

Tesis de Posgrado

Rol de los oligosacáridos monoglucosilados en el plegamiento de glicoproteínas en *Schizosaccharomyces pombe*

D'Alessio, Cecilia

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

D'Alessio, Cecilia. (2001). Rol de los oligosacáridos monoglucosilados en el plegamiento de glicoproteínas en *Schizosaccharomyces pombe*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3360_DAlessio.pdf

Cita tipo Chicago:

D'Alessio, Cecilia. "Rol de los oligosacáridos monoglucosilados en el plegamiento de glicoproteínas en *Schizosaccharomyces pombe*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3360_DAlessio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ROL DE LOS OLIGOSACÁRIDOS
MONOGLUCOSILADOS EN EL PLEGAMIENTO DE
GLICOPROTEÍNAS EN *Schizosaccharomyces pombe***

Autora: Cecilia D'Alessio

Director: Armando J. Parodi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas

Fundación Campomar

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

- 2001 -

Nº 3360

*A mis geniales papás y
a mi dulce hermana.*

*A Ariel y a Bruno,
mis dos amores.*

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Dr. Armando Parodi por todo, especialmente por su entusiasmo, su paciencia y su generosidad.

A mis papás y a mi hermana, por el apoyo incondicional de siempre.

A Ari, por acompañarme hasta la madrugada, por los litros de té, por su ayuda con las figuras y por cuidar a Bruno mientras yo escribía, y porque sin él no podría haber escrito este trabajo.

A Mario, Diana, Juan y Ceci por brindarme su amistad y por demostrar su afecto tan deliciosamente.

A todos los compañeros del Instituto que me ayudaron y acompañaron durante estos años, especialmente a Vero, Amaicha, Nara, Fedes, Ana, Fernanda, Mariana, Diego, Ale, Leo, Fabio, Cata y Caro por estar siempre dispuestos a dar una mano.

A mis compañeros del 209: Olgus, Julio, Marcelo, Carlitos, Ianina, Fabiana, Sandra, Susana y Verónica por el compañerismo de todos los días.

A Fabiana Fernández por enseñarme a trabajar con levaduras y por la delección de $ura4$ en la mutante $GII\alpha$.

A Sandra Fanchiotti por la construcción $alg6::ura4^+$.

A Eva, Laura, Margarita, Hugo, Francisco, Salvador, Ernesto, Carmen, Silvia, Nelly, María y a toda la gente que ayudó a hacer más fácil el trabajo de todos los días.

A Pablo Briones por su ayuda con la computadora.

A mis amigos Vale, Leo, Vivi, Ana, Rober, Vera y Ceci, por estar siempre ahí.

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.

ABREVIATURAS

aa: aminoácido
ALG6⁻: *S. pombe* mutantes en el gen *alg6*
BiP: chaperona de la familia Hsp70 residente del retículo endoplasmático
BSA: seroalbúmina bovina
cDNA: DNA copia
CNX: calnexina
CPY: carboxipeptidasa Y
CRT: calreticulina
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNJ: 1-deoxinojirimicina
Dol: dolicol
DTT: ditioneitol
E-64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano
Endo H: endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
5-FOA: ácido 5-fluororótico
Gal: galactosa
GI: glucosidasa I
GII: glucosidasa II
GII α ⁻: *S. pombe* mutantes en el gen *gls2 α*
GII β ⁻: *S. pombe* mutantes en el gen *gls2 β*
Glc: glucosa
GlcNAc: N-acetilglucosamina
GT: UDP-Glc:glcoproteína glucosiltransferasa
GT⁻: *S. pombe* mutantes en el gen *gpt1*
Man: manosa
 β MSH: β -mercaptoetanol
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
NEM: N-etilmaleimida
OT: dolicol difosfato oligosacárido:proteína oligosacariltransferasa
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
POPOP: 2,2-p-fenilenbis-fenil oxazol
PPO: 2,5-difeniloxazol
RE: retículo endoplasmático rugoso
RNA: ácido ribonucleico
RT-PCR: PCR sobre la reacción de la transcriptasa reversa
SDS: dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TCA: ácido tricloroacético
TLCK: tosil-lisil-clorometilcetona
ufp: unidades formadoras de placa de lisis
UPR: respuesta a proteínas mal plegadas
VSV: virus de la estomatitis vesicular
WT: genotipo o fenotipo salvaje

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
Funciones intracelulares de N-glicanos	5
El retículo endoplasmático como sitio de inicio de la N-glicosilación de proteínas	5
Secuencia y topología de los pasos iniciales de la N-glicosilación en el RE	7
Procesamiento de N-glicanos unidos a proteínas.....	9
Glucosilación transitoria de glicoproteínas en el RE.....	11
La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa	12
El RE como compartimento de plegamiento de proteínas de la vía secretoria.....	14
El plegamiento de proteínas dentro del RE está asistido	15
Los N-glicanos son necesarios para el plegamiento de las glicoproteínas.....	16
La calnexina y calreticulina son lectinas que unen glicoproteínas monoglucosiladas	17
Modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE.....	17
Degradación de proteínas incorrectamente plegadas	21
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> como organismo de estudio del modelo	21
Problemática	22
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y METODOS	25
Materiales	25
Cepas y Medios de cultivo	25
Procedimientos con levaduras	25
Procedimientos con DNA.....	25
Preparación de DNA genómico de <i>S. pombe</i>	26
Preparación de RNA de <i>S. pombe</i>	26
Reacciones de PCR.....	27
RT-PCR	27
Northern.....	27
Disrupción del gen que codifica la subunidad $GII\alpha$ de <i>S. pombe</i>	28
Disrupción del gen que codifica la subunidad $GII\beta$ de <i>S. pombe</i>	30
Construcción de <i>S. pombe</i> doble mutante $GII\alpha/ALG6^-$	32
Screening de una biblioteca genómica de <i>S. pombe</i>	34
Preparación de microsomas de <i>S. pombe</i>	35
Sustratos y estándares radiactivos	35
Determinación de actividades GI y GII en cepas WT y mutantes	36
Ensayo de actividad GT	36
Marcación <i>in vivo</i> de <i>S. pombe</i> con [14 C]Glc y obtención de oligosacáridos N-unidos a glicoproteínas	37

Métodos con oligosacáridos.....	38
Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	38
Western Blot.....	38
Marcación de proteínas <i>in vivo</i> de <i>S. pombe</i> con [³⁵ S]Met y [³⁵ S]Cys	38
Secreción de CPY	39
Obtención de anticuerpos anti-CNX de <i>S. pombe</i>	39
Inmunoprecipitación de CNX en condiciones reductoras y no reductoras	40
RESULTADOS.....	41
I - EVIDENCIA GENÉTICA DE LA ESTRUCTURA HETERODIMÉRICA DE LA GII DE <i>S. POMBE</i>	41
Obtención de un fragmento del gen que codifica para la GII α en <i>S. pombe</i>	42
Obtención de una mutante de <i>S. pombe</i> GII α ⁻	44
Caracterización genética de la mutante GII α ⁻	44
La subunidad α de la GII de <i>S. Pombe</i> carece de señal de retención en el RE	45
Una secuencia de <i>S. pombe</i> homóloga a la subunidad β de ratón posee la señal VDEL	47
Obtención del cDNA que codifica para la posible subunidad β de la GII	47
Obtención de <i>S. pombe</i> mutante GII β ⁻	48
Caracterización genética de la mutante GII β ⁻	49
Las mutantes <i>S. pombe</i> GII α ⁻ y GII β ⁻ no tienen actividad GII en microsomas aislados.....	51
La mutante <i>S. pombe</i> GII α ⁻ no produce oligosacáridos monoglucosilados <i>in vivo</i> mientras que la mutante GII β ⁻ produce una pequeña proporción, consistente con una actividad GII residual	52
II - LA CNX Y NO LA FORMACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS MONOGLUCOSILADOS ES ESENCIAL PARA LA VIABILIDAD DE <i>S. POMBE</i>	58
Las células <i>S. pombe</i> carentes de oligosacáridos monoglucosilados son viables en un amplio rango de temperaturas.....	60
Las mutantes de <i>S. pombe</i> GII α ⁻ no presentan diferencias morfológicas con las células WT ...	61
III - LOS OLIGOSACÁRIDOS MONOGLUCOSILADOS FACILITAN EL PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS EN <i>S. POMBE</i>	62
Acumulación de glicoproteínas mal plegadas con oligosacáridos RE-específicos en mutantes defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados	62
Las mutantes defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados presentan UPR.	65
Procesamiento de CPY en células que no poseen oligosacáridos monoglucosilados	66
IV - UNA CONFORMACIÓN MAL PLEGADA NO ES CONDICIÓN SUFICIENTE PARA LA GLUCOSILACIÓN <i>IN VIVO</i> POR LA GT.....	70
Para analizar exclusivamente la glucosilación proveniente de la GT se requiere una doble mutante <i>S. pombe</i> GII α ⁻ /ALG6 ⁻	70
Construcción de doble mutante <i>S. pombe</i> GII α ⁻ /ALG6 ⁻	72
Caracterización genética de <i>S. pombe</i> doble mutante	73

Caracterización bioquímica de la cepa de <i>S. pombe</i> doble mutante GII α ⁻ /ALG6 ⁻	75
Caracterización fenotípica de la doble mutante GII α ⁻ /ALG6 ⁻	76
El DTT no induce un aumento de la glucosilación <i>in vivo</i> de glicoproteínas de <i>S. pombe</i>	77
Posibles hipótesis para explicar que el DTT no induzca un aumento de la glucosilación.	81
El shock de calor tampoco induce un aumento generalizado de la glucosilación.....	90
DISCUSION	93
CONCLUSIONES.....	102
REFERENCIAS	103

RESUMEN

El retículo endoplasmático (RE) es el compartimiento de varias modificaciones post-traduccionales y plegamiento de proteínas destinadas a secreción, a membrana plasmática o a organelas del sistema endocítico. Una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes, la N-glicosilación, está relacionada con el plegamiento de las proteínas ya que sin la adición de N-glicanos, numerosas especies proteicas son incapaces de alcanzar su conformación nativa. Los intermediarios de plegamiento, las proteínas oligoméricas 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 y ensamblado correctamente. El mecanismo que asegura la funcionalidad de las proteínas que salen del RE, ha sido denominado "control de calidad del plegamiento de glicoproteínas".

En la mayoría de los eucariotas la N-glicosilación comienza con la transferencia de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde un intermediario lipídico (dolicol difosfato) a la secuencia Asn-X-Ser/Thr de proteínas nacientes en el RE. Las tres glucosas terminales del oligosacárido transferido son inmediatamente removidas por las glucosidasas del RE, I y II (GI y GII). Parodi y colaboradores demostraron la existencia de una reglicosilación transitoria de los N-oligosacáridos libres de glucosa dentro del RE por la acción de la enzima luminal UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT). Esta enzima glucosila glicoproteínas, en ensayos libres de células, sólo si éstas han sido previamente desnaturalizadas. Por esta característica especial se ha propuesto a la GT como posible sensor del estado conformacional de las glicoproteínas en el RE. Los oligosacáridos monoglucosilados, que se generan por la deglicosilación parcial por la GI (encargada de remover la glucosa más externa) y GII (encargada de remover las dos glucosas más internas) y por la actividad de la GT, permiten la interacción de las glicoproteínas con dos lectinas del RE, la calreticulina (CRT) y/o calnexina (CNX). Esta interacción facilita el plegamiento de las glicoproteínas, evita la formación de agregados, permite la interacción de las glicoproteínas unidas a CNX con otras chaperonas del RE y constituye un mecanismo para retener en el RE las estructuras proteicas mal plegadas.

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* existen todos los componentes del modelo de control de calidad de glicoproteínas en el RE, ya que esta levadura expresa actividad GT y posee un homólogo de CNX. Además, el oligosacárido transferido a polipéptidos nacientes es $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y este compuesto es procesado en el RE a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, indicando la presencia de actividades GI y GII. La disrupción del gen que codifica la CNX en *S. pombe* ha resultado ser letal para estas células. Sin embargo una mutante deficiente en actividad GT (mutante *gpt1*) obtenida en nuestro laboratorio no posee ningún fenotipo distintivo. Esto planteó el interrogante de cuál es la importancia y el rol de la formación de oligosacáridos monoglucosilados en el plegamiento de glicoproteínas en estas levaduras. En este trabajo se realizaron además experimentos destinados a analizar si una conformación mal plegada es condición suficiente para la glucosilación de todos los oligosacáridos N-unidos a proteínas por la GT *in vivo*, tal como ocurre *in vitro*.

En este trabajo de Tesis se presentan evidencias genéticas de la estructura heterodimérica propuesta para la GII. La GII de *S. pombe* está compuesta de dos subunidades $\text{GII}\alpha$ y $\text{GII}\beta$. La actividad catalítica está presente en la subunidad $\text{GII}\alpha$, que carece de señal conocida para

permanecer en el RE. La subunidad GII β posee en el extremo C-terminal el tetrapéptido VDEL, homólogo a conocidas señales de retención/recuperación en el lumen del RE.

En *S. pombe* la CNX es esencial para la viabilidad celular. Sin embargo, la disrupción del gen que codifica para GII α abolió totalmente la formación de oligosacáridos monoglucosilados, tanto por deglucosilación del compuesto transferido a las proteínas como por reglucosilación mediada por la GT. Estas mutantes de *S. pombe* resultaron viables a todas las temperaturas ensayadas. Esto significa que la CNX y *no* los oligosacáridos monoglucosilados son esenciales para esta levadura en condiciones normales de crecimiento.

Si bien la formación de oligosacáridos monoglucosilados no es esencial para la viabilidad celular, células defectivas total (mutantes GII α ⁻) o parcialmente (mutantes GII β ⁻ o GT⁻) en la formación de oligosacáridos monoglucosilados presentaron una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE en ausencia de estrés adicional. Esto se evidenció por la inducción de mensajeros que codifican para chaperonas del RE (respuesta a proteínas mal plegadas o UPR). La acumulación de proteínas mal plegadas en estas mutantes se evidenció además por la presencia en sus glicoproteínas de una mayor proporción de oligosacáridos con estructuras específicas del RE y no del aparato de Golgi. Los glicanos sintetizados por estas mutantes son similares a los obtenidos cuando se agregó a células salvajes un agente reductor que provoca un mal plegamiento en las glicoproteínas que se están sintetizando en el RE. Tal como fue descrito para células de mamífero, en células intactas de *S. pombe* la formación de oligosacáridos monoglucosilados reduce la velocidad de plegamiento, pero incrementa su eficiencia. Esto fue evidenciado por una comparación de la cantidad de carboxipeptidasa y la velocidad de llegada a la vacuola de esta proteína en células salvajes y GII α ⁻. Este resultado indicó que los oligosacáridos monoglucosilados están involucrados en la facilitación del plegamiento de las glicoproteínas de *S. pombe*.

La formación de proteínas mal plegadas causada tanto por el agregado de una agente que impide la formación de puentes disulfuro (ditiotretol) a células intactas, como por un shock de calor, no fueron condiciones suficientes para la glucosilación *in vivo* mediada por la GT. dichos tratamientos no resultaron en un aumento generalizado de la glucosilación. La explicación para este resultado podría estar en las restricciones de la GT para reconocer sus sustratos: aparentemente la GT sólo glucosilaría glicoproteínas que presentan una estructura parcial o un intermediario del plegamiento con flexibilidad limitada, ausente en las formas completamente desplegadas. Estos resultados sugieren que las glicoproteínas que se pliegan en el RE son sometidas al sistema de control de calidad del plegamiento en las etapas finales del proceso de plegamiento.

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

“Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunit-encoded genes on glycoprotein folding”. C. D’Alessio, F. Fernandez, S. Trombetta y A. J. Parodi. *The Journal of Biological Chemistry* (1999) 274 (36), 25899-25905

“A misfolded protein conformation is not a sufficient condition for *in vivo* glucosylation by the UDP-Glc glycoprotein glucosyltransferase”. F. Fernandez, C. D’Alessio, S. Fanchiotti y A. J. Parodi. *The EMBO Journal* (1998) 17 (20), 5877-5886

Palabras clave: glucosidasa II / glucosiltransferasa / plegamiento de glicoproteínas / *Schizosaccharomyces pombe*

SUMMARY

The endoplasmic reticulum (ER) is the intracellular location of some post-translational modifications and folding of proteins destined to secretion, to the plasma membrane or to organelles of the endocytic system. *N*-glycosylation is one of the most frequent modifications. This modification is related to protein folding, as many species are unable of properly fold without *N*-glycan addition. Folding intermediates, incomplete assembled oligomers, misfolded proteins and aggregates are selectively retained in the ER. Transport to Golgi compartments takes place only if proteins are in their native conformation and properly assembled. The mechanism that ensures the functionality of proteins that exit the ER, is the so called "quality control of glycoprotein folding".

In most eucariotic cells, *N*-glycosylation is initiated on transfer of an oligosaccharide ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) from a lipid-carrier (dolichyl diphosphate), to the sequence Asn-X-Ser/Thr in nascent proteins in the ER. The three terminal glucose residues of the transferred oligosaccharide are immediately trimmed by two ER glucosidases, I and II (GI and GII). Parodi and coworkers demonstrated the occurrence of transient reglucosylation of glucose-free *N*-linked oligosaccharides in the ER by a lumenal enzyme, the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (GT). This enzyme glucosylates glycoproteins in a cell-free assay, only if they have been previously denatured. For this especial feature, GT has been proposed as a possible sensor of glycoprotein conformation in the ER. Monoglucosylated oligosaccharides can be generated by partial deglucosylation by of GI (that removes the most terminal glucose) and GII (that trims both inner glucose residues), or by GT. Monoglucosylated oligosaccharides allow interaction of glycoproteins with two ER lectins, calnexin (CNX) and/or calreticulin (CRT). This interaction facilitates glycoprotein folding, avoids aggregation of glycoproteins, allows interaction of bound glycoproteins with the ER chaperone system and constitutes a retaining mechanism of misfolded glycoproteins in the ER.

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has the three elements of the quality control of glycoprotein folding in the ER as this yeast expresses a GT activity and a CNX homologue. In addition, the oligosaccharide transferred to nascent polypeptides is $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ and this compound is processed in the ER to $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, indicating the presence of both GI and GII activities. The disruption of the gene encoding CNX in *S. pombe* has been shown to be lethal. However, a mutant lacking GT activity (*gpt1*) obtained in our laboratory had no discernible phenotype. This raised the question of the actual importance of monoglucosylated oligosaccharide formation in glycoprotein folding in this yeast and its role in glycoprotein folding. Further work reported here was performed in order to test whether a misfolded conformation is a sufficient condition for *in vivo* glucosylation of all *N*-linked oligosaccharides by GT as was observed *in vitro*.

Results presented herein provide genetic support for a proposed heterodimeric structure of GII. *S. pombe* GII appears to be composed by two subunits $\text{GII}\alpha$ and $\text{GII}\beta$. Catalytic activity is contained in $\text{GII}\alpha$ subunit, which in turn lacks any known ER retrieval signal. $\text{GII}\beta$ has in its C-terminal sequence the tetrapeptide VDEL, homologous to known lumenal ER retrieval signal. A model is proposed in which $\text{GII}\beta$ subunit functions as the retrieval element of $\text{GII}\alpha$ -subunit to the ER.

CNX resulted essential for *S. pombe* viability. However, $\text{GII}\alpha$ subunit disruption

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ROLE OF MONOGLUCOSYLATED
OLIGOSACCHARIDES IN GLYCOPROTEIN
FOLDING FACILITATION IN *Schizosaccharomyces
pombe***

Autora: Cecilia D'Alessio

Director: Armando J. Parodi

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Fundación Campomar**

4

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

- 2001 -

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ROLE OF MONOGLUCOSYLATED
OLIGOSACCHARIDES IN GLYCOPROTEIN
FOLDING FACILITATION IN *Schizosaccharomyces*
*pombe***

Autora: Cecilia D'Alessio

Director: Armando J. Parodi

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Fundación Campomar**

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

- 2001 -

completely abolished the formation of monoglucosylated oligosaccharides, both by deglucosylation of the transferred compound as by GT-mediated reglucosylation. This mutant was viable at all temperatures tested. It was concluded that CNX but not monoglucosylated oligosaccharides is essential for this yeast.

Although monoglucosylated oligosaccharide formation is not essential for cell viability, cells totally (GII α minus) or partially (GII β or GT minus) defective in monoglucosylated oligosaccharide formation showed accumulation of misfolded proteins in the ER in the absence of any exogenous stress. This was evidenced by the induction of mRNAs encoding ER chaperones (unfolded protein response). Besides, misfolding of glycoproteins in those mutants was revealed by the much higher proportion of protein-linked oligosaccharides having ER-specific structures and lacking Golgi-specific modifications. Glycans synthesized by the mutants displayed sizes similar to those found when a reducing agent that prevents proper protein folding in the ER was added to wild type cells. As was described for mammalian cells, also in intact *S. pombe* cells formation of monoglucosylated oligosaccharide decreased the folding rate but increased the folding efficiency as judged by comparison of amounts and rates of arrival of carboxypeptidase Y to the vacuole in wild type and GII α minus cells. This result indicated that monoglucosylated glycans are indeed involved in glycoprotein folding facilitation in the fission yeast.

Protein misfolding caused both by addition of a reagent that prevents disulfide bond formation (dithiothreitol) to intact cells as well as by a heat shock treatment were not conditions sufficient for *in vivo* GT-mediated glucosylation. Those treatments did not result in a generalized glycoprotein glucosylation. The explanation for this result may lie in GT restrictions to recognize its substrates. Apparently GT only glucosylates partially structured conformers or folding intermediates bearing a limited flexibility that is absent in less structured species. These results suggest that glycoproteins are mainly subjected to ER quality control in the last folding stages.

Some of the results obtained in this Ph.D. Thesis were included in the following publications:

- “Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunit-encoded genes on glycoprotein folding”. C. D’Alessio, F. Fernandez, S. Trombetta y A. J. Parodi. *The Journal of Biological Chemistry* (1999) 274 (36), 25899-25905
- “A misfolded protein conformation is not a sufficient condition for *in vivo* glucosylation by the UDP-Glc glycoprotein glucosyltransferase”. F. Fernandez, C. D’Alessio, S. Fanchiotti y A. J. Parodi. *The EMBO Journal* (1998) 17 (20), 5877-5886

Keywords: glucosidase II / glucosyltransferase / glycoprotein folding/ *Schizosaccharomyces pombe*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El retículo endoplasmático (RE) juega un rol central en la síntesis de las proteínas que están destinadas a la vía secretoria de todas las células eucariotas. Sus membranas constituyen más de la mitad de las membranas totales de una célula animal y forman una superficie cerrada que contiene un único espacio, el lumen del RE, que ocupa más del 10% del volumen total celular. Si la célula está especializada en secreción, puede llegar a ocupar un 60% del volumen total. Las proteínas son translocadas al RE en forma cotraduccional, y la señal para que ello ocurra es un péptido generalmente N-terminal de 18-30 aminoácidos que se une a un complejo nucleoproteico llamado SRP (por “Signal Recognition Particle”) que dirige al ribosoma con el polipéptido nascente hacia la membrana del RE, formando con su receptor y otras proteínas un complejo de translocación (1). El RE es responsable del plegamiento, ensamblado, modificación post-traduccional y eventualmente también de la degradación de estas proteínas. La adición covalente de azúcares a través de una unión N-glicosídica a las proteínas es una de las funciones biosintéticas más importantes del RE. La mayor parte de las proteínas solubles y de membrana cuya síntesis se inicia en el RE y tienen como destino tanto el RE como el aparato de Golgi, lisosomas, membrana plasmática, pared celular o espacio extracelular, son glicoproteínas.

Funciones intracelulares de N-glicanos

En las glicoproteínas maduras de las células eucariotas, los componentes N-glicosídicos son estructuralmente muy diversos: la composición de azúcares y el número y tamaño de ramificaciones en el árbol de azúcares varía entre glicanos unidos a la misma proteína, entre glicoproteínas, entre tipos celulares, y entre tejidos y especies (2). Sin embargo, cuando se inicia la N-glicosilación en el RE, los glicanos no muestran esa heterogeneidad: los oligosacáridos que se transfieren a las proteínas son homogéneos, relativamente simples y comunes a casi todas las células. El espectro de glicoformas se mantiene bastante uniforme hasta que las glicoproteínas salen del RE y se introduce la diversificación estructural: los glicanos son sometidos a amplias modificaciones a medida que las glicoproteínas maduran y atraviesan el aparato de Golgi hacia sus destinos finales dentro y fuera de la célula. El cambio de una estructura uniforme de los oligosacáridos en el RE a la diversificación en el Golgi coincide con un marcado cambio en la función de los glicanos. En los inicios de la vía secretoria, los glicanos tienen el rol de promover el correcto plegamiento de las glicoproteínas y en el control de calidad de dicho plegamiento. Más tarde en el Golgi se producen variaciones complejas para un espectro amplio de funciones de los azúcares en las proteínas maduras (3).

El retículo endoplasmático como sitio de inicio de la N-glicosilación de proteínas

La N-glicosilación de proteínas de la mayoría de las células eucariotas se inicia con la transferencia en bloque de un sacárido de 14 unidades de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (**Figura 1**) preformado sobre un precursor lipídico unido a membrana (dolicol difosfato, Dol-P-P) (4), a las cadenas polipeptídicas nascentes que están siendo translocadas hacia el lumen del RE (5, 6). Este oligosacárido es transferido al grupo NH_2 de la cadena lateral de una asparagina (Asn) en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro) a través de

La reacción de transferencia es catalizada en un sólo paso por la Dol-P-P oligosacárido:proteína oligosacariltransferasa (OT), una enzima compleja unida a membrana con su sitio activo en el lumen del RE (7). Esta enzima reconoce tanto una conformación específica de la secuencia Asn-X-Ser/Thr cuando la proteína emerge del complejo de translocación (a 10-12 aminoácidos de distancia de la membrana del RE), como la presencia de los tres residuos de glucosa en el oligosacárido-P-P-Dol (8). La remoción de la glucosa más externa disminuye la velocidad de transferencia 10-20 veces (9), lo que determina una severa hipoglicosilación de glicoproteínas en células mutantes incapaces de glucosilar el oligosacárido unido al lípido (10).

