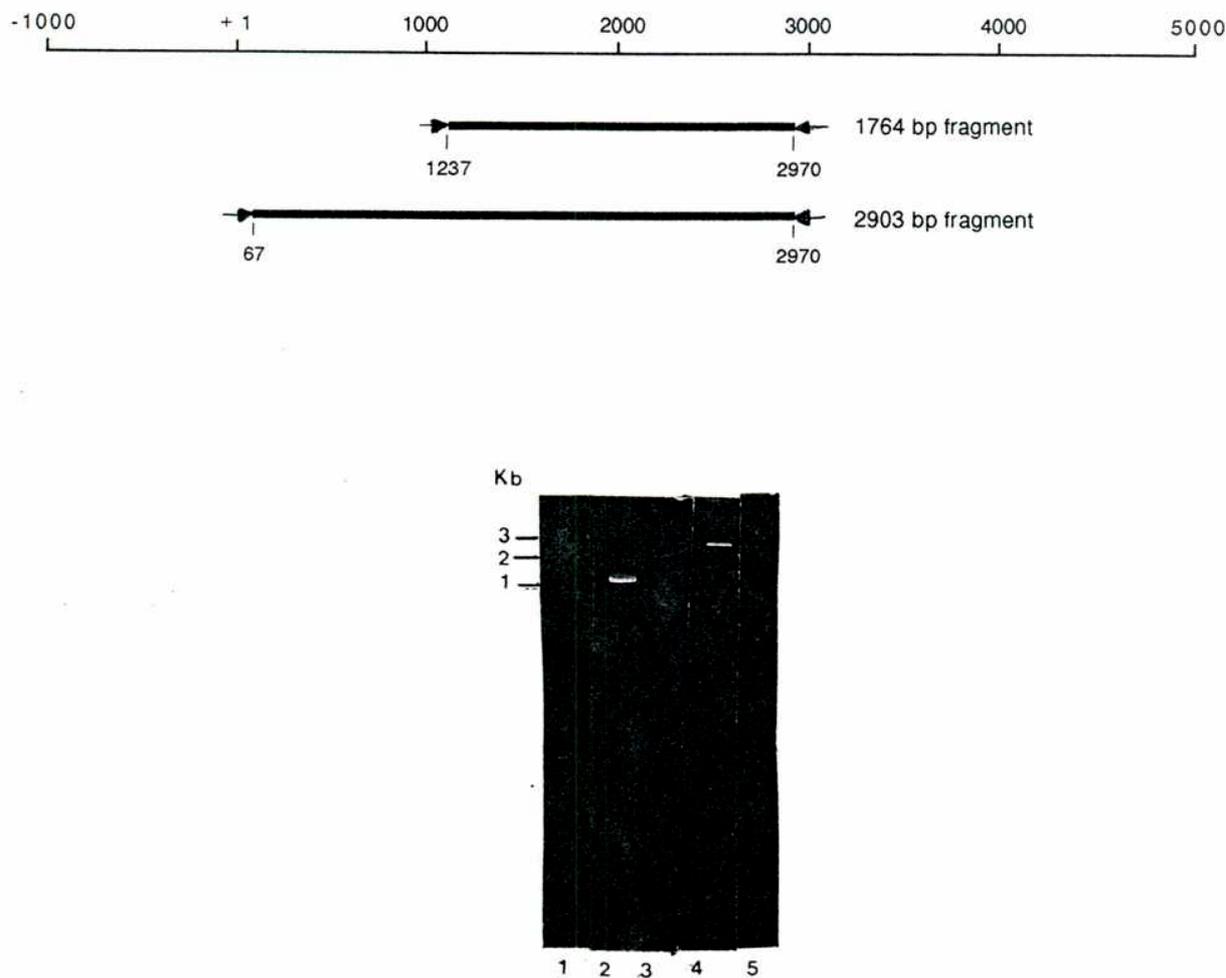


Figura 10. Reacciones de PCR con oligonucleótidos derivados de las secuencias de péptidos de la glucosiltransferasa de *S. pombe*.

Panel A. La base +1 corresponde a la A del codón de iniciación ATG en el gen de la glucosiltransferasa. Con flechas se indican las posiciones de los oligonucleótidos degenerados usados para las reacciones de PCR. El fragmento de 1764 pares de bases está contenido en el de 2903.

Panel B. Los productos obtenidos en las reacciones de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1.3 % en buffer TAE. Línea 1, producto de PCR cuando se usó solo el oligonucleótido 1 sense; línea 2, producto de PCR al usar los oligonucleótidos 1 sense y 2 antisense; línea 3, igual que línea 1 pero en este caso se usó solo el oligonucleótido 2 antisense; línea 4, fragmento de PCR generado por los oligonucleótidos N-ter sense y 2 antisense; línea 5, igual que la línea 1 pero solo con el oligonucleótido N-ter sense. El templado de estas reacciones fue DNA genómico de *S. pombe*. Para más detalles ver MATERIALES Y MÉTODOS.

Screening de una biblioteca de cDNA:

El fragmento de 2903 pb fue utilizado como sonda para realizar el screening de una biblioteca de cDNA de *S. pombe* en el vector λ ZAP II. Los detalles del procedimiento se describen en MATERIALES Y MÉTODOS. Luego de tres rondas de screening se obtuvieron 8 fagos independientes, estos fueron escindidos en forma de plásmido y fueron secuenciados. Solo dos tenían el extremo 5' completo, es decir contenían el codon ATG que codifica para la metionina inicial. De ellos se pudo obtener la secuencia del péptido señal, que comprende 18 amino ácidos (Fig. 12). También estaba presente como era de esperarse la secuencia del N-terminal de la proteína madura que había sido determinada por microsecuenciación de aminoácidos. Con respecto al extremo 3' de estos clones, todos tenían una secuencia similar, 1 de ellos solo difería en el sitio de poli adenilación. Desde el codon STOP hasta el poli A la región 3' no traducida fue de 452 pb para 7 de los clones y 485 pb para el restante.

Screening de una biblioteca genómica:

Con el objetivo de conocer la secuencia del promotor de la glucosiltransferasa se realizó el screening de una biblioteca genómica de *S. pombe*. Se empleó como sonda un fragmento de 4410 pb que abarca prácticamente todo el gen, y luego de tres rondas de screening se aislaron 3 fagos positivos. Estos se secuenciaron y se comprobó que se extendían desde la base -752 hasta la 4383. En esta región se encontraron tres posibles TATA boxes ubicadas entre las bases -179 a -183, -477 a -481 y -491 a -495 (Fig. 11). Además se encontró una secuencia de 10 pares de bases (ATTCTGGAAT) en la posición -366 (Fig. 11), que esta muy conservada en los promotores de distintas proteínas inducibles por calor en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Tuite *et al*, 1988; Jannatipour y Rokeach, 1995)

El gen que codifica para la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa de *S. pombe* fue designado *gpt1* y su número de acceso al GenBank es U38417.

Figura 11. Secuencia de nulceótidos y traducción del gen de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de *S. pombe*

La secuencia ATTCTGGAAT que se encuentra en varios promotores inducibles por calor de distintas proteínas de *S. pombe* y *S. cerevisiae* esta subrayada con una linea doble. También se indican las tres posibles TATA boxes, subrayadas con una linea de puntos.

AATTTGGCGTTTTTTGATTTGAATTATTTAATAGTTTATTGCTCCATGAATGCAATATTGCNCGTTTTTCAGTTAAAAAGAGGTGTGCA
 ACACAAACACGAACAAGTTCGTTTTTCATTTTTATGACAAAATGACTACAGGGACTTTTTTTTTCCCATTATTATTGATTATGTGCTA
 ATCAATTATTTTCATTATCACAACTATGGGTTACAATTAGAAACCTGTTGTAATAACAATAATTGCTCTACTGAAGTAATA T A A GCT
 AATGATTA T A A AATTTATCAATTGCATATACATTAATAATTTAATTCATGGAACCAATTCATCTATGGTGATTATTTATCTCGTT
 TGCTGGATTGAAATGATTATTTTTAGCATTCTGGAATTTAGATCTTGTA AACCTGTGTCAAGAATTTTTATTTTAAACAAAT
 CGTAATCAGTAATATGGAAAAGTCTTCTACTTTCAAAGTTTGGATTTTTGTATAGCGCCCCAGTTACGAATACTTGCAAATTATTCC
 TTGTAATTAATTAGTCATAGAACAAAATAGGAAGCCGAAGTAAGATTA T A A ATTAGATACAGCTTTAAATAGCTAATTATTATAC
 CACTTGTTTACTGTTCTATCGATCAAGTAACTGTTACGTAATAGTCGCGTTAGTCTCTCAACTACTTAGTTACTCCGCCAACTTC
 TTTTGTCTGCAAAAAATAGCTAAACATTCCAAAAGCAAAAAGAGATAAGTATAAG ATG AGA TGG GGC TTT TGG TTT GCT
 M R W G F W F A
 ATT GCA ACT CTC ATT ACG ATT TGC TAT GCC GCC AAG CCT TTA GAC GTC AAG ATT GCG GCG GCG ACT
 I A T L I T I C Y A A K P L D V K I A A A T
 TTT AAC GCT CCT TCA TTT TCT GCA CTT ATA GCT GAG TCA TTG TAT CAA GAG AAG AAG GAG GGA TTC
 F N A P S F S A L I A E S L Y Q E K K E G F
 ATT TGG TAT TTA AAT CAC TTG AGC GAT TTA CTA GAT GCT GAA AAT ACC ACC GAA AAG GAG CTG TAC
 I W Y L N H L S D L L D A E N T T E L Y
 ATT AAT GTT GTC AAT TCA CTT AAA CGC GAG TAT GTT CTT TCT GAT GAA GAA TTA TCT TCC TTG CAG
 I N V V N S L K R E Y V L S D E E L S S L Q
 TTT TCT CTG GGA TTG TTT TCT GGC GCA CCA AAG TTA CAA GCA TTT TCA AGT ATT GTT CAA TCG CGC
 F S L G L F S G A P K L Q A F S S I V Q S R
 ACG TGT GAT TGT GAC ACT TGG CTA CAA CTT GAC GAA GAA TCA CAG GTT TGC TTT TCG GAT TTG CCA
 T C D C D T W L Q L D E E S Q V C F S D L P
 AAG GAC TCC CCA TTG TTT AGC AAG CTG TAC AGC AAA AAT CCT CTA GAT TAC GAA GTT GTA AAA ACC
 K D S P L F S K L Y S K N P L D Y E V V K T
 TCG GCT ACT GGC ATT CCG TAC GCA GTG GTT GTA ACT AGC TTC GAA CGA GAT CTT ATT CCT TTT CAC
 S A T G I P Y A V V V T S F E R D L I P F H
 GAA CTA TAT TAC AAG CTG GCA TTG GAA GGA AAG TGC AAT TAT GTT ATA AGA TAT TCT CCT CCT TCT
 E L Y Y K L A L E G K C N Y V I R Y S P P S
 TCC TCG AAA CTT AAC TCC AAA CTT TAC GTT AAG GGC TTT GGT ACC CAT GTG TCA TTG AAG CGC ACA
 S S K L N S K L Y V K G F G T H V S L K R T
 GAT TAC TTA GTT GTA GAT GAT CGC GAG TTT CCA AGG GAA AAG GGA GAT AAC CCA GCA AGT TTT ACA
 D Y L V V D R E F P R E K G D N P A S F T
 TCA TCC CGC AAC AAA AGA TCA AAT GAG AGA CTA TTT GGA ATG ACC TCC GAC AGC CTA CAA ACT GTA
 S S R N K R S N E R L F G M T S D S L Q T V
 ACG CCT GAT AAA ATT GCA ATA CTT GAT TTA TTA GCT ACA CAA AGT ATT GCT AGC AGT GCT GAC ATG
 T P D K I A I L D L L A T Q S I A S S A D M
 TTG AGT GCT TTT CGA GAG CTT ACA CAA GAT TTT CCT ATT TAT GCG CAT TAC CTT TCT ATA CAA CCG
 L S A F R E L T Q D F P I Y A H Y L S I Q P
 GAT GTT TCT AAT CAT TTA ATC GAG GAA CTG AAC CAA TTT CAA TCG CAA TAT GTT CCT GAA GGC ATT
 D V S N H L I E E L N Q F Q Y V P E G I
 AAT ACG ATT TGG TTG AAT GGT TTA TCT CTT GAT TTA GAG GAA ACG GAT GCT TTT TCT ATT CTC TCT
 N T I W L N G L S L D L E E T D A F S I L S
 TTA ATT AAG AAA GAA AAA GAT ATG TTT GAT AGA TTT GAA GCT CTA GGG ATT AAA TCT TCG AAG GTC
 L I K K E K D M F D R F E A L G I K S S K V
 TTA GAT ATA GTC ACT AAT GAG GCT TTT GCT AAC GAG GAC TCA GAT TTC AAG TTT GTT AAG TTT CAT
 L D I V T N E A F A N E D S D F K F V K F H
 TGC CAG GAC GAC ATA GAG GAC TGG AAA GCC ATA CAT TGG GTG AAC GAA ATA GAA AGC AAC CCT AAG
 C Q D D I E D W K A I H W V N E I E S N P K
 TAT GAC AAT TGG CCC AAG AGT ATA CAA ATT TTA TTA AAA CCT ATC TAT CCA GGA CAG CTT CAT ATG
 Y D N W P K S I Q I L L K P I Y P G L H M
 CTC GGA AAA CAA CTG CAT ACT GTC ATT TAT CCT ATT TTT CCT TCT TCT TCA TCG TTA CCT CTT
 L G K Q L H T V I Y P I F P S S P S S L P L