Existen además oligosacáridos unidos a un grupo OH de la cadena lateral de un aminoácido Ser o Thr. Esos O-oligosacáridos se forman en el aparato de Golgi postraduccionalmente por agregado secuencial de un monosacárido por vez, a diferencia de los N-oligosacáridos que se forman en el RE por agregado en bloque de un oligosacárido de manera cotraduccional.

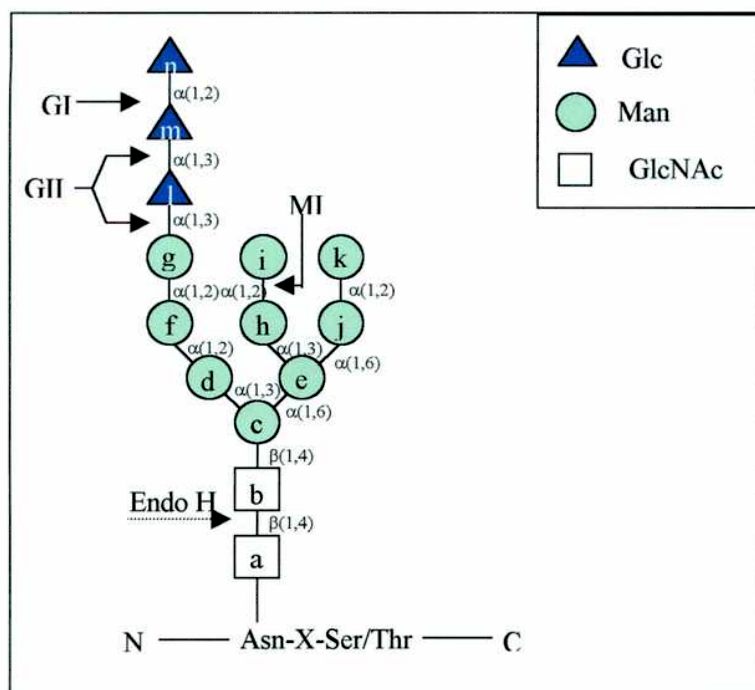


Figura 1. Estructura del oligosacárido transferido a proteínas en células de mamíferos, plantas y hongos. Las letras indican el orden de incorporación de los monosacáridos en la síntesis *in vivo* del precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Las enzimas involucradas en el procesamiento del oligosacárido *in vivo* en el RE se indican con flechas llenas: GI, glucosidasa I; GII, glucosidasa II; MI, manosidasa I del RE. El sitio de corte *in vitro* por la endo- β -N-acetil glucosaminidasa H (Endo H) se indica con flecha punteada.

Secuencia y topología de los pasos iniciales de la N-glicosilación en el RE

El oligosacárido que se mostró en la **Figura 1** es construido azúcar por azúcar sobre una molécula lipídica embebida en la membrana del RE. El lípido al cual está unido el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ por un puente difosfato es el dolicol (Dol), compuesto de 18 a 21 unidades de isopreno en mamíferos (2). Parte de la maquinaria biosintética del precursor de los N-glicanos está en la membrana del RE enfrentando el citosol y usa nucleótido azúcares dadores que son provistos por enzimas citosólicas. Dichos intermediarios donan el monosacárido directa o indirectamente al lípido en una secuencia ordenada: los primeros siete monosacáridos (residuos a-g de la **Figura 1**) son transferidos directamente desde sus correspondientes nucleótido-azúcares; los siguientes siete azúcares (residuos h-n de la **Figura 1**) son transferidos a partir de intermediarios lipídicos, que son a su vez sintetizados en la cara citosólica del RE a partir de nucleótido azúcares.

En la **Figura 2** se detalla la secuencia y topología de reacciones que conducen a la formación del oligosacárido transferido en las reacciones de N-glicosilación (11). Con la transferencia de GlcNAc-1-P a Dol-P a partir de UDP-GlcNAc , se forma Dol-P-P-GlcNAc al que se le agrega otro residuo de GlcNAc también a partir de UDP-GlcNAc (paso 1). Luego se transfieren 5 residuos de Man a partir de GDP-Man (paso 2). Estas reacciones son catalizadas por glicosiltransferasas situadas en la cara citoplasmática del RE. El intermediario $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ unido a Dol-P-P es translocado al lumen del RE donde un número adicional de 4 residuos manosa y 3 glucosas es transferido a partir de Dol-P-Man y Dol-P-Glc (pasos 3, 6 y 9 respectivamente). Estos dadores de glucosas y manosas son sintetizados en la cara externa del RE a partir de Dol-P y los correspondientes nucleótido azúcares y luego son translocados al interior del RE (pasos 4, 5, 7 y 8). La adición de tres residuos de glucosa, 2 en uniones $\alpha(1,3)$ y la terminal en unión $\alpha(1,2)$ son la etapa final de la síntesis del bloque del oligosacárido (paso 9). El oligosacárido triglucosilado es el sustrato preferido por el complejo de la OT que lo transfiere específicamente a la Asn del tripéptido Asn-X-Ser/Thr (paso 10). Si bien la glicosilación es un proceso muy eficiente, no todos los sitios posibles son glicosilados efectivamente, debido probablemente a restricciones conformacionales del entorno de dicha secuencia. Dado que la glicosilación es cotraduccional, la Asn es parte de una proteína en proceso de plegamiento, de manera que el periodo de tiempo en el cual la glicosilación puede ocurrir es relativamente corto.

En los eucariotas inferiores y superiores están involucradas tres glicosiltransferasas dependientes de Dol-P-Glc en el proceso de glicosilación terminal. En *Saccharomyces cerevisiae* se han aislado varias mutantes deficientes en los pasos de biosíntesis del oligosacárido unido a Dol-P-P conocidas como mutantes *alg* (por “asparagine linked glycosylation”). Las mutaciones detectadas en esta levadura que afectan el agregado de las Glc terminales son *alg5*, que afecta la síntesis de Dol-P-Glc mientras que *alg6*, *alg8* y *alg10* afectan las glicosiltransferasas que agregan la primera, segunda y tercera Glc respectivamente (12). Estas mutaciones no afectan el crecimiento de estas levaduras pero como ya se explicó llevan a la hipoglicosilación de las glicoproteínas debido a una menor eficiencia de transferencia por la OT (10).

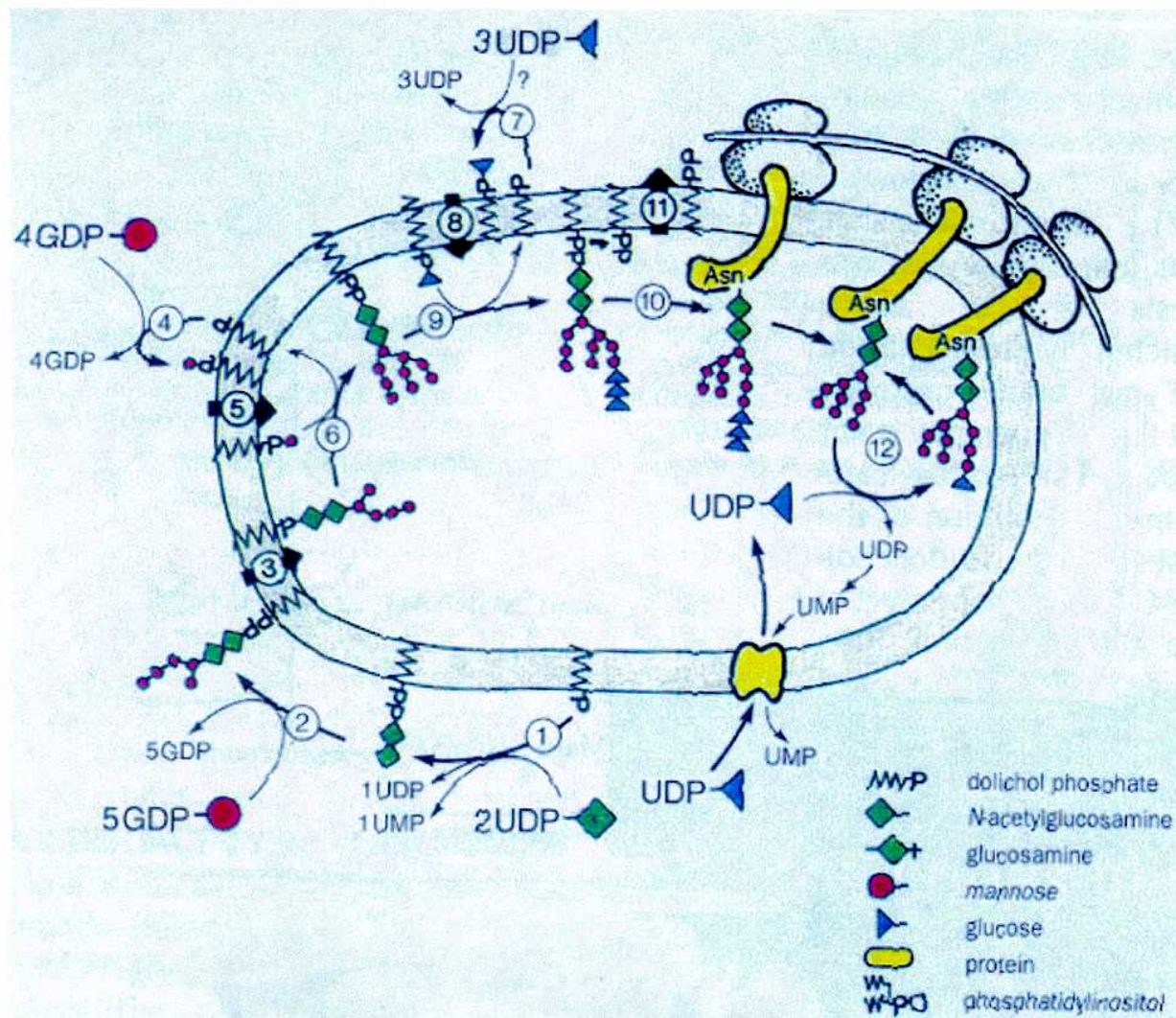


Figura 2. Secuencia y topología de las reacciones de los pasos iniciales de la N-glicosilación en el RE. Tomado de referencia 11. Ver texto para detalles.

Procesamiento de N-glicanos unidos a proteínas

Procesamiento en el RE: inmediatamente después de la transferencia del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ se inicia en el RE un proceso de recortado de dicho oligosacárido unido a la proteína: los tres residuos de Glc son removidos secuencialmente por dos glucosidasas muy específicas del RE. La glucosidasa I (GI), una $\alpha(1,2)$ glucosidasa de membrana remueve el residuo de Glc más externo del oligosacárido. La $\alpha(1,3)$ glucosidasa II (GII), una enzima soluble, remueve los otros dos residuos de Glc restantes (**Figura 3**). La deglucosilación es independiente de la conformación de la glicoproteína sustrato y es un proceso rápido que ocurre en forma cotraduccional y cotranslocacional (6). Dependiendo de la especie, una o dos unidades de Man también son removidas por α -manosidasas en el RE (13). Un procesamiento adicional ocurre en el lumen del RE (**Figura 2**, paso 12) y consiste en la reglucosilación transitoria de glicoproteínas después de la deglucosilación completa por GI y GII. Esta reglucosilación es catalizada por la UDP-Glucosa:glicoproteína glucosiltransferasa (GT) y genera $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, y $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ como productos. Esta reacción se discutirá en detalle más adelante.

Procesamiento en el Golgi: un procesamiento adicional de los oligosacáridos unidos a proteína ocurre a medida que las glicoproteínas migran a través de las distintas cisternas del aparato de Golgi donde se exponen a las sucesivas glicosidasas y glicosiltransferasas dando por resultado las distintas estructuras encontradas en las glicoproteínas maduras (2). Las estructuras encontradas en los oligosacáridos unidos a los restos de Asn de las glicoproteínas de células de mamífero se pueden dividir en tres grandes grupos: los oligosacáridos *alta manosa* 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 y por último, los *híbridos* tienen algunas características de los alta manosa y de los complejos. En la **Figura 3** se ejemplifica el procesamiento de un oligosacárido complejo. Todos estos N-oligosacáridos tienen en común el mismo pentasacárido de dos GlcNAc y tres Man (residuos a-e de la **Figura 1**). En el Golgi de *S. cerevisiae*, una serie de manosiltransferasas agrega Man para formar el manano encontrado en sus manoproteínas, que poseen 50 a 150 residuos de Man. En el Golgi de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* existe manosilación y galactosilación de glicoproteínas (14).

Este camino biosintético es intrigante: ¿por qué la célula ensambla un oligosacárido grande para luego recortarlo y reconstruirlo otra vez de una manera diferente? Por qué el RE contiene enzimas tanto para remover como para reponer residuos de Glc? La respuesta a esta pregunta reside en el rol de los oligosacáridos transferidos a las proteínas en el RE y su procesamiento en dicha organela con el correcto plegamiento de las glicoproteínas como así también el control de calidad que evita que glicoproteínas aberrantemente plegadas lleguen a su destino final.

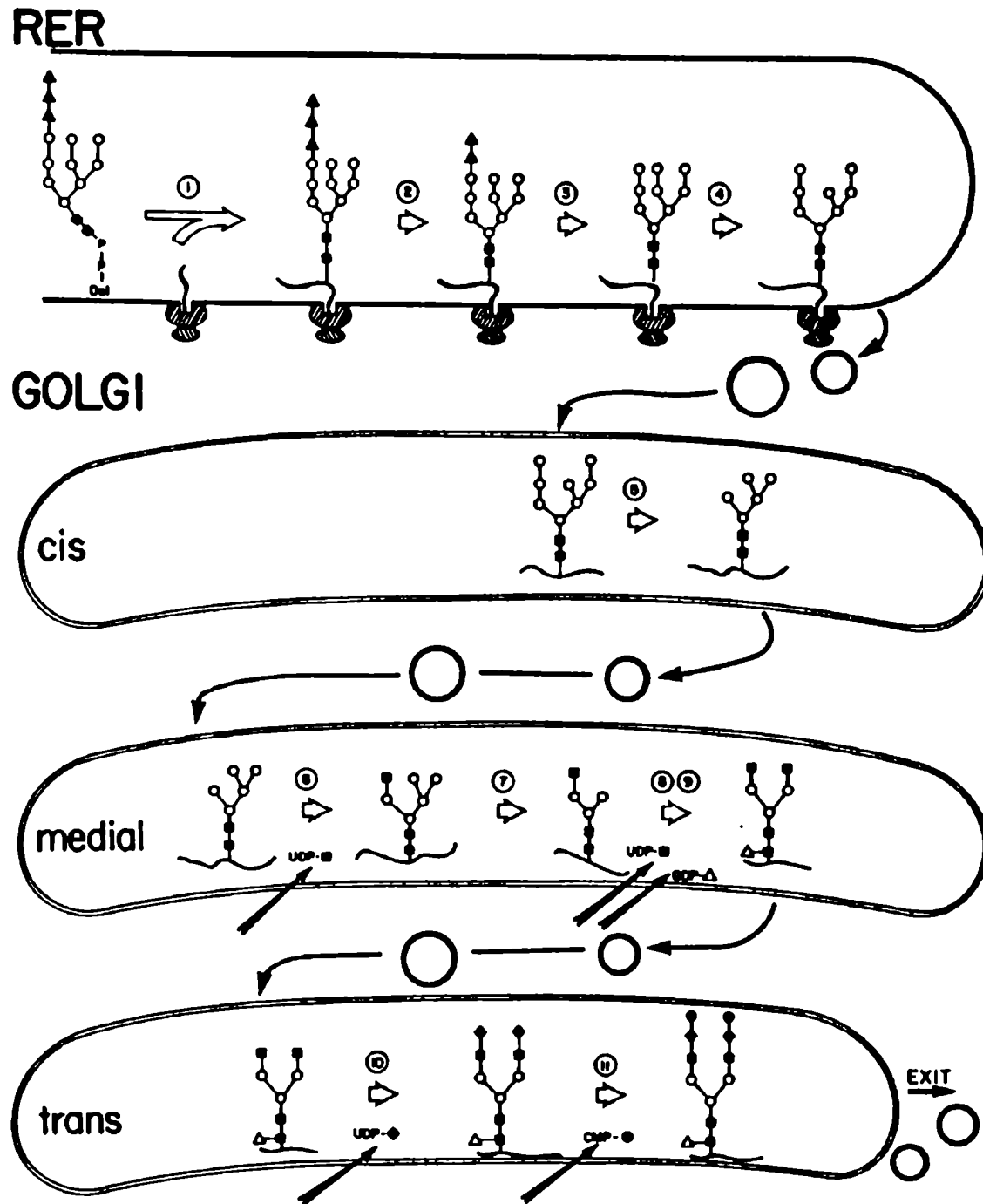


Figura 3. Ruta esquemática del procesamiento de oligosacáridos en glicoproteínas recién sintetizadas. Las reacciones son catalizadas por las siguientes enzimas: (1) oligosacariltransferasa, (2) $\alpha(1,2)$ glucosidasa I, (3) $\alpha(1,3)$ glucosidasa II, (4) $\alpha(1,2)$ α -manosidasa I del RE, (5), α -manosidasa I de Golgi, (6), N-acetilglucosaminiltransferasa I, (7), α -manosidasa II de Golgi, (8), N-acetilglucosaminiltransferasa II, (9), fucosiltransferasa, (10), galactosiltransferasa, (11), sialiltransferasa. Los símbolos representan: ■ N-acetilglucosamina; ○ manosa; ▲ glucosa; ◆ galactosa; △ fucosa; ● ácido siálico. Dol, dolicol. RER, retículo endoplásmico rugoso. Modificado de referencia 2.

Glucosilación transitoria de glicoproteínas en el RE

Las N-glicoproteínas son transitoriamente reglucosiladas en el RE después de la deglucosilación completa por GI y GII. Esto se evidenció por primera vez en *Trypanosoma cruzi*: en tripanosomátidos, el oligosacárido transferido a las proteínas no está glucosilado (no posee los residuos 1-n en la **Figura 1**) (15, 16). Sin embargo al incubar las células con [^{14}C]Glc, se encontraron oligosacáridos de alta manosa glucosilados unidos a proteínas (17, 18). Los compuestos monoglucosilados de composición $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ tenían una existencia transitoria ya que desaparecían cuando se hacía un “chase” de las células con Glc fría (19). El procesamiento de oligosacáridos unidos a proteínas en *T. cruzi* se muestra en la **Figura 4 B**.

A diferencia de lo que ocurre en tripanosomátidos, en células de mamífero los compuestos monoglucosilados $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteínas podrían ser formados de dos maneras: 1) por deglucosilación parcial de $\text{Glc}_3\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ a $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ o 2) por deglucosilación completa del compuesto transferido seguida de la reglucosilación directa del glicano no glucosilado ($\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$). La existencia de glucosilación directa en tripanosomas sugirió el diseño de experimentos que demostraron que la glucosilación transitoria de los oligosacáridos deglucosilados era un paso general de su procesamiento en el RE, ya que ocurre en células de mamíferos, plantas y hongos (20, 21). El precursor de las glucosas agregadas es UDP-Glc. El procesamiento de oligosacáridos unidos a proteínas en mamíferos se muestra en la **Figura 4 A**.

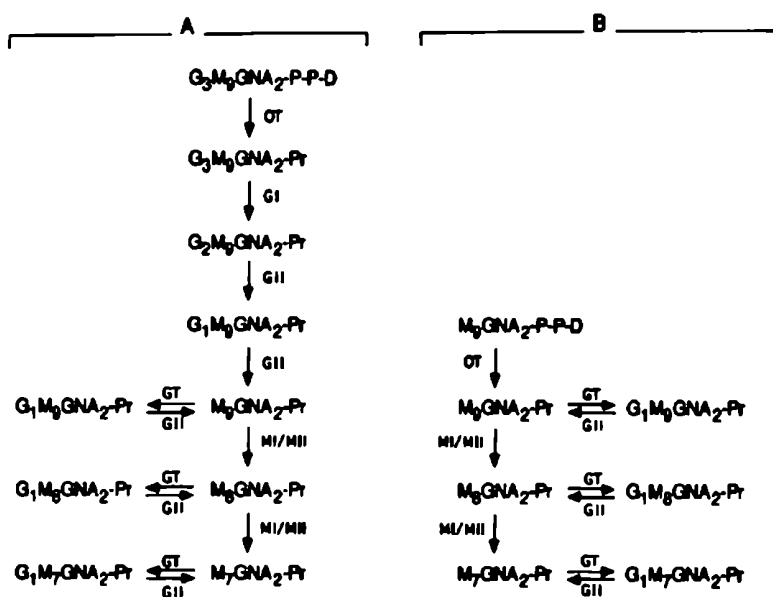


Figura 4. Glucosilación transitoria de oligosacáridos unidos a proteínas en *T. cruzi* y mamíferos. En mamíferos (A) el oligosacárido transferido a proteínas es $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, mientras que en *Trypanosoma cruzi* (B) es $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. OT, oligosacariltransferasa; M1 y MII, manosidasas I y II del RE; GI, glucosidasa I; GII, glucosidasa II; GT, UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa; G, glucosa; M, manosa; GNA, N-acetilglucosamina; Pr, proteína; D, dolicol.

La reglucosilación de glicoproteínas endógenas observada *in vivo* fue reproducida en sistemas libres de células y la actividad fue localizada por fraccionamiento subcelular en el RE, donde las proteínas son deglucosiladas por GI y GII. La actividad responsable de la reglucosilación, la GT, fue detectada en células de mamíferos, plantas, hongos y protozoos (22).

La estructura Glc₁Man₉GlcNAc₂-proteína formada por la GT es idéntica a la obtenida por la deglucosilación parcial de Glc₃Man₉GlcNAc₂, sugiriendo que la GII es también la responsable, *in vivo*, de la deglucosilación del nuevo compuesto. Los tripanosomátidos tienen actividad GII, y dado que estos organismos no transfieren compuestos glucosilados a las proteínas, la única función de esta enzima es la de realizar la actividad contraria a la GT. Más del 50% de los oligosacáridos de *T. cruzi* son transitoriamente reglucosilados en el RE y la glucosilación transitoria es un paso que ocurre normalmente en el procesamiento de las glicoproteínas (23).

La característica más notable de la GT es que glucosila glicoproteínas incorrectamente plegadas pero no a aquellas que ya han adoptado su estructura terciaria nativa: cuando se desarrolló un ensayo para la reglucosilación de proteínas exógenas, la glicoproteína sustrato (tiroglobulina bovina, una glicoproteína con oligosacáridos de alta manosa) resultó tener que estar desnaturalizada para ser aceptora de Glc en la reacción de reglucosilación (22). Basado en esta propiedad única para una glicosiltransferasa, se propuso que la GT y la formación de oligosacáridos monoglucosilados podrían estar involucrados de alguna manera en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE (22, 24).

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa

La GT, enzima responsable de la reglucosilación transitoria en el RE, fue purificada hasta homogeneidad de microsomas de hígado de rata (25), de *S. pombe* (26) y de *Drosophila melanogaster* (27). La GT consiste en un único polipéptido de 170 kDa, mucho mayor que la mayoría de glicosiltransferasas conocidas. Mientras que las glicosidasas y glicosiltransferasas de la vía secretoria son proteínas transmembrana, la GT y la GII (que cataliza la reacción enzimática opuesta) son proteínas solubles del lumen del RE (28). La GT aislada tiene un pH óptimo neutro y requiere de iones Ca²⁺ en concentraciones milimolares para su actividad. Dicho requerimiento es compatible con su localización en el RE, que es un reservorio intracelular de Ca²⁺. La GT agrega específicamente un residuo de Glc al residuo Man terminal en la rama α1,3-α1,2 del oligosacárido Man₉GlcNAc₂-proteína (residuo g en la **Figura 1**), y oligosacáridos que contienen un número menor de Man en la rama α1,6 son glucosilados a menor velocidad que el oligosacárido completo (25 - 28).

Otra glucosiltransferasa del RE sintetiza la misma estructura Glc₁Man₉GlcNAc₂ producida por la GT, pero sobre el precursor Dol-P-P-oligosacárido: esta proteína de membrana (denominada Alg6p) utiliza Dol-P-Glc (que se sintetiza en el citosol) como dador de Glc (11). En contraste, la reglucosilación de proteínas mediada por la GT usa UDP-Glc como dador del azúcar (25). La membrana del RE contiene un transportador específico para transportar UDP-Glc desde el citosol al lumen del RE, transporte acoplado a la salida de UMP (11, ver **Figura 2**). Este nucleósido monofosfato se produce por una UDPasa del RE recientemente identificada (29) que

hidroliza el UDP producido por la actividad GT, impidiendo una inhibición por producto de la enzima y facilitando el ingreso del sustrato.

El cDNA de la GT ha sido clonado y secuenciado de *D. melanogaster*, de *S. pombe* y de rata (27, 30, 31), y en bases de datos de DNA se pueden identificar también homólogos de otros organismos. Las secuencias codifican para proteínas de aproximadamente 1500 aa que carecen de dominios transmembrana y contienen en sus extremos C-terminales el tetrapéptido KDEL (o similares) de retención/recuperación en el RE. La secuenciación del DNA de la GT de *S. pombe* reveló que contenía un elemento de respuesta al shock de calor en su promotor, y la expresión de su mRNA se induce en condiciones que provocan la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, como ser un shock de calor, agregado de ionóforos de Ca^{2+} , de agentes reductores o de tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación), enfatizando la posible participación de la GT en el plegamiento de glicoproteínas en el RE (30).

Cuando se comparan las secuencias primarias entre las GTs de diferentes especies, éstas presentan una conservación moderada (30-40% de identidad) a lo largo de la proteína completa, únicamente existe alta homología en aproximadamente 270 aa de la región C-terminal (65-85% de identidad). Este dominio tiene homología con glicosiltransferasas bacterianas que utilizan UDP-Glc o UDP-Gal como sustratos dadores y que poseen una longitud total de 300 aa, por lo que probablemente esta región conservada de la GT corresponda a un dominio glicosiltransferasa. Una región de 200 aa que también están conservados entre las GT une el dominio C-terminal altamente conservado con los 800 aa N-terminales que están muy poco conservados. La razón para esta divergencia en el N-terminal no es clara, pero se parece a lo que ocurre en chaperonas de la familia de las Hsp70, que difieren en la región de unión a péptidos hidrofóbicos (32).

Reconocimiento de estructuras no nativas por la GT

El hallazgo más importante cuando se caracterizó la GT fue que la reglucosilación de las glicoproteínas es dependiente del estado de plegamiento de la parte proteica de las mismas. Para la reacción de transferencia de Glc a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -proteína por la GT es necesaria la exposición de ciertos dominios proteicos aparentemente ausentes o no expuestos en las conformaciones nativas, ya que las GTs aisladas de hígado de rata, *S. pombe* y *D. melanogaster* glucosilan únicamente glicoproteínas desnaturalizadas (25-27).

El reconocimiento del sustrato por la GT no está determinado por una secuencia aminoacídica específica, ya que glicoproteínas muy diversas y que no presentan homología entre sí son sustratos de la GT. El reconocimiento está dado probablemente por propiedades biofísicas generales comunes a las proteínas que no han alcanzado su estructura terciaria nativa, que pueden incluir la exposición de regiones hidrofóbicas o una excesiva movilidad dinámica en la zona de contacto (33).

La glicosiltransferasa reconoce el residuo mas interno de N-acetilglucosamina del oligosacárido en las glicoproteínas sustrato. Glicoproteínas desnaturalizadas que contienen únicamente GlcNAc unido a la Asn de la secuencia consenso de glicosilación (obtenidas por tratamiento con Endo H, ver **Figura 1**) fueron potentes inhibidores de la GT mientras que

proteínas desnaturalizadas idénticas pero que carecían del residuo GlcNAc no tuvieron efecto en la glucosilación. Esto implica que la GT debe reconocer simultáneamente una conformación desnaturalizada y el residuo de GlcNAc interno para catalizar la reacción, y se demostró que ambos elementos tienen que estar unidos covalentemente (24). El reconocimiento de la GlcNAc por la GT le permite distinguir entre *glicoproteínas* y proteínas, lo que asegura que proteínas desnaturalizadas no glicosiladas no interfieran con su función. Al mismo tiempo, el requerimiento de que el N-glicano debe estar unido covalentemente a una proteína no nativa sugiere que la GT sensa principalmente conformaciones locales, modificando oligosacáridos presentes en dominios mal plegados. La GT es un sensor extremadamente sensible de la estructura de las glicoproteínas, ya que posee la capacidad de distinguir entre dos formas de neoglicoproteínas con la misma estructura secundaria pero que difieren en la terciaria (33).

Si bien como ya se explicó la GT reconoce partes del oligosacárido aceptor de Glc, su característica más distintiva es la de discriminar entre conformaciones nativas y no nativas. Esta propiedad es exhibida por chaperonas moleculares, pero en este sentido la GT es única en el hecho de que modifica covalentemente a sus blancos.

El RE como compartimento de plegamiento de proteínas de la vía secretoria

El RE 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 de su plegamiento, ensamblado, modificación post-traducciona, transporte y eventualmente también de su degradación.

El lumen del RE constituye un medio que es intermedio entre el citosol y el espacio extracelular. La maduración de varias proteínas es dependiente del Ca^{2+} en el RE y la concentración de este catión es del orden milimolar (34; 35). La concentración de otros electrolitos es similar a la del citosol y el pH en el lumen es neutro. Las condiciones redox dentro del RE son de particular interés dada su relación con la formación de puentes disulfuro. 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. 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 (36). Cuando agentes reductores como DTT o β mercaptoetanol (β MSH) son agregados a las células, las condiciones redox en el RE cambian y el plegamiento, maduración y transporte de proteínas es afectado (37). El RE contiene ATP: la presencia de ATP en el lumen del RE es importante ya que algunas de las chaperonas que asisten el plegamiento de proteínas dependen de ATP para su función (38).

El plegamiento de proteínas dentro del RE está asistido

Las proteínas entran a la vía secretoria en el RE, donde adquieren la estructura nativa, antes de ser transportadas al aparato de Golgi y continuar hacia su destino final. La estructura tridimensional de las proteínas esta determinada por su secuencia de aa. El plegamiento no ocurre al azar, sino siguiendo caminos específicos y con intermediarios definidos: 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. A esto sigue un número de reacciones mas lentas que involucran la isomerización de prolinas, la formación de puentes disulfuro y la adaptación conformacional entre dominios. En las proteínas con mas de un dominio, éstos se pliegan independientemente. Las proteínas pueden plegarse espontáneamente, es decir no requieren *a priori*, de la asistencia de otras macromoléculas. A pesar de que la información que determina la estructura tridimensional de los polipéptidos está contenida su secuencia, el plegamiento *in vivo* está asistido en el RE por un conjunto de proteínas celulares llamadas chaperonas moleculares y por otras proteínas de plegamiento (39, 40). Estas proteínas son necesarias para aumentar la eficiencia del plegamiento intracelular de polipéptidos, especialmente durante las reacciones tardías. La función de las chaperonas no es impartir información sobre el plegamiento, sino prevenir interacciones intra e intermoleculares inapropiadas o no productivas para la reacción de plegamiento y acelerar la cinética del plegamiento. Consistentemente con su rol de punto central de biogénesis de proteínas, el RE es rico en chaperonas moleculares.

El plegamiento en el RE está facilitado por una batería de chaperonas moleculares clásicas: BiP (por “immunoglobulin heavy-chain binding protein”)/GRP68, GRP94 y GRP170 (por “glucose-regulated proteins”) (41, 42). La BiP es una de las proteínas del lumen del RE mejor caracterizada, pertenece a la familia de las Hsp70 e interactúa transitoriamente con una amplia variedad de polipéptidos por unión a un motivo hidrofóbico. Es sintetizada constitutivamente (aunque se induce en condiciones de estrés) y representa el 5 % del contenido total del lumen del RE. La GRP94 pertenece a la familia de las Hsp90.

Otras proteínas que asisten el plegamiento catalizan la formación de puentes disulfuro: PDI o ERp59 (por “protein disulphide isomerase”), ERp72 y ERp57 (43, 44, 45). Estas proteínas presentan actividades tiol:proteína disulfuro oxido reductasa e isomerasa y están involucrada en la formación y reacomodamiento de los puentes disulfuro durante el proceso de plegamiento.

Calnexina (CNX) y calreticulina (CRT) constituyen una nueva familia de chaperonas no convencionales residentes en el RE (46), con propiedades de lectina y capaces de unirse específicamente a oligosacáridos monoglucosilados (ver más adelante).

Las proteínas que no se pliegan correctamente son retenidas en el RE y eventualmente transportadas al citosol, donde son degradadas por los proteasomas (47). Las células poseen por lo tanto mecanismos de control estrictos que distinguen entre confórmeros, mecanismos necesarios para retener a las estructuras incorrectas en el RE y prevenir su transporte. Estos se han referido globalmente como “control de calidad del plegamiento de proteínas”.

Los N-glicanos son necesarios para el plegamiento de las glicoproteínas

Los oligosacáridos agregados a las proteínas en el RE tienen dos efectos en el plegamiento de las glicoproteínas: un efecto directo del oligosacárido en promover el correcto plegamiento de polipéptidos recién sintetizados en el RE y un efecto más indirecto en el control de calidad del plegamiento de las glicoproteínas.

Se encuentra bien documentado en la bibliografía que la presencia de N-oligosacáridos es necesaria para la adquisición de la estructura terciaria correcta de muchas glicoproteínas (48, 49). La N-glicosilación puede ser evitada *in vivo* inhibiendo la formación del precursor oligosacárido-P-P-Dol (tanto por adición de compuestos que inhiben su biosíntesis, como la tunicamicina, o por mutaciones en las enzimas involucradas) o por eliminación de las secuencias consenso para la glicosilación (por mutagénesis dirigida de las glicoproteínas en estudio). Cuando la glicosilación es inhibida el efecto más comúnmente observado es la generación de proteínas mal plegadas incapaces de alcanzar un estado funcional. Las especies mal plegadas que no poseen oligosacáridos forman grandes agregados en el RE, muchas veces unidas unas a otras por puentes disulfuro intercatenarios aberrantes, unidos a su vez no covalentemente a BiP y a otras chaperonas del RE (50).

La importancia de la adición de glicanos para el correcto plegamiento varía entre proteínas: algunas son completamente dependientes de la glicosilación y otras no muestran dependencia alguna. Algunas son dependientes a alta temperatura, mientras que otras son dependientes en un tipo celular pero no en otro. Cuando se analiza la importancia de un sitio de glicosilación individual, se ve que a veces algunos son más importantes que otros, lo que implica que el agregado de oligosacáridos tiene efectos locales en el plegamiento de las proteínas. Sin embargo, cuando más de un sitio es modificado, el plegamiento se ve comprometido aunque ninguno de los sitios en particular sea necesario individualmente. Por lo tanto, los oligosacáridos tienen efectos tanto locales como globales en el proceso de plegamiento (3).

Los oligosacáridos proveen grupos hidrofílicos voluminosos que ayudan a mantener a las glicoproteínas en solución durante el proceso de plegamiento. También modulan la conformación de las proteínas forzando a los aa cercanos a la Asn de la secuencia consenso a estar próximos a una interfase acuosa y altera las preferencias conformacionales cercanas a un sitio de glicosilación (51, 52). Además, como se detallará más adelante, la interacción de los oligosacáridos monoglucosilados con lectinas del RE provee un mecanismo para retener moléculas que no están correctamente plegadas en el RE, asistir a su plegamiento y eventualmente degradar a las proteínas que permanecieron demasiado tiempo en el RE sin alcanzar su estructura nativa (5). Estas razones explican por qué el agregado de N-glicanos debe ocurrir cotraduccionalmente en el RE, es decir, antes de que comience el proceso de plegamiento. Es importante aclarar que si bien los N-oligosacáridos suelen ser cruciales para el correcto plegamiento y oligomerización de muchas glicoproteínas, en general no son necesarios para mantener la estructura nativa de las glicoproteínas maduras una vez que estas ya se han plegado (51).

La calnexina y calreticulina son lectinas que unen glicoproteínas monoglucosiladas

Uno de los efectos indirectos más importantes de los glicanos en el plegamiento involucra a un sistema único de chaperonas del RE que se encuentra en casi todos los eucariotas, llamado sistema CNX/CRT (6). La CNX fue descrita inicialmente como una proteína transmembrana tipo I del RE que reconocía transitoriamente moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) e inmunoglobulinas unidas a membrana (53). Ou *et al.* mostraron que CNX se asociaba en forma transitoria con una serie de glicoproteínas en células de hepatoma humano, que dicha asociación se abolía con inhibidores de la glicosilación (tunicamicina) y que proteínas no glicosiladas como la albúmina no interactuaban con la CNX (54).

Se demostró luego que no solo la tunicamicina sino también inhibidores de GI y GII (castanospermina y DNJ) abolían la interacción transitoria con CNX durante el plegamiento (55). La proteína G del mutante termosensible del virus de la estomatitis vesicular (VSV, ts045) se encontraba presente en su forma monoglucosilada a 39°C y deglucosilada a la temperatura permisiva: sólo a la temperatura elevada interactuaba con CNX. Se concluyó que la CNX reconocía específicamente oligosacáridos monoglucosilados (56). La CRT, homóloga soluble de la CNX, posee la misma especificidad (57). No sólo las glicoproteínas en proceso de plegamiento tenían que estar monoglucosiladas para unirse en forma transitoria a las lectinas, sino que para ser liberadas requerían de la remoción de la Glc remanente por la GII (56). De la larga lista de glicoproteínas que interactúan con CNX y CRT en células de mamíferos, se concluyó que la interacción transitoria con las lectinas es independiente del destino final de las primeras. Ambas requieren de Ca^{2+} para la unión al N-glicano (6). Experimentos de unión *in vitro* de CNX/CRT a oligosacáridos aislados, demostraron que de una mezcla de oligosacáridos de alta manosa marcados radiativamente sólo los compuestos monoglucosilados eran retenidos por las lectinas inmovilizadas (58, 59, 60). La unión es óptima para $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y menor para compuestos con menor contenido de Man.

Modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE

El carácter transitorio de la interacción de la CNX/CRT con glicoproteínas monoglucosiladas, y la relación directa entre esta interacción y su tiempo de permanencia en el RE, indicó la participación de las lectinas en la retención en el RE de glicoproteínas incompletamente plegadas. Esto último, junto con la reglucosilación selectiva de glicoproteínas mal plegadas fue conceptualizado por A. Helenius que propuso que GT, CNX y CRT eran parte de un mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE (55, 61).

En el modelo de control de plegamiento propuesto para mamíferos, los oligosacáridos transferidos a proteína ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) son inicialmente deglucosilados por acción de GI y GII y luego, a medida que las glicoproteínas van adquiriendo sus conformaciones nativas, alternan entre formas no glucosiladas y monoglucosiladas por efecto de las actividades catalíticas opuestas de la GII y de la GT, que transfiere una glucosa sólo si las glicoproteínas no han adquirido aún sus estructuras terciarias correctas. Las dos chaperonas del RE, CNX y CRT, que poseen una actividad de tipo lectina y reconocen oligosacáridos monoglucosilados de alta manosa unirían a las

proteínas monoglucosiladas y por lo tanto mal plegadas reteniéndolas en el RE. El ciclo de deglucosilación y reglucosilación continuaría hasta que el plegado correcto de las glicoproteínas se haya completado: cuando las mismas adoptan su conformación nativa, se convertirían en sustratos de la GII, pero no de la GT y se liberarían del “ancla” de las lectinas. Las glicoproteínas bien plegadas continuarían su camino por la vía secretoria hacia su destino mientras que las estructuras incorrectas serían retenidas y eventualmente translocadas al citoplasma para ser degradadas en los proteasomas (47) (**Figura 5**). En este ciclo, la GT funciona como el sensor del plegamiento, y la interacción de las especies mal plegadas al CNX/CRT está mediada por la “etiqueta” de la glucosilación. El ciclo de unión a CNX-disociación-reglucosilación –unión promueve el plegamiento correcto, inhibe el agregado de intermediarios de plegamiento, bloquea la oligomerización prematura, regula la degradación y provee un control de calidad al prevenir la salida del RE de especies incompletamente plegadas o ensambladas (3).

Este no es el único mecanismo de control de calidad del plegamiento en el RE: otros mecanismos simultáneos aplicables tanto a glicoproteínas como a proteínas no glicosiladas deben funcionar para evitar la secreción de proteínas mal plegadas. Uno de estos mecanismos se basa en la formación de puentes disulfuro reversibles entre la proteína en proceso de plegamiento y proteínas residentes del RE (62), mientras que otro mecanismo es la asociación de confórmers en plegamiento con BiP y otras chaperonas clásicas (63). Uno de los principales problemas durante el plegamiento es la agregación: al unirse a los oligosacáridos, CNX y CRT mantienen a las glicoproteínas en solución, permitiendo una interacción funcional entre la parte proteica de las mismas y las chaperonas. Experimentos de cross-linking realizados en células intactas mostraron que ERp57, una tiol:proteína oxido reductasa e isomerasa residente en el RE (homóloga a PDI), interactúa con formas monoglucosiladas de glicoproteínas mediante una asociación CNX/CRT-ERp57 (64). La asociación de glicoproteínas con dicho complejo con ERp57 aumenta la eficiencia del plegamiento (65). Además, se demostró que se forman puentes disulfuro transitorios entre ERp57 y las glicoproteínas unidas a CNX o CRT, que serían estructuras intermediarias en las reacciones de oxidación e isomerización necesarias para la formación de los puentes disulfuro correctos (66).

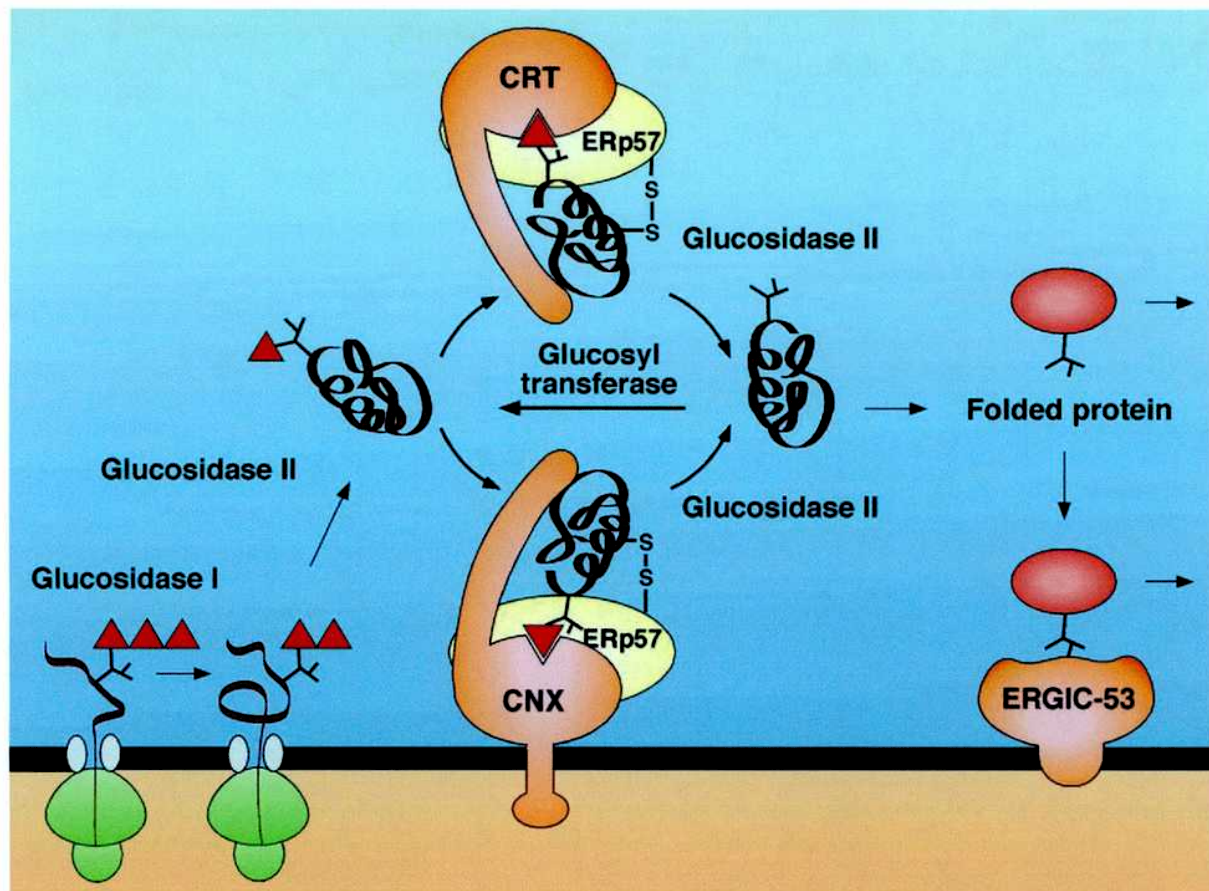


Figura 5. Modelo del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE. Las dos primeras Glc son removidas de las glicoproteínas recién sintetizadas, que con oligosacáridos monoglucosilados se unen a CNX y/o CRT. Las glicoproteínas quedan expuestas a ERp57, unido a las lectinas. Si las glicoproteínas tienen Cys, se forman puentes disulfuro transitorios con ERp57. Cuando la GII remueve la Glc restante, el complejo se disocia. Si la proteína no está plegada para entonces, es reglucosilada por la GT. El ciclo se repite hasta que las proteínas son plegadas o degradadas. Cuando las proteínas han adoptado su estructura terciaria correcta, dejan de ser sustrato de la GT, son deglucosiladas por la GII y dejan de ser retenidas en el RE por la CNX/CRT. La salida de ciertas proteínas del RE está asistida por la lectina ERGIC-53, que se une a residuos de Man. Tomado de referencia 3.

Un aspecto aún no resuelto definitivamente es si CNX y CRT actúan sólo como lectinas, como se propone en el modelo arriba descrito (modelo “sólo lectina”: **Figura 5 y Figura 6A**) (55, 61), o si la interacción de glicanos monoglucosilados con CNX/CRT es el primer paso, necesario para una interacción posterior de las partes proteicas de las glicoproteínas con las lectinas. Según este segundo modelo, tanto CNX como CRT actuarían primero como lectinas y después como chaperonas clásicas (59, 67) (modelo “lectina primero, interacción proteína-proteína después”: **Figura 6B**). En los dos modelos debe existir la interacción del oligosacárido monoglucosilado con CNX/CRT, que recluta ERp57 para asistir la correcta formación de puentes disulfuro en las glicoproteínas que se están plegando.

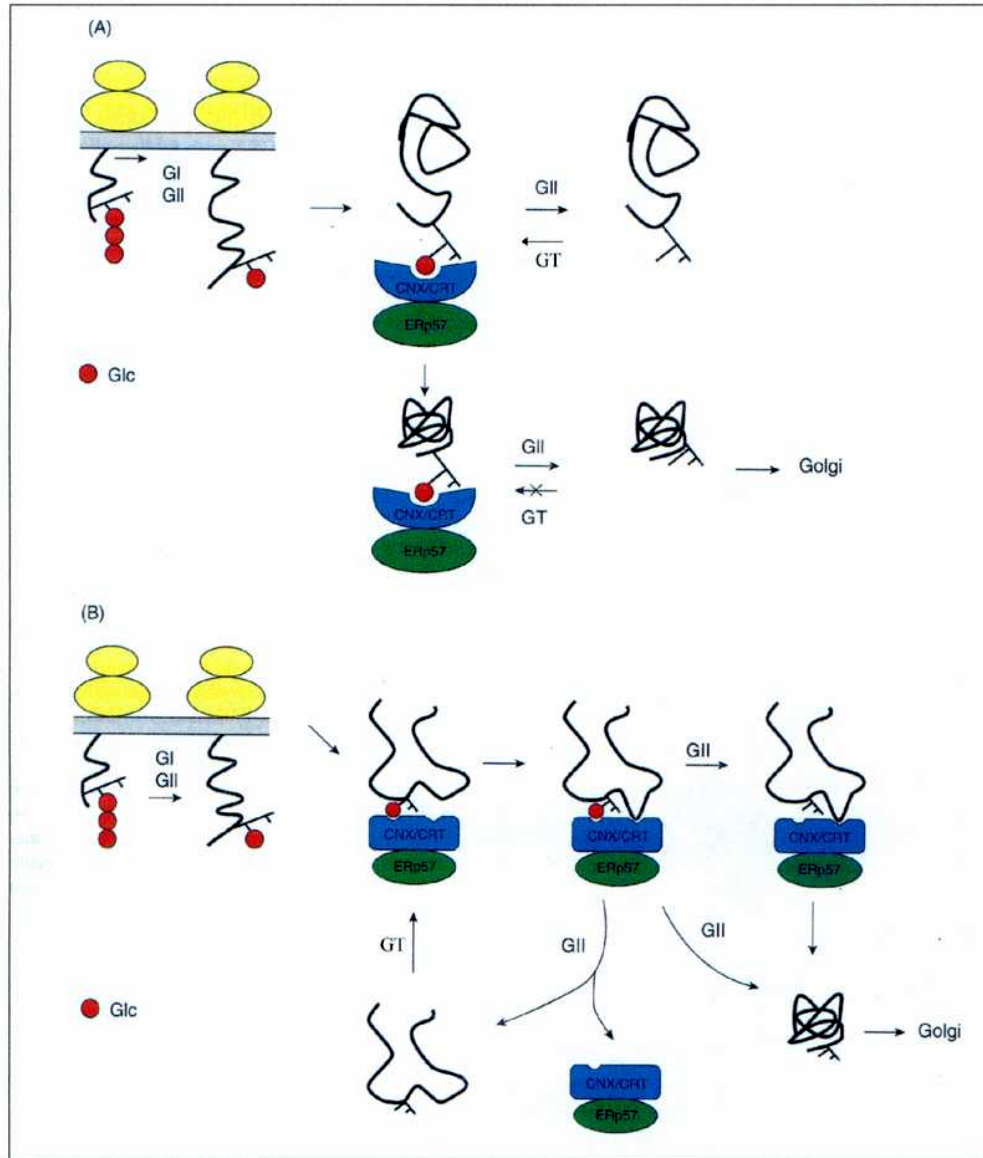


Figura 6. Modelos alternativos propuestos para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE. (A) Modelo "sólo lectina": El oligosacárido Glc₃Man₉GlcNAc₂ transferido es deglucosilado hasta el derivado monoglucosilado por GI y GII, y esta estructura es reconocida por CNX/CRT. Si ocurre la deglucosilación completa antes de la unión a las lectinas, el oligosacárido Man₉GlcNAc₂ es reglucosilado por la GT. La glicoproteína es liberada del ancla de la CNX/CRT por la GII y reglucosilada por la GT sólo si está incompleto su plegamiento, mientras que si adquirió su estructura nativa, es liberada por la GII pero no es reglucosilada por la GT. **(B) Modelo "lectina primero, interacción proteína-proteína después":** la unión del oligosacárido unido a proteína es un paso necesario para una posterior interacción proteína-proteína entre la glicoproteína y CNX/CRT. La liberación del ancla CNX/CRT es consecuencia de la acción de la GII y de un cambio conformacional en la glicoproteína, en CNX/CRT o en ambas. Tomado de referencia (5).