CTT TCC GAG CTT ATT CAG TTT TCA CGG CGC CCT TCG CCC GTT CAG ACT GGT ATG GTA TGT GCT GCT
L S E L I Q F S R R P S P V Q T G M V C A A
AAC GAT GAC GAT GAA TTT GCT CAA ACT GTT TGC AAA TCC TTT TTC TAC ATT TCG AAG GAG AGC GGA
N D D D E F A Q T V C K S F F Y I S K E S G
ACT GAC AGC GCT CTC AAA TTT TTA TAT AAA TGT TTG AAC AGC GAT TCT AGT GCT GAT TTG TAG TCC
T D S A L K F L Y K C L N S D S S A D L Y S
TTG CTT GAA GAG CAT CTT CCA TTA AGC GAG CAT GAT GAT GAT ACT CTA GCT AAT CTT AAA AAA GAT
L L E E H L P L S E H D D T L A N L K K D
CTT TCC TCA TCT TTT TTT GAC CAC TAC ATG TCT AAG AGC AAT AGC TGG GTT AAT CGT TTA GGA ATA
L S S S F F D H Y M S K S N S W V N R L G I
GAT TCT TCT GCA TCA GAG GTC ATA GTC AAC GGC CGA ATT ATT TCT CAT GAT GAA AAT TAC GAT AGG
D S S A S E V I V N G R I I S H D E N Y D R
AGT ATG TAT GGA ATA TTT TTA GAA GAT ATC CCT GAA GTT CAA ATT GCA GTT GCA GAA GGG AAG ATT
S M Y G I F L E D I P E V Q I A V A E G K I
TCT GAA GAT GAT AAT CTG TTA GAT TTT ATT TTG CGA GAT GCT TCG TTA ACG CGG AAT CCT TTA GTT
S E D D N L L D F I L R D A S L T R N P L V
TAC CCT TCC GCA AAA TCT AGT ATC AAG AGT ATT GAT AAT AAA CGG GTT TTG GAG AAC GTT GGT AGT
Y P S A K S S I K S I D I K R V L E N V G S
TTG AAC CAC GAA GAT ATT TTA CTT ATC GGC AGT TCT AAT GCT AAA TAT TCA TTC TGG CTA GTT GCT
L N H E D I L L I G S S N A K Y S F W L V A
GAT TTT AAT GAA AAG GAA GGG CTT GAA ATA CTT TCA TTA CTT GCC GAC CTT CTT TCG GAG AAT AAA
D F N E K E G L E I L S L L A D L L S E N K
GAT GCA AAT CTT ATG TTG ATT CAG GAA GGA AAA AAT CAT GTT GTA CCC CCT CTG TTT GCT AAA CTG
D A N L M L I Q E G K N H V V P P L F A K L
TTA TCA TCA CCA AAG AGA TCT AGT AAG CAT TTA CAA AAG ATA TTA AAT TCC ACG CTC GAT CCK AGT
L S S P K R S S K H L Q E I L N S S L D P S
TCT GGC GTC GTT AAC GAT ATG GAT AAA GCA TTG AAA TTT CTA AAA AAA TCG AAA GCC GTT GTT AAA
S G V V N D M D K A L K F L K K S K A V V K
GAG TTG GGT CTT ACC GGT GAA TGT AAA TCT GCT TTG TTA TTA AAC GGA CGG ATG ATC TGT VCT TTC
E L G L T G E C K S A L L L N G R M I C S F
TCA GTT GAT AGT TTG AAC ACC GCT GAC TTA AAA ATG TTA ATG CAA ATG GAA TAC GAT AAT TAT CTG
S V D S L N T A D L K M L M Q M E Y D N Y L
TCA AAA CTG TCA AAC ATT GCT GGA AGC TCA AGA AAG TTA AAA AAC AGC CGT GCT ATT TCA TTC CTT
S K L S N I A G S S R R L K N S R A I S F L
AGC TCA TAT TTA AAA ACG CTT GAA TCT ACA CCC ATG AGT ACT TCT TCA CCT ACT AAG GAA GAA AAA
S S Y L K T L E S T P M S T S A S P T K E E K
TTA TTT CCT CGT GAT TTT ATC TAC AAT AAA CTT GGT GTT GGA AAT GCT ACA TTT GAA ACT GAC GAT
L F P R D F I Y N K L G V G N A T F E T D D
TTT TCA AAA GCT TAT TAT CAG TTT GTT GCA GTT TTA GAT CCT CTT TCA AAA GAT TCT CAA AAA TGG
F S K A Y Y Q F V A V L D P L S K D S Q K W
TCA GCT ATT CTT GAA GCA GTC TCA AAG TTG AAC GGC GTA GGA GTT CGA ATT CAT TTG AAT CCT AAA
S A I L E A V S K L N G V G V R I H L N P K
CAA ACT TTG TCT GAG CTT CCA TTA ACA AGG TTT TAT CGA TAT TCA ATT TCT CGG GAG CCA GAG TTT
Q T L S E L P L T R F Y S I S A E P E F
GAT GCG CTT GGC CAT TTA GAG GAG TCT TAC GTA GAA TTT GAC AAC TTA CCG GCT GAT ACA CTG CTT
D A L G H L E E S Y V E F D N L P A D T L L
ACA ATG GAC ATT GAA GCT AGA GAC GCA TGG ACA GTT ATG CAA AAA GAT GTG GAC ATT GAT CTT TTC
T M D I E A R D A W T V M Q K D V D I D L F
AAC ATA AAA TTA GAG CAC ACT TCT GAA GCA GAG GCT TTG GAC TCA CAT ACA GCA ATC TAT GAA CTT
N I K L E H T S E A E A L D S H T A I Y E L
AAA AAC ATT TTG GTA CAA GGT TAC TCT CAA GAA TTC AGG AAA AGC CCA CCG AGG GGT ATG CAA
K N I L V Q G Y S Q E E F R K S P R G M Q
TTA AAG CTA GGC AAC CTT ACT AAT TCC CAT GTG ACT GAT ACA ATT GTA TTA TCA AAT TTA GGA TAT
L K L G N L T N S H V T D T I V L S N L G Y
TTT CAA TTG AAG GCG AAC CCA GGC GTA TGG ACT TTG GAA CCT ATG GAT GGG CGG TCT TCT CAG TTT
F Q L K A N P G V W T L E P M D G R S S Q F
TAT GAA ATA CTG TCG CTA AAT AAG AAA AAT TCC TAT AAA GAC CCT CAA GTA ATT GTT GAC AGT TTT
Y E I L S L N K K N S Y K D P Q V I V D S F
GAA GGT GTC ACC TTA AAT CCG GTT ATG CGA CGT AAA CCT GGT TTT GAG TCT GCC GAC ATT ATG GAT
E G V T L N P V M R R K P G F E S A D I M D
GAA GAC CTT AGC TCC CAT AAA TTT TTC GAT AAA ATA AAA AAG TCT CTC AGC TTC TTT AAT TTC AAA
E D L S S H K F D K I K K S L S F F N F K
CGT AAA GAA GCA TCT ATA AAT ATT TTT TCT GTT GCC AGC GGA CAC TTG TAT GAA AGA TTC TTA TAC
R K E A S I N I F S V A S G H L Y E R F L Y
ATC ATG ACT AAG AGT GTA ATT GAG CAT ACG GAT AAA AAA GTC AAG TTC TGG TTT ATT GAG AAC TTT
I M T K S V I E H T D K K V K F W F I E N F
TTG TCC CCT TGT TTT AAA AGC TCT ATT CCG GCC ATT GCC AAA AAG TAT AAT TTC GAG TAT GAG TAT
L S P C F K S S I P A I A K K Y N F E Y E Y
ATT ACT TAC AAT TGG CCA CAC TGG CTG AGA AAA CAA GAA GAA AAG CAA CGT GAG ATA TGG GGA TAC
I T Y N W P H W L R K Q E E K Q R E I W G Y
AAA ATA TTG TTC CTT GAT GTT TTA TTC CCT TTA GAA TTG CAT AAG GTT ATC TAT GTT GAT GCC CAA
K I L F L D V L F P L E L H K V I V D A Q

RESULTADOS

ATT GTG CGT GCT GAC TTG CAG GAA TTG ATG GAT ATG GAT TTA CAT GGT GCT CCA TAT GGG TAT ACA
 I V R A D L Q E L M D M D L H G A P Y G Y T
 CCC ATG TGT GAT TCT CGC GAA GAG ATG GAA GGT TTT AGA TTC TGG AAA AAA GGA TAC TGG AAA AAA
 P M C D S R E E M E G F R F W K K G Y W K K
 TTC TTA CGT GGA TTA AAA TAT CAC ATT AGT GCA TTA TAT GTT GTA GAC TTA GAT CGT TTC AGG AAG
 F L R G L K Y H I S A L Y V V D L D R F R K
 ATG GGT GCG GGT GAT TTA CTT CGC AGA CAA TAC CAA CTT TTG TCT GCC GAT CCT AAC TCC CTG TCT
 M G A G D L L R R Q Y Q L L S A D P N S L S
 AAT TTA GAT CAA GAT TTG CCA AAT CAC CTT CAA CAC CTT ATT CCT ATA TAC TCT CTT CCG CAA GAT
 N L D Q D L P N H L Q H L I P I Y S L P Q D
 TGG CTT TGG TGT GAG ACA TGG TGC AGT GAT GAA AGT TTG AAA ACT GCC AAA ACA ATC GAT TTA TGT
 W L W C E T W C S D E S L K T A K T I D L C
 CAA AAT CCT TTA ACT AAA GAA AAG AAG CTG GAT CGC GCA CGT AGG CAA GTC TCT GAA TGG ACT TCA
 Q N P L T K E K K L D R A R R Q V S E W T S
 TAC GAT AAT GAG ATA GCA TCC GTA TTG CAA ACC GCC TCT AGT CAA TCA GAT AAA GAG TTT GAA GAA
 Y D N E I A S V L Q T A S S Q S D K E F E E
 AAG GAT AAC AAC TCA TCT CCG GAC GAA CTT TGA AACATACTTTTCTTTTGCCTTTCATATTTAATTCGTGATTGTAC
 K D N N S S P D E L *

GCCTGAAATTTTATAATCGTTTTTCTAATTTACTTGCGAATTTGCATAAGTTAGAAGAGAAAAGAGTTAAAATCAAATGTTTTAAT
 GAATTGCTTGAATACTGAGAGTATTGGCTTTAGGGATTAAAAGGGGTCAAATTAGTATATGTGCTCCGTTTCAAATGAGCTAGTCA
 TGAGTTAATTTTTT

La Glucosiltransferasa de S. pombe contiene una nueva señal de retención para proteínas solubles del RE

La secuencia de amino ácidos deducida se muestra en la Fig. 12. En la misma figura se muestra la secuencia de los péptidos obtenida por microsecuenciación. Los péptidos 3 (DLSSFFDHYMS) y 4 (RKPGFESADIMDE) no fueron usados en el diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR. Además se corroboró la secuencia que había aparecido como doble para los péptidos 5 (5a, NHVVPPLF y 5b, LYSKNPLDYEVV) y 6 (6a, CDCDTWLQLDE y 6b, DPQVIVD).

Como se mencionó más arriba el extremo amino terminal posee un péptido señal de 18 aminoácidos (MRWGFWFAIATLITICYA), la mayoría de los cuales son hidrofóbicos. El sitio de clivaje de este péptido señal se encuentra después de la alanina en posición 18 lo que origina el amino terminal de la proteína madura con idéntica secuencia (AKPLDVKIAATFN) a la que se había obtenido por microsecuenciación.

El peso molecular calculado a partir de la secuencia de amino ácidos es de 162.921 Da, lo que concuerda con el valor obtenido en un SDS-PAGE de la enzima pura (158.000 Da). El punto isoeléctrico deducido de la secuencia de amino ácidos es 5.11. En la Fig. 12 se puede observar la secuencia de cinco posibles sitios de N-glicosilación. Sabemos que al menos uno de ellos es funcional *in vivo* ya que la enzima es retenida en columnas de Con A, de las que puede ser eluída con α -metilmanosido. La secuencia no posee ningún dominio transmembrana, como era de esperarse para una proteína soluble del RE. En su lugar el C-terminal de la proteína presenta el tetrapéptido PDEL lo que podría representar una nueva señal de retención para proteínas solubles del RE en *S. pombe*. La única señal de retención conocida hasta el momento en *S. pombe* es ADEL que fue encontrada en la proteína BIP, una chaperona soluble del RE (Pidoux y Armstrong, 1992).

Hasta el momento se conocen las secuencias de 3 glucosiltransferasas, la de *S. pombe* la de *Drosophila melanogaster* (Parker *et al*, 1995) y recientemente fue secuenciada la de hígado de rata (A. Parodi y J. Bergeron, dato no publicado). Estas son similares en cuanto al tamaño y presentan una elevada identidad en sus secuencias de aminoácidos hacia el extremo C-terminal (Fig. 13). Por el contrario la región N-terminal de las enzimas presenta una escasa homología. Al comparar las secuencias de las glucosiltransferasas en un banco de genes (GenBank) se encontró similitud en el extremo C-terminal con otros dos genes, un gen (F48 E3.3) de *Caenorhabditis elegans* y con la proteína Kre 5 de *Saccharomyces cerevisiae* (números de acceso al

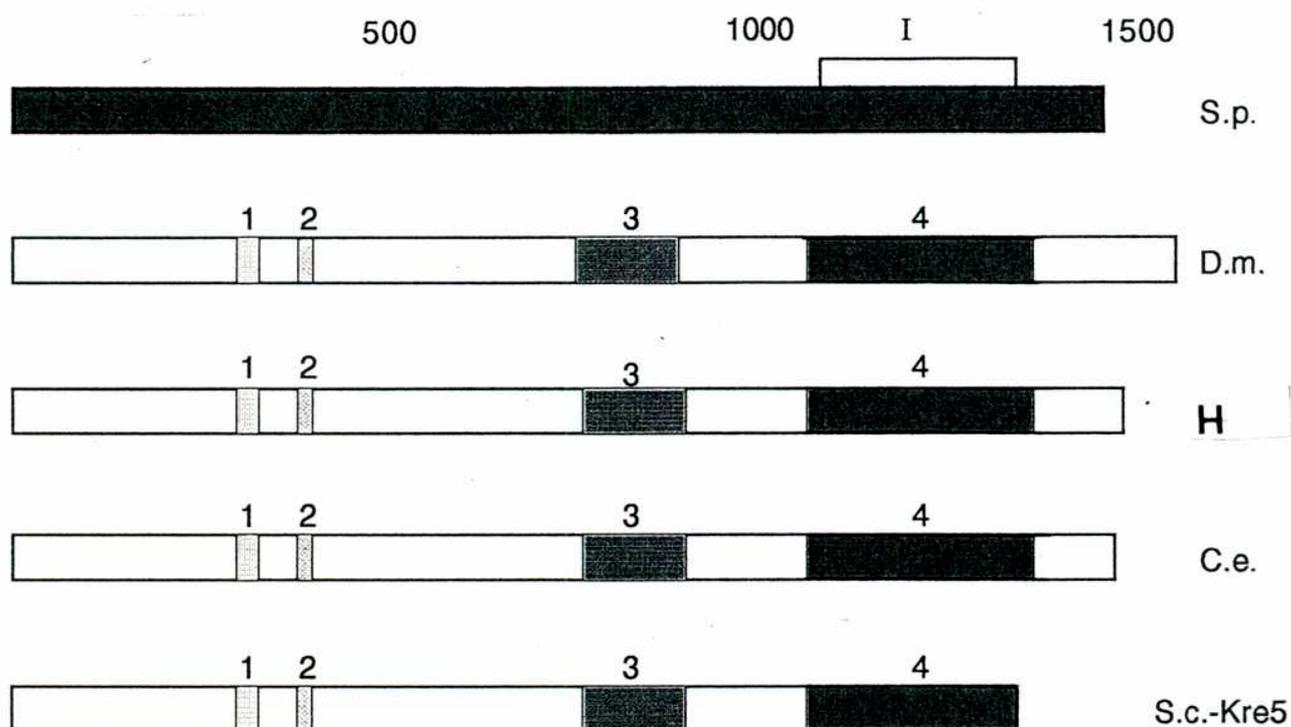
GenBank U28735 y M33556). En el caso de *C. elegans* suponemos que la proteína que se encuentra codificada por dicho gen es la glucosiltransferasa dado que es muy similar a las secuencias conocidas (Fig. 13 B). La alta homología observada en el dominio C-terminal de las proteínas nos conduce a pensar que en él se encontrarían regiones de reconocimiento del nucleótido-azúcar (dador del residuo de glucosa) y del oligosacárido en la glicoproteína sustrato.

La función de la proteína Kre 5 es desconocida, se cree que esta relacionada con la síntesis de glucanos de la pared celular de *S. cerevisiae* (Meaden *et al*, 1990). No está claro el mecanismo de reacción en el que interviene Kre 5, pero dado que utilizaría como sustrato un polisacárido y no una glicoproteína (sustrato característico de la glucosiltransferasa) creemos que este gen no codifica para la glucosiltransferasa. Mas aún, existen evidencias de que *S. cerevisiae* sería el único organismo eucarionte conocido hasta el momento que no presenta actividad de UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, (ver mas adelante).

MRWGFWF[.]AIATLITICYA↓AKPLDVKIAATFNAPSFSALIAE
 SLYQEKKEGFIWYLNHLSDL LDAENTTEKELYINVVNSLKRE
 YVLSDEEQFSLGLFSGAPKLQAFSSIVQSRTCDCDTWLQLDE
 ESQVCFSDLPKDSPLFSKLYSKNPLDYE[.]VVKTSA TGIPYAVV
 VTSFERDLIPFHEL[.]YKLALEGKCN[.]YVIRYSPSSSKLNSKL
 YVKGFGTHVSLKRTDYLVD[.]DREFPREKGDNPASFTSSRNKR
 SNERLFGMTSDSLQTVTPDKIAILDLLATQSIASSADMLSAF
 RELTQDFPIYAHYLSIQPDVSNHLIEELNQFQSQYVPEGINT
 IWLNGLSLDLEETDAFSILSLIKKEKDMFDRFEALGIKSSKV
 LDIVTNEAFANEDSDFKFVKFHCQDDIEDWKAIHWVNEIESN
 PKYDNWPKSIQILLKPIYPGQLHMLGKQLHTVIYPIFPSSPS
 SLPLLESELIQFSRRPSPVQTGMVCAANDDDEFAQTVCKSFFY
 ISKESGTD[.]SALKFLYKCLNSDSSADLYSLLEEHLPLSEHDDD
 TLANLKKDLSSSFFDH[.]YMSKSN[.]SVNRLGIDSSASEVIVNGR
 IISHDENYDRSMYGFLEDIPEVQIAVAEGKISEDDNLLDFI
 LRDA[.]SLTRNPLVYPSAKSSIKSIDIKRVLENVGSLNHEDILL
 IGSSNAKYSFWLVADFNEKEGLEILSLLADLLENKDALML
 IQEGKNHVVPPLFAKLLSSPKRSSKHLQEILNSSLDPSSGVV
 NDMDKALKFLKKS[.]KA[.]VV[.]KELGLTGECKSALLNGRMIC[.]SFSV
 D[.]SLNTADLKM[.]LMQMEYDNYLSKLSNIAGSSRRLKNSRAISFL
 SSYLKTLESTPMSTSSPTKEEKLFPRDFIYNKLG[.]VGNATFET
 DDFS[.]KAYYQFVAVLDPLSKDSQKWSAILEAVSKLNGVGVRIH
 LNP[.]KQTLSELPLTRFYRYSISAEPFDALGHLEESYVEFDNL
 PADTLLTMDIEARDAWTVMQKDVDIDL[.]FN[.]IKLEHTSEAEALD
 SHTAIYELKNILVQGY[.]SQEEFRKSPPRGMQLKLGNLTNSHVT
 DTIVLSNLGYFQLKANPGVWTL[.]EPMDGRSSQFYEILSLNKKN
 SYKDPQVIVDSFEGVTLNPVMRRKPGFESADIMDEDLSSHKF
 FDKIKKSL[.]SFFNFKRKEASINIFSVASGHLYERFLYIMTKSV
 IEHTDKKV[.]KFWFIENFLSPCFKSSIPAIAKKYNFEY[.]EYITYN
 WPHWLRKQEEKQREIWGYKILFLDVLFPLELHKV[.]IYVDAQIV
 RADLQELMDMDLHGAPYGYTPMCDSREEMEGFRFWKKGYWKK
 FLRGLKYHISALYVVDLDRFRKMGAGDLLRRQYQLLSADPNS
 LSNLDQDLPNHLQH[.]LIP[.]IYSLPQDWLWCETWCSD[.]ESLKTAKT
 IDLCQNPLTKEKKLDRARRQVSEWTSYDNEIASVLQTASSQS
 DKEFEEKDNNSSPDEL*

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la glucosiltransferasa de *Schizosaccharomyces pombe*.

Traducción conceptual del cDNA de *gpt1*. La secuencia comprende 1448 aminoácidos. La flecha indica el sitio de clivaje del péptido señal. Los sitios potenciales de N-glicosilación se indican con líneas de puntos. Los péptidos obtenidos por microsecuenciación se encuentran subrayados.