Degradación de proteínas incorrectamente plegadas

La retención prolongada de proteínas incompletamente plegadas en el RE lleva a su degradación. La degradación asociada al RE se lleva a cabo principalmente en el proteasoma 26S localizado en el citosol (47). El proceso ocurre en varias etapas: las proteínas mal plegadas son reconocidas por chaperonas del RE, CNX u otros factores como lectinas específicas de Man. Luego ocurre un transporte retrógrado del lumen del RE al citosol vía el canal Sec61, las glicoproteínas son deglicosiladas por una glicanasa citosólica y poliubiquitinadas previo a la degradación de la parte proteica en el proteasoma (68). El procesamiento de los N-glicanos juega nuevamente un papel en el proceso que conduce a la degradación: el uso de inhibidores de α -manosidasas (como kifunensina o 1-deoximanojirimicina) bloquea la degradación de proteínas mal plegadas (69), implicando la participación de la manosidasa I de RE (MI) en el proceso de deshecho. Como la demanosilación de los N-oligosacáridos es más lenta que la deglicosilación, el contenido de Man puede actuar como un indicador de permanencia en el RE. Recientemente se identificó al oligosacárido $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ como la señal necesaria para la degradación de una CPY mutante de plegamiento en *S. cerevisiae* (70) y se postuló que si una especie permanece en el RE suficiente tiempo, es demanosilada por la MI. Si se pliega bien abandona el RE; si no lo hace, es reconocida por la GT y la proteína se une a CNX. Como el sustrato $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ es un pobre sustrato de la GII comparado con $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, la glicoproteína no se libera rápidamente de la CNX, es retrotranslocada y degradada (69).

Por último, otra estrategia de degradación consiste en el redireccionamiento de las proteínas mal plegadas que han escapado el control del RE a lisosomas o vacuolas para ser degradadas allí (68). El rol de los oligosacáridos en este proceso no ha sido evaluado.

***Schizosaccharomyces pombe* como organismo de estudio del modelo**

S. pombe es una levadura de fisión que posee los componentes de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas. Posee una molécula que presenta un 40 % de homología con la CNX y es esencial para la viabilidad de *S. pombe*, ya que la disrupción del gen que la codifica es letal (71, 72). En nuestro laboratorio se ha clonado y secuenciado el gen que codifica para la GT en *S. pombe* y purificado la proteína a homogeneidad (30). Por otra parte, el oligosacárido transferido a las proteínas en *S. pombe* es $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y es procesado en el RE a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (14), indicando la existencia tanto de GI como de GII. La observación de que *S. pombe* es más similar a eucariotes superiores que otras levaduras como *S. cerevisiae* en aspectos fisiológicos, morfológicos y genéticos (73), que sus glicoproteínas adquieren residuos de galactosa terminales como lo hacen los eucariotes superiores. Otros procesos como el ciclo celular, la estructura del cromosoma y el splicing del RNA son más similares entre células de mamífero y *S. pombe* que entre mamíferos y *S. cerevisiae* (74). El hecho de que *S. pombe* es adecuado para análisis de genética clásica y reversa, lo convierten en un organismo ideal para estudiar el control de calidad del plegamiento de las glicoproteínas del RE.

Problemática

La glucosidasa II

La GII es una enzima soluble del RE que juega un papel fundamental en el procesamiento de N-oligosacáridos en el RE. El oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transferido a la secuencia Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se están translocando cotraduccionalmente a través de la membrana del RE es deglucosilado inicialmente a $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ por la GI. La GII produce la deglucosilación tanto de los oligosacáridos diglucosilados como los monoglucosilados producidos por la GT. Recientemente se observó que la GII de rata y de ratón consiste en un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas, α (110 kDa) y β (80kDa), que no podían ser separadas por procedimientos comúnmente utilizados para la purificación enzimática sin pérdida de la actividad (75, 76). Se propuso que la actividad catalítica estaría presente en la subunidad mayor α ya que la secuenciación de péptidos internos de esta subunidad de hígado de rata posee homología con la familia 31 de glicosil hidrolasas. Dado que esta subunidad α carece de la señal de retención en el RE se ha postulado que la función de la subunidad β , que sí la posee, sería la de retener a la subunidad catalítica α en el RE. Hasta el momento no se han presentado evidencias que respalden esta propuesta, que ha planteado controversias ya que no se encontró una estructura dimérica en GII purificada de hígado y riñón de cerdo, ni de tejidos de plantas (77, 78), 79).

Importancia de los oligosacáridos monoglucosilados en la facilitación del plegamiento

Como ya se mencionó, dos grupos reportaron que el gen de la CNX es esencial para la viabilidad de *S. pombe* (71, 72). Esta es una evidencia más que apoya el modelo descripto. Sin embargo, una reducción en la formación de oligosacáridos monoglucosilados mediante la disrupción del gen que codifica GT (*gpt1*), no afectó el crecimiento celular (30). Una explicación posible es que la interacción CNX-oligosacáridos monoglucosilados que en condiciones normales de crecimiento ayuda al plegamiento correcto sería la que se realiza con los compuestos monoglucosilados formados por deglucosilación parcial del oligosacárido transferido. La interacción con los oligosacáridos monoglucosilados formados por acción de la GT sería importante en condiciones de estrés exógeno, condiciones que inducen la síntesis de esta enzima. Queda sin embargo pendiente la cuestión de si la CNX es esencial por su función de unirse a oligosacáridos monoglucosilados o por alguna función adicional.

Herbert *et al.* mostraron que en células de mamíferos la interacción oligosacárido monoglucosilado-CNX facilita el plegamiento de las glicoproteínas previniendo la agregación y la formación de puentes disulfuro no nativos. Como resultado de esta interacción se observó una disminución de la velocidad en el plegamiento y un aumento de la eficiencia de este último proceso (80). Se planteó el interrogante de si lo mismo sucede en células de *S. pombe*.

Condiciones para la reglucosilación por la GT in vivo

El descubrimiento de que la GT glucosila glicoproteínas que no tienen su estructura nativa deriva experimentos realizados *in vitro*. Se demostró que una condición de mal plegamiento es

suficiente para que la proteína sea glucosilada. La proteína G del mutante t VSV ts045, no se pliega a 39°C y es retenida en el RE con sus oligosacáridos alternando entre la forma monoglucosilada $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y no glucosilada $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Cuando las células se llevaron a la temperatura permisiva, la proteína se plegó correctamente y no era reglucosilada. Esta fue la primera demostración de que la GT es responsable *in vivo* de glucosilar glicoproteínas mal plegadas (56). Un aspecto que queda por estudiar es si una conformación mal plegada es también *in vivo* condición suficiente para la glucosilación mediada por GT.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es entender cual es la importancia de la formación de oligosacáridos monoglucosilados en la retención de las glicoproteínas y en facilitar su proceso de plegamiento, así como demostrar la naturaleza heterodimérica de la GII. Se utilizará como modelo a la levadura de fisión *S. pombe* por sus características genéticas y bioquímicas. Los aspectos que se busca tratar son los siguientes:

- Demostrar la estructura heterodimérica de la GII en la levadura de fisión *S. pombe*. Determinar si la función catalítica de la GII está en la subunidad α y si la función de la subunidad β es la de retener a la α en el retículo endoplásmico.
- Eliminar la capacidad de formar oligosacáridos monoglucosilados en células de *S. pombe*. Determinar si la formación de dichos oligosacáridos y por lo tanto la interacción oligosacárido monoglucosilado – CNX es esencial para la viabilidad celular.
- Determinar si la ausencia de oligosacáridos monoglucosilados produce en células de *S. pombe* una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE y una disminución en la eficiencia de secreción de glicoproteínas maduras. Analizar la posible función de los oligosacáridos monoglucosilados en facilitar el plegamiento de glicoproteínas en condiciones normales de crecimiento.
- Determinar si la formación de glicoproteínas mal plegadas es una condición suficiente para un aumento de la glucosilación de sus oligosacáridos *in vivo* por la GT.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

Materiales

La [^{14}C]Glc (250 Ci/mol) es de New England Nuclear. UDP-[^{14}C]Glc (250 Ci/mol) se sintetizó según se describió por Wright y Robbins (81). EasyTag Express protein labeling mix ([^{35}S]Met y [^{35}S]Cys 70:30, >1000 Ci/mmol) y Protosol[®] son de New England Nuclear. *Jack bean* α -manosidasa, tiroglobulina bovina, DNJ, DTT, Proteína A-Sepharosa y Endo H fueron de Sigma. Los anticuerpos anti CPY son una donación de Dr. Kaoru Takegawa.

Cepas y Medios de cultivo

Para los procedimientos de clonado se usó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α . Las cepas de *E. coli* XL1-Blue MRF'y XL0LR (Stratagene) fueron usadas para el screening de la biblioteca genómica y la escisión de plásmidos de los fágemidos, respectivamente. La biblioteca genómica estaba construida en fagos λ ZAP Express (Stratagene) Las cepas de *S. pombe* utilizadas fueron la Sp95, de genotipo *h⁹⁰ ade6-M216, leu1-32, ura4-D18* y la ADm de genotipo *h⁻ ade6-M210, leu1-32, ura4-D18*. Todas las cepas salvajes de *S. pombe* son consideradas isogénicas excepto para las mutaciones indicadas dado que todas las cepas derivan de un mismo aislamiento. Las levaduras fueron crecidas en el medio rico YE: Glc 3 %, extracto de levadura (Difco) 0.5 %; o en medio mínimo (MM): KH italato 14.7 mM, Na₂HPO₄ 15.5 mM, NH₄Cl 94 mM, Glc 2 % con sales, minerales y vitaminas como se describe en (73 y 82). Los suplementos adenina y uracilo se utilizaron a una concentración de 75 mg/l y leucina a 250 mg/l. Para las marcaciones con [^{35}S]Met las levaduras se crecieron en medio YNBD (0.67% base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos (Difco), 3% Glc). Las marcaciones con [^{14}C]Glc de las levaduras se realizaron en medio YNB (1% base nitrogenada de levaduras, sin Glc agregada). 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 %.

Procedimientos con levaduras

La preparación de células *S. pombe* competentes y las transformaciones de las mismas se realizaron por el procedimiento de acetato de litio que se describe en (83). La ruptura de células por los distintos métodos empleados (bolitas de vidrio y digestión enzimática de la pared), así como todas las demás manipulaciones microbiológicas con levaduras fueron tomadas de (82).

Procedimientos con DNA

Las sondas se marcaron usando el 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 Easy Vector System (vector T, Promega). La técnica de Southern Blot fue realizada como fue descripto por Sambrook *et al.* (84).

Preparación de DNA genómico de *S. pombe*

Se inocularon 50 ml de YE suplementado con adenina, con una colonia aislada de *S. pombe* (WT o mutantes según cada caso) y se creció a 28°C hasta alcanzar la fase exponencial. Se cosecharon las células por centrifugación (5 min a 3000 x g) y se lavaron con solución SP1 (1.2 M, citrato de sodio 50 mM, fosfato de sodio 50 mM, EDTA 40 mM, pH 5.6). El pellet se resuspendió en 10 ml de SP2 (sorbitol 1.2 M, citrato de sodio 50 mM, fosfato de sodio 50 mM, pH 5.6) conteniendo 20 mg de Novozym 234 (Sigma), para degradar la pared de las levaduras. Se incubó la suspensión de células a 37°C hasta observar la formación de protoplastos al microscopio y se centrifugó por 5 min a 3.000 rpm. El pellet se resuspendió en 7.5 ml de buffer TE 5X (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM), se agregaron 750 µl de SDS 10 % y se incubó a 60°C durante 5 min. Los restos celulares se precipitaron con el agregado de 2.5 ml de acetato de potasio 5 M, incubación en hielo por 30 min y centrifugación. Al sobrenadante se le agregaron 10 ml de isopropanol y se incubó 15 min a 4°C. Se centrifugó 15 min a 8.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Se resuspendió el material en 3 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 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 durante 1 h. Se agregaron 3 ml de fenol equilibrado en TE 5X, se agitó por inversión y se centrifugó. La fase acuosa superior se extrajo con fenol dos veces más. El DNA se precipitó agregando 1/10 de volumen de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol 100 % y agitando el tubo por inversión. Se centrifugó a 8.000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó una vez con etanol 70 % y se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 200 µl de agua y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza por la relación de absorbancias 260nm/280nm.

Preparación de RNA de *S. pombe*

Una colonia aislada de *S. pombe* se utilizó para inocular 10 ml de medio YE y las células se crecieron a 28°C hasta una OD_{600 nm} = 2 (mitad de la fase exponencial). Se centrifugó por 5 min a 3000 x g a temperatura ambiente, el pellet celular se lavó una vez con H₂O y se centrifugó nuevamente. Las células se resuspendieron en 300 µl de buffer RNA (NaCl 0.5 M, Tris-HCl 200 mM pH 7.5, EDTA 10 mM), se agregó el equivalente a 200 µl de bolitas de vidrio (de rango 0.45 – 0.5 mm de diámetro) y 300 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se rompieron las células mediante agitación en un vortex (3 ciclos de 1 min de agitación - 1 min incubación a 4°C). Se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min. La fase acuosa. se extrajo dos veces más con 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). El RNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100 % e incubación a -70°C durante 30 min. Se centrifugó 5 min a 14000 rpm, el precipitado se lavó dos veces con etanol 70 % y se resuspendió en 30 µl de agua. El RNA se cuantificó por absorbancia a 260 nm. Todos los elementos utilizados en la preparación de RNA fueron autoclavados dos veces, y los buffers y soluciones utilizados fueron preparados con agua tratada con dietilpirocarbonato 0.05 % (v/v) y autoclavada (85).

Reacciones de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó como templado DNA genómico o cDNA de *S. pombe*. El templado fue desnaturalizado a 95°C por 5 min en un volumen final de 50 µl conteniendo 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM y 1 µM de cada oligonucleótido. La temperatura se redujo a 80°C, se agregaron 2.5 unidades de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Perkin Elmer) y se realizaron 30 ciclos de desnaturalización/hibridación/extensión. La temperatura de hibridación utilizada se detalla en cada caso en particular y la extensión se realizó a 72°C. Luego de los 30 ciclos se incubó por 10 min adicionales a 72°C y se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa 1% en buffer Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

“Colony” PCR de *E. coli*: se resuspendió una colonia de bacteria aislada en 50 µl de agua estéril y se calentó 5 min a 100°C. Se centrifugó 1 min a 14000 x g y 10 µl del sobrenadante se utilizaron como templado de la reacción de PCR.

“Colony” PCR de células de *S. pombe*: se resuspendió una colonia aislada en 20 µl de agua estéril. De esta suspensión se tomaron 10 µl como fuente de DNA. La reacción se realizó como se describió anteriormente, pero el número de ciclos se ascendió a 36.

RT-PCR

Purificación del RNA: el RNA obtenido como se describió más arriba se trató con DNAsa por 25 min a 37°C en un volumen final de 0.1 ml. Se extrajo la DNAsa con 0.1 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y luego con 0.1 ml de cloroformo:isoamílico (24:1). El RNA de la fase acuosa se precipitó con el agregado de 0.3 M acetato de sodio y 0.1 ml de isopropanol.

Síntesis de cDNA: el RNA libre de DNA (1 µg) y 10 pmoles de primer antisense se desnaturalizaron juntos a 70°C por 10 min, se transfirieron a 4°C y luego se sintetizó el cDNA. Para ello se agregaron los siguientes reactivos: 2 µl de buffer de síntesis 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 0.5 M, BSA 1 mg/ml), 1 µl de dNTP 40 mM, 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl DTT 0.1 M y 1 µl SUPERScript II RT (200 U/ml) (Gibco). Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y luego la polimerización prosiguió a 42°C por 50 min. Se detuvo la reacción por calentamiento 15 min a 70°C. Finalmente se agregó 1 µl de RNAsa H (Gibco) y se incubó a 37°C por 20 min. Se realizaron luego las reacciones de PCR utilizando 2 µl del producto de esta reacción y los primers que se especifican en cada caso.

Northern

Células de *S. pombe* salvaje o mutantes fueron crecidas en condiciones normales (medio YE a 28°C) hasta OD_{600nm} = 2. Se preparó RNA total como se describió más arriba y se determinó su concentración espectrofotométricamente. De cada muestra se sembraron 12 µg en un gel de agarosa 1.2%, se sometieron a una electroforesis en buffer MOPS 20 mM pH 7.0, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, p-formaldehído 8.5% y se transfirieron por vacío a una membrana de nylon en buffer SSC 20X (SSC 1X: citrato de sodio 20 mM pH 7.0, NaCl 0.15 M). La membrana

se expuso a luz ultravioleta y luego se hibridó en forma simultánea con sondas de DNA que codifican para BiP (1003 pb) y para actina (973 pb) marcadas radiactivamente por “random priming” con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP. Los fragmentos de DNA utilizados como sonda fueron obtenidos por reacciones de PCR utilizando DNA genómico de *S. pombe* como templado, con los primers y a las temperaturas de hibridación que se detallan a continuación. BiP: 5'-CCTGTCACTCACTCTGTTGTT-3' y 5'-GACTTCAATTTGGGGAACACC-3' (50°C), y actina: 5'-GGTATTATGGTAGGTATGGG-3' y 5'-CGCTCTCATCATACTCTTGC-3' (55°C). Las hibridaciones se realizaron en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7.4, SSC5X, Denhardt's 5X, formamida 50% (v/v), 100 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de espermatozoos de salmón a 42°C y se hicieron tres lavados de 20 min cada uno en SDS 0.1%, SSC 0.1X a 60°C. Las membranas se expusieron a una placa autoradiográfica Biomax MS1 (Kodak) 3 días a -70°C.

Disrupción del gen que codifica la subunidad GII α de *S. pombe*

Las secuencias aminoacídicas de los genes que codifican para la GII en *S. cerevisiae*, en humanos y la putativa de *C. elegans* (GenBank N° Z36098, D42041 y D42041 respectivamente) se alinearon y los primers sense (GII3, 5'-TGGAAYGAYATGAAYGARCC-3') y antisense (GII4, 5'-IGCRTGNGCICKRAARAA-3') se designaron de acuerdo a los péptidos WNDMNEP y FFRAHA conservados entre las tres secuencias mencionadas. Estos corresponden a los aminoácidos 535-541 y 668-673 de la GII de *S. cerevisiae*. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando DNA genómico de *S. pombe* Sp95 como templado, los primers mencionados más arriba y una temperatura de hibridación de 50°C se obtuvo un fragmento de 414 pb del gen homólogo. Este fragmento fue clonado en el vector pT7 Blue, secuenciado y un primer antisense exacto se diseñó de acuerdo con la secuencia de las posiciones 355-375 de dicho fragmento (GIIAa, 5'-CCACCGAACAACAATTCAGC-3'). Con este primer y otro sense degenerado (GII1, 5'-AAYGCGNGCNGANACNTGG-3) derivado de la secuencia peptídica conservada NAAEDTW (posiciones 330-335 de la GII de *S. cerevisiae*) se sintetizó un fragmento de 1002 pb por PCR sobre el DNA genómico de Sp95 como templado. El fragmento de 1002 pb fue clonado en el vector pGEMT-Easy (Promega) y secuenciado. El gen marcador *ura4*⁺ (Genbank M36504) se introdujo en orientación reversa en la posición 568 (sitio *HindIII*) del fragmento de 1002 pb clonado en el vector. La digestión con la enzima *NotI* de la construcción obtenida liberó un fragmento de 2766 pb conteniendo el gen *ura4*⁺ flanqueado por 568 pb (5') y 434 pb (3') del DNA codificante de la GII α de *S. pombe* (Figura 7). Este fragmento lineal fue purificado por escisión de un gel de agarosa 1.2 % y se utilizó para transformar las células *S. pombe* WT Sp95. Se seleccionaron las células que se convirtieron en protótrofos para uracilo. La mutante obtenida se llamó Sp95II α , de genotipo *h*⁹⁰, *ura4-D18*, *ade6-M216*, *leu1-32*, *gls2::ura4*⁺.

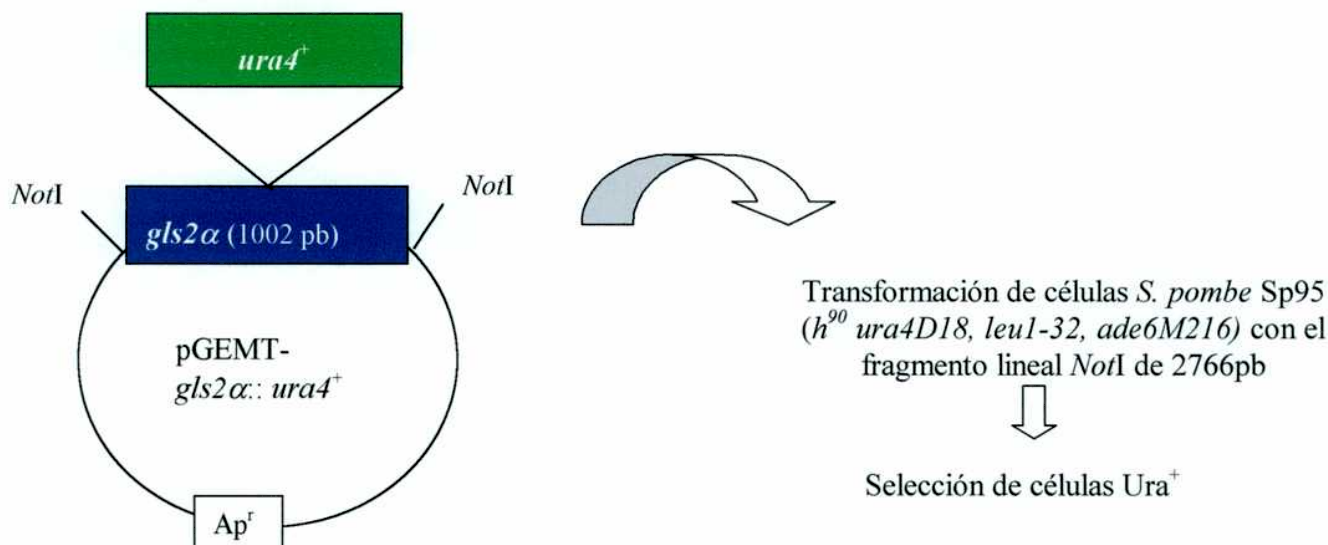


Figura 7. Esquema de la interrupción del gen que codifica la subunidad *GIIα*.

*Caracterización de la mutante *GIIα* por PCR*

Para verificar la transformación de las células obtenidas se realizaron reacciones de PCR directamente sobre las colonias salvajes o Ura^+ resuspendidas en agua ("colony PCR"). Estas fueron usadas como templado de la reacción, o bien con los primers específicos de la secuencia *GIIα* (GIISb: 5'-GTCGTCCGCTTCTCCCTC-3' posición 164-181 y GIIAb 5'-CCCCATAATGAATAGCATC-3' posición 688-706 del fragmento de 1002 pb), o bien con el primer GIIBa de la secuencia *GIIα* y otro del *ura4+* (5'-TTTTCATATCCCCCTCAGCTC-3'). Las reacciones se realizaron a 55°C con los dos primers de la *GIIα* y a 57°C cuando se usó el primer del *ura4+*. Como control negativo en lugar de DNA de templado se usó agua, y como control positivo se utilizó el plásmido conteniendo la construcción del fragmento que codifica la *GIIα* interrumpido por el gen *ura4+* clonado en el sitio *HindIII* (pGEMT Easy-*gls2α::ura4+*).

*Caracterización de la mutante *GIIα* por Southern Blot*

Se preparó DNA genómico de la cepa salvaje y de dos posibles mutantes que dieron los fragmentos del tamaño esperado por PCR. Este se digirió durante 16 h con las enzimas de restricción *KpnI* y *MluI*, se resolvió en un gel de agarosa 1.2% y se transfirió por vacío a una membrana de nylon que fue hibridizada sucesivamente con una sonda específica para la *GIIα* (577 pb *KpnI/HindIII* derivado del fragmento de 1002 pb) marcada con [^{32}P] por el método de Random Priming (Promega), y luego de lavar el filtro, con otra que hibridiza con el gen *ura4+*. La hibridización se realizó en 2X PIPES (NaCl 0.8 M, PIPES 20 mM pH 6.5), 0.5% SDS, 50% formamida, 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón a 42°C y los lavados se hicieron a alta rigurosidad (0.1% SDS, 0.1X SSC a 65°C).

Disrupción del gen que codifica la subunidad GII β de *S. pombe*

Para realizar la disrupción del gen que codifica para la subunidad GII β de *S. pombe*, se diseñaron los primers exactos B1s (5' AGATGAAGTTCAGTCAATGG 3') y B1a (5' ATATTATAACTCATCGACAG 3') de acuerdo a las posiciones 27-46 y 1533-1552 de una secuencia de *S. pombe* (GenBank D89245) que codifica una proteína homóloga a la GII β de ratón. Una reacción de PCR utilizando DNA genómico de *S. pombe* como templado produjo un fragmento de aproximadamente 1800 pb, más grande que el esperado de 1526 pb. El fragmento de 1800 pb fue clonado en el vector pGEMT y 200 bases de cada extremo fueron secuenciadas. Las secuencias correspondieron a la del gen D89245. Esto indicó la presencia de al menos un intrón. Se realizó una reacción de RT-PCR sobre RNA total de *S. pombe* usando el primer B1a para la transcripción reversa, y ese mismo primer y B1s para la reacción de PCR. Se obtuvo una banda única de 1526 pb, confirmando la presencia de intrones. Para facilitar la introducción del marcador *ura4*⁺ (GenBank M36504) en el fragmento de 1526 pb, se diseñaron dos primers de acuerdo con la secuencia D89245 (BaHindIII, posiciones 595 a 614: 5'-AATCCGTTGAAAGCT TCATC-3', antisentido y BsHindIII, posiciones 592 a 611: 5'-GAAGATGAAGCTTTCAACGG-3', sentido). Estos primers introducen un sitio *Hind*III por una sustitución G-T. Se realizaron dos reacciones de PCR usando el cDNA de *S. pombe* como templado y los primers B1s/BaHindIII, por un lado, y los primers BaHindIII/B1a, por el otro. Estas reacciones dieron los fragmentos N (588 pb) y C (961 pb) respectivamente, que fueron clonados por separado en el vector pGEMT.

El fragmento N fue liberado del vector utilizando las enzimas de restricción *Sac*II (con sitio en el vector) y *Hind*III (sitio en el inserto). El vector conteniendo el fragmento C (pGEMT-C) fue linealizado con las mismas enzimas. El fragmento N fue ligado al vector pGEMT-C linealizado para formar pGEMT- β . Este vector contiene el cDNA de la GII β de *S. pombe* con una mutación puntual en la posición 577 del inserto que introduce el sitio *Hind*III en la construcción. Este vector fue linealizado con *Hind*III y ligado al gen *ura4*⁺ liberado previamente del vector pBluescript con la misma enzima. El fragmento de DNA de 3290 pb conteniendo el gen *gls2 β* interrumpido por el gen *ura4*⁺ (con su propio promotor) (*gls2 β ::ura4*⁺) fue liberado del vector con la enzima *Not*I e introducido en células de *S. pombe* ADm. Se seleccionaron las transformantes capaces de crecer en un medio en ausencia de uracilo exógeno. La cepa resultante se llamó ADmII β (*h⁻ ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, gls2 β ::ura4*⁺) (86) (Figura 8).

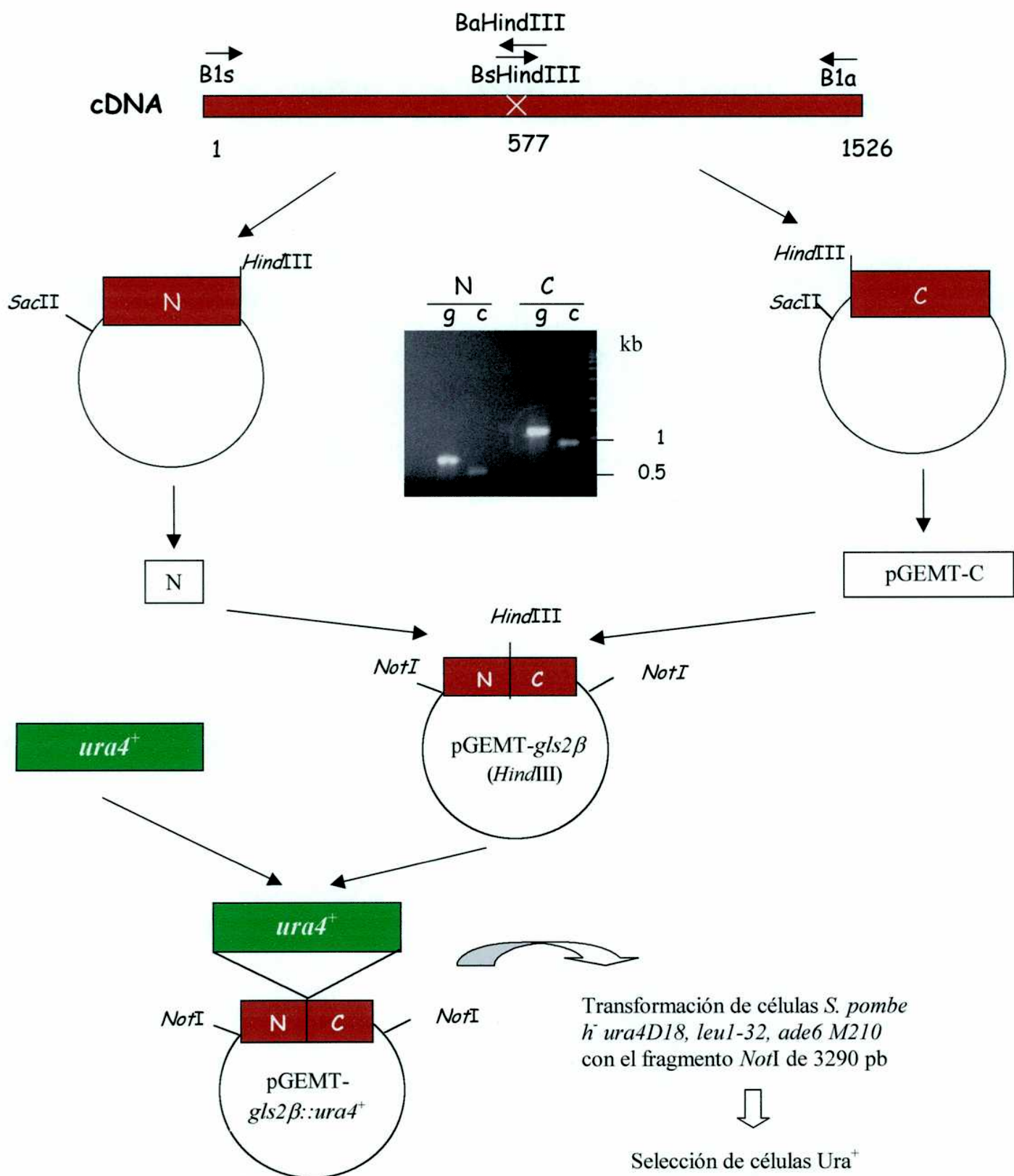


Figura 8. Esquema de la construcción del fragmento de DNA utilizado para realizar la disrupción del gen que codifica la subunidad *GIIβ*. En el inserto se muestra las reacciones de PCR con primers B1s/BaHindIII (N) y BsHindIII/B1a (C), sobre DNA genómico (g) o cDNA (c).

Caracterización de la mutante $GII\beta^-$ por PCR y por Southern Blot

Para verificar la disrupción del gen $gls2\beta$ en las células transformantes, se realizaron reacciones de PCR directamente sobre las células salvajes o sobre cinco colonias Ura^+ resuspendidas en agua. Se utilizó un primer específico para el gen $gls2\beta$ (primer B1s) y otro para el gen $ura4^+$ (primer UraAN: 5'-TTTTCATATCCCCCTCAGCTC-3'). Las reacciones se realizaron a 55°C. Como control negativo en lugar de DNA de templado se usó agua, y como control positivo se utilizó el plásmido conteniendo la construcción del fragmento de la $GII\beta$ interrumpido por el gen $ura4^+$ clonado en el sitio *HindIII* (pGEMT – $gls2\beta::ura4^+$).

Para confirmar la obtención de mutantes $GII\beta^-$ ($gls2\beta$) se analizaron las colonias $ura4^+$ por Southern Blot. Se preparó DNA genómico y se digirió durante 16 h con las enzimas de restricción *BglI* y *NcoI*, se resolvió en un gel de agarosa 1.2% y se transfirió por vacío a una membrana de nylon que fue hibridizada con una sonda específica para $gls2\beta$. Esta sonda consistió en dos fragmentos de 192 y 260 pb obtenidos a partir de la digestión con *XhoI* y *HindIII* del pGEMT- $gls2\beta$, que son contiguos en el DNA WT pero que flanquean los extremos 5' y 3' del gen $ura4^+$ en la construcción utilizada para la disrupción. La sonda fue marcada con [$\alpha^{32}P$]dCTP por el método de Random Priming (Promega). La hibridización se realizó como ya se describió para las mutantes $GII\alpha^-$.

Construcción de *S. pombe* doble mutante $GII\alpha^-/ALG6^-$

Escisión del gen $ura4^+$ de mutantes $GII\alpha^-$: El plásmido conteniendo el fragmento de 1002 pb del gen $gls2\alpha$ interrumpido por el gen $ura4^+$ en posición invertida (pGEMT- $gls2\alpha::ura4^+$) se digirió con *Bsu36I*. Se delecionó un fragmento de 1198 pb que contenía 210 pb del gen $gls2\alpha$ mas 988 pb del extremo 3' del gen $ura4^+$. El vector conteniendo 359 pb del extremo 5' de $gls2\alpha$, 776 pb del 5' terminal del $ura4^+$ y 430 pb del 3' terminal de $gls2\alpha$ se ligó nuevamente y se transformaron células de *E. coli* DH5 α (Figura 9). El plásmido purificado de estas bacterias (pGEMT- $gls2\alpha::ura4$) se digirió con *NotI*, que no corta en los fragmentos remanentes de $gls2\alpha$ ni $ura4^+$ y libera un fragmento de 1565 pb conteniendo las porciones de $gls2\alpha$ y $ura4$ mencionadas mas arriba. Con este fragmento se transformaron las mutantes $GII\alpha^-$ (h^{90} , $ura4-D18$, $ade6-M216$, $leu1-32$, $gls2::ura4^+$) como se describió excepto que antes de la selección se crecieron en medio YE suplementado con adenina y uracilo durante 24 h para diluir la concentración del producto del gen $ura4^+$. Las células Ura^- fueron luego seleccionadas en medio mínimo suplementado con adenina, uracilo y leucina, conteniendo 1mg/ml de ácido 5-fluorouracílico (5-FOA). Esta droga inhibe el crecimiento de células que poseen la enzima orotidina-5'-fosfato decarboxilasa activa (producto del gen $ura4^+$) (87). Se realizó una "colony PCR" de las células resistentes a 5-FOA para verificar la transformación homóloga. Los oligonucleótidos complementarios al gen $gls2\alpha$ utilizados fueron GIISb y GIIAb, ya descriptos. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 542 pb en células WT, un fragmento de 2306 pb en células portando el gen $gls2\alpha::ura4^+$ y uno de 1108 pb en las células $gls2\alpha::ura4$. Las mutantes así obtenidas se nombraron Sp95II α 2 y poseen genotipo h^{90} , $ura4-D18$, $ade6-M216$, $leu1-32$, $gls2::ura4$.

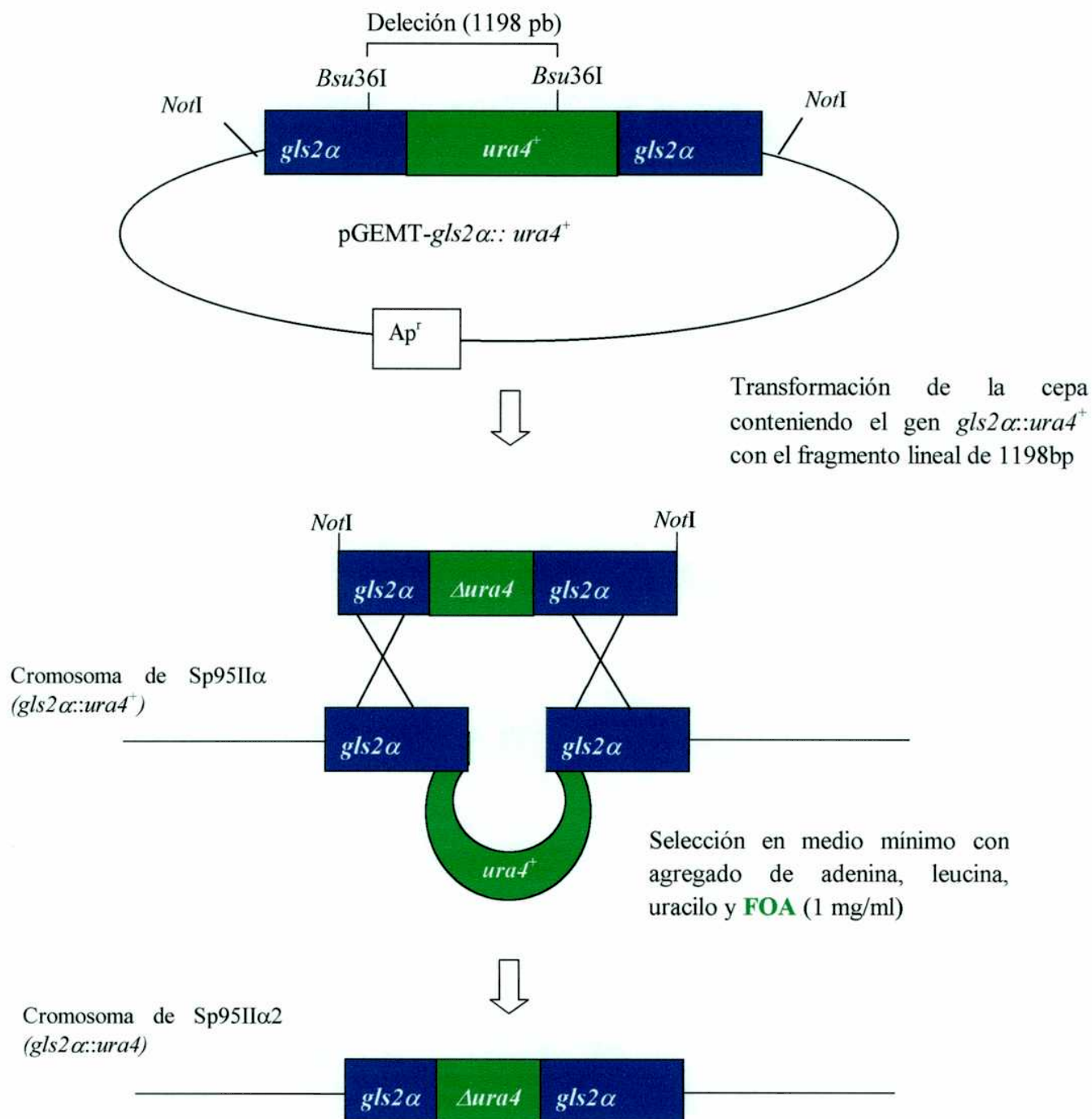


Figura 9 Diagrama de la construcción de la mutante Sp95IIα2 (*gls2α::ura4*). Esta fue luego utilizada para realizar la doble mutante GIIα⁻/ALG6⁻ (*gls2α::ura4/alg6::ura4⁺*).

Disrupción del gen $alg6^+$

Las células *gls2::ura4* fueron transformadas con una construcción utilizada anteriormente en el laboratorio para realizar la disrupción del gen *alg6⁺* (88). Brevemente, un fragmento del gen *alg6* de *S. pombe* fue clonado, un segmento de 102 pb del fue eliminado y se reemplazó por el gen *ura4⁺* en posición invertida y bajo su propio promotor. Con el DNA lineal conteniendo el gen *ura4⁺* flanqueado en los extremos 5' y 3' por 148 pb y 562 pb del gen *alg6* se transformó la cepa Sp95II α 2. Las transformantes se crecieron en medio mínimo suplementado con adenina y leucina y se seleccionaron las células capaces de crecer en ausencia de uracilo en el medio de cultivo.

Caracterización por PCR de la doble mutante

Se realizó una reacción de PCR usando DNA genómico de las células Ura⁺ como templado, los oligonucleótidos GIIb y GIIa para el gen *gls2 α* y A6S (5'-ATTGCATACTCCTGTGTC-3') y uraSC (5'-TGCTCCTACAACATTACC-3') para el análisis del gen *alg6*. Las colonias seleccionadas (*gls2 α ::ura4/alg6::ura4⁺*) dieron los fragmentos esperados de 1108 pb cuando se utilizaron los oligonucleótidos GIIb y GIIa y de 423 pb cuando se usaron A6S y uraSC. Debe mencionarse que el oligonucleótido A6S corresponde a una región de *alg6⁺* hacia el extremo 5' no utilizada como parte de la construcción utilizada para la disrupción de este gen. La doble mutante se llamó Sp95II α 2A y fue de genotipo *h⁹⁰*, *ura4-D18*, *ade6-M216*, *leu1-32*, *gls2 α ::ura4*, *alg6::ura4⁺*.

Screening de una biblioteca genómica de *S. pombe*

El fragmento de 414 pb correspondiente a la porción media del gen que codifica la subunidad α de GII (*gls2 α*) fue utilizado como sonda para un screening de una biblioteca genómica de *S. pombe* construida en el fago λ ZAP Express (Stratagene). Células de *E. coli* XL1-Blue MRF' crecidas en LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y maltosa 0.2% (p/v) fueron cosechadas y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM a una OD_{600nm} = 0.5. Se adsorbieron estas células con fagos λ de la biblioteca genómica de *S. pombe* (título 1.16x10⁷ ufp/ml) y se incubaron a 37°C por 15 min. Luego se agregaron 7 ml de medio NZY con agarosa 0.7 % precalentado a 42°C y se crecieron sobre 10 cajas de Petri de 15 cm de diámetro que contenían medio NZY-agar, a razón de 30000 ufp/placa. Las placas de lisis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por duplicado. Luego se desnaturalizó el DNA adsorbido sumergiéndolas en NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M por 2 min, se neutralizó en Tris-HCl 0.5 M pH 8.0, NaCl 1.5 M y se lavó en Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, SSC 2X por 1 min. Las membranas fueron expuestas a luz ultravioleta para unir covalentemente el DNA transferido. Dichas membranas fueron luego prehibridizadas a 42°C por 2 h en una solución que contenía buffer PIPES 2X, formamida 50 % (v/v), SDS 0.5 % (p/v) y DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml. La sonda se marcó radiactivamente con [α^{32} P]dCTP por el método de polimerización a partir de hexámeros al azar ("Random Priming"), se hirvió durante 5 min y se agregó a la solución de prehibridización conteniendo las membranas. Se hibridizó a 42°C durante toda la noche, las membranas se lavaron 4 veces durante 30 min con una solución de SSC 0.1X y SDS 0.1% (p/v) a 60°C y luego se expusieron con una placa radiográfica Kodak Biomax

MS1 por 24 h a -80°C. Se revelaron las placas, se superpusieron con las placas de Petri y se aislaron los fagos λ positivos, que sometieron a tres rondas de purificación de la misma manera que antes. Una vez aislados los fagos de interés se escindieron *in vivo* en forma de plásmido pBK-CMV. Para ello se combinaron en un tubo 0.2 ml de las células XL1-Blue MRF' resuspendidas en MgSO₄ 10 mM con 10⁵ ufp de los fagos positivos y 10³ ufp de fagos filamentosos helper ExAssist™, y se incubaron por 15 min a 37°C. Se agregaron 3 ml de medio LB y se incubó por 3 h más a 37°C con agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las células y el sobrenadante conteniendo los fagémidos con el plásmido escindido de los brazos del fago λ se calentó a 70°C por 15 min. Con 100 μ l de este sobrenadante se infectaron 0.2 ml de células XSOLR en MgSO₄ 10 mM a OD_{600nm} = 0.8 por 15 min a 37°C. Luego se sembraron 20 μ l de estas células sobre placas de Petri conteniendo LB+Kanamicina (50 μ g/ml). Las colonias que crecen en este medio contienen el DNA del clon positivo como un inserto en el plásmido pBK-CMV. Se aislaron cuatro clones independientes, que tuvieron insertos de aproximadamente 4500 pb. Dos de ellos fueron secuenciados utilizando oligonucleótidos “sense” internos del fragmento de 1002 pb y luego otros hacia 3’ del gen que se fueron diseñando a medida que se fue leyendo la secuencia, resultando ser idénticos.

Preparación de microsomas de *S. pombe*

Los microsomas de *S. pombe* WT, GII α ⁻ y GII β ⁻ se prepararon esencialmente como ya se describió (26). Brevemente, se cosecharon 10 g de células, se lavaron con agua y se resuspendieron en 10 ml de solución A (0.25M sacarosa, 20 mM buffer fosfato de sodio pH 7.1, 5 mM EDTA, 5 mM β MSH) suplementada con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 1 mM TPCK, 1 μ M E-64, 1 μ M pepstatina, 10 μ M leupeptina). Se agregaron perlas de vidrio hasta la mitad del volumen total y las células se rompieron con 2 pulsos de agitación de 1 min en agitador enfriado con CO₂. El sobrenadante y el lavado con 10 ml de solución A de las perlititas se juntaron y centrifugaron sucesivamente 10 min a 5000 rpm y 15 min a 10000 rpm (rotor SS34, Sorvall). El sobrenadante se ultracentrifugó 1 h a 100000 x g y el pellet microsomal se resuspendió en 1 ml de 20 mM buffer fosfato de sodio pH 7.1 conteniendo inhibidores de proteasas. Se determinaron proteínas totales por el método de Lowry (89). Los microsomas se alicuotaron y se conservaron a -70°C.

Sustratos y estándares radiactivos

[¹⁴C-Glc]Glc₃Man₉GlcNAc (G₃M₉) y [¹⁴C-Glc]Glc₂Man₉GlcNAc (G₂M₉): se obtuvieron a partir de sus correspondientes Dol-P-P-oligosacáridos por degradación con Endo H. Los derivados de Dol-P-P fueron obtenidos por incubación de microsomas de hígado de rata con UDP-[¹⁴C]Glc, extracción de fase lipídica seguida de una hidrólisis ácida suave (tratamiento con HCl 0.02 N durante 15 min a 100 °C) (90).

[¹⁴C-Glc]Glc₁Man₉GlcNAc (G₁M₉), [¹⁴C-Glc]Glc₁Man₈GlcNAc (G₁M₈) y [¹⁴C-Glc]Glc₁Man₇GlcNAc (G₁M₇): se prepararon incubando tiroglobulina bovina (Sigma) previamente desnaturalizada en urea 8 M con UDP-[¹⁴C]Glc y GT de hígado de rata purificada parcialmente. Los oligosacáridos monoglucosilados se obtuvieron por un tratamiento con proteasa de

Streptomyces griseus tipo XIV (Pronasa, Sigma) y Endo H como fue descrito anteriormente (22, 25).

[¹⁴C]Man₉GlcNAc (M₉) y [¹⁴C]Man₈GlcNAc (M₈): se obtuvieron por incubación de crestas de oviductos de gallina ponedora con [¹⁴C]Glc como fue descrito anteriormente (91).

Por degradación con α -manosidasa de los oligosacáridos glucosilados se obtuvieron [¹⁴C-Glc]Glc₁Man₄GlcNAc (G₁M₄) [¹⁴C-Glc]Glc₁Man₅GlcNAc (G₁M₅) y [¹⁴C-Glc]Glc₂Man₄GlcNAc (G₂M₄), y por degradación de los no glucosilados se obtuvo [¹⁴C]ManGlcNAc (M₁).

Determinación de actividades GI y GII en cepas WT y mutantes

Las mezclas de incubación para la determinación de actividades contenían 1150 cpm del sustrato ([¹⁴C-Glc]Glc₃Man₉GlcNAc para actividad de GI y [¹⁴C-Glc]Glc₁Man_{7,9}GlcNAc para la actividad de GII), buffer fosfato de sodio 40 mM pH 7.0, 0.3% Tritón X-100 y 0.6 mg de proteína microsomal de células salvajes o mutantes, en un volumen total de 0.1 ml. Se incubó por distintos tiempos a 30°C y las reacciones se frenaron con la adición de 0.1 ml de metanol. Se calentó 5 min a 60°C, se centrifugó y el sobrenadante se sometió a una cromatografía ascendente en papel en 2-propanol/acético/H₂O (29:4:9). Se calculó la actividad como % de [¹⁴C]Glc liberada (R_f = 0.4) respecto del total de marca (92).

Ensayo de actividad GT

La actividad de GT se midió en un volumen total de 50 μ l conteniendo buffer imidazol-HCl 10 mM pH 7.2, CaCl₂ 10mM, 200 μ g de tiroglobulina bovina desnaturalizada y la preparación proteica a ser ensayada. Como sustrato se agregaron aproximadamente 10⁵ cpm de UDP-[¹⁴C]Glc (actividad específica 250 Ci/mol). Para permeabilizar las membranas se incluyó Tritón X-100 0.5 % en las mezclas de reacción. Cuando se analizó el efecto del agregado de DTT, éste fue utilizado a una concentración 5 mM. La reacción se realizó por 30 minutos a 30°C y se detuvo con el agregado de 1 ml de TCA 10 %. Se calentó 5 min a 100°C y se centrifugó. 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 de tejidos (Protosol[®]) y se calentó a 60°C por un 1 min. Luego se agregaron 15 μ l de ácido acético glacial y 2.5 ml de la solución centelladora (tolueno/PPO/POPOP) y se contaron las cpm incorporadas a glicoproteínas en un contador de centelleo líquido.

Marcación *in vivo* de *S. pombe* con [¹⁴C]Glc y obtención de oligosacáridos N-unidos a glicoproteínas

Marcaciones in vivo a tiempo corto: *S. pombe* WT, GII α ⁻, GII β ⁻ o GII α ⁻/ALG6⁻ se crecieron en medio YE suplementado con adenina hasta OD_{600nm} = 4, aproximadamente. Se cosecharon 2 g de células (peso húmedo), se lavaron tres veces con 35 ml de medio YNB y se preincubaron a 28°C con agitación en el mismo medio (para deprivar a las células de Glc y efectuar los diversos tratamientos) por 10-30 min, según se indica en cada caso. Se agregaron 100 μ Ci de [¹⁴C]Glc resuspendida en YNB y se continuó la incubación 10-15 min más a 28°C. Se agregaron en ese momento 10 ml de metanol, se centrifugó y el precipitado que se obtuvo fue resuspendido en 1 ml de agua. Se agregaron 5 ml de metanol y el precipitado fue lavado tres veces más con 1 ml de H₂O y 5 ml de metanol. Finalmente los lípidos se separaron por agregado de 2 ml de metanol y 4 ml de cloroformo, seguido de agitación vigorosa y centrifugación a baja velocidad. Se lavó el precipitado tres veces con 5 ml de metanol y una vez con 1 ml de H₂O. Las glicoproteínas así obtenidas fueron digeridas toda la noche a 37°C en 3 ml de buffer Tris-HCl 150 mM pH 8.0, CaCl₂ 5mM conteniendo 50 mg de Pronasa. Las muestras conteniendo los glicopéptidos fueron concentradas a un volumen final de 1 ml, centrifugadas, y desaladas y purificadas parcialmente por pasaje a través de una columna de Sephadex G10 (1,2 x 57 cm) equilibrada en 2-propanol 7%. El material obtenido en el volumen de exclusión fue sometido a una electroforesis en papel Whatman 1 de 5 cm de ancho, en ácido fórmico 10 % durante 3 h a 1500 V. Se cortaron fracciones de 1 cm de ancho a lo largo del papel secado después de la electroforesis y se contaron las cpm con 0.5 ml de solución centelleadora (tolueno/PPO/POPOP). Las sustancias cargadas positivamente, que migraron entre 8 y 14 cm, fueron eluidas del papel y tratadas con Endo H (0.01 unidades) en 250 μ l de buffer acetato de trietilamina 50 mM pH 5.5 por 16 h a 37°C. El producto de esta reacción se sometió nuevamente a una electroforesis en papel en las mismas condiciones que la anterior, se contaron las cpm, pero se recuperaron las sustancias no cargadas. El pico neutro corresponde a los oligosacáridos liberados por la Endo H, que se analizaron por cromatografía en papel (corrida en 1-propanol/nitrometano/H₂O (5:2:4) durante 2-3 días), se hidrolizaron o trataron con α -manosidasa como se explica en "Métodos". Cuando se utilizó DNJ, ésta se agregó a una concentración 5 mM final durante toda la preincubación sin Glc y permaneció durante la incubación con [¹⁴C]Glc. Donde se indica, se agregó DTT 5 mM final durante los diferentes períodos de preincubación antes del agregado de [¹⁴C]Glc.