Proteína	Región	GT <i>S. pombe</i>	Identidad
D. m.	1	304-348	25%
	2	411-445	28%
	3	895-107	39%
	4	1157-1417	68%
Hígado	1	304-348	30%
	2	411-445	35%
	3	895-107	46%
	4	1157-1417	70%
C. e.	1	304-348	27%
	2	411-445	23%
	3	895-107	42%
	4	1157-1417	66%
Kre 5	1	304-348	13%
	2	411-445	18%
	3	895-107	15%
	4	1157-1417	25%

Figura 13. Comparación de secuencias de las diferentes glucosiltransferasas

Panel A. Esquema de las proteínas que presentan regiones similares. Cada rectángulo representa una proteína completa. Con color se señalan las regiones potencialmente homólogas. S.p., D.m., H, C.e., significan: *S. pombe*, *D. melanogaster*, hígado de rata, *C. elegans*. S.c.-Kre5 representa la secuencia de la proteína Kre5 de *S. cerevisiae*.

Panel B. Analisis de la identidad de las proteínas mostradas en el panel A con la glucosiltransferasa de *S. pombe*.

F S V A S G H L Y E R F L Y I M T K S V I E H T D K K V K F W F I E N F L S P C	S.p.	GT
F S V A S G H L Y E R L L R I M M V S L L K H T K S P V K F W F L K N Y L S P Q	D.m.	GT
F S V A S G H L Y E R F L R I M M L S V L K N T K T P V K F W F L K N Y L S P T	H	GT
F K S S I P A I A K K Y N F E Y E Y I T Y N W P H W L R K Q E E K Q R E I W G Y	S.p.	GT
F T D F L P H M A S E Y N F Q Y E L V Q Y K W P R W L H Q Q T E K Q R T I W G Y	D.m.	GT
F K E F I P Y M A K K Y N F Q Y E L V Q Y K W P R W L H Q Q T E K Q R I I W G Y	H	GT
K I L F L D V L F P L E L H K V I Y V D A Q - I V R A D L Q E L M D M D L H G A	S.p.	GT
K I L F L D V L F P L N V R K I I F V D A D A I V R T D I K E L Y D M D L G G A	D.m.	GT
K I L F L D V L F P L V V D K F L F V D A D Q I V R T D L K E L R D F N L D G A	H	GT
P Y G Y T P M C D S R E E M E G F R F W K K G Y W K K F L R G L K Y H I S A L Y	S.p.	GT
P Y A Y T P F C D S R K E M E G F R F W K Q G Y W R S H L M G R R Y H I S A L Y	D.m.	GT
P Y G Y T P F C D S R R E M D G Y R F W K S G Y W A S H L A G R K Y H I S A L Y	H	GT
V V D L D R F R K M G A G D L L R R Q Y Q L L S A D P N S L S N L D Q D L P N H	S.p.	GT
V V D L K R F R K I A A G D R L R G Q Y Q A L S Q D P N S L S N L D Q D L P N N	D.m.	GT
V V D L K K F R K I A A G D R L R G Q Y Q G L S Q D P N S L S N L D Q D L P N N	H	GT
L Q H L I P I Y S L P Q D W L W C E T W C S D E S L K T A K T I D L C Q N P L T	S.p.	GT
M I H Q V A I K S L P D D W L W C O T W C S D S N F K T A K V I D L C N N P Q T	D.m.	GT
M I H Q V P I K S L P Q E W L W C E T W C D D A S K K R A K T I D L C N N P M T	H	GT

Panel C. Comparación de la secuencia de amino ácidos de las glucosiltransferasas de *S. pombe*, *D. melanogaster* e hígado de rata de la región marcada con I en el panel A. Los residuos idénticos se encuentran recuadrados.

La transcripción del mRNA de la glucosiltransferasa de S. pombe se induce frente a diferentes condiciones de crecimiento

Como se discutió en la INTRODUCCIÓN se ha propuesto que la glucosiltransferasa participa en el mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE (Sousa *et al*, 1992; Hammond *et al*, 1994; Helenius, 1994). Esto está basado en el hecho de que en ensayos libres de células la enzima glucosila glicoproteínas desnaturalizadas y no las formas nativas (Trombetta *et al*, 1989; Sousa *et al*, 1992). Sin embargo no existía ninguna evidencia *in vivo* que apoyara esta hipótesis. Es dable esperar que si la glucosiltransferasa estuviese relacionada con el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas, una alteración en las condiciones de crecimiento de las células que provocase la acumulación de proteínas mal plegadas debería producir un aumento en la expresión del mRNA que codifica para la enzima. Para investigar esta hipótesis, células haploides de *S. pombe* fueron sometidas a diversos tratamientos que se sabe aumentan la transcripción de ciertos genes que codifican para chaperonas, dado que las células son sometidas a condiciones que producen una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Normington *et al*, 1992; Rose *et al*, 1989; Pidoux y Armstrong, 1992; Cox *et al*, 1993; Kohno *et al*, 1993; Mori *et al*, 1993; Partaledis y Berlin, 1993).

Se extrajo el RNA de los diferentes cultivos y se analizó por la técnica de Northern blot como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS. Una banda de aproximadamente 5 Kb se detectó en las células control. Como se demuestra en la Fig. 14 luego de crecer las células a 28 °C un cambio de solo 5 min a 39 °C produjo un aumento equivalente a dos veces la expresión del mRNA de la glucosiltransferasa. Este efecto fue aún mayor cuando las células fueron sometidas al shock térmico por el lapso de 10 min, lo que produjo un aumento de 9 veces el nivel basal del mRNA. Un aumento de 5 veces se pudo observar en el caso que las células fueron mantenidas a 39 °C por 60 min (Fig. 14). Estos resultados concuerdan con la presencia de la secuencia ATTCTGGAAT en el promotor del gen de la enzima (Fig. 11), que como se mencionó anteriormente, es una secuencia encontrada en promotores de genes inducibles por shock térmico en *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Se sabe que la presencia de oligosacáridos es crucial para el plegamiento correcto de ciertas glicoproteínas (Helenius, 1994). La expresión del mRNA de la glucosiltransferasa aumentó aproximadamente 4 veces cuando las células fueron crecidas en presencia de inhibidores de la glicosilación de proteínas como tunicamicina o 2-deoxiglucosa. También la transcripción del mRNA de *gpt1* fue estimulada por un ionóforo de Ca²⁺

y un agente reductor como el 2-mercaptoetanol (Fig. 14). La presencia de Ca^{2+} es requerida para el correcto plegamiento de proteínas dentro del RE, ya que se sabe que la acción de ciertas chaperonas es dependiente de este catión. La inclusión de 2-mercaptoetanol en el medio de cultivo interfiere con el potencial redox del RE, y por lo tanto con la formación de puentes disulfuro. Puede concluirse entonces que la expresión del gen de la glucosiltransferasa de *S. pombe* está inducida por mecanismos que se sabe alteran el plegamiento correcto de glicoproteínas en el RE. Esta es la primer evidencia *in vivo* de que la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa podría estar relacionada con los mecanismos de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE.

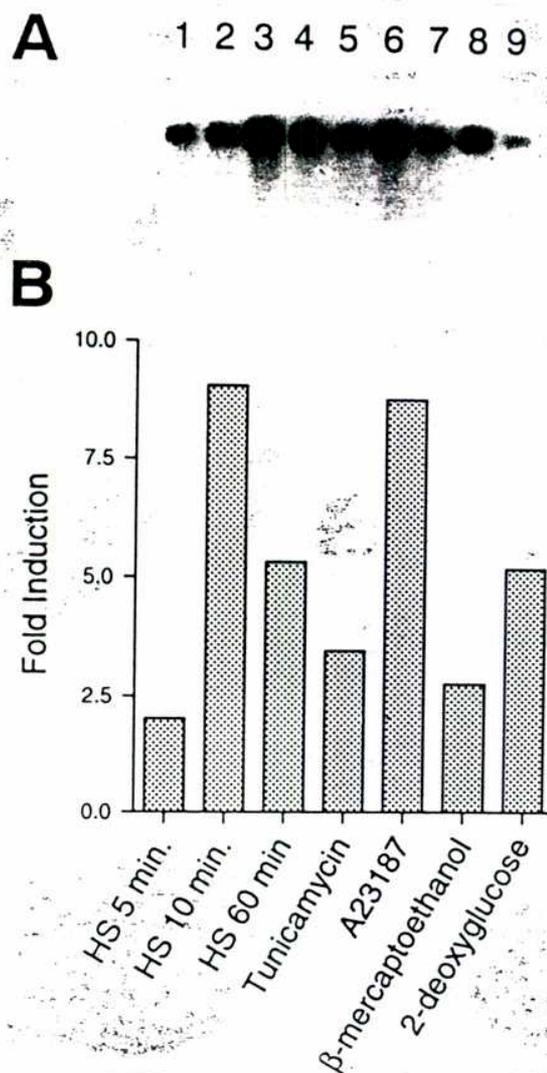


Figura 14. Expresión del mRNA de *gpt1* bajo distintas condiciones de stress.

Panel A. Las células fueron crecidas a 28 °C y luego pasadas a 39 °C por los tiempos indicados. Alternativamente las células fueron crecidas por 2 horas en presencia de tunicamicina, A23187 (un ionóforo de Ca^{2+}), 2-mercaptoetanol o 2-deoxiglucosa. Se preparó RNA total de las células sometidas a los distintos tratamientos y se analizó por Northern blot. Línea 1, células control crecidas por 2 horas a 28 °C; las líneas 2-4 corresponden a incubaciones por 5, 10 y 60 min. a 39 °C respectivamente; la línea 5, 2 horas en 10 mg/ml de tunicamicina a 28 °C; línea 6, 2 horas en 10 μM A23187 a 28 °C; línea 7, 2 horas en 2-mercaptoetanol a 28 °C; líneas 8 y 9, 2 horas a 28 °C en presencia o ausencia de 2-deoxiglucosa 10 mM, respectivamente. Las condiciones de crecimiento para los dos controles (líneas 1 y 8) fueron diferentes (ver MATERIALES Y MÉTODOS).

Panel B. Las intensidades relativas de cada mRNA de *gpt1* fueron analizadas densitométricamente por soft-LASER. La intensidad de las bandas fue normalizada con respecto a los valores obtenidos cuando el mismo filtro fue hibridizado con una sonda para el gen de actina.

Disrupción del gen de la Glucosiltransferasa

Para saber si el gen que codifica para la glucosiltransferasa es esencial para las células de *S. pombe* se realizó la disrupción de dicho gen. Se eliminaron 966 pares de bases de la región codificante por tratamiento del DNA con enzimas de restricción y se reemplazó por el gen *ura 4* (Fig. 15). Se mantuvieron a cada lado del gen *ura 4*, 400 pb hacia el 5' y 1000 pb hacia el 3' para asegurar la recombinación homóloga entre estos fragmentos y el gen salvaje de la GT. Con un fragmento lineal de esta construcción se transformó una cepa diploide de *S. pombe* (Sp 13). Se crecieron las células en medio mínimo suplementado con adenina y leucina, y se seleccionaron las células Ura⁺. Para confirmar la disrupción del gen *gpt1* se extrajo DNA de las células que fueron capaces de crecer en un medio sin uracilo y se digirió con Bgl II. Se analizó por Southern blot el DNA extraído de las células transformadas y el DNA de las células parentales (para más detalles ver MATERIALES Y MÉTODOS). Se utilizó como sonda un fragmento de 1200 pares de bases correspondiente al gen *gpt1*. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 15 B líneas 1, 2 y 3 donde puede apreciarse la presencia de una banda de 2.4 Kb que corresponde al fragmento del gen *gpt1* que contiene el gen *ura4* y además dos bandas de 0.8 y 1.2 Kb que corresponden a la copia salvaje del gen de la glucosiltransferasa. En la línea 4 de la misma figura se muestra que la banda de 2.4 Kb está ausente en las células parentales. La misma membrana que se utilizó para revelar la presencia de la banda de 2.4 Kb fue lavada de la sonda y expuesta a una placa por el término de 7 días. Al no observarse radioactividad presente, fue incubada nuevamente pero en este caso se utilizó como sonda el gen *ura 4*. Como se muestra en la Fig. 15 líneas 5, 6 y 7 la banda de 2.4 Kb hibridiza con la sonda *ura 4*. De esta manera se pudo comprobar que el fragmento obtenido era el adecuado y además que el gen utilizado para hacer la disrupción se introdujo solamente en el sitio esperado y no en otro lugar del genoma de las levaduras.

Las células diploides heterocigotas para el gen *gpt1* fueron esporuladas y se realizó el análisis de las esporas obtenidas. Todas resultaron ser viables, tanto las *gpt1*⁺ como las *gpt1*⁻. Esto indica que la actividad de esta enzima no es esencial para la supervivencia de las células. También se realizó un análisis de tetradas en el que se encontró que las 4 células obtenidas luego de la esporulación eran viables.

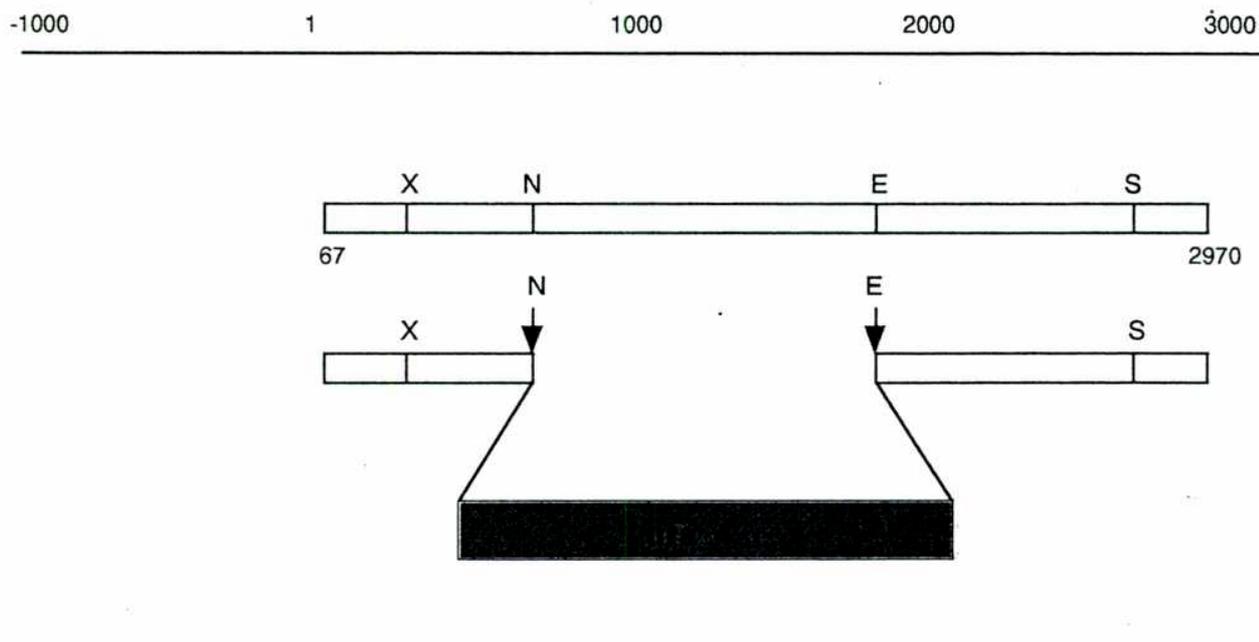
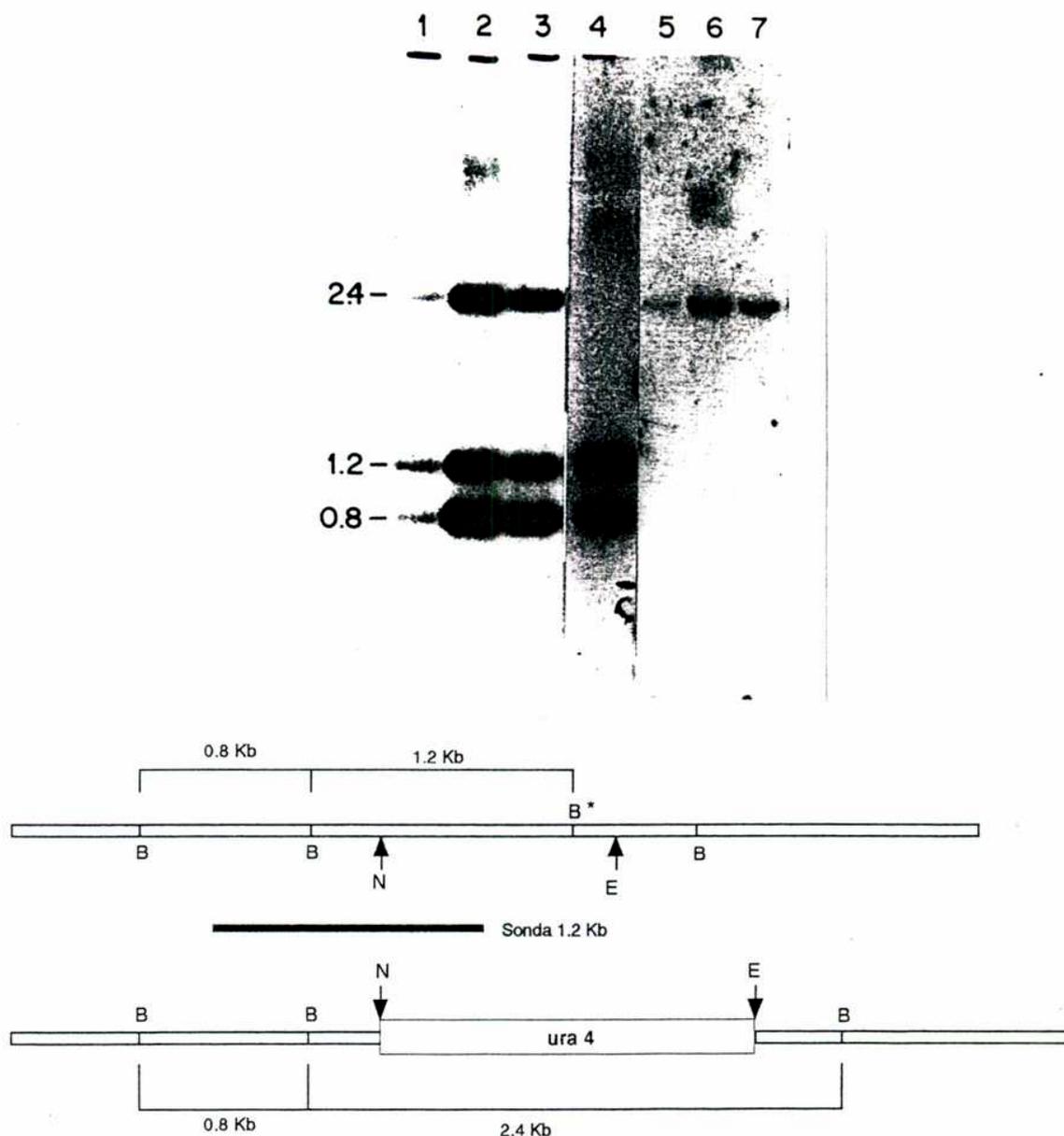


Figura 15. Disrupción del gen *gpt1*.