Marcaciones in vivo a tiempo largo: para los experimentos de pulso y chase, células *S. pombe* (0.5 g) WT, GII α ⁻, GT⁻ o GII α ⁻/ALG6 en fase exponencial temprana se lavaron 3 veces con YNB y se resuspendieron en el mismo medio. Las muestras se preincubaron por 15 min a 28°C y luego fueron agregados 200 μ Ci de [¹⁴C]Glc. Después de transcurridos 60 min se agregó glucosa sin marca (100 mM final) y la incubación se prolongó por 30 min adicionales. Donde se indica, se agregó DTT 5 mM 15 min antes del agregado de [¹⁴C]Glc. Cuando se indica, la preincubación, la marcación y el "chase" fueron realizados a 37°C o 38°C en ausencia de DTT. Se aislaron los oligosacáridos sensibles a Endo H como se describió más arriba.

Métodos con oligosacáridos

Las cromatografías de los mono y oligosacáridos se realizaron en papel Whatman 1. Los solventes utilizados fueron: *A*: 1-propanol/nitrometano/agua (5:4:2); *B*: 1-butanol/piridina/agua (10:3:3) y *C*: 1-butanol/piridina/agua (4:3:4). La degradación de oligosacáridos con α -manosidasa se realizó como se describió previamente (26). La hidrólisis ácida fuerte de los oligosacáridos fue hecha en HCl 1 N por 4 h a 100 °C.

Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

SDS-PAGE: Se utilizaron geles de poliacrilamida de 8 x 10 x 0.1 cm con sistema de buffer discontinuo (93). Las electroforesis se realizaron a 150 V constantes. Los geles se fijaron con metanol/ácido acético/agua (50:10:40), se tiñeron con Coomassie Blue R-250 (Sigma) 0.1 % en la misma solución y se destiñeron en la solución de fijación.

Transferencia a nitrocelulosa: las muestras sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Inmobilon-N) en un aparato de electrotransferencia semi seca *Semipor* (Hoefer). Se utilizó el mismo buffer de electroforesis pero sin SDS y conteniendo metanol 20 %. Se transfirió durante 45 min a 80 mA constantes. La eficiencia de la transferencia se controló por tinción de la membrana con Rojo Ponceau en ácido acético 0.1 % (v/v) y posterior lavado con agua destilada.

Western Blot

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon en TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) con 5 % de leche en polvo descremada. Se incubaron con el anticuerpo a ensayar diluido en TBST con 3 % leche en polvo descremada durante 90 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con TBST por 15 min cada uno de ellos. Se incubó por 30 min IgG anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Immuno Chemicals) diluido 1:30.000 en TBST 3 % leche. Se lavaron dos veces con TBST por 10 min cada uno y dos veces con TBS (TBST sin Tween-20) 10 min cada uno. Se revelaron utilizando una pastilla de BCIP/NBT (Sigma) diluida en 10 ml de agua destilada.

Marcación de proteínas *in vivo* de *S. pombe* con [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys

Células de *S. pombe* se crecieron en un medio carente de Met y Cys (YNBD suplementado con adenina, leucina y uracilo) hasta una OD_{600nm} = 0.2 - 0.5 y se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. El pellet se lavó una vez con H₂O y una con YNBD. Para cada reacción se utilizaron 10⁸ células en 0.2 ml de YNBD y se marcaron con 100 μ Ci de [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys (EasyTag Express protein labeling mix, >1000Ci/mmol) en presencia de 1 mg/ml BSA durante 10 minutos a 30°C con agitación. La reacción de marcación se detuvo con el agregado de puromicina 1 mM y cicloheximida 1 mM, e incubación a 4°C.

Secreción de CPY

S. pombe WT o $GII\alpha^-$ (4×10^8 células) se marcaron con [35 S]EasyTag Express Protein Labeling Mix en un volumen final de 0.8 ml. A los 10 min se agregaron Met 4 mM, Cys 4 mM, puromicina 1 mM y cicloheximida 1 mM. Se tomaron alícuotas de 0.2 ml a los 0, 5, 10 y 30 minutos de chase e inmediatamente se agregaron 0.2 ml “stop buffer” (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM NaN_3 , 20 mM DTT, 2M sorbitol). La pared de las células se digirió con Novozym (Sigma) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las proteínas se precipitaron con TCA 5 % y se centrifugaron. El pellet obtenido se lavó 3 veces con acetona, resuspendiendo por sonicado cada vez. El pellet se resuspendió finalmente en 100 μl de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 % SDS y se calentó 5 min a 100°C. Se agregaron 1 ml de buffer IPT (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20, 0.1 mM EDTA) y BSA 1 mg/ml. Se centrifugó a 14000 x g durante 20 min y se separó una alícuota del sobrenadante (15 μl) que se contó como control de marca total incorporada para cada tiempo. Al resto del sobrenadante se le agregaron 5 μl de suero de conejo anti-CPY y se incubó 16 h a 4°C con agitación suave. Se precipitó el inmunocomplejo por agitación durante 2 h en presencia de Proteína A Sepharosa. Los precipitados se lavaron dos veces con buffer IPT, dos veces con IPTU (IPT con 2 M urea) y una vez con SDS 1%. Se les agregó un volumen de Tris-HCl 125 mM pH 6.8, 6 % SDS, 10% β MSH, 20 % glicerol y se calentaron a 90°C 5 min. Se centrifugaron brevemente (para separar la Sepharosa) y las proteínas del sobrenadante se resolvieron por SDS-PAGE 12%. El gel fue luego fijado, tratado 30 min con salicilato 1 M, secado y expuesto a placa autoradiográfica. Las bandas correspondientes a la CPY madura (32 kDa) se escanearon y cuantificaron.

Obtención de anticuerpos anti-CNX de *S. pombe*

Expresión en bacterias del dominio luminal de la CNX fusionado a His₆: Se amplificó por PCR un fragmento de 1380 pb del gen que codifica la CNX de *S. pombe* (cnx1+) correspondiente al dominio de la proteína presente en el lumen del RE: se excluyó el péptido señal y se amplificó la región soluble hasta el dominio transmembrana (72). Para la reacción se utilizó DNA genómico de *S. pombe* como templado, la enzima Pwo y dos oligonucleótidos homólogos a la CNX en cuyos extremos 5' se agregaron secuencias de reconocimiento para el corte de 2 enzimas de restricción: *Nde*I, para el oligonucleótido CnxS-*Nde*I (5' GGAATTCCATATGCCTGAATC CGAACAAGA 3') y *Xho*I para el oligonucleótido CnxAb-*Xho*I (5' TCCGCTCGAGCTCG ATGATGGTTTCAACAT 3'). El producto de PCR y el vector de expresión pET22b⁺ (Novagen) fueron digeridos con *Nde*I y *Xho*I 5 h a 37°C, purificados y ligados. Con el producto de la ligación se electroporaron células *E. coli* DH5 α competentes. Con plásmido purificado de dos clones positivos (analizados por “colony” PCR y secuenciados parcialmente para confirmar que el gen se hallaba clonado en el marco de lectura correcto) se transformaron células *E. coli* BL26 (DE3). Una colonia correspondiente a cada transformación anterior se transfirió a medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se creció a 37°C toda la noche. Al día siguiente los cultivos se diluyeron 1/100, se incubaron 37°C hasta alcanzar una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$ y se agregó isopropiltiogalactósido 1 mM. La inducción se prolongó durante 4 h a 37°C con agitación. Para

analizar la inducción y si la proteína expresada resultó soluble o formando cuerpos de inclusión, 1 ml de bacterias se centrifugó, el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y se sonicó 20 s. Se centrifugó en tubos Eppendorf 20 min a 14000 rpm y las fracciones total, soluble e insoluble se analizaron por SDS-PAGE 12 %.

Purificación de CNX-His₆ expresada en la fracción soluble: 100 ml de bacterias inducidas se centrifugaron a 5.000 rpm 5 min y se resuspendieron en 3 ml de “Binding Buffer” (Tris-HCl 20 mM pH 7.9, imidazol 5 mM, NaCl 0.5 M, PMSF 10 mM). Las células fueron sonicadas en 5 pulsos de 30 s cada uno y se centrifugaron 30 min a 14000 rpm. El sobrenadante del paso anterior se sometió a una cromatografía de afinidad en una columna de ácido iminodiacético-agarosa (1ml) (Pharmacia) equilibrada con NiCl. La proteína recombinante fue eluida con Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 0.5 M, imidazol 1 M y dializada contra Tris-HCl 5 mM pH8, CaCl₂ 3 mM.

Inmunización del conejo: Se inyectaron a un conejo 250 µg de la proteína emulsionada en adyuvante completo de Freund por vía intradérmica. Se repitieron 2 inyecciones más de 150 µg por vía subcutánea cada 20 días con adyuvante incompleto. A los 30 días de la última inyección se sangró al conejo y se obtuvo el suero, al que se le determinó el título y la especificidad por Western Blot.

Inmunoprecipitación de CNX en condiciones reductoras y no reductoras

S. pombe WT (2x10⁸ células) fueron preincubadas durante 5 min a 30°C en 0.2 ml de medio YNBD sin aminoácidos (suplementado con adenina, leucina y uracilo) en presencia o ausencia de DTT 5 mM. Las células se incubaron luego 10 min con 100 µCi de [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys a la misma temperatura y la reacción de marcación se paró con el agregado de cicloheximida 1mM y N-etilmaleimida (NEM) a una concentración 20 mM. Se agregó un volumen de 2X “stop buffer” sin DTT y las mezclas se dejaron en hielo por 5 min. Los extractos celulares se prepararon e inmunoprecipitaron como se indicó anteriormente para la CPY, pero utilizando 5 µl suero de conejo anti-CN_X. Las muestras se lavaron como se indicó para la CPY y luego cada muestra inmunoprecipitada (pretratada o sin pretratar con DTT) se dividió en dos partes iguales: una de ellas se desnaturizó a 90°C en condiciones reductoras (100 mM DTT, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 10% glicerol, 3% SDS) y la otra en condiciones no reductoras (el mismo buffer sin el agregado de DTT). Los inmunoprecipitados reducidos y no reducidos se sometieron a SDS-PAGE 12% durante 6 hs a 150 V y 13 hs a 30 V. Los resultados se analizaron por autoradiografía del gel tratado con salicilato 1 M. Las placas fueron expuestas 3 días a temperatura ambiente.

RESULTADOS

RESULTADOS

I - EVIDENCIA GENÉTICA DE LA ESTRUCTURA HETERODIMÉRICA DE LA GII DE *S. pombe*

La GII juega un papel fundamental en el procesamiento de N-oligosacáridos en el RE. Los oligosacáridos $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transferidos a partir del derivado Dol-P-P a las secuencias Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se están sintetizando en el RE, son deglucosilados por la GI, que remueve la Glc más externa y luego por la GII, que remueve las dos Glc restantes. La GT transfiere luego una unidad de Glc a los oligosacáridos libres de Glc ($\text{Man}_{7,9}\text{GlcNAc}_2$) de las proteínas que no han adoptado aún su estructura terciaria nativa. Los oligosacáridos monoglucosilados formados tanto por deglucosilación parcial del compuesto transferido como por reglucosilación mediada por la GT son reconocidos por las chaperonas del RE CNX y CRT, y son sustratos de la GII. Los ciclos de glucosilación por la GT y deglucosilación por la GII continúan hasta que las glicoproteínas adquieren el plegamiento correcto (55).

Toda la evidencia para el modelo propuesto para control de calidad del plegamiento deriva de experimentos realizados en células de mamífero, pero presumiblemente un mecanismo similar opera en *S. pombe*, ya que esta levadura de fisión expresa actividad GT y un homólogo de CNX (26, 71, 72). Además, se ha reportado que el oligosacárido transferido a los polipéptidos nacientes en *S. pombe* es de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, el mismo que en la mayoría de células eucarióticas, y que este compuesto es procesado en el RE a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, indicando la presencia de actividades GI y GII (14).

Recientemente se observó que la GII de rata y ratón consistía en dos polipéptidos unidos fuertemente (llamados $\text{GII}\alpha$ y $\text{GII}\beta$) que no podían ser separados con los procedimientos comúnmente utilizados para la purificación enzimática sin pérdida de la actividad. Se propuso que la actividad catalítica estaría presente en la subunidad α ya que ésta posee homología con otras glucosidasas monoméricas conocidas. La subunidad β no presentaba similitud de secuencia con ninguna proteína conocida. Dado que la subunidad α carece de la señal de retención en el RE, se propuso que la función de la subunidad β , que sí la posee, sería la de retener a la subunidad catalítica α en el RE (75). Hasta el momento no se han presentado evidencias que respalden esta propuesta.

Con el objetivo de presentar evidencias genéticas que respalden la estructura heterodimérica propuesta para la GII, así como también anular la formación de oligosacáridos monoglucosilados para entender aspectos de la interacción oligosacárido monoglucosilado – CNX, fue necesario obtener *S. pombe* mutantes en ambas subunidades propuestas de la GII.

La estrategia utilizada para obtener las *S. pombe* mutantes $\text{GII}\alpha^-$ y $\text{GII}\beta^-$ consistió en la identificación y clonado de los genes que codifican para ambas subunidades ($\text{gls2}\alpha^+$ y $\text{gls2}\beta^+$), la interrupción de los genes con un gen marcador y la transformación de *S. pombe* auxótrofas para dicho marcador.

Obtención de un fragmento del gen que codifica para la GII α en *S. pombe*

Si bien se han identificado los genes que codifican para la GII en *S. cerevisiae* (GenBank N° Z36098), en humanos (GenBank N° D42041) y el putativo homólogo en *C. elegans* (GenBank N° D42041), el gen que codifica para la actividad GII en *S. pombe* no ha sido identificado aún. Por lo tanto, para realizar la disrupción de la GII α , fue necesario en primer lugar identificar y obtener un fragmento del gen que la codifica en *S. pombe*. Se diseñó una estrategia por PCR para obtener un fragmento de dicho gen a partir de DNA genómico, basada en el diseño de primers degenerados sobre las secuencias peptídicas conservadas entre las GII conocidas. A partir de dos secuencias de péptidos internos conservados (WNDMNEP y FFRAHA) se sintetizaron oligonucleótidos degenerados sentido (GII3, ver secuencias de oligonucleótidos sintéticos en Materiales y Métodos) y antisentido (GII4). Estos oligonucleótidos fueron utilizados para llevar a cabo una reacción de PCR sobre DNA genómico de *S. pombe* WT como templado, obteniéndose un fragmento de 414 pb, que fue clonado y secuenciado. La traducción conceptual de este fragmento dio homologías de 49, 43 y 47% con las respectivas porciones de la GII de *S. cerevisiae*, humana y de la putativa de *C. elegans* respectivamente.

Este fragmento es muy pequeño para interrumpirlo con el marcador *ura4*⁺ y mantener zonas flanqueantes suficientemente largas como para garantizar una doble recombinación homóloga en *S. pombe* (se requieren aproximadamente 250 - 300 pb flanqueantes 5'y 3' al marcador utilizado para la interrupción). Por lo tanto, basándose en la secuencia obtenida de este fragmento de 414 pb, se diseñó un oligonucleótido *exacto* antisentido (GIIAa). Con dicho oligonucleótido y otro sentido degenerado que se diseñó basándose en el péptido NAADETW (GII1) se amplificó un fragmento de 1002 pb, que se clonó y secuenció. Este corresponde aproximadamente al tercio central del gen completo. En la **Figura 10** se muestra un alineamiento de las secuencias conocidas de la GII hasta el momento con el fragmento obtenido de la putativa GII α de *S. pombe* y se indican con flechas las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación por PCR.

Figura 10, página siguiente. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las GII. Se alinearon las secuencias depositadas en el GenBank con la traducción del fragmento secuenciado de 1002 pb de *S. pombe*. Las flechas indican las posiciones de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos, en rojo los degenerados y en azul los exactos. La comparación fue realizada usando DNA STAR software (Megaligne, Clustal method). Los residuos iguales a la secuencia consenso entre todas las secuencias se hayan recuadrados.

GIII

330 N A A D T W V D I K Y D T S K N - - - - -
 290 N A A E T W V D T S S V T S K G L F G K M L D K V T G S S D N V P H F D A H F I S S E S G L V D V F
 316 N A A E T W V D I S S N T A G K T L F G K M M D Y L Q G S S G E T - P Q T D V R W M S S E T G I I D V F
 1 N A A E T W I D V E K E S G P - - - - - S P H S - Q S T S T H W Y S E S S G T L D L F
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

362 M S L G P D I P T I I D K F T D L T G R P F L P P I S S I G Y H Q C R W N Y N D E M D V L T V D S Q
 340 F F V G P T V K D V Q R Q N S K L T G V T P L P L F S I G Y H Q C R W N Y N D E A D V A T V N Q G
 365 L L L G P S I S D V F R Q Y A S L T G T Q A L P L F S L G Y H Q S R W N Y R D E A D V L E V D Q G
 37 I F L G P K A S D V Y E S Y S A L V G R P L L P L F S I G Y H Q C R W N Y V S E E D V L N V D A K
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

412 M D A H M I P Y D F I W L D L E Y T N D K K Y F T W K Q H S F P N P K R L S K L K K L G R N L V V
 390 F D D H D M P M D V I W L D I E H T D G K K Y F T W D K H K F P T P N D M V D K V A A K G R K M V T
 415 F D D H N L P C D V I W L D I E H A D G K R Y F T W D P S R F P Q P R T M L E R L A S K R K L V A
 47 F D E V D M P Y D T I W L D I E Y A S K R R Y F T W D K A T F P N P K A M L E K L D S K S R K L I V
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

462 L I D P H L K K D - Y E I S D R V I N E N V A V K D H N G N D - Y V G H C W P G N S I W I D T I S
 440 I V D P H I K K D D G Y Y V Y K D A K D K G L F V K R V D G S D - F E G H C W P G S S E Y L D F W H
 465 I V D P H I K V D S G Y R V H E E L R N L G L Y V K T R D G S D - Y E G W C W P G S A G Y P D F T N
 137 I L D P H I K N D P N Y F V S K E L I D Y N Y A V K D K S G V D N Y N A D C W P G N S V W V D F F N
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

509 K Y G Q K I W K S F F E R F M D L P A D L T N L F I W N D M N E P S I F D G P E T T A P K D L I H D
 489 P D T R S Y W K D Q F A - F D R Y T G S S N L H F I W N D M N E P S V F S G P E I T M D K E S I H Y
 514 P T M R A W W A N M F S - Y D N Y E G S A P N L F V W N D M N E P S V F N G P E V T M L K D A Q H Y
 147 P D S Q A W W G S L Y E - F D R F E - S D K N L W I W N D M N E P S V F R G P E T S M H R D A I H Y
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

559 N Y I E E R S V H N I Y G L S V H E A T Y D A I K S I Y S P S D K R P F L L T R A F F A G S Q R T A
 538 G G I E H R E I H N M Y G M Y T S A T F D G M I A R - T G G K E R P F L L S R A G F I G T Q R T A
 563 G G W E H R D V H N I Y G L Y V H M A T A D G L R Q R - S G G M E R P F V L L A R A F F A G S Q R F G
 235 G G W E H R D I H N I Y G H K C I N G T Y N G L I K R - G E G A V R P F I L T R S F F A G T S A L A
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

609 A T W T G D N V A N W D Y L K I S I P M V L S N N I A G M P F I G A D I A G F A E D P T P E L I A R
 587 A I W T G D N T A D W G H L E I A A P M T L S L S I A G V P F V G A D V G G F F G N P D E Q L L S R
 612 A V W T G D N T A E W D H L K I S I P M C L S L G L V G L S F C G A D V G G F F K N P E P E L L V R
 284 A N W I G D T M T T W E H L R G S I P T V L T N G I S G M A F S G A D V A G F F G N P D A E L L F V R
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

659 W Y Q A G L W Y P F F R A H A H I D T K R R E P Y L F N E P L K S I V R D I I Q L R Y F L L P T L Y
 637 W Y Q T A A F Q P F F R A H A H I D T K R R E P W L L F S E Q T Q Q I I R D A L G Q R Y S L L P F W Y
 662 W Y Q M G A Y Q P F F R A H A H L D T G R R E P W L L P S Q H N D I I R D A L G Q R Y S L L P F W Y
 334 W Y E T A I F Y P F F R A H A
 GII S. cerevisia
 GII C. elegans
 GII human
 GII S. pombe

GIIAa

GII4

Obtención de una mutante de *S. pombe* $GII\alpha^-$

Se construyó una mutante de *S. pombe* a la que se le interrumpió el gen que codifica para la $GII\alpha$, mediante la inserción de del gen marcador $ura4^+$ (GenBank M36504). Este gen con su propio promotor fue colocado en posición invertida en la posición 568 del fragmento clonado de 1002 pb codificante para la $GII\alpha$, de manera que quedaron flanqueando al gen $ura4^+$ 568 pb y 434 pb de la secuencia $gls2\alpha$. Esto es suficiente para obtener una buena eficiencia de doble recombinación homóloga. La construcción, que se muestra en la **Figura 11**, se liberó del vector y con el DNA lineal así obtenido se transformaron células de *S. pombe* WT (Sp95: h^{90} $ade6$ -M216, $leu1$ -32, $ura4$ -D18). Se seleccionaron las células que adquirieron la prototrofia para uracilo.

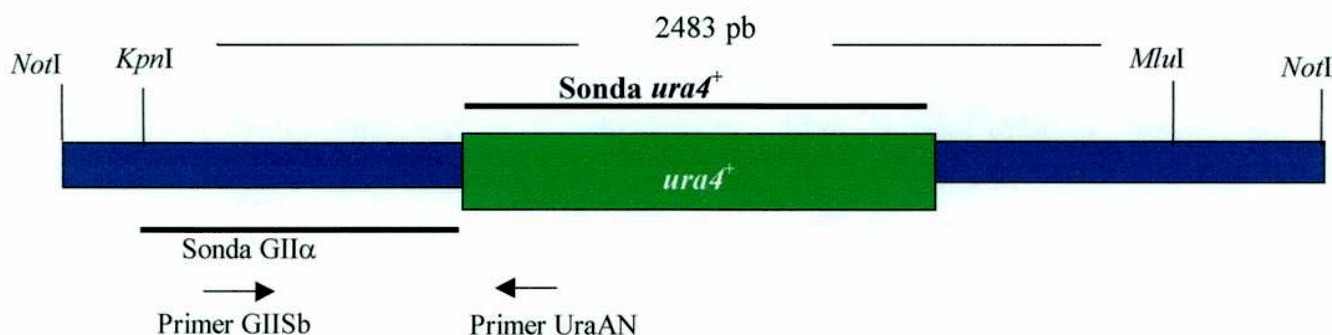


Figura 11. Construcción utilizada para obtener una mutante de *S. pombe* $GII\alpha^-$. El gen marcador $ura4^+$ (1764 pb) se introdujo en orientación reversa en la posición 568 (sitio $HindIII$) del fragmento de 1002 pb del gen $gls2\alpha$ clonado en el vector pGEMT. La digestión con la enzima $NotI$ de la construcción obtenida liberó un fragmento lineal de 2766 pb conteniendo el gen $ura4^+$ flanqueado por 568 pb (5') y 434 pb (3') del gen $gls2\alpha$. Este fragmento fue purificado y se utilizó para transformar células de *S. pombe* WT. Las posiciones de las sondas y los oligonucleótidos utilizados para la caracterización genética de la mutante $GII\alpha^-$ obtenida se esquematizan.

Caracterización genética de la mutante $GII\alpha^-$

Como una primera aproximación para verificar la transformación de las células obtenidas, se realizó una reacción de PCR utilizando directamente las colonias capaces de crecer sin uracilo agregado al medio como templados de la reacción ("colony PCR"). Se utilizó un primer específico de la secuencia $GII\alpha$ (GIISb) y otro para la del $ura4^+$ (UraAN). Las colonias WT, que no poseen la inserción $ura4^+$, no amplificaron ningún fragmento de DNA. Sólo las células mutantes produjeron el fragmento predicho de 714 pb (**Figura 12 A**).

La mutación introducida se caracterizó por Southern Blot: se preparó DNA genómico de la cepa salvaje y de dos posibles mutantes y se digirió con las enzimas de restricción $KpnI$ y $MluI$. La digestión se resolvió en un gel de agarosa y se transfirió a una membrana que fue hibridizada sucesivamente con una sonda específica para el gen $gls2\alpha$ (475 pb derivados de la digestión con $KpnI/HindIII$ del fragmento de 1002 pb) y luego de hervir el filtro para despegar la sonda, con

otra que hibridiza con el gen *ura4*⁺. Se observó una banda de 2483 pb en el DNA de las dos cepas capaces de crecer sin uracilo, mientras que la banda de 719 pb esperada se observó el DNA de células WT cuando la sonda utilizada fue la de *gls2α* (Figura 12 B). Sólo la banda de 2483 pb hibridizó con la sonda del gen *ura4*⁺ (Figura 12 C). Esto indica que hubo un reemplazo en las células mutantes del DNA salvaje por el que posee la inserción y además que este evento ocurrió sólo una vez en el genoma de cada mutante.

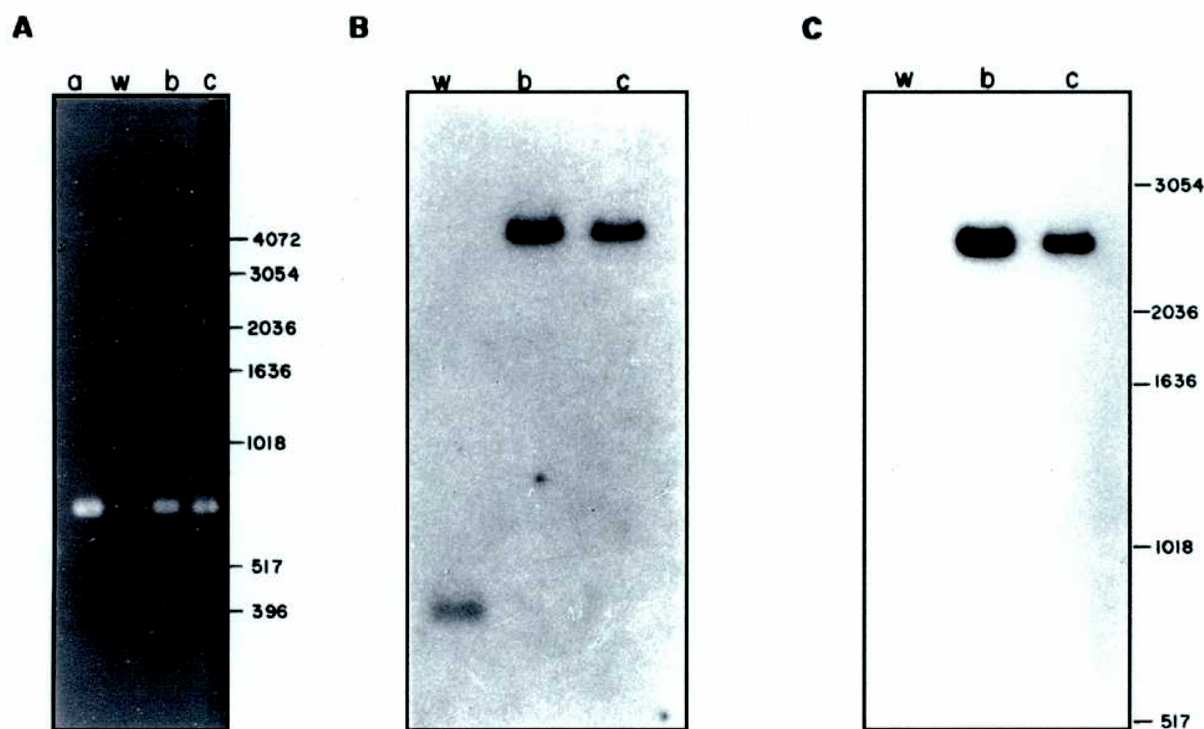


Figura 12. Caracterización molecular de la mutante *GIIα* (*gls2α::ura4*⁺). A, Identificación por PCR de posibles mutantes. Se realizaron reacciones de PCR sobre el plásmido pGEMT Easy- *gls2α::ura4*⁺ (a, control positivo de la reacción), directamente sobre las células salvajes (calle w) o Ura⁺ (calles b y c) usando un primer específico de la secuencia *gls2α* (GIISb) y otro del *ura4*⁺ (UraAN). B y C, Southern Blot de células salvajes (w) o mutantes (b y c): se digirió el DNA de las tres cepas con *KpnI* y *MluI*, se resolvió en un gel de agarosa 1.2 % y se transfirió a una membrana de nylon que fue hibridizada sucesivamente con una sonda específica para *gls2α* (475 pb *KpnI/HindIII* derivado del fragmento de 1002 pb) (B), y luego de hervir y lavar el filtro con otra que hibridiza con el gen *ura4*⁺ (C).

La subunidad α de la GII de *S. Pombe* carece de señal de retención en el RE

Todas las GII purificadas hasta el momento son enzimas solubles del lumen del RE. La localización en el RE de las proteínas solubles está mediada por un tetrapéptido C- terminal que en mamíferos es usualmente KDEL (94). El receptor para esa señal de localización en el RE se encuentra en el compartimento de Golgi y funciona a través de un proceso de reciclado de vesículas que reintegra o recupera a las proteínas al RE (95). Con el objetivo de determinar si el

gen que codifica para la putativa subunidad $GII\alpha$ en *S. pombe* posee señal de retención/recuperación en el RE, hemos buscado el gen completo *gls2 α* ⁺ en una biblioteca genómica construida en el vector λ ZAP II. Se empleó como sonda el fragmento de 1002 pb ya obtenido por PCR, marcado radiactivamente. Los detalles del procedimiento de screening de la biblioteca se detallan en Materiales y Métodos. Luego de tres rondas de screening se obtuvieron 5 clones puros, todos del mismo tamaño, pero que carecían de la porción 5' correspondiente al extremo amino terminal de la proteína. Sin embargo, la secuenciación y traducción de la región 3' del gen permitió determinar que al igual que ocurre con la subunidad α de las GII de mamíferos (75), el gen homólogo en *S. pombe* carece de señal de retención en el RE, ya que termina con la secuenciaGCIRNPQLFLV (**Figura 13**)

```

1  MRYHGICWFIFQAAIIFAIFGSCQGAFRHQFKTAEQDGFARRNRDLAKFQ
51  KENLNWNGLFQLNSISYNSGVVSGVFEQQSENGENQHLFPFSISFLKNDV
101 VRFQMDEKSRLEGTVEYEKNILTKRRFDASTELGFNERAEVYGKDAHLL
151 QTSTSLTIRYGSHGRFTVIVTFSPFKVEFQRDGEQVVLNERHLLNMEYY
201 RPKSSRTPEQEANGMWDETFDNFHDSPKPKGPESVGLDIKFVDYGNVYGV
251 EHTSSLSLKETNNSDAGYTEPYRLYNVDLFEYEVDSPMSQYGAIPFMQAH
301 KPNSDVAVFWS|NAAATWIDVEKESGPSPHSQSTSTHWYSESGTLDLFI
351 GPKASDVYESYSALVGRPLLPLFSIGYHQCRWNYVSEEDVLNVDKAFDE
401 VDMPYDTIWLDIEYASKRRYFTWDKATFPNPKAMLEKLDKSRKLIVILD
451 PHIKNDPNYFVSKELIDYNYAVKDKSGVDNYNADCWPGNSVWVDFNPEA
501 QAWWGSLYEFDRFESDKNLWIWNDMNEPSVFRGPETSMHRDAIHGGWEH
551 RDIHNIYGHKCNGTYNGLIKRGEGAVRPFILTRSFAGTSALAAANWIGD
601 TMTTWEHLRGS IPTVLTNGISGMAFSGADVAGFFGNPDALFVRWYETAI
651 FYPFFRAHAHIDTKRREPWLYGEPYTSLVRELLRIRYRLLPWTYAFYNS
701 HTHGFPILYPQFLMHPEDDEGFAIDDQFYVGDSGLLVKPVTHPSIDKITI
751 YLADDEVYFDLHDHTEYAGKGHVVPAPLGRVPVLLRGGNILITRERIRR
801 AAELTRNDPFTLTIAVSKIGKNASGFLYLDGVTFNKKGEYLIRHFSYE
851 NGILTMKDSHSNPPVSPKYSSSQKHLKVERINIYGEQTRKSIKIRKIIDS
901 EVTEWDVSVDDSGCIRNPQLFLV

```

Figura 13. Secuencia aminoacídica de la $GII\alpha$ de *S. pombe*. La secuencia contiene 923 aminoácidos. La región subrayada comprende el péptido señal. Los sitios potenciales de N-glicosilación se resaltan en negritas. La secuenciación a partir de la línea vertical se realizó en este trabajo. El gen *gls2 α* ⁺ se secuenció como parte del proyecto de secuenciación del genoma completo de *S. pombe* y se depositó en GenBank durante la escritura de esta tesis con N° de acceso CAB65603. En cursiva se indican los tres aminoácidos que presentaron diferencias entre la secuencia obtenida en este trabajo y la depositada. Obsérvese que la región C-terminal de la proteína no posee señal de retención/recuperación del RE.

Una secuencia de *S. pombe* homóloga a la subunidad β de ratón posee la señal VDEL

Hemos identificado en *S. pombe* la existencia de una secuencia de cDNA homóloga a la GII β de ratón (*gls2 β*) (Número de acceso al GenBank D89245). Esta secuencia que codifica para un polipéptido de 506 aminoácidos, posee una secuencia de péptido señal en el extremo N-terminal y la señal VDEL de retención/recuperación en el RE en el extremo C-terminal (**Figura 14**). Se propuso entonces que la GII de *S. pombe* consiste en un heterodímero formado por una subunidad α carente de señal de retención y otra subunidad β con la señal VDEL.

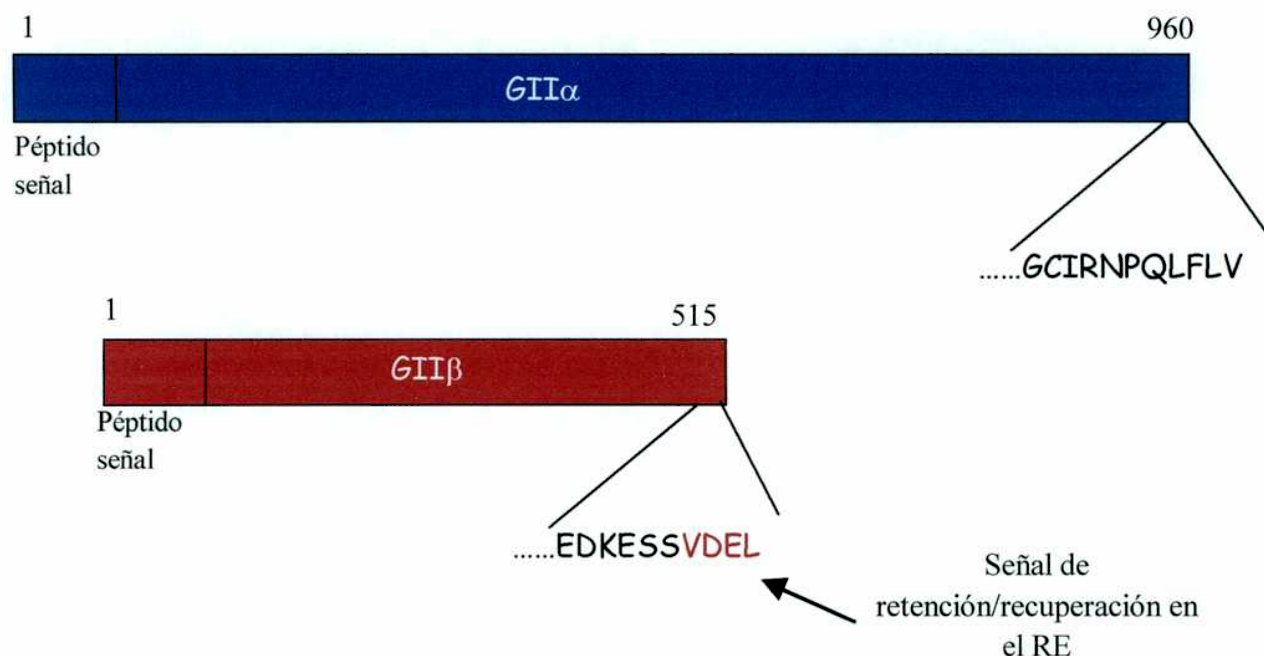


Figura 14. Secuencias aminoacídicas C-terminal de las probables GII α y GII β de *S. pombe*.

Obtención del cDNA que codifica para la posible subunidad β de la GII

Para obtener un fragmento de DNA codificante de la putativa subunidad β de la GII de *S. pombe*, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos exactos basándose en la secuencia D89245 homóloga a la GII β de ratón (B1s y B1a, cuyas secuencias y posiciones se indican en Materiales y Métodos). Una reacción de PCR utilizando DNA genómico de *S. pombe* como templado y los mencionados primers produjo un fragmento de aproximadamente 1800 pb, más grande que el esperado de 1526 pb. El fragmento de 1800 pb fue clonado y 200 bases de cada extremo fueron secuenciadas. Las secuencias correspondieron a la del gen D89245, lo que sugirió la presencia de al menos un intrón. Cuando la reacción de PCR utilizando los mismos primers se realizó con RNA

de *S. pombe* como templado (RT-PCR), se obtuvo la banda esperada de 1526 pb, confirmando la presencia de intrones.

Para facilitar la inserción del marcador *ura4*⁺ en el cDNA de *gls2β*⁺ (necesaria para realizar la disrupción de este gen) se introdujo un sitio *Hind*III por una sustitución G-T en la posición 577 de la secuencia codificante, mediante dos reacciones de RT-PCR realizadas con primers mutados. Se obtuvieron los cDNA correspondiente a la región N-terminal de la GIIβ (N) y a la C-terminal (C), conteniendo dicha mutación en sus extremos 3' y 5' respectivamente (ver **Figura 8** en Materiales y Métodos). Por comparación de estas dos reacciones con reacciones realizadas utilizando el DNA genómico como templado, se confirmó que *ambas* partes tenían intrones ya que se observaba un menor tamaño en los fragmentos obtenidos por RT-PCR. La presencia de intrones en la levadura de fisión *S. pombe* es relativamente frecuente: los mismos ya han sido descritos para algunos genes y se caracterizan por ser muy cortos (de 35-130 pb). *S. pombe* es bastante similar a otros hongos y metazoos en términos de frecuencia y distribución de intrones en los genes y de las secuencias consenso de splicing: la mayor diferencia es el tamaño de los mismos, que en general es mayor en metazoos (96).

Obtención de *S. pombe* mutante GIIβ⁻

Con el objetivo de estudiar la posible estructura heterodimérica de la GII de *S. pombe*, es decir, si *gls2β*⁺ codifica efectivamente una subunidad de la GII, como así también de tratar de analizar si su función es la de retener a la subunidad α en el RE, se realizó la disrupción de este gen en la levadura de fisión. Esto se realizó mediante doble recombinación homóloga del genoma de *S. pombe* WT con un DNA lineal que posee el marcador *ura4*⁺ insertado en la secuencia de cDNA de la GIIβ. El gen *ura4*⁺ con su propio promotor se clonó en la posición 577 del cDNA, en el sitio *Hind*III obtenido por la introducción de la sustitución G-T. Con la construcción de la **Figura 15** se transformaron células *S. pombe* WT (ADm, *h⁻ ade6-M210, leu1-32, ura4-D18*) y se seleccionaron las células que se convirtieron en protótrofos para uracilo. La cepa resultante se llamó ADmIβ y fue de genotipo *h⁻ ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, gls2β::ura4⁺*

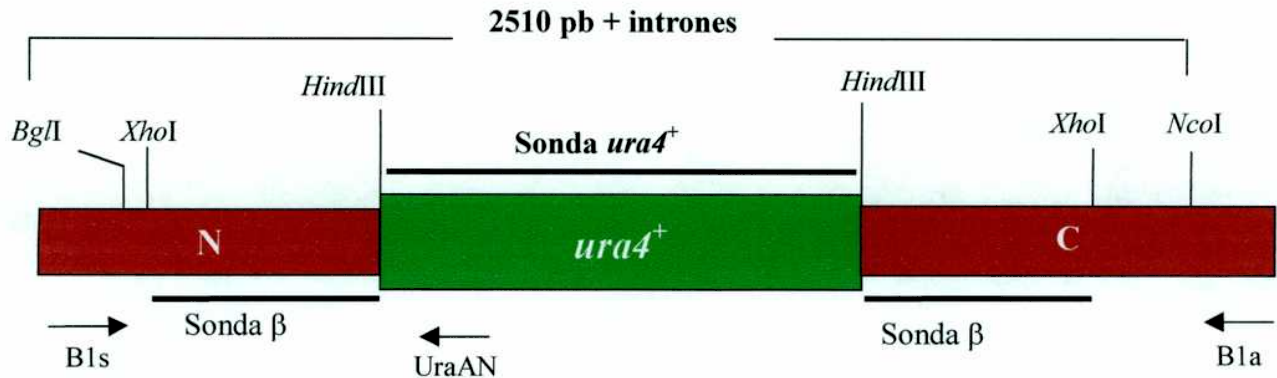


Figura 15. Esquema de la construcción utilizada para realizar la interrupción del gen *gls2β* en células de *S. pombe*. Un fragmento de DNA de 3290 pb conteniendo el gen *gls2β* interrumpido por el gen *ura4+* (*gls2β::ura4+*) fue liberado del vector pGEM-T con la enzima *NotI* e introducido en células de *S. pombe* ADm. Se seleccionaron las transformantes capaces de crecer en ausencia de uracilo. La posición de los oligonucleótidos y sondas utilizados para la obtención del cDNA *gls2β*⁺ y para la caracterización genética se indican en la figura. La sonda β se obtuvo por digestión con *XhoI* y *HindIII* del cDNA *gls2β* mutado. La sonda *ura4+* se obtuvo por digestión con *HindIII* de pBluescript-*ura4+*.

Caracterización genética de la mutante GIIβ⁻

La caracterización genética de las mutantes que adquirieron la capacidad de crecer en ausencia de uracilo en el medio (*ura4+*) se realizó tanto por PCR como por Southern Blot como se describe a continuación.

a) *Por PCR*: como una primera aproximación para verificar la transformación de las células obtenidas se realizaron reacciones de colony PCR directamente sobre cinco colonias *ura4+* utilizando un primer específico para la secuencia *gls2β* y otro para la del gen *ura4+*. Además se realizaron controles con células WT y con el plásmido utilizado para la interrupción (pGEMT-*gls2β::ura4+*). El fragmento esperado en las mutantes GIIβ⁻ era de 1180 pb, sin embargo 4 de las colonias analizadas dieron una banda 200 pb más grande, probablemente porque la recombinación homóloga ocurrió río abajo de un intrón en el DNA genómico. La quinta colonia y la construcción usada como control dieron fragmentos del tamaño esperado y no se sintetizó DNA cuando células WT fueron usadas como templado (**Figura 16 A**). La colonia en que el intrón no está presente puede provenir tanto de una recombinación río arriba del intrón o de una recombinación no-homóloga en otro lugar del genoma.

b) *Por Southern Blot*: La transformación de las células se confirmó por Southern Blot, como así también la existencia de un intrón en 4 de las colonias y su ausencia de una de ellas. Se preparó DNA genómico de la cepa salvaje y de las posibles mutantes. Este DNA se digirió con *BglII* y *NcoI*, se resolvió en un gel de agarosa y se transfirió a una membrana que fue hibridizada

sucesivamente con una sonda específica para *gls2 β* y luego de lavar el filtro con otra que hibridiza con el gen *ura4⁺*. Los fragmentos esperados en las células WT, en las que contienen intrón y en la que no lo contiene son de aproximadamente 1000 (746 más intrones), 2780 (2510 más intrones) y 2510 pb, respectivamente. Esos fueron precisamente los fragmentos encontrados (**Figura 16 B**). Sólo las bandas de 2780 y 2510 pb hibridizaron con la sonda del gen *ura4⁺*. Esto indica que hubo una reemplazo en las células mutantes del DNA salvaje por el que posee la inserción y además que este evento ocurrió sólo una vez en el genoma de cada mutante. En la colonia que no poseía el intrón, la recombinación fue homóloga ya que no se detectó una segunda banda correspondiente a un gen WT en el Southern Blot.

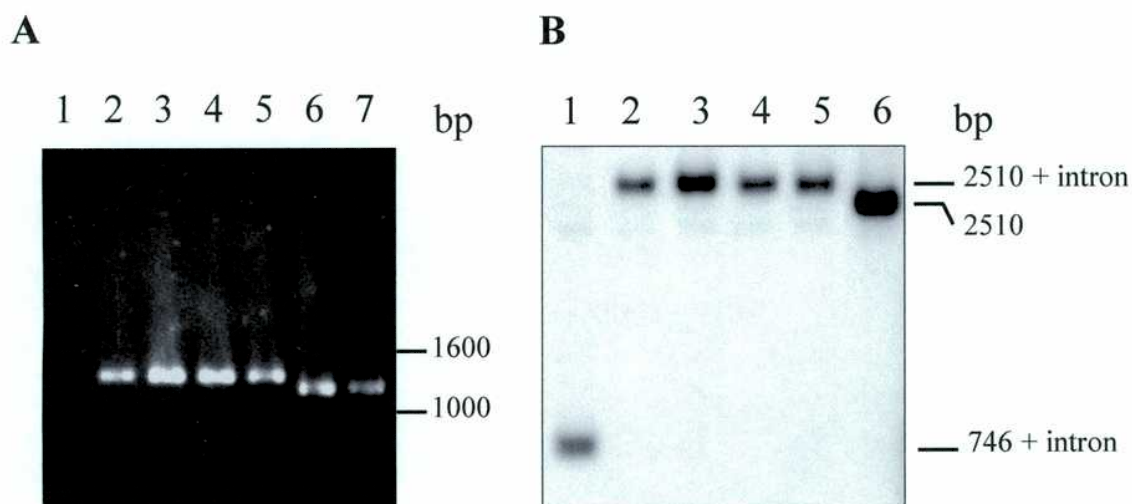


Figura 16. Caracterización genética de las mutantes *S. pombe* *GII β* . A: PCR sobre colonias WT (1), *ura4⁺* (2-6) y pGEMT- β (7). Los primers utilizados fueron el B1s y el UraAN B: Southern Blot de DNA de *S. pombe* WT (1) y *ura4⁺* (2-6). El DNA se digirió con BglI y NcoI, se resolvió en un gel de agarosa y se transfirió a una membrana que fue hibridizada sucesivamente con una sonda específica para la subunidad *GII β* y *ura4⁺*. Los lavados se realizaron a alta rigurosidad y se expusieron en placas Biomax MS1 por tres días a -70°C .

Las mutantes *S. pombe* $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$ no tienen actividad GII en microsomas aislados

Con el objetivo de presentar evidencias genéticas que respalden la estructura heterodimérica propuesta para la GII, hemos identificado los genes que codifican para homólogos de ambas subunidades ($gls2\alpha^+$ y $gls2\beta^+$) y construimos levaduras *S. pombe* mutantes en ambos genes.

Para determinar si las células de *S. pombe* mutantes en los genes $gls2\alpha$ y $gls2\beta$ perdieron la actividad GII, se purificaron microsomas de células *S. pombe* WT, $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$. Los microsomas se solubilizaron con detergente (0.3% Tritón X-100) e incubaron durante distintos tiempos con $[^{14}C-Glc]Glc_1Man_{7-9}GlcNAc$ como sustrato. El producto de la reacción se sometió a una cromatografía ascendente en papel para separar la $[^{14}C]Glc$ liberada del oligosacárido sin digerir. Los resultados se cuantifican como % de Glc liberada respecto de la marca total contada en las distintas fracciones del papel (**Figura 17 C**) y muestran que sólo se liberó $[^{14}C]Glc$ de la incubación con microsomas salvajes, indicando que los microsomas de ambas mutantes carecen completamente de actividad GII.

Como control de que la actividad GI no se vio afectada, microsomas de las tres cepas (WT, $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$) se incubaron con $[^{14}C-Glc]Glc_3Man_9GlcNAc$ como sustrato y se analizó la actividad como $[^{14}C]Glc$ liberada de este oligosacárido de la misma manera que antes (**Figura 17 A y B**). En este caso se liberaron unidades de Glc marcada tanto de la cepa WT como de las dos mutantes $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$, indicando que la actividad GI permaneció intacta.

El hecho de que la disrupción tanto del gen $gls2\alpha$ como del $gls2\beta$ provoquen *ambos* la pérdida de actividad GII en microsomas aislados de las mutantes, demuestra la estructura heterodimérica de la GII.

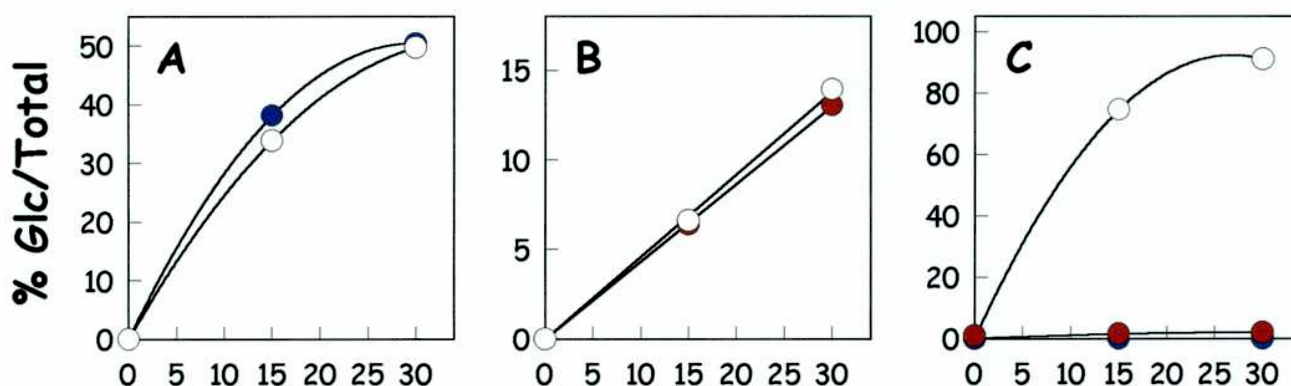


Figura 17. Determinación de actividades GI y GII en extractos libres de células WT y mutantes. Microsomas de células WT (O), $GII\alpha^-$ (●) y $GII\beta^-$ (●) se incubaron a 30°C por los tiempos indicados con $[^{14}C-Glc]Glc_3Man_9GlcNAc$ para ensayar actividad GI (A y B) o con $[^{14}C-Glc]Glc_1Man_{7-9}GlcNAc$ para ensayar actividad GII (C). En las ordenadas se representa la actividad como % de $[^{14}C]Glc$ liberada respecto del total de marca (100% = 1150 cpm).