Panel A. Estrategia utilizada para hacer la disrupción del gen *gpt1*. El fragmento de 2903 pares de bases obtenido por PCR (ver Fig. 10) fue cortado con Nhe I y Eco RV para eliminar un fragmento de 966 pares de bases de la región codificante y se reemplazó por el gen *ura4* de *S. pombe* que tiene 1700 pares de bases. Esta construcción fue cortada con las enzimas Xba I y Sac I para obtener un fragmento lineal de DNA que contiene al gen *ura4* flanqueado por aproximadamente 400 pares de bases del gen *gpt1* hacia el 5' y 1000 pares de bases del mismo gen hacia el 3'. Este fragmento fue usado para transformar una cepa diploide de *S. pombe* (Sp13) que es *ura⁻* y se seleccionaron las células transformadas *ura⁺*. Las letras corresponden a las siguientes enzimas de restricción: E, Eco RV; N, Nhe I; S, Sac I y X, Xba I.



Panel B. Análisis por Southern blot de las células transformadas que llevan la disrupción en uno de los alelos *gpt 1*. Se extrajo DNA de 3 clones *ura*⁺ (líneas 1-3 y 5-7) y también de la cepa parental (línea 4) y se digirió con Bgl II (B). Las líneas 1 a 4 corresponden a las bandas obtenidas cuando se utilizó como sonda un fragmento del gen de la glucosiltransferasa que incluye 1200 pb desde la base 67 hacia el 5'. Líneas 5 a 7 corresponden al DNA de los mismos clones que se analizaron en las líneas 1 a 3 pero en este caso la sonda utilizada fue el gen *ura 4*.

Panel C. Esquema del DNA de *gpt1* salvaje y *gpt1* mutado. Con una línea negra gruesa se representa la sonda de 1200 pb utilizada para hibridizar el Southern blot. Entre corchetes se señalan los fragmentos obtenidos al cortar el DNA de ambos tipos celulares con Bgl II (B). Con B* se señala el sitio para Bgl II que fue eliminado al insertar el gen *ura 4*.

PCR sobre el DNA de las células *gpt1*⁺ y *gpt1*⁻

Si bien el resultado del Southern blot había dado el resultado esperado, tanto para las células salvajes como para las glucosiltransferasa⁻ se realizó otro control de la disrupción utilizando la técnica de PCR. Para esto se eligieron oligonucleótidos que se apareaban al DNA de *gpt1* en una región que estaba por fuera del sitio elegido para realizar la disrupción. De esta manera debía encontrarse una diferencia de aproximadamente 750 pares de bases entre las células *gpt1*⁺ y *gpt1*⁻. Esto se debe a que para realizar la disrupción de la glucosiltransferasa, se eliminaron 966 pb del gen de la enzima y se reemplazaron por el gen *ura 4* que tiene aproximadamente 1700 pb. Cuando se utilizó un par de oligonucleótidos que originaban una banda de aproximadamente 2.3 Kb en las células glucosiltransferasa⁺ (Fig. 16 calle 1), esta banda se convirtió en una de 3.1 Kb cuando se utilizó sobre DNA de las células glucosiltransferasa⁻, (Fig. 16 calle 2). Para otro par de oligonucleótidos que están un poco por fuera de los anteriores, las bandas obtenidas fueron de 2.8 Kb para el control y 3.5 Kb para las células con la disrupción, (Fig. 16 calles 3 y 4 respectivamente).

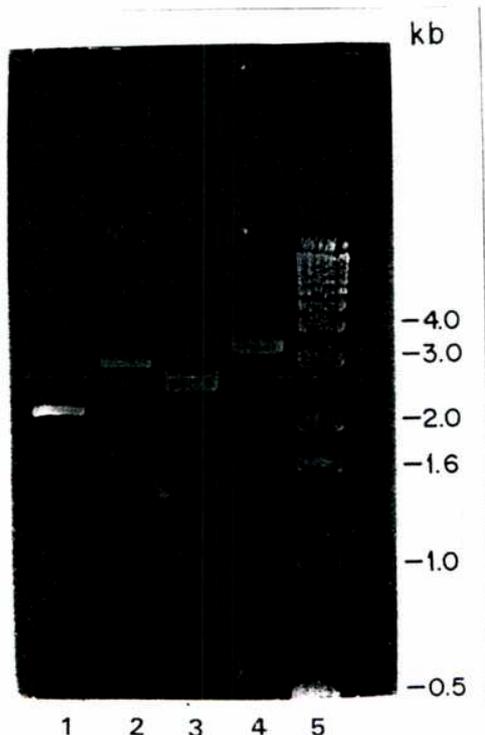


Figura 16. Analisis de los productos de PCR sobre el DNA de las células *gpt1*⁻ y *gpt1*⁺

Los productos obtenidos en la reacción de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%. La descripción de la Fig. se detalla en el texto. En la calle 5 se corrió un marcador del tamaño del DNA (1Kb leader de Gibco)

Las células $gpt1^-$ no forman $Glc_1Man_7-9GlcNAc_2$ -proteína por reglucosilación de $Man_7-9GlcNAc_2$ -proteína

Para corroborar bioquímicamente lo que se había hecho a nivel genético, se prepararon microsomas de las células $gpt1^-$ y $gpt1^+$. Se midió actividad de glucosiltransferasa en ambos extractos crudos y se caracterizaron los productos obtenidos. En las células glucosiltransferasa⁺ se obtuvo, en ausencia de tiroglobulina desnaturalizada, $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ -Prot, $Glc_1Man_8GlcNAc_2$ -Prot y $Glc_1Man_7GlcNAc_2$ -Prot, (Fig. 17). La adición de esta glicoproteína estimuló la formación de los mismos compuestos. En el caso de los microsomas preparados a partir de las células que llevan la disrupción no se formó ninguno de los productos, tanto en ausencia como en presencia de la tiroglobulina desnaturalizada (Fig. 17).

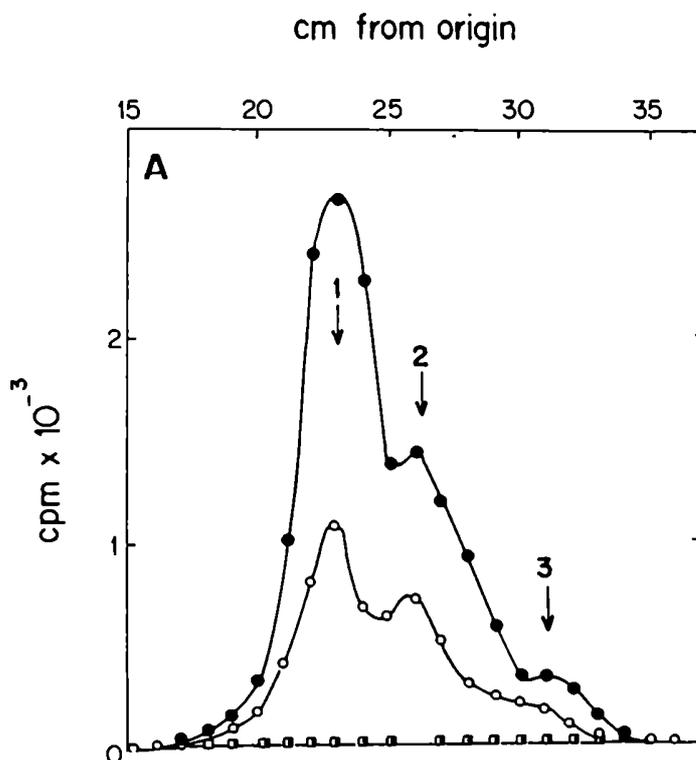


Figura 17. Caracterización bioquímica de las mutantes

Se prepararon microsomas de células haploides salvajes (círculos) y $gpt1^-$ (cuadrados) y fueron incubados con UDP- ^{14}C Glc en presencia (●-● o ■-■) o en ausencia (○-○ o □-□) de tiroglobulina desnaturalizada. Las proteínas totales fueron degradadas con Pronasa y los glicopéptidos resultantes incubados con Endo H. Los oligosacáridos se corrieron en una cromatografía en papel en solvente A. Las posiciones de los standards fueron; 1: $Glc_1Man_9GlcNAc$; 2: $Glc_1Man_8GlcNAc$; 3: $Glc_1Man_7GlcNAc$.

Caracterización fenotípica de las mutantes

Para investigar si el crecimiento de las células que llevan la disrupción está alterado, se realizaron cultivos a diferentes temperaturas, tanto de las células parentales como de las *gpt1*⁻. A 18 y 39 °C no se observó una diferencia importante en la velocidad de crecimiento de ambos tipos celulares (Fig. 18). Sin embargo cuando fueron crecidas a 28 °C las células mutantes crecieron a mayor velocidad que las glucosiltransferasa⁺. Del mismo modo se observó una diferencia en el tamaño de las células, siendo las *gpt1*⁻ un 30 % más cortas que las salvajes (Fig. 19).

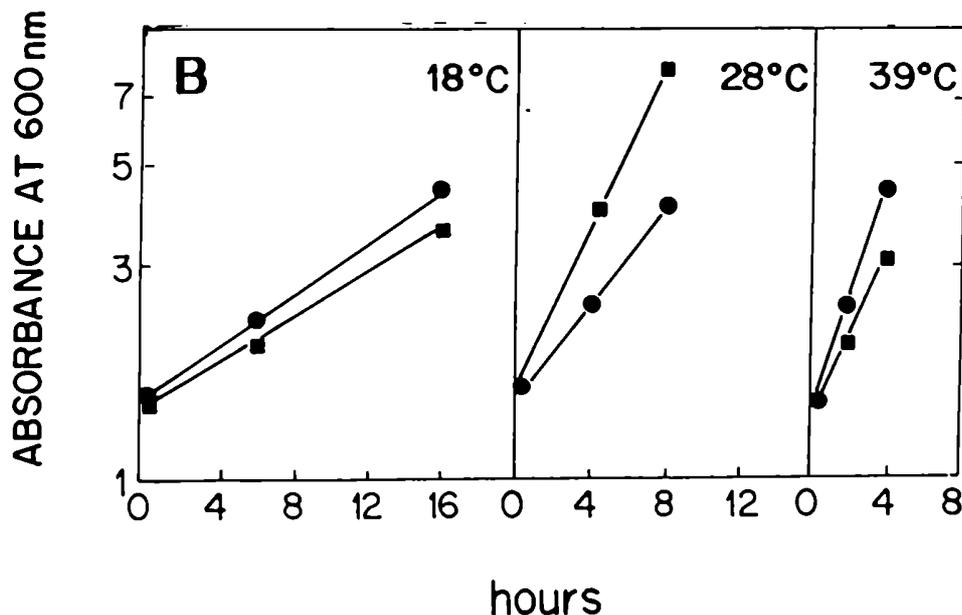


Figura 18. Crecimiento de las células *gpt1*⁺ y *gpt1*⁻. Las células salvajes (*gpt1*⁺) indicadas con círculos o mutantes (*gpt1*⁻) indicadas con cuadrados fueron crecidas a 18, 28 o 39 °C.

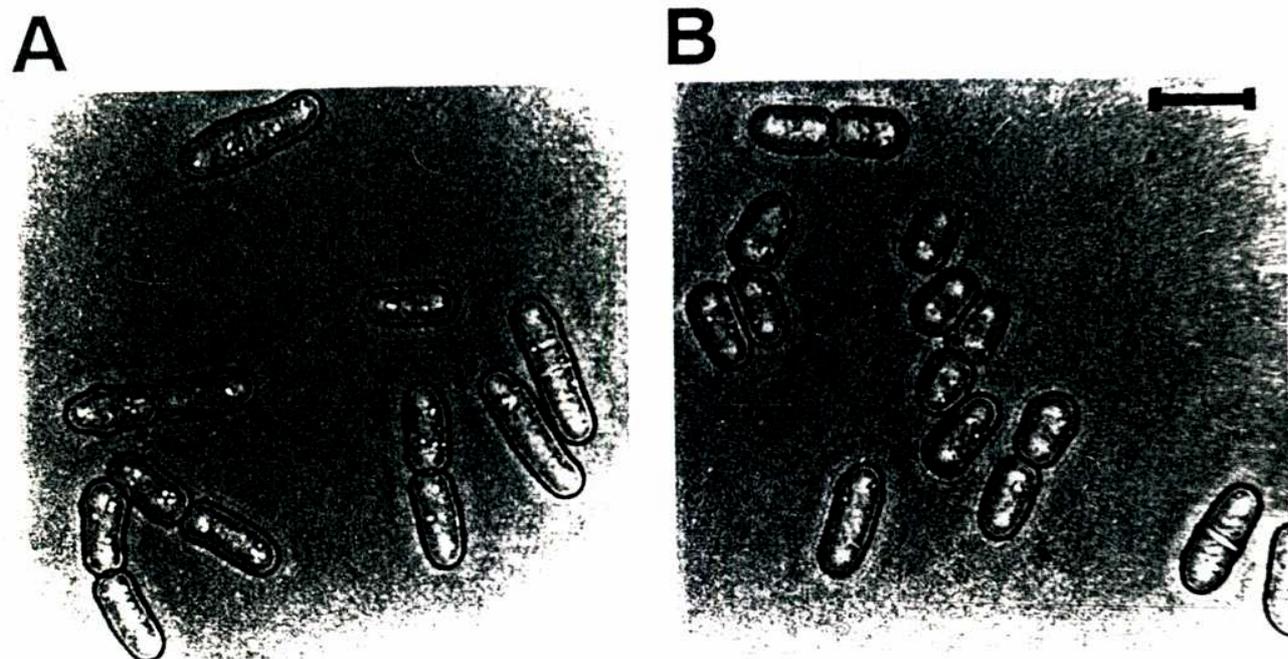


Figura 19. Diferencias de morfología.

Microscopía de contraste de fase de A, *S. pombe* tipo salvaje (*gpt1*⁺) y B, *S. pombe* mutante (*gpt1*⁻). La barra equivale a 10 μm .

Saccharomyces cerevisiae no tiene actividad de UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa

La glucosilación de tiroglobulina desnaturalizada fue detectada en preparaciones crudas de células de mamíferos (tiroide bovina e hígado de rata) (Parodi *et al*, 1983; Parodi *et al*, 1984; Trombetta *et al*, 1989), plantas (*Phaseolus vulgaris* y *Daucus carota*) (Trombetta *et al*, 1989, y resultados no publicados), insectos (*Drosophila melanogaster*) (Parker y col., 1995) hongos (*Mucor rouxii*) (Trombetta *et al*, 1989) y protozoos (*Trypanosoma cruzi* y *Crithidia fasciculata*) (Trombetta *et al*, 1989 y Labriola *et al*, 1995). También se obtuvieron evidencias *in vivo* de la reacción de glucosilación transitoria en tiroide bovina, *P. vulgaris*; células de tripanosomátidos (Parodi *et al*, 1983; Parodi *et al*, 1984; Parodi *et al*, 1983 b; Mendelzon y Parodi 1986 y Mendelzon *et al*, 1986). A pesar de ser una reacción ampliamente distribuida en la naturaleza no se detectó actividad de glucosiltransferasa cuando se ensayaron membranas microsomales de *S. cerevisiae*. De este organismo se conoce la secuencia del gen *Kre 5* que presenta homología con las glucosiltransferasas de *S. pombe*, *D. melanogaster* e hígado de rata y por esto se pensó que podía ser el gen que codifica para la glucosiltransferasa de *S. cerevisiae*. Para confirmar si la glucosilación transitoria de glicoproteínas ocurre o no en células intactas de *S. cerevisiae*, se realizaron experimentos de marcación *in vivo* de estas células. Se utilizaron tres tipos de células: *S. cerevisiae* salvaje, y dos mutantes, *alg 5* y *alg 6*. Las mutantes transfieren a las proteínas oligosacáridos no glucosilados (Man₉GlcNAc₂). Estas no pueden sintetizar dolicol-P-P-oligosacáridos glucosilados. En el caso de *alg 5* porque son defectivos en la síntesis de dolicol-P-Glc y en el caso de *alg 6* porque carecen de la enzima que transfiere el residuo de glucosa desde el dolicol-P-Glc al Man₉GlcNAc₂-P-P-dolicol (Runge *et al*, 1984). Se incubaron las células por 15 min con [¹⁴C]glucosa en presencia de DNJ, un inhibidor de la glucosidasa II. El análisis de los oligosacáridos resistentes a la degradación por Endo H se muestra en la Fig. 20 A-C. Como puede observarse las células salvajes produjeron oligosacáridos que migran como Glc₂Man₉GlcNAc, Glc₁Man₉GlcNAc y Glc₁Man₈GlcNAc y aparcan en forma de hombros, en menor proporción, Glc₃Man₉GlcNAc y Glc₁Man₇GlcNAc. En cambio los mutantes producen solamente compuestos que migran como Man₉GlcNAc, Man₈GlcNAc y Man₇GlcNAc.

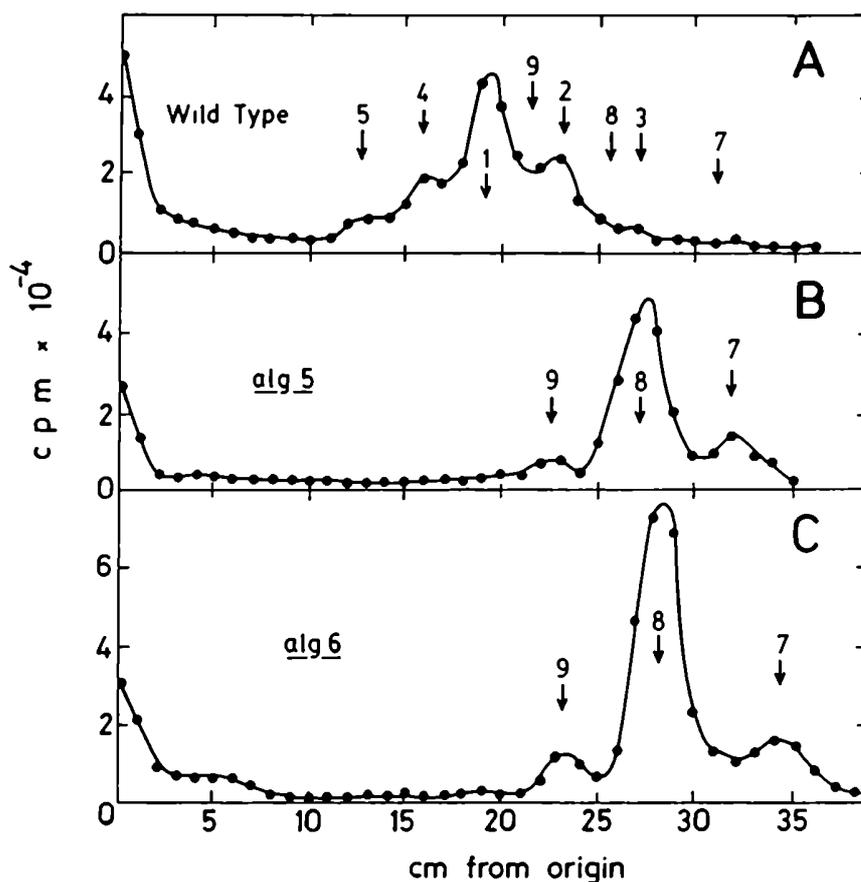


Figura 20. Oligosacáridos sintetizados por *S. cerevisiae* tipo salvaje y mutantes (*alg 5* y *alg 6*).

Se incubaron células de *S. cerevisiae* tipo salvaje y mutantes *alg 5* y *alg 6* con [¹⁴C]glucosa en presencia de DNJ por 15 minutos. Se aislaron los oligosacáridos resistentes al tratamiento con Endo H y se corrieron en una cromatografía en papel en solvente A. Para más detalles ver MATERIALES Y MÉTODOS. Standards, 1: Glc₁Man₉GlcNAc; 2: Glc₁Man₈GlcNAc; 3: Glc₁Man₇GlcNAc; 4: Glc₂Man₉GlcNAc; 5: Glc₃Man₉GlcNAc; 7: Man₇GlcNAc; 8: Man₈GlcNAc; 9: Man₉GlcNAc.

Para analizar la composición de azúcares de los oligosacáridos obtenidos en el paso anterior, se trataron con α -manosidasa y se sometieron a una cromatografía en papel. Todos generaron manosa (Fig. 21 A-C), en el caso de las células mutantes se obtuvo además un compuesto resistente a la degradación con α -manosidasa que migra justo por delante de la manosa, en la posición del disacárido $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$ (Fig. 21 B y C), este producto no se detectó en el caso de las células salvajes (Fig. 21 A). Por el contrario estas últimas generaron un producto resistente al tratamiento con la enzima, que migra como $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (Fig. 21 A). Dado que la resolución obtenida entre la manosa y el disacárido mencionado más arriba no fue la óptima, estos compuestos se eluyeron del papel y se recromatografiaron en otro solvente (solvente C, ver MATERIALES Y MÉTODOS). En este caso pudo confirmarse sin duda la presencia de $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$ y manosa para las mutantes (Fig. 21 E) (solo se muestra lo obtenido en el caso de *alg 6* ya que con *alg 5* se obtuvo el mismo resultado). La Fig. 21 D muestra que la recromatografía de los productos que migraron entre los cm 21 y 23 de la Fig. 21 A, solo generan manosa y no se detectó el disacárido $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$. Con el objetivo de analizar la composición de las sustancias resistentes al tratamiento con α -manosidasa que migraron como $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ en la Fig. 21 A se realizó una hidrólisis ácida fuerte de estos compuestos. Los productos obtenidos se corrieron en una cromatografía en papel obteniéndose solamente glucosa y manosa (Fig. 21 F). Es necesario mencionar que cuando la cepa salvaje se incubaba en condiciones similares con $[^{14}\text{C}]$ glucosa pero en ausencia de DNJ, solo se obtienen $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$ (Parodi *et al.*, 1984).

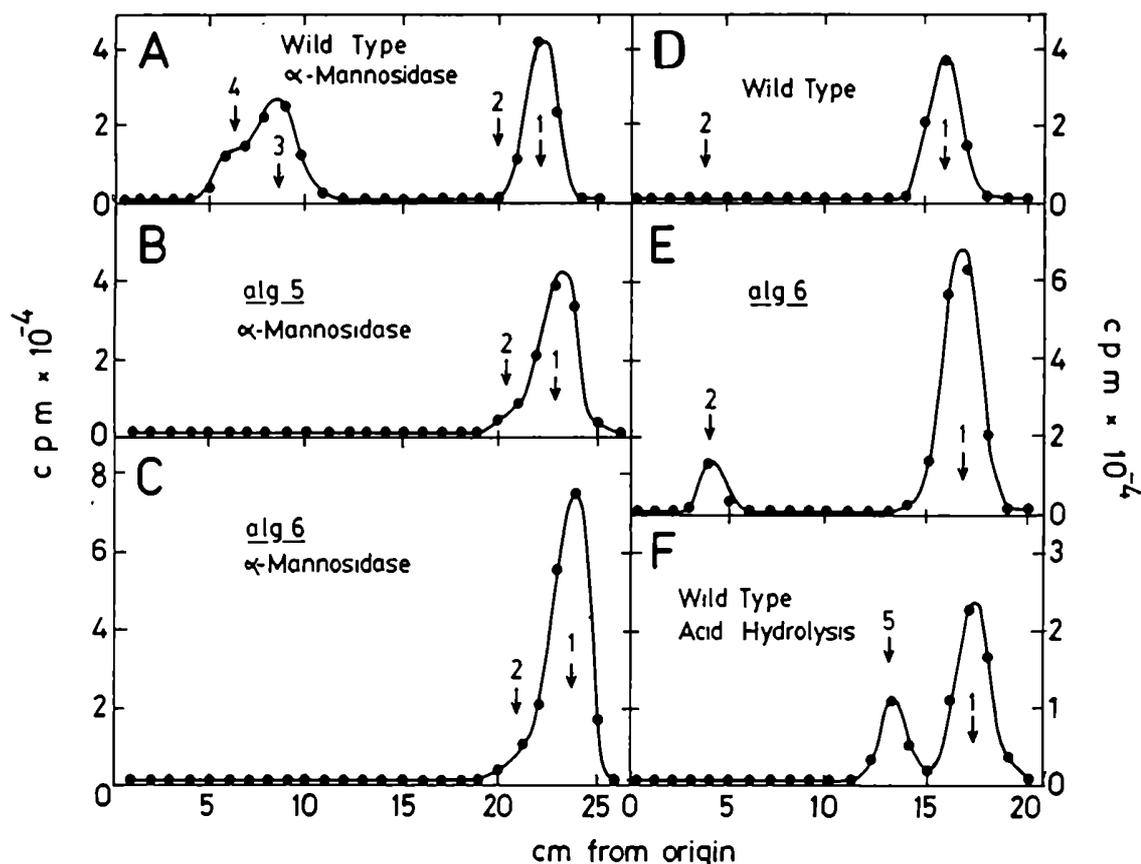


Figura 21. Caracterización de los oligosacáridos sintetizados por *S. cerevisiae*.

Panel A. Los oligosacáridos que migraron entre los cm. 12 y 27 de la Fig 20 panel A fueron tratados con α -manosidasa y posteriormente corridos en una cromatografía en papel en solvente C.

Panel B. lo mismo que el panel A pero en este caso los oligosacáridos tratados con α -manosidasa fueron los que migraron entre los cm 21 y 34 del panel B Fig. 20.

Panel C. lo mismo que en el panel A pero los oligosacáridos que se trataron con la enzima fueron los que migraron entre los cm. 22 y 36 en el panel C de la Fig. 20.

Panel D. las sustancias que migraron entre los cm 21 y 23 del panel A se corrieron en una cromatografía en papel en solvente B.

Panel E. lo mismo que en panel D, pero en este caso se corrieron los productos que habían migrado entre los cm. 20 y 25 del panel C.

Panel F. las sustancias obtenidas entre los cm 5 y 10 del panel A fueron sometidas a una hidrólisis ácida fuerte y corridas en una cromatografía en papel en solvente B. Standards: 1, manosa; 2, $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$; 3, $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$; 4, $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$; y 5, glucosa.

Estos resultados indican que los oligosacáridos sintetizados por las células mutantes no contienen glucosa, ya que son completamente degradados por la α -manosidasa a residuos de manosa y $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$. Este disacárido es resistente ya que presenta uniones de tipo b. Los resultados obtenidos con las células salvajes demuestran que la DNJ inhibió eficientemente la remoción de glucosas debida a la actividad de la glucosidasa II, ya que no se detectó la formación de $\text{Man}_1\text{GlcNAc}$ entre los productos de degradación por la α -manosidasa. El hecho de que no se encontraron en las células mutantes oligosacáridos que contengan glucosa, confirma que la glucosilación transitoria de glicoproteínas, no ocurre en *S. cerevisiae*. Los residuos de glucosa detectados en los oligosacáridos unidos a proteínas en las células salvajes provienen de los compuestos unidos al dolicol-P-P, y que son transferidos a las proteínas como oligosacáridos glucosilados que luego de ser incorporados en las proteínas son procesados dentro del RE.

Cabe mencionar que células de *T. cruzi* incubadas con [^{14}C]glucosa en presencia de DNJ acumulan $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteínas por acción de la glucosiltransferasa (Gañan *et al*, 1991). Este parásito posee una serie de particularidades en su mecanismo de N-glicosilación de proteínas. Es incapaz de sintetizar dolicol-P-Glc por lo que transfiere a proteínas oligosacáridos no glucosilados de estructura $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Los mutantes de *S. cerevisiae* utilizados en el experimento anterior son idénticos a lo descrito para *T. cruzi*. Sin embargo estas levaduras fueron incapaces de reglucosilar los oligosacáridos unidos a proteínas. Por lo tanto queda demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que *S. cerevisiae* carece de actividad de UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. Estos datos junto con otras evidencias que se discuten anteriormente con respecto a la proteína Kre5 nos hacen pensar que este gen no corresponde a la glucosiltransferasa. Mas aún el otro integrante del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE es la calnexina. Cuando se buscó el gen de esta proteína en *S. cerevisiae* (Parlati *et al*, 1995), se encontró el gen *CNE 1*. Este codifica para una proteína que es similar a la calnexina pero que a diferencia de esta carece del dominio citoplasmático, no une Ca^{+2} , y la disrupción de dicho gen no fue letal para las levaduras ni causa ningún fenotipo detectable (a diferencia de la disrupción de la calnexina en *S. pombe* que es letal). Esto induce a pensar que *S. cerevisiae* posee algún otro mecanismo de control para el plegamiento de las glicoproteínas o que directamente carece de él.

Expresión del gen gpt1 en S. pombe glucosiltransferasa menos

Se transformó la cepa glucosiltransferasa ⁻ con un plásmido de expresión que llevaba el gen *gpt1*. Los detalles de la construcción de este plásmido se describen en MATERIALES Y MÉTODOS. El gen de la glucosiltransferasa se encuentra bajo el control del promotor *nmt1* ("no message in thiamine") (Maudrel, 1993). Este puede ser desreprimido cuando la concentración de tiamina del medio de cultivo es inferior a 0.5 mM. Existen tres versiones de este promotor que permiten obtener distintos grados de expresión. En este caso se usaron los plásmidos llamados pREP3x, pREP41x y pREP81x de niveles de expresión fuerte, media y débil respectivamente (Basi *et al* 1993; Forsburg, 1994). Las células que llevaban el plásmido pREP3x se crecieron en medio mínimo suplementado con adenina y tiamina para mantener el promotor reprimido o medio mínimo suplementado solo con adenina con el fin de desreprimir el promotor y lograr la expresión del gen *gpt1*. Las células que llevaban las otras dos versiones del promotor (pREP41x y pREP81x) se crecieron en ausencia de tiamina. La actividad de glucosiltransferasa obtenida en los microsomas para cada una de las distintas condiciones se puede observar en la Tabla IV.

TABLA IV

ACTIVIDAD DE GLUCOSILTRANSFERASA BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR *NMT1*

Células	Plásmido	Tiamina	cpm/mg Prot
<i>gpt1</i> ⁺	-----	-----	7607
<i>gpt1</i> ⁻	-----	-----	511
<i>gpt1</i> ⁻	pREP3x	10 µg/ml	3059
<i>gpt1</i> ⁻	pREP3x	-----	17343
<i>gpt1</i> ⁻	pREP41x		4920
<i>gpt1</i> ⁻	pREP81x		3445

Los procedimientos experimentales se detallan en MATERIALES Y MÉTODOS.

La actividad obtenida en el caso de las células transformadas con el plásmido que lleva el gen *gpt1* bajo el control del promotor fuerte (17343 cpm/mg proteína) fue superior a la obtenida con el extracto preparado a partir de las células *gpt1*⁺ (7607 cpm/mg proteína), lo que sugiere que en estas condiciones la glucosiltransferasa se está expresando a niveles superiores al normal. Esta actividad fue nula en el caso de las células *gpt1*⁻. Era de esperar que las células que llevaban el plásmido pREP3x y que fueron crecidas en presencia de tiamina tuvieran una actividad de glucosiltransferasa nula sin embargo se obtuvieron 3059 cpm/mg proteína. Se ha demostrado que aún en presencia de tiamina usando distintas proteínas como genes "reporter", el promotor *nmt1* no se reprime totalmente. Con los plásmidos de niveles de expresión media (pREP41x) y baja (pREP81x) se obtuvo una actividad de glucosiltransferasa similar. Para el pREP41x 4920 cpm/mg proteína y para el pREP81x se obtuvieron 3445 cpm/mg proteína. Con ninguno de ellos se logró tener la actividad presente en los microsomas de las células salvajes

Las proteínas microsomales fueron analizadas en un SDS-PAGE (Fig. 22). La intensidad de las bandas obtenidas coincide con la actividad de glucosiltransferasa ensayada en cada caso. En el mismo gel se corrió una muestra de glucosiltransferasa de hígado de rata (HR) parcialmente purificada (Fig. 22 línea 4). En un extracto crudo de microsomas de *S. pombe* salvaje la glucosiltransferasa es apenas visible (línea 3) y esta ausente en el caso de las células que son glucosiltransferasa⁻ (línea 2). Cuando las células transformadas con el vector pREP3x se crecieron en ausencia de tiamina la banda correspondiente a la glucosiltransferasa se hace claramente visible (línea 5). Para las mismas células crecidas en presencia de tiamina (línea 6), lo que debería reprimir al promotor, se observó una banda de intensidad similar a la obtenida con las células transformadas con el vector pREP81x (línea 8). Como se mencionó mas arriba la actividad de glucosiltransferasa en el caso de las células transformadas con el vector pREP3x (promotor reprimido) y pREP81x (promotor promotor desreprimido) fue similar. Las células transformadas con el plásmido pREP41x (línea 7) presentan una banda correspondiente a la glucosiltransferasa de intensidad apenas superior a la de las células transformadas con el plásmido de expresión débil.

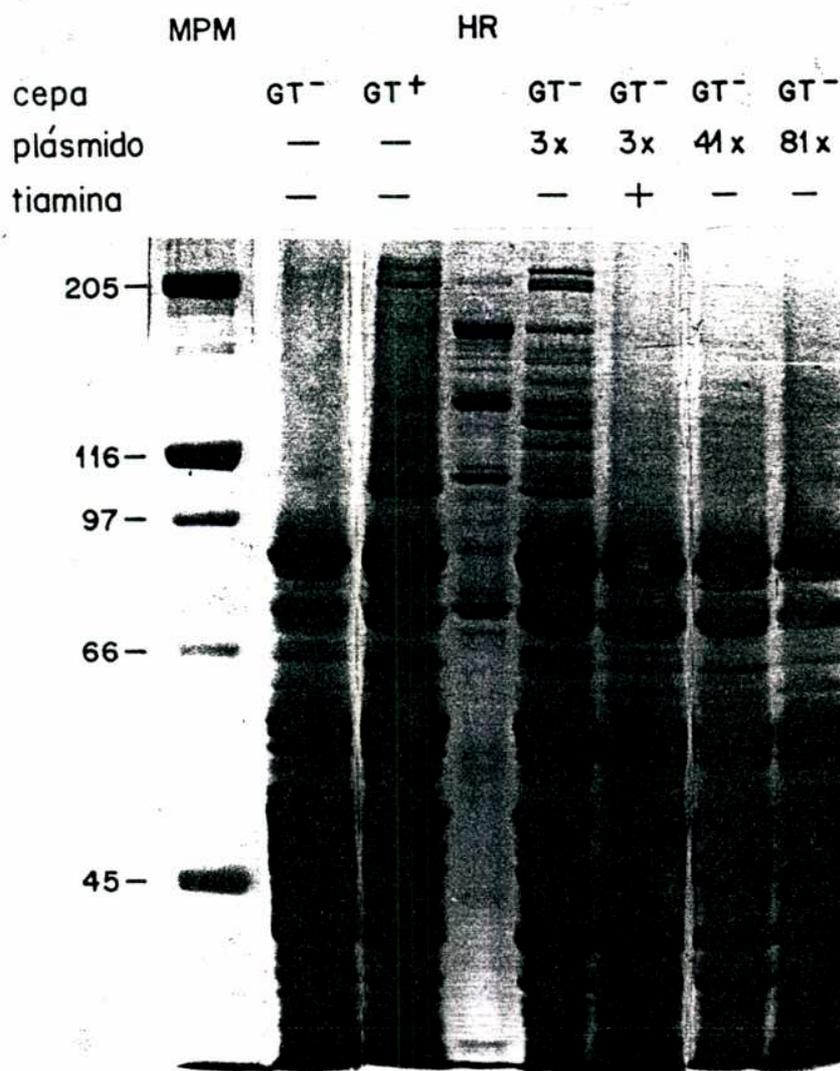


Figura 22. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas microsomales en *S. pombe* *gpt1*⁺, *gpt1*⁻ y *gpt1*⁻ transformadas con los plásmidos de expresión.

Las proteínas se analizaron en un SDS-PAGE al 7.5 %. El gel se tiñó con Coomassie Blue. Se sembraron aproximadamente 300 µg de proteínas totales en cada calle. En el caso de la calle 4 donde se sembró un fracción parcialmente purificada de la glucosiltransferasa de hígado de rata se sembraron 25 µg de proteínas totales. La banda correspondiente a la glucosiltransferasa se señala con una flecha.

Los niveles de expresión obtenidos aún con el promotor fuerte pueden parecer bajos, sin embargo; hay que tener en cuenta que por la forma en la que está construido el plásmido entre el promotor y el codón de iniciación ATG hay 76 pb. Esta distancia es superior a la óptima, que no debería superar los 30 pb para tener niveles de expresión mayores. Pese a esto se logró obtener la expresión de glucosiltransferasa en células *gpt1⁻*.

DISCUSIÓN

Excepto en unos pocos casos extraordinarios (Strous *et al*, 1987; Kaushal *et al*, 1990 ; Ohta *et al*, 1992), no se han detectado glicoproteínas maduras con oligosacáridos de estructura $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$. Esto indica que la glucosa no es un componente normal de las N-glicoproteínas maduras, interviniendo sólo transitoriamente en su biosíntesis. En primer término la presencia de los tres restos de glucosa en el intermediario $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ parece servir como señal para su transferencia a la proteína. Inmediatamente después de la transferencia, los residuos de glucosa son removidos por las glucosidasas I y II (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Kaplan *et al*, 1987). A continuación operaría el mecanismo de reglucosilación de los oligosacáridos deglucosilados unidos a proteína. La formación *in vivo* de $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$ a partir de los correspondientes compuestos deglucosilados es transitoria.

Los resultados aquí presentados demuestran que la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, la enzima responsable de la glucosilación transitoria, de *Schizosaccharomyces pombe* es una proteína soluble del interior del RE, ya que presenta una señal de retención (PDEL) para proteínas residentes del RE. Esto había sido demostrado por ensayos bioquímicos para la enzima de hígado de rata (Trombetta *et al*, 1991). Recientemente en un trabajo en colaboración entre el laboratorio del Dr. A. Parodi y el Dr. J. Bergeron se secuenció el gen que codifica para la glucosiltransferasa de hígado de rata que presenta en su extremo C-terminal la secuencia HEEL. Desde 1995 se conoce la secuencia de la glucosiltransferasa de *Drosophila melanogaster* que también presenta una señal de retención para proteínas solubles del RE, esta es HGEL (Parker *et al*, 1995). La caracterización de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa como una proteína soluble del lumen del RE, coincide con la localización de sus sustratos *in vivo*: las glicoproteínas, el UDP-Glc y el Ca^{2+} . En las células de mamíferos el RE es el principal reservorio celular de Ca^{2+} pudiendo alcanzar concentraciones de 3 mM, tres ordenes de magnitud mayor que en el citoplasma (Sambrook, 1990). En el caso de las levaduras se sabe que el calcio se almacena en las vacuolas, aunque se comprobó que la concentración de este ión en el RE es mayor que la que se encuentra en el citoplasma de estos organismos. Se describió para las células de mamíferos un sistema que transporta específicamente UDP-Glc desde el citoplasma, donde es sintetizado, hacia el RE. En *S. pombe* debería existir un sistema similar que proporcione el UDP-Glc que la

enzima utiliza como dador de azucar. La glucosiltransferasa tendría entonces la misma localización subcelular que la otra enzima del ciclo de glucosilación-deglucosilación, la glucosidasa II (Lucocq *et al*, 1986). Resulta interesante que todas las glicosiltransferasas y glicosidasas involucradas en la síntesis y procesamiento de N-glicoproteínas estudiadas hasta el momento son proteínas de membrana (Paulson y Colley, 1989), excepto las involucradas en la glucosilación transitoria; la UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa y la glucosidasa II. Ambas enzimas pueden compartir la misma ubicación dentro del RE, lo que tal vez contribuya a la rápida desaparición de los compuestos glucosilados, o tal vez se sitúen en distintos sub-compartimentos del RE, ya que existen algunas comunicaciones que permiten suponer dicha subcompartimentalización (Kabcenell y Atkinson, 1985; Rizzolo *et al*, 1985; Pathak *et al*, 1988; Rizzolo y Kornfeld, 1988; Prime, 1989). La disponibilidad de anticuerpos contra la glucosiltransferasa y la glucosidasa II permitirá resolver esto por colocalización al microscopio electrónico.

Es interesante observar que cuando se comparan las secuencias de las glucosiltransferasas de *S. pombe*, *D. melanogaster* e hígado de rata, todas tienen aproximadamente el mismo tamaño y presentan una elevada identidad en el extremo C-terminal. Sin embargo son muy diferentes en el extremo N-terminal. Esta característica es similar a lo que ocurre entre proteínas de la familia hsp70 que incluye a la chaperona BiP del RE. El extremo N-terminal de estas proteínas donde se encuentra la actividad de ATPasa es muy similar, mientras que la región C-terminal que contiene sitios de reconocimiento y unión a péptidos hidrofóbicos, es mucho menos conservada. Como se mencionó anteriormente se ha demostrado que la glucosiltransferasa de hígado de rata se une a péptidos hidrofóbicos expuestos en las glicoproteínas mal plegadas (Sousa y Parodi, 1995). Esta estructura de dos dominios nos permite especular que el extremo C-terminal, que además presenta similitud con algunas glicosiltransferasas bacterianas (Parker *et al*, 1995), tendría la actividad de glucosiltransferasa. Por lo tanto sería la región encargada de reconocer el nucleótido-azúcar (dador del residuo de glucosa) y el oligosacárido en la glicoproteína sustrato. La región N-terminal tiene una composición de amino ácidos muy variable, lo que le permitiría el reconocimiento de una gran variedad de péptidos hidrofóbicos diferentes que quedarían expuestos cuando las proteínas tienen una conformación diferente a la nativa.

Existe otra proteína que presenta semejanzas en el extremo C-terminal con las glucosiltransferasas, esta es la proteína Kre 5 de *Saccharomyces cerevisiae*. No se sabe a ciencia cierta cual es la reacción que cataliza esta enzima (si es que cataliza alguna).

Se cree que participa de algún modo en la síntesis del (1-6)- β -D-glucano de la pared celular de dichas levaduras. Dado su semejanza con las glucosiltransferasas se pensó que podía ser la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa de *S. cerevisiae*. Sin embargo por dos motivos suponemos que el gen *kre 5* no codifica para dicha glucosiltransferasa: i) Utilizando el mismo ensayo *in vitro* con el que se detectó actividad de glucosiltransferasa en *T. cruzi*, *S. pombe* y células de mamífero (hígado de rata) no se pudo detectar la actividad enzimática en microsomas de *S. cerevisiae*. Para confirmar que la glucosilación transitoria no ocurría en dichas levaduras se recurrió a un ensayo *in vivo* mediante el cual se crecieron células mutantes de *S. cerevisiae* con [14 C]glucosa en presencia de un inhibidor de la glucosidasa II. Dado que estas células mutantes solo transfieren a sus proteínas oligosacáridos no glucosilados, la presencia de glucosa en sus glicoproteínas debería provenir únicamente por acción de la glucosiltransferasa. Ninguno de los dos mutantes utilizados fue capaz de formar *in vivo* glicoproteínas glucosiladas. Por lo tanto las evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* demuestran que dichas levaduras son los únicos organismos eucariontes conocidos hasta el momento que carecen de actividad de glucosiltransferasa. ii) La identidad de los residuos de aminoácidos encontrada en la zona C-terminal de las tres glucosiltransferasas conocidas (*S. pombe*, *D. melanogaster* e hígado de rata) es superior al 58 % a pesar de que estas sean especies tan distantes en la escala evolutiva. Cuando se compara la misma región con la proteína Kre 5 la identidad es inferior al 20 %. Como se menciona mas arriba se cree que Kre 5 participa de alguna manera en la síntesis de glucano. Es posible que la homología observada entre estas proteínas se deba a que en la zona C-terminal se encuentra la región encargada de reconocer el nucleotido-azúcar (UDP-Glc ?). Existe otra identidad posible para la proteína Kre 5. La disrupción del gen de la glucosiltransferasa en *S. pombe* no afectó la viabilidad de las células, por el contrario las células *kre5*⁻ mostraron un fenotipo alterado y dificultades en el crecimiento a 28 °C. A pesar que la disrupción de la calnexina en *S. pombe* es letal, en *S. cerevisiae* se encontró un gen similar cuya disrupción no tiene efecto alguno para el crecimiento de las células. Dado que se comprobó que la glucosiltransferasa se une específicamente a péptidos hidrofóbicos se podría especular que ésta posee *in vivo*, además de una actividad enzimática, una de chaperona. Estos antecedentes permitirían suponer que la proteína Kre 5 es una glucosiltransferasa que perdió su actividad catalítica pero que conserva su propiedad de chaperona. Al estar ausente en las células *kre5*⁻ los efectos observados en el fenotipo se podrían deber a la ausencia de su actividad como chaperona. Se podría evaluar esta posibilidad expresando la

glucosiltransferasa de *S. pombe* en *S. cerevisiae kre5⁻* lo que debería restituir el fenotipo salvaje.

La característica más saliente mostrada por la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa (tanto para la de hígado como para la de *S. pombe*) ha sido la absoluta selectividad por glicoproteínas desnaturalizadas. El efecto de la desnaturalización no fue el de hacer accesibles a los oligosacáridos que pudieran estar escondidos en las estructuras nativas ya que: (a) los glicopéptidos generados por tratamiento de glicoproteínas con Pronasa o con tripsina fueron pobremente glucosilados a pesar de que los oligosacáridos se encuentran totalmente expuestos al medio en estas especies; y (b) los oligosacáridos en las glicoproteínas nativas que tampoco fueron glucosilados fueron, sin embargo, accesibles a sondas macromoleculares como Con A-Sepharosa, Endo H y α -manosidasa.

En experimentos orientados a develar las bases moleculares del reconocimiento exclusivo de glicoproteínas desnaturalizadas por parte de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa, se obtuvo evidencia de que uno de los elementos del sistema de reconocimiento es el residuo más interno de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos (Sousa y Parodi, 1995). Este residuo no es completamente accesible a una sonda macromolecular como la Endo H en la mayoría de las glicoproteínas nativas. En estas el clivaje de los oligosacáridos por la Endo H requiere la desnaturalización de la glicoproteína. Se demostró también para la glucosiltransferasa de hígado de rata que existirían determinantes proteicos cuya interacción con la enzima es requerida para que la reacción de transferencia tenga lugar (Sousa y Parodi, 1995). Estos determinantes se encuentran expuestos en las formas desnaturalizadas de las glicoproteínas pero no en las nativas. La necesidad del reconocimiento no solo del residuo más interno de N-acetilglucosamina, sino también de determinantes proteicos está claramente evidenciada por el hecho de que los glicopéptidos obtenidos por digestión con Pronasa o con tripsina son muy pobremente glucosilados. Los determinantes proteicos y el oligosacárido deben estar covalentemente unidos para que la reacción de glucosilación tenga lugar. Esta es una restricción importante dado el gran número de proteínas y glicoproteínas desplegadas, parcialmente plegadas o mal plegadas que existen en el lumen del RE. Si no fuera necesario que los elementos proteicos y el oligosacárido a ser glucosilado estuviesen covalentemente unidos, podría suponerse que los determinantes proteicos de especies no plegadas inducirían la glucosilación de oligosacáridos pertenecientes a moléculas correctamente plegadas, siempre y cuando estas

últimas tengan el residuo mas interno de N-acetilglucosamina accesible a la glucosiltransferasa.

La selectividad por glicoproteínas desnaturalizadas encontrada en sistemas libres de células concuerda con lo descripto *in vivo* para la proteína G de mutantes del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y para una quimera entre la hormona de crecimiento de rata con un fragmento de la hemaglutinina del virus influenza.

La proteína G normal tiene dos sitios de glicosilación ocupados con oligosacáridos complejos y adopta su estructura terciaria nativa y se ensambla en trímeros antes de ser transportada fuera del RE (Doms *et al*, 1987). La proteína G de la mutante termosensible ts045 (Gallione y Rose, 1985) lleva una mutación puntual Ser 204 por Phe que hace que a 41 °C (temperatura no permisiva) no sea capaz de adoptar su estructura terciaria nativa y no se trimerice, formando agregados que son retenidos en el RE. Al volver a 32 °C (temperatura permisiva) la proteína G recupera la capacidad de adoptar su estructura terciaria nativa, se trimeriza y es transportada fuera del RE recuperando el fenotipo normal (Knipe *et al*, 1977; Bergman *et al*, 1981). Se encontró que la proteína G de la mutante ts045 conserva oligosacáridos monoglucosilados $\text{Glc}_1\text{Man}_8,9\text{GlcNAc}_2$ a la temperatura no permisiva (Suh *et al*, 1989). La TM12, una variante que tiene una delección de 8 amino ácidos (472-479) en el sector transmembrana de la proteína G (Adams y Rose, 1985) tiene el mismo fenotipo termosensible que ts045 y sus oligosacáridos también permanecieron monoglucosilados a 41 °C (Suh *et al*, 1989). En los dos casos la adición de los residuos de glucosa fue post-traducciona. A la temperatura no permisiva hubo un pasaje entre las formas no glucosiladas y monoglucosiladas, indicando que los restos de glucosa fueron transferidos por la acción de la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa. Un modelo posible para interpretar la persistencia de oligosacáridos monoglucosilados es que las proteínas G mutantes son completamente deglucosiladas a ambas temperaturas por las glucosidasas I y II pero a la temperatura no permisiva son incapaces de adoptar la estructura nativa formando agregados que quedan retenidos en el RE. Estos son reconocidos como sustratos por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa comenzando un ciclo de glicosilación-deglucosilación. Al volver a 32 °C son capaces de adoptar su estructura nativa y dejan de ser reconocidas como sustrato por la glucosiltransferasa pasando al Golgi y continuando con el procesamiento normal.

Un caso similar se ha descripto para una quimera entre un fragmento de la hemaglutinina del virus influenza (HA) y la zona C-terminal de la hormona de crecimiento de rata (Rizzolo y Kornfeld, 1988). Esta construcción tiene un sitio de N-glicosilación

ocupado en la secuencia correspondiente a la HA en la que normalmente es procesado al estadio de complejo cuando pasa por el aparato de Golgi. Cuando esta quimera se expresa por transfección en células COS forma agregados que quedan retenidos en el RE sin llegar al aparato de Golgi (Rizzolo *et al*, 1985) y conserva sus oligosacáridos monoglucosilados (Rizzolo y Korfeld, 1988).

Las glicoproteínas aceptoras en su faz inicial de glicosilación, procesamiento y ensamblado residen en el interior del RE donde adoptan su estructura nativa antes de seguir el camino de secreción o alcanzar su localización subcelular definitiva (Pfeffer y Rothman, 1987; Rose y Doms, 1988; Lodish, 1988; Hurtley y Helenius, 1989). De acuerdo a la especificidad encontrada *in vitro* e *in vivo* la glucosiltransferasa reconocería como sustratos a las glicoproteínas que aún no adoptaron su estructura definitiva y hace que conserven sus oligosacáridos monoglucosilados.

En 1983 se describió por primera vez la glucosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteína y se propuso que el residuo de glucosa agregado por la glucosiltransferasa a los oligosacáridos tipo alta manosa podría ser una señal de reconocimiento molecular en el procesamiento de glicoproteínas (Parodi *et al*, 1983). Posteriormente la selectividad mostrada por la enzima para glucosilar glicoproteínas desnaturalizadas y los resultados explicados mas arriba relacionados con la retención en el RE de las formas no plegadas de la proteína G y el estado monoglucosilado de sus oligosacáridos, permitió refinar la idea de la función *in vivo* de la glucosiltransferasa proponiéndose un rol para la misma en el mecanismo mediante el cual la célula detecta y eventualmente retiene y degrada las glicoproteínas incorrectamente plegadas (Sousa *et al*, 1992).

Se ha descrito que la calnexina (una proteína de membrana del RE) y la calreticulina (una proteína soluble del RE) tendrían una actividad tipo chaperona molecular ya que se las aisló formando parte de complejos con varias proteínas en proceso de plegamiento (Degen y Williams, 1991; Degen *et al*, 1992; Hochstenbach *et al*, 1992). Estudios posteriores mostraron que la calnexina interactuaba solo con glicoproteínas no totalmente plegadas y que la inhibición de la glucosilación de esas proteínas con tunicamicina abolía la interacción con la calnexina (Ou *et al*, 1993; Hammond *et al*, 1994). Trabajos realizados recientemente fundamentaron la idea de que la calnexina tendría además, una actividad tipo lectina, es decir reconociendo oligosacáridos, y que tendría especificidad por oligosacáridos monoglucosilados (Hammond *et al*, 1994). Estos resultados en conjunto permitieron a A. Helenius proponer un modelo en el cual la calnexina y/o calreticulina, la glucosidasa II y la UDP-Glc:glicoproteína

glucosiltransferasa forman parte del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE (Fig 23) (Helenius, 1994).

De acuerdo al mencionado modelo, las glicoproteínas en proceso de plegamiento sufrirían, dentro del RE, ciclos de deglucosilación y reglucosilación catalizados por la glucosidasa II y la glucosiltransferasa respectivamente. Las glicoproteínas no plegadas serían entonces unidas por la calnexina siendo retenidas dentro del RE dado que la calnexina es una proteína de membrana. Este ciclo continuaría hasta que la glicoproteína adquiere su estructura terciaria nativa. En estas condiciones dejarían de ser sustrato de la glucosiltransferasa y solo serían sustrato de la glucosidasa II que las liberaría del residuo de glucosa y por lo tanto de la interacción con la calnexina permitiendo su salida del RE.

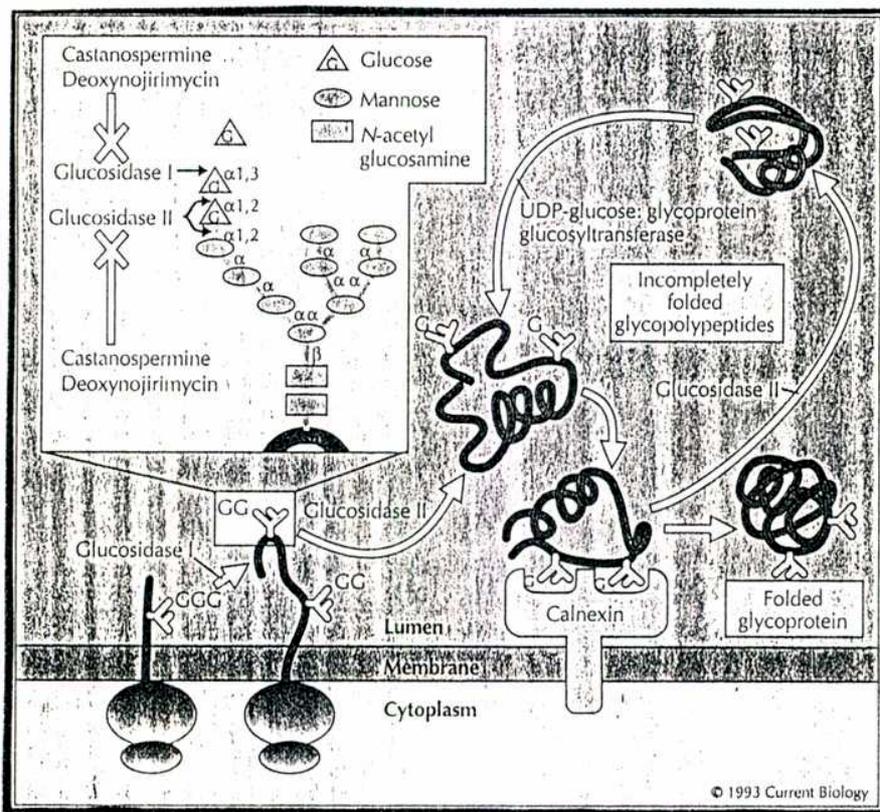


Figura 23 . Modelo de mecanismo de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE

Tomado de Hammond y Helenius, 1993

La glucosiltransferasa tendría un rol fundamental dentro de este modelo ya que sería el sensor de la estructura de las glicoproteínas, marcándolas o no con el residuo de glucosa que determinará su unión a la calnexina.

Si esta fuese la función de la glucosiltransferasa *in vivo*, es posible pensar que un incremento de proteínas mal plegadas en el RE produciría una alteración en la transcripción de su mRNA. Para probar esto se crecieron las células en condiciones que se sabe causan una acumulación de proteínas de estructura aberrante en el lumen del RE. Se comprobó que el nivel de transcripción del mRNA de la glucosiltransferasa aumentó entre 2 y 9 veces en las condiciones ensayadas. Se comprobó de esta manera que la glucosiltransferasa de *S. pombe* es una proteína de stress. Esto concuerda con el hecho de haberse encontrado en el promotor de la enzima, una secuencia que esta muy conservada entre distintos promotores de proteínas que se inducen por calor en *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Estos resultados apoyarían el rol que la glucosiltransferasa tendría *in vivo* y su participación en el modelo propuesto por A. Helenius.

Se ha demostrado recientemente que la calnexina de mamíferos puede formar complejos estables con la subunidad e del receptor de las células T aunque carezca de oligosacáridos unidos a asparagina como a una versión recombinante de la glicoproteína P en la cual el sitio de N-glicosilación fue removido por mutagénesis (Loo y Clarke, 1994 ; Rajagopalan *et al*, 1994). También ha sido comprobado en células de mamíferos que la formación de oligosacáridos monoglucosilados no es esencial para la supervivencia de las células. Mutantes carentes de glucosidasa I en los que no se forman glicoproteínas monoglucosiladas ni por deglucosilación del oligosacárido transferido ni por reglucosilación por la glucosiltransferasa, no presentaron alteraciones en su crecimiento (Ray *et al*, 1991). Estos antecedentes sumados al hecho de que *S. cerevisiae* no presenta actividad de glucosiltransferasa concuerdan con los resultados obtenidos cuando se analizó el efecto de la disrupción del gen de la glucosiltransferasa en *S. pombe*. Concretamente cuando se realizó dicha disrupción la viabilidad en *S. pombe* resultó no estar afectada, solo se observó una diferencia en la morfología de las células que llevaban la mutación. Por el contrario la calnexina demostro ser esencial para la viabilidad en las mismas levaduras (Jannatipour y Rokeach, 1995). Estos parecen ser resultados contradictorios. Una explicación posible para esta aparente incongruencia sería que la formación de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (el ligando que es reconocido por la calnexina) que se produce por deglucosilación del oligosacárido transferido a las proteínas ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), sería suficiente para asegurar la unión a la chaperona. De esta forma la

glucosiltransferasa actuaría como un mecanismo de auxilio. Es decir, el rol de la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa sería el de facilitar el reconocimiento de la calnexina por las glicoproteínas parcialmente o mal plegadas de las cuales han sido removidos todos los residuos de glucosa. Sin embargo es lógico pensar que las células que son *gpt1*⁻ (carentes de actividad de glucosiltransferasa) presenten alteraciones en la asociación de las glicoproteínas con la calnexina en el RE y que por lo tanto se encuentre afectada la velocidad de secreción de las glicoproteínas desde el RE. Esto último podría estar relacionado con la alteración encontrada en la morfología de las células *gpt1*⁻ y con el hecho de que éstas presentan una diferencia (no muy pronunciada pero reproducible) en la velocidad de crecimiento a 28 °C cuando se las compara con la cepa salvaje. Es posible también que el reconocimiento inicial de proteínas mal plegadas que llevan oligosacáridos monoglucosilados por parte de la calnexina sea un mecanismo de seguridad pero no esencial. Esto se podría comprobar analizando la interacción de la calnexina con distintas glicoproteínas en células de *S. pombe* mutantes donde todas las glicoproteínas carezcan de glucosa en sus oligosacáridos. Estas se podrían obtener generando células mutantes que transfieran oligosacáridos no glucosilados (análogos a las mutantes *alg 6* y *alg 8* de *S. cerevisiae*) y además carezcan de la posibilidad de reglucosilar los oligosacáridos unidos a proteínas (deberían ser *gpt1*⁻). También sería interesante observar que sucede con la secreción de las glicoproteínas en células que carecen de actividad de glucosidasa II y por lo tanto no pueden generar oligosacáridos mono o deglucosilados ya que solo producirían proteínas con oligosacáridos de tipo Glc₂Man₉GlcNAc₂. Estas dos últimas posibilidades están siendo analizadas en nuestro laboratorio.

En el modelo propuesto por A. Helenius en 1994 la calnexina y/o calreticulina, la glucosidasa II y la UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa forman parte del mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE. Sin embargo no se puede descartar la existencia de otra u otras proteínas cuya acción sea necesaria para asegurar el correcto funcionamiento de dicho mecanismo de control. En este sentido se están llevando a cabo en nuestro laboratorio experimentos que nos permitirían saber si existe algún gen cuyo producto interacciona específicamente con la glucosiltransferasa de *S. pombe*. Dado que el gen *gpt1* resultó no ser esencial para dichas levaduras, es posible que una mutación en otro gen genere células no viables o con algún defecto observable únicamente en las células que son *gpt1*⁻. Este procedimiento para buscar ese otro gen se conoce con el nombre de "Synthetic lethal" y permite identificar la interacción requerida entre dos proteínas para la misma función esencial.

REFERENCIAS

- Abeijon, C. and Hirschberg, C. B. (1992) *TIBS* **17**, 32-36
- Adams, G. A. and Rose, J. K. (1985) *Cell* **41**, 1007-1015
- Anfinsen, C. B. and Scheraga, H. A. (1975) *Adv. Protein. Chem.* **29**, 205-300
- Arima, T., Spiro, M. J. and Spiro, R. G. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1825-1835
- Bachinger, H. P. and Compton, L. A. (1991) *J. Cell. Biochem. suppl.* **15G**, 188
- Basi, G., Schmid, E. and Maundrell, K. (1993) *Gene* **123**, 131-136
- Behrens, N. H. and Leloir, L. F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 153-159
- Bergman, J. E. and Singer, S. J. (1983) *J. Cell Biol.* **97**, 1777-1787
- Bergman, J. E., Tokusayu, K. T. and Singer, S. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 1746-1750
- Bole, D. G., Hendershot, L. M. and Kearney, J. M. (1986) *J Cell Biol.* **102**, 1558-1566
- Bosch, J. V., Tlusty, A., McDowell, W., Legler, G. and Schwarz, R. T. (1985) *Virology* **143**, 342-346
- Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992) *EMBO J.* **11**, 1717-1722
- Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992) *Nature* **356**, 260-262
- Bulleid, N. J. and Freedman, R. B. (1988) *Nature* **335**, 649-651
- Chojnacki, T. and Dallner, G. (1988) *Biochem. J.* **251**, 1-9
- Clairmont, C. A. De Maio, A., and Hirschberg, C. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3983-3990
- Cox, J. S., Shamu, C. E. and Walter, P. (1993) *Cell* **73**, 1179-1206
- Creighton, T. E. (1986) *Meth. Enzymol.* **131**, 83-106
- Datema, R., Romero, P. A., Legler, G. and Schwartz, R. T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 6787-6791
- Degen, E. and Williams, D. B. (1991) *J. Cell Biol.* **112**, 1099-1115
- Degen, E., Cohen-Doyle, M. F. and Williams, D. B. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1653-1661
- Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A. and Balch, W. E. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 1957-1969
- Ellis, J. and Van Der Vies, S. M. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347
- Engel, J. C. and Parodi A. J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10105-10110
- Felsted, R. L., Leavitt, R. D. and Bachur, N. R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **405**, 72-81
- Fisher, G. and Schmid, F. X. (1990) *Biochemistry* **29**, 2205-2212
- Fitting, T. and Kabat, D. (1982) *J. Cell Biol.* **257**, 14011-14017

- Forsburg, S. L. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 2955-2956
- Freedman, R. B. (1989) *Cell* 57, 1069-1072
- Gallagher, P. J., Henneberry, J. M., Sambrook, J. F. and Gething, M.-J. (1992) *J. Virol.* 66, 7136-7145
- Gallione, C. J. and Rose, J. K. (1985) *J. Virol.* 54, 374-382
- Gañan, S., Cazzulo, J. J. and Parodi, A. J. (1991) *Biochemistry* 30, 3098-3104
- Gething, M.-J. and Sambrook, J. (1992) *Nature* 355, 33-45
- Gething, M.-J., McCammon, K. and Sambrook, J. (1986) *Cell* 46, 939-950
- Gibson, R., Leavitt, R., Kornfeld, S. and Schlesinger, S. (1978) *Cell* 13, 671-679
- Gilbert, H. F. (1990) *Adv. Enzymol.* 63, 69-172
- Gordon, J. A., Blumberg, S., Lis, H. and Sharon, N. (1972) *FEBS Lett.* 24, 193-196
- Hammond, C. and Helenius, A. (1993) *Curr. Biol.* 3, 884-886
- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 913-917
- Hebert, D. H., Foellmer, B. and Helenius, A. (1995) *Cell* 81, 425-433
- Helenius, A. (1994) *Mol. Biol. Cell* 5, 253-265
- Hellman, U., Wernstedt, C., Goñez, J. and Heldin, C. (1995) *Anal. Biochem.* 224, 451-455
- Hendershot, L. M., Bole, D. and Kearney, J. M. (1987) *Immunol. Today* 8, 111-114
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349-384
- Hickman, J. and Kornfeld, S. (1978) *J. Immunol.* 121, 990-996
- Hirschberg, C. B. and Snider, M. D. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87
- Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S. and Brenner, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4734-4738
- Hubbard, S. C. and Ivatt, R. I. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 555-583
- Hurtley, S. M. and Helenius, A. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 277-308
- Hwang, C., Sinskey, A. J. and Lodish, H. F. (1992) *Science* 257, 1496-1502
- Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry* 30, 3147-3161
- Jannatipour, M. and Rokeach, L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 4845-4853
- Kabcenell, A. K. and Atkinson, P. H. (1985) *J. Cell Biol.* 101, 1270-1280
- Kaplan, H. A., Welply, J. K. and Lennarz, W. J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* 906, 161-173
- Kaushal, G. P., Pastuszak, I., Hatanaka, K. and Elbein, A. D. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 16271-16279
- Kelleher, D. J., Kreibich, G. and Gilmore, R. (1992) *Cell* 69, 55-65
- Keller, K. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 443-445

- Klausner, R. D. (1989) *New Biol.* **1**, 3-8
- Knipe, D. M., Baltimore, D. and Lodish, H. F. (1977) *J. Virol.* **21**, 1149-1158
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M. J. and Mori, K. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 877-890
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 217-237
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.-J. and Sambrook, J. (1988) *Nature* **332**, 462-464
- Labriola, C. A., Cazzulo, J. J. and Parodi, A. J. (1995) *J. Cell Biol.* **130**, 771-779
- Lamantia, M. L., Miura, T., Tachikawa, H., Kaplan, H. A., Lennarz, W. J. and Mizunaga, T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4453-4457
- Leavitt, R., Schlesinger, S. and Kornfeld, S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 9018-9023
- Lee, A. S. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 20-23
- Lodish, H. F. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2107-2110
- Lodish, H. F. and Kong, N. (1984) *J. Cell Biol.* **98**, 1720-1729
- Lodish, H. F. and Kong, N. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10803-10899
- Loo, T. W. and Clarke, D. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28683-28689
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Lucocq, J. M., Brada, D. and Roth, J. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 2137-2146
- Machamer, C. E. and Rose, J. K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5948-5954
- Machamer, C. E. and Rose, J. K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5955-5960
- Margolese, L., Waneck, G. L., Suzuki, C. K., Degen, E., Flavell, R. A. and Williams, D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17959-17966
- Marquardt, T. and Helenius, A. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 505-513
- Mazzarella, R. A., Srinivasan, M., Haugejorden, S. M. and Green, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1094-1101
- Meaden, P., Hill, K., Wagner, J., Slipetz, D., Sommer, S. S. and Bussey, H. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3013-3019
- Mendelzon, D. H. and Parodi A. J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2129-2133
- Mendelzon, D. H., Previato, J. O. and Parodi A. J. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol* **18**, 355-367
- Miyazaki, J.-I., Appella, E. H. Z., J., F. and Ozato, K. (1986) *J. Exp. Med.* **163**, 856-871
- Montreuil, J. (1980) *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **37**, 157-223
- Moore, S. E. H. and Spiro, R. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3800-3812
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 795-823

- Mori, K, Ma, W., Gething, M. J. and Sambrook, J. (1993) *Cell* **74**, 743-756
- Morrison, T. G., McQuain, C. O. and Simpson, D. (1978) *J. Virol.* **254**, 3600-3607
- Munro, S. and Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* **46**, 291-300
- Noiva, R. and Lennarz, W. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3553-3556
- Normington, K., Kohono, K., Kozutsumi, Y., Gething, M. J. and Sambrook, J. (1989) *Cell* **57**, 1223-1236
- Ohta, M., Hamako, J., Yamamoto, S., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., Oka, S., Mizuochi, T. and Matsuura, F. (1992) *Glycoconj. J.* **8**, 400-413
- Olden, K., Parent, B. J. and White, S. L. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* **650**, 209-232
- Olden, K., Pratt, R. M. and Yamada, K. M. (1978) *Cell* **13**, 461-473
- Ou, W. J., Cameron, P. H., Thomas, D. and Bergeron, J. J. (1993) *Nature* **364**, 771-776
- Parker, C. G., Fessler, L. I., Nelson, R. E. and Fessler, J. H. (1995) *EMBO J.* **14**, 1294-1301
- Parlatti, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J. and Thomas, D. Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**,
- Parodi, A. J. and Cazzulo, J. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7641-7645
- Parodi, A. J. and Leloir, L. F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 1-37
- Parodi, A. J. and Quesada-Allué, L. A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7637-7640
- Parodi, A. J., Behrens, N. H., Leloir, L. F. and Carminatti, H. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3268-3272
- Parodi, A. J., Lederkremer, G. Z. and Mendelzon, D. H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 5589-5595
- Parodi, A. J., Mendelzon, D. H. and Lederkremer, G. H. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8260-8265
- Parodi, A. J., Mendelzon, D. H., Lederkremer, G. H. and Martin-Barrientos, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6351-6357
- Parodi, A. J., Quesada-Allué, L. A. and Cazzulo, J. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 6201-6205
- Parodi, A. J., Staneloni, R. J., Cantarella, A. I., Leloir, L. F., Behrens, N. H., Carminati, H. and Levy, J. (1973) *Carbohydr. Res.* **26**, 393-400
- Partadelis, J. A. and Berlin, V. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5450-5454
- Pathak, R. K., Merkle, R. K., Cummings, R. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. and Anderson, R. G. W. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1831-1841
- Paulson, J. C. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 272-276
- Paulson, J. C. and Colley, K. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618
- Pelham, H. R. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 1-23
- Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* **46**, 959-961

- Pelham, H. R. B. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 483-486
- Pérez, M. and Hirschberg, C. B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 6822-6830
- Pérez, M. and Hirschberg, C. B. (1987) *Meth. Enzymol.* 138, 709-714
- Peyrieras, N., Bause, E., Legler, G., Vasilov, R., Claesson, L., Peterson, P. and Floegh, H. (1983) *EMBO J.* 2, 823-832
- Pfeffer, S. R. and Rothman, J. E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 829-852
- Pidoux, A. L. and Armstrong, J. (1992) *EMBO J.* 11, 1583-1591
- Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C. and Pastan, I. (1977) *Cell* 41, 941-947
- Pryme, L. F. (1989) *Mol. Cell. Biochem.* 87, 93-103
- Rademacher, T. W., Parekh, B. B. and Dwek, R. A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 785-838
- Rajagopalan, S., Xu, Y. and Brenner, M. B. (1994) *Science* 263, 387-390
- Ray, M. K., Yang, J., Sundaram, S. and Stanley, P. *J. Biol. Chem.* 266, 22818-22825
- Rizzolo, L. J. and Kornfeld, R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 9520-9525
- Rizzolo, L. J., Finidori, J., Gonzalez, A., Arpin, M., Ivanov, I. E., Adesnik, M. and Sabatini, D. D. (1985) *J. Cell Biol.* 101, 1351-1362
- Robbins, P. W., Hubbard, S. C., Turco, S. J. and Wirth, D. F. (1977) *Cell* 12, 893-900
- Roberts, P. C., Garten, W. and Klenk, H.-D. (1993) *J. Virol.* 67, 3048-3060
- Rokeach, L., Jannatipour, M., Haselby, J. A. and Hoch, S. O. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5024-5030
- Rose, J. K. and Doms, R. W. (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 258-289
- Rose, M. D., Misra, L. M. and Vogel, J. P. (1989) *Cell* 57, 1211-1221
- Rothman, J. E. (1989) *Cell* 59, 591-601
- Runge, K. W., Huffaker, T. C. and Robbins, P. W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 412-417
- Sambrook, J. F., (1990) *Cell* 61, 197-199
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* 166, 368-379
- Schreiber, S. L. (1991) *Science* 251, 283-287
- Sidman, C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9374-9376
- Sousa, M. C. and Parodi, A. J. (1995) *EMBO J.* 14, 4196-4203
- Sousa, M., Ferrero García, M. A., and Parodi, A. J. (1992) *Biochemistry* 31, 97-105
- Stamnes, M. A., B-H., S., Chuman, L., Harris, G. L. and Zuker, C. S. (1991) *Cell* 65, 219-227
- Strous, G. J., Van Kerkhof, P., Brok, R., Roth, J. and Brada, D. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3620-3625

-
- Su, K., Stoller, T., Rocco, J., Zemsky, J. and Green, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14301-1409
- Suh, K., Bergmann, J. E. and Gabel, C. A. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 811-819
- Suzuki, C. K., Bonifacino, J. S., Lin, A. Y., Davis, M. M. and Klausner, R. D. (1991) *J. Cell Biol.* **114**, 189-205
- Trimble, R. B. and Maley, F. (1984) *Anal. Biochem.* **141**, 515-522
- Trombetta, S. E. and Parodi, A. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9236-9240
- Trombetta, S. E., Bosch, M. and Parodi, A. J. (1989) *Biochemistry* **28**, 8108-8116.
- Trombetta, S. E., Gañán, S. and Parodi, A. J. (1991) *Glycobiology* **1**, 155-161
- Tuite, M. F., Bossier, P. and Fitch, I. T. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 11845
- Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A. and Williams, D. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4697-4701
- Yamashita, K., Tachibana, Y. and Kobata, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3862-3869
- Zhang Q., Tector, M. and Salter, R. D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 3944-3948

NOTAS

LA UDP-GLC:GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASA DE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. UNA PROTEÍNA DE STRESS QUE INTERVIENE EN EL MECANISMO DE CONTROL DE CALIDAD DEL PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

La N-glicosilación de proteínas se inicia por la transferencia, en el lumen del retículo endoplásmico (ER), de un oligosacárido (Glc3Man9GlcNAc2) de un derivado de dolicol-P-P a un residuo de asparagina en cadenas polipeptídicas nacientes. El procesamiento de los oligosacáridos se inicia inmediatamente luego de la reacción de transferencia: los residuos de glucosa son removidos por dos glucosidasas específicas localizadas en el lumen del ER. La glucosidasa I remueve la unidad de glucosa más externa (unida por unión α 1-2) mientras que la glucosidasa II remueve las dos unidades de glucosa restantes (unidas por unión α 1-3). Algunos residuos de manosa pueden ser también removidos por manosidasas específicas. Las glicoproteínas son entonces transportadas al aparato de Golgi donde pueden ocurrir otras reacciones de procesamiento de oligosacáridos.

Hemos encontrado en nuestro laboratorio que los oligosacáridos unidos a proteína, ya libres de residuos de glucosa por la acción de las glucosidasas I y II (Man9GlcNAc2, Man8GlcNAc2 y Man7GlcNAc2) son transitoriamente re-glicosilados en el ER. Los compuestos formados fueron identificados como Glc1Man9GlcNAc2, Glc1Man8GlcNAc2 y Glc1Man7GlcNAc2. *In vivo* estos compuestos son inmediatamente de-glicosilados. La glucosiltransferasa responsable de la re-glicosilación (UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, GT) fue detectada en células de mamíferos, plantas, hongos y protozoos y fue purificada a homogeneidad de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Se encontró que es una proteína soluble del lumen del ER de peso molecular, en condiciones no nativas, de alrededor de 150.000, que usa UDP-Glc como dador de glucosa y que requiere Ca^{2+} para su actividad. La enzima responsable de la de-glicosilación de los compuestos re-glicosilados por la GT es la ya mencionada glucosidasa II.

La propiedad más importante de la GT es que en sistemas libres de células glucosila glicoproteínas mal plegadas (desnaturalizadas) pero no glicoproteínas correctamente plegadas (nativas). Se observó que glicoproteínas desnaturalizadas (mal plegadas) y de-glicosiladas con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) son inhibidores potentes de la glucosilación de glicoproteínas desnaturalizadas mientras que la albúmina nativa de suero bovino no tiene efecto. La Endo H corta entre las dos

residuos internos de N-acetilglucosamina liberando los oligosacáridos y dejando unido a la proteína un único residuo de N-acetilglucosamina. Se concluyó que la interacción de la GT con dominios proteicos expuestos en conformaciones desnaturalizadas pero no en las nativas era requerida para la reacción de transferencia. En muchas glicoproteínas nativas el residuo de N-acetilglucosamina no es accesible a una sonda macromolecular como la Endo H. En esos casos, para permitir la liberación del oligosacárido por esta glicosidasa, es necesario desnaturalizar previamente a la glicoproteína. Se puede especular, por lo tanto, que un plegamiento correcto de la mayoría de las glicoproteínas ocultaría el residuo de N-acetilglucosamina interna a la GT y así impediría la glucosilación. Por otra parte se encontró que ambos elementos de reconocimiento, los dominios proteicos de amino ácidos hidrofóbicos expuestos en conformaciones desnaturalizadas y el residuo de N-acetilglucosamina deben estar unidos covalentemente.

Se identificó y secuenció el gen que codifica para la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa de *Schizosaccharomyces pombe*. Este gen fue designado como *gpt1*. Codifica para un polipéptido de 1448 amino ácidos que posee en su extremo N-terminal un péptido señal de 18 amino ácidos. No posee dominios transmembrana, como era de esperar para una proteína soluble del RE. El extremo C-terminal presenta el tetrapéptido PDEL que correspondería a una nueva señal de retención para proteínas solubles del RE en *S. pombe*. La síntesis del mRNA correspondiente fue inducida entre 2 y 9 veces por condiciones que se sabe afectan el plegamiento de glicoproteínas en el RE, estas son: shock térmico, presencia de un iónforo de calcio, 2-mercaptoetanol e inhibidores de la N-glucosilación como tunicamicina y 2-deoxiglucosa). Esta fue la primer evidencia obtenida *in vivo* que apoya la idea de que la glucosiltransferasa participa del control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE. Se realizó la disrupción del gen *gpt1* y las células *gpt1*⁻ resultaron ser viables. No se encontraron grandes diferencias en la velocidad de crecimiento de las células *gpt1*⁺ y *gpt1*⁻ crecidas a 18, 28 o 39 °C. Ambos tipos celulares solo difieren un poco en el tamaño, siendo las *gpt1*⁻ un 30% mas cortas que las *gpt1*⁺.

Las proteínas del camino de secreción adoptan su estructura terciaria y en muchos casos también cuaternaria en el ER, antes de ser transportados a las cisternas *cis* del aparato de Golgi. Solamente las proteínas plegadas correctamente son transportadas al aparato de Golgi mientras que las mal plegadas son degradadas en el ER. La existencia de un control de calidad del plegamiento de proteínas muy estricto es por lo tanto necesaria para impedir el pasaje de proteínas mal plegadas a las cisternas del aparato de

Golgi. Un modelo para dicho control de calidad aplicable a glicoproteínas ha sido propuesto recientemente. De acuerdo a este modelo, los oligosacáridos existen en el ER en dos estados interconvertibles, monoglucosilados y de-glucosilados. Su formación está catalizada, respectivamente, por la GT y la glucosidasa II. La calnexina, una proteína (chaperona) unida a la membrana del ER que tiene propiedades de lectina ya que reconoce a oligosacáridos monoglucosilados, uniría las estructuras con una glucosa y así retendría a las glicoproteínas en el ER hasta tanto ellas adopten un plegamiento correcto. Al adoptar dicho plegamiento, las glicoproteínas serían sustrato para la glucosidasa II pero no para la GT y serían así liberadas del ancla de la calnexina. Las glicoproteínas serían así capaces de ser transportadas al aparato de Golgi.

The UDP-glc:glycoprotein glucosyltransferase from SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE.. A new stress protein involved in the quality control of glycoprotein folding into the ER

N-glycosylation of proteins is initiated by the transfer, in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), of an oligosaccharide (Glc₃Man₉GlcNAc₂) from a dolichol-P-P derivative to asparagine residues in nascent polypeptide chains. Processing of the protein-linked oligosaccharides is initiated immediately after the transfer reaction: the glucose residues are removed by two highly specific glucosidases located in the lumen of the ER: glucosidase I removes the more external $\alpha(1-2)$ -linked glucose residue whereas glucosidase II excises both $\alpha(1-3)$ -linked glucose units. Some mannose units may also be removed in the same subcellular location by specific mannosidases. Glycoproteins are then transported to the Golgi apparatus where further processing of the oligosaccharides may occur.

*It was found in our laboratory that protein-linked oligosaccharides already freed from glucose units due to the action of glucosidases I and II (Man₉GlcNAc₂, Man₈GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂) were transiently re-glucosylated in the ER. The compounds formed were identified as protein-linked Glc₁Man₉GlcNAc₂, Glc₁Man₈GlcNAc₂ and Glc₁Man₇GlcNAc₂. In vivo these compounds were immediately de-glucosylated by the above mentioned glucosidase II. The glucosyltransferase responsible for the re-glucosylation (UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase, GT) was detected in mammalian, plant, fungal and protozoan cells and was purified to homogeneity from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. It was found to be a soluble protein of the ER, to use UDP-Glc as sugar dono, to have a*

molecular weight under denaturing conditions of about 150,000 and to require Ca^{2+} for activity.

The most striking feature of the GT is that it glucosylates, in cell free assays, denatured but not native glycoproteins. It was observed that denatured endo- β -N-acetylglucosaminidase H-(Endo H)-de-glycosylated glycoproteins were potent inhibitors of the glucosylation of the glycosylated species whereas native bovine serum albumin had no effect (Endo H breaks the bond between the internal N-acetylglucosamine residue of the oligosaccharide, leaving one of the residues linked to the protein moiety). It was concluded that interaction of the glucosyltransferase with protein domains exposed in denatured but not in native conformations was required for the transfer reaction. In many native glycoproteins the innermost N-acetylglucosamine is not accessible to a macromolecular probe as Endo H. In those cases, cleavage of oligosaccharides by the endoglycosidase requires denaturation of the glycoprotein. It may be speculated that proper folding of most glycoproteins would hinder recognition of the innermost N-acetylglucosamine unit by the GT and thus prevent glucosylation. On the other hand, both recognition elements, the N-acetylglucosamine and the hydrophobic patches exposed in denatured but not in native conformations, had to be covalently linked.

We have identified and begun the characterization of the gene encoding UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase in *Schizosaccharomyces pombe*. This gene, here designated *gpt1*, codes for a polypeptide having a signal peptide of 18 amino acids followed by 1429 amino acids with no transmembrane domain, as expected for a soluble protein of the endoplasmic reticulum (ER). The C-terminal tetrapeptide PDEL corresponds most likely to a novel ER-retention signal in this fission yeast. Synthesis of the corresponding mRNA was induced 2-9 fold by conditions known to affect glycoprotein folding in the ER (e.g., heat shock, culture in the presence of a Ca^{2+} ionophore, 2-mercaptoethanol or inhibitors of protein N-glycosylation such as tunicamycin or 2-deoxyglucose). This is the first evidence obtained *in vivo* that supports the proposed involvement of the enzyme in the quality control of glycoprotein folding in the ER. Thus far, the said involvement was solely inferred from the property of the enzyme to glucosylate misfolded but not native glycoproteins in cell-free assays. The *gpt1* gene was disrupted and *gpt1*⁻ cells were found to be viable. Moreover, no significant differences in the growth rate patterns at 18 °C, 28 °C or 39 °C or in cell morphology between *gpt1*⁺ and *gpt1*⁻ cells were observed. Both cell types slightly differed in size.

Proteins adopt their tertiary and in many cases their quaternary structures in the ER, before being transported to the cis cisternae of the Golgi apparatus. Only properly folded proteins are transported to the Golgi apparatus whereas misfolded species are degraded within the ER. A very stringent quality control is therefore required to prevent passage of misfolded proteins to the Golgi cisternae. A model for such quality control applicable to glycoproteins has been recently proposed. According to it, the oligosaccharides in the endoplasmic reticulum shuttle between monoglucosylated and unglucosylated structures, their formation being catalyzed by the GT and glucosidase II. A membrane bound protein (chaperone), calnexin, that has a lectin-like activity that recognizes the monoglucosylated oligosaccharides, would bind the monoglucosylated structures, and thus retain glycoproteins in the ER as long as the protein moieties are not properly folded. On attaining the correct native conformations, glycoproteins would become substrates for the glucosidase but not for the GT and thus be liberated from the calnexin anchor. Glycoproteins would then be able to be transported to the Golgi apparatus.

Palabras claves/Key words:

Schizosaccharomyces pombe. / *Schizosaccharomyces pombe.*

Glicoproteínas / *Glycoproteins*

Plegamiento de proteínas / *Protein folding*

Glucosiltransferasa / *Glucosyltransferase*

Secuencia / *Sequence*