La mutante *S. pombe* $GII\alpha^-$ no produce oligosacáridos monoglucosilados *in vivo* mientras que la mutante $GII\beta^-$ produce una pequeña proporción, consistente con una actividad GII residual

En células de *S. pombe* WT el oligosacárido transferido a la secuencia Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se están sintetizando, translocando a través de la membrana del RE y plegando en el lumen es, como en la mayor parte de las células eucariotas, de composición $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (14). La GI inicia el camino del procesamiento del oligosacárido en el RE removiendo la Glc distal unida $\alpha 1,2$ y la GII remueve las dos Glc más internas con uniones $\alpha 1,3$. Dado que en las células WT ambas glucosidasas son activas, se espera que el procesamiento en el RE continúe hasta el oligosacárido $Man_9GlcNAc_2$. En las células carentes completamente de actividad GII , pero cuya actividad GI no se ve afectada, la Glc externa podrá ser removida pero no así las dos Glc más internas, lo que conduce necesariamente a la composición $Glc_2Man_9GlcNAc_2$ de los oligosacáridos unidos a proteína en estas mutantes. Sin embargo, si la hipótesis de que la subunidad β de la GII es responsable de la retención de la subunidad α en el RE es correcta, aunque no se detecte la actividad GII en microsomas aislados de las mutantes $GII\beta^-$, es posible que en estas mutantes se produzca una pequeña cantidad de oligosacáridos monoglucosilados o deglucosilados provenientes de la actividad de la subunidad catalítica α en su tránsito a través del RE. Se comparó entonces el patrón de oligosacáridos unidos a proteínas en las células WT, $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$.

Patrón de oligosacáridos RE- específicos unidos a proteínas en células WT, $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$

Con el objetivo de analizar la composición de oligosacáridos unidos a proteínas en células de *S. pombe* WT y de las mutantes en las dos subunidades de la GII , células WT, $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$ se privaron de Glc por lavado con medio YNB, y se preincubaron luego en el mismo medio 15 min a 28°C. Luego se marcaron con 100 μCi de [^{14}C]Glc durante otros 15 minutos a la misma temperatura. Las proteínas totales celulares se degradaron con una proteasa inespecífica (Pronasa), y se liberaron los oligosacáridos sensibles a Endo H de los glicopéptidos así obtenidos. Los oligosacáridos se purificaron por electroforesis en papel y luego se analizaron por cromatografía en papel. Los resultados se muestran en la **Figura 18**, donde también se muestra la posición de los estándares utilizados que se cromatografiaron en paralelo.

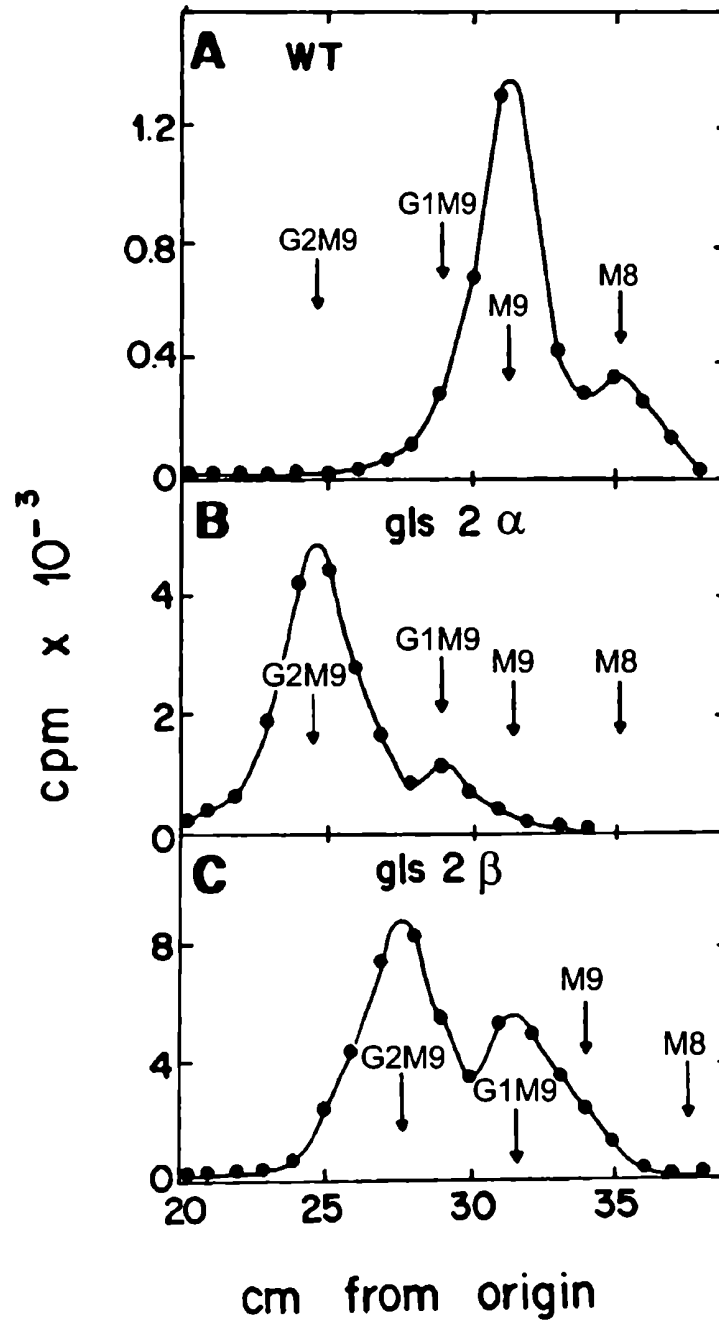


Figura 18. Patrón de oligosacáridos unidos a proteínas en células WT y mutantes *GII α* y *GII β* a tiempos cortos. Células WT (A), o mutantes en los genes *gls2 α* (B) y *gls2 β* (C) se marcaron con [¹⁴C]Glc durante 15 minutos y las proteínas totales se degradaron con una proteasa inespecífica. Los oligosacáridos sensibles a Endo H se liberaron de los glicopéptidos formados y se cromatografiaron en papel con solvente A. *Estándares:* G1M9: Glc₁Man₉GlcNAc; G2M9: Glc₂Man₉GlcNAc; M9: Man₉GlcNAc y M8: Man₈GlcNAc

La cepa WT mostró principalmente sustancias que migraron en la cromatografía en papel como los estándares de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ (**Figura 18 A**). Para analizar la composición de monosacáridos de las sustancias se realizó una hidrólisis ácida fuerte de ambas especies por tratamiento con HCl 1 N durante 4 h a 100°C . Este tratamiento resultó en la producción únicamente de manosa marcada (**Figura 19 A**). Debido al corto período de incubación con la marca, no se detectaron GlcNAc marcadas ni modificaciones Golgi específicas (agregado de unidades de Gal y Man al oligosacárido $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) en las muestras. Los oligosacáridos unidos a proteína en la cepa WT son entonces, como se preveía por la presencia de actividades Gl y GII, principalmente $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y en menor cantidad $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Este último puede provenir de la actividad de una manosidasa I del RE.

Un patrón diferente de oligosacáridos N-unidos a proteínas se obtuvo en el caso de las cepas mutantes $\text{GII}\alpha^-$ y $\text{GII}\beta^-$ cuando se realizó la marcación en idénticas condiciones. En ambos cromatogramas aparecen sólo dos compuestos, que migraron como los estándares de $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (**Figura 18 B y C**). Una proporción mayor del compuesto de migración más rápida se observó en las células $\text{GII}\beta^-$ respecto de las $\text{GII}\alpha^-$. La hidrólisis ácida fuerte de cada uno de los oligosacáridos sintetizados por las dos mutantes resultaron tanto en la producción de unidades de Man como así también de *Glc marcada* (**Figura 19 B y C**). Esta última está ausente en las células WT.

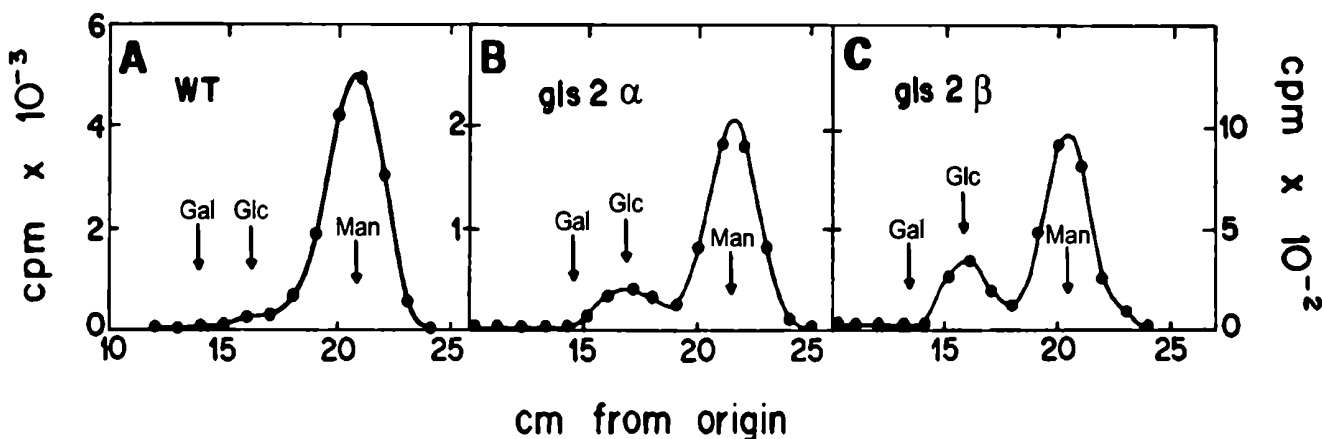


Figura 19. Composición de monosacáridos de los oligosacáridos unidos a proteínas en células WT y mutantes $\text{GII}\alpha^-$ y $\text{GII}\beta^-$. Los sacáridos que migraron como los estándares M9 y M8 en la **Figura 18 A** (cepa WT) (A) y como G2M9 en la **Figura 18 B** (mutante en el gen *gls2 α*) (B) y **Figura 18C** (mutante en el gen *gls2 β*) (C) fueron sometidos a una hidrólisis ácida fuerte con HCl 1 N durante 4 h a 100°C seguida de cromatografía en papel en solvente B. Los estándares Man, Glc y Gal se cromatografiaron en paralelo y sus posiciones se indican con flechas.

Análisis de los compuestos glucosilados de las mutantes por tratamiento con α -manosidasa

Con el objetivo de determinar la identidad de los compuestos que integran ambos picos observados en las mutantes $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$ que migran como los estándares $Glc_2Man_9GlcNAc$ y $Glc_1Man_9GlcNAc$ y que contienen tanto Glc como Man, éstos fueron eluidos del papel, tratados con α -manosidasa, y sometidos a una nueva cromatografía. La presencia de residuos de Glc protege de la degradación por α -manosidasa a la rama del oligosacárido que la contiene (Ver **Figura 1**). El tratamiento permite aumentar las diferencias de migración entre los oligosacáridos y así distinguir entre estructuras que no se resuelven en la primera cromatografía. Los resultados se muestran en la **Figura 20**.

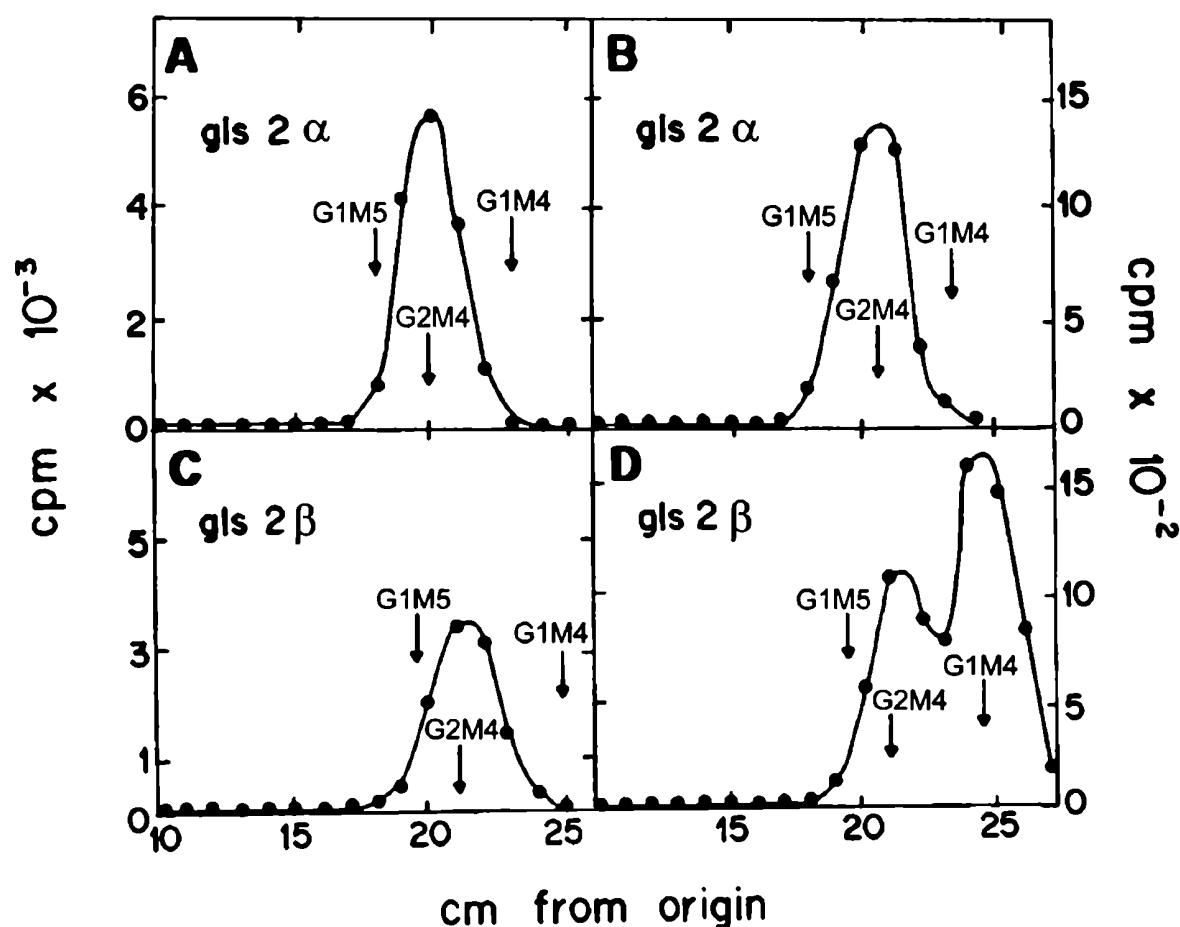


Figura 20. Degradación con α -manosidasa de compuestos glucosilados de las mutantes $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$. Los sacáridos que migraron como los estándares G2M9 (A) y G1M9 (B) en las mutantes en el gen *gls2α* (**Figura 18 B**) fueron eluidos del papel, tratados con α -manosidasa y re-cromatografiados con solvente A. Los sacáridos que migraron como G2M9 (C) y G1M9 (D) en la en la mutante en el gen *gls2β* (**Figura 18 C**) fueron tratados de igual modo. Estándares: G1M4, $Glc_1Man_4GlcNAc$; G2M4, $Glc_2Man_4GlcNAc$; G1M5, $Glc_1Man_5GlcNAc$.

El tratamiento exhaustivo con α -manosidasa de los compuestos que migraron como los estándares $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (**Figura 18 B**) sintetizados por la mutante $\text{GII}\alpha^-$ produjo en ambos casos un compuesto que migró como el estándar $\text{Glc}_2\text{Man}_4\text{GlcNAc}$. Este es claramente diferente de los estándares $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (**Figura 20 A y B**, respectivamente). Ello indicó que el compuesto producido por esta cepa que migraba como $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ era en realidad $\text{Glc}_2\text{Man}_8\text{GlcNAc}$. Estos resultados muestran que *sólo la glucosa más externa* fue removida del oligosacárido transferido en la mutante $\text{GII}\alpha^-$ y que en algunos casos un residuo de manosa fue también escindido. Las células $\text{GII}\alpha^-$ son entonces incapaces de formar oligosacáridos monoglucosilados *in vivo*.

Por otra parte, el tratamiento con α -manosidasa del oligosacárido sintetizado por la mutante $\text{GII}\beta^-$ que migró como el estándar $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (**Figura 18 C**), dio un compuesto que migró como el estándar $\text{Glc}_2\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ al igual que el sintetizado por las células $\text{GII}\alpha^-$ (**Figura 20 C**). Sin embargo, el compuesto que migraba como $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ produjo, con el mismo tratamiento enzimático, compuestos que migran como los estándares de $\text{Glc}_2\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ (**Figura 20 D**). Esto indica que el compuesto que migraba como el estándar de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ en la **Figura 18 C** era en realidad *una mezcla* de $\text{Glc}_2\text{Man}_8\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$. A diferencia de las células $\text{GII}\alpha^-$, las células $\text{GII}\beta^-$ no abolieron totalmente la actividad GII *in vivo* y producen una pequeña cantidad de oligosacáridos monoglucosilados. La estructura de los oligosacáridos producidos por ambas mutantes, como así también el análisis de su degradación con α -manosidasa se esquematiza en la **Figura 21**.

El hecho de que la disrupción de los genes $\text{gls2}\alpha$ y $\text{gls2}\beta$ haya provocado en ambos casos la eliminación de la actividad GII en microsomas purificados demostró genéticamente la naturaleza heterodimérica de la GII . Por otra parte, concluimos que la $\text{GII}\alpha$ es la subunidad catalítica de la enzima, ya que la disrupción del gen que la codifica ($\text{gls2}\alpha^+$) en *S. pombe* abolió totalmente la actividad GII tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*: no se detectó actividad en microsomas aislados ni tampoco formación de oligosacáridos monoglucosilados ni deglucosilados. La $\text{GII}\beta$ no constituye la subunidad catalítica, ya que en las mutantes en el gen $\text{gls2}\beta$ existe una formación residual de oligosacáridos monoglucosilados en ensayos *in vivo*. La actividad GII extremadamente baja que se detecta *in vivo* pero no *in vitro* en las mutantes $\text{GII}\beta^-$ probablemente representa a la $\text{GII}\alpha$ presente transitoriamente en el RE. Esto es consistente con la hipótesis de que la subunidad β tendría el rol de retener la subunidad catalítica α en el RE.

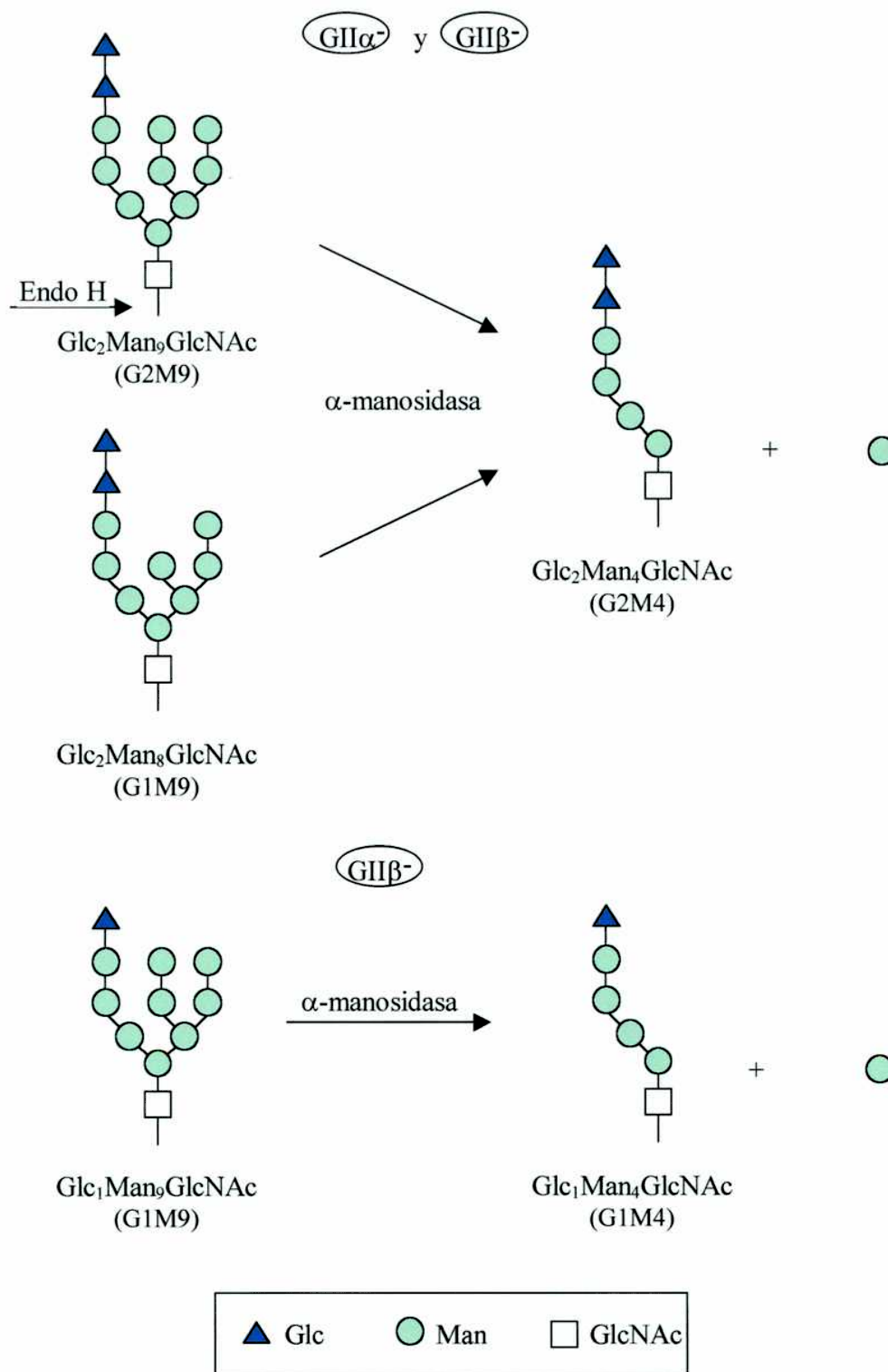


Figura 21. Representación esquemática de los oligosacáridos producidos por las mutantes $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$. Entre paréntesis se indica el estándar de migración del oligosacárido. En la figura también se muestran los oligosacáridos producidos por la degradación con α -manosidasa.

II - LA CNX Y NO LA FORMACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS MONOGLUCOSILADOS ES ESENCIAL PARA LA VIABILIDAD DE *S. pombe*

La CNX unida a membrana y su homóloga soluble CRT constituyen una nueva familia de chaperonas moleculares implicadas en el plegamiento de glicoproteínas en el RE. La CNX y la CRT poseen una actividad de lectina con especificidad única para glicoproteínas monoglucosiladas. Dichas glicoproteínas monoglucosiladas surgen de la acción consecutiva de la GI y GII, o alternativamente de la reglucosilación mediada por la GT sólo si la proteína no ha adquirido su estructura terciaria nativa.

Dos grupos reportaron el aislamiento del gen homólogo de *S. pombe* de la CNX (*cnx1*⁺) y la aparente ausencia de CRT de estas levaduras. La proteína que codifica *cnx1*⁺ es esencial para la viabilidad de dichas levaduras (71, 72). Esto se consideró consistente con el modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE, en el que se propone que la CNX se une a los oligosacáridos monoglucosilados de las glicoproteínas reteniéndolas en el RE durante su proceso de plegamiento y evitando la formación de agregados perjudiciales.

Si bien la CNX mostró ser esencial para la viabilidad celular, en nuestro laboratorio se obtuvo una mutante de *S. pombe* GT⁻ (*gpt1*) en la que no se vio afectado el crecimiento, a pesar de tener una disminución en la formación de oligosacáridos monoglucosilados (30). En esta mutante no hay actividad de GT, es decir no existe el paso de reglucosilación transitoria de los oligosacáridos transferidos a proteínas en el RE, pero existen aún derivados monoglucosilados que son aquellos que surgen del procesamiento parcial del oligosacárido por las actividades de GI y GII (**Figura 22**).

Con el objetivo de analizar si la formación de oligosacáridos monoglucosilados (Glc₁Man₉GlcNAc₂) unidos a las proteínas es esencial para la viabilidad celular, se abolió totalmente la capacidad de producir dichos oligosacáridos tanto por deglucosilación parcial del compuesto transferido como por reglucosilación por la GT en células de *S. pombe* intactas. La estrategia utilizada consistió en la construcción de una mutante de *S. pombe* a la que se le interrumpió el gen *gls2α*, que codifica para la subunidad catalítica de la GII (GIIα). La construcción, caracterización genética y bioquímica de dicha mutante se detalló en la sección anterior. Como se describió, la disrupción del gen que codifica GIIα conlleva a la retención de dos unidades de Glc en los oligosacáridos unidos a proteínas y a la ausencia total de oligosacáridos monoglucosilados formados *in vivo*.

En la **Figura 22** se muestran las diferentes vías de glicosilación y el procesamiento de los oligosacáridos tanto de las células WT de *S. pombe*, como de las mutantes GIIα⁻, GIIβ⁻ y GT⁻. Como se puede observar, únicamente las mutantes GIIα⁻ carecen absolutamente de oligosacáridos monoglucosilados, mientras que las mutantes GIIβ⁻ y GT⁻ presentan una disminución parcial en la formación de dichos oligosacáridos.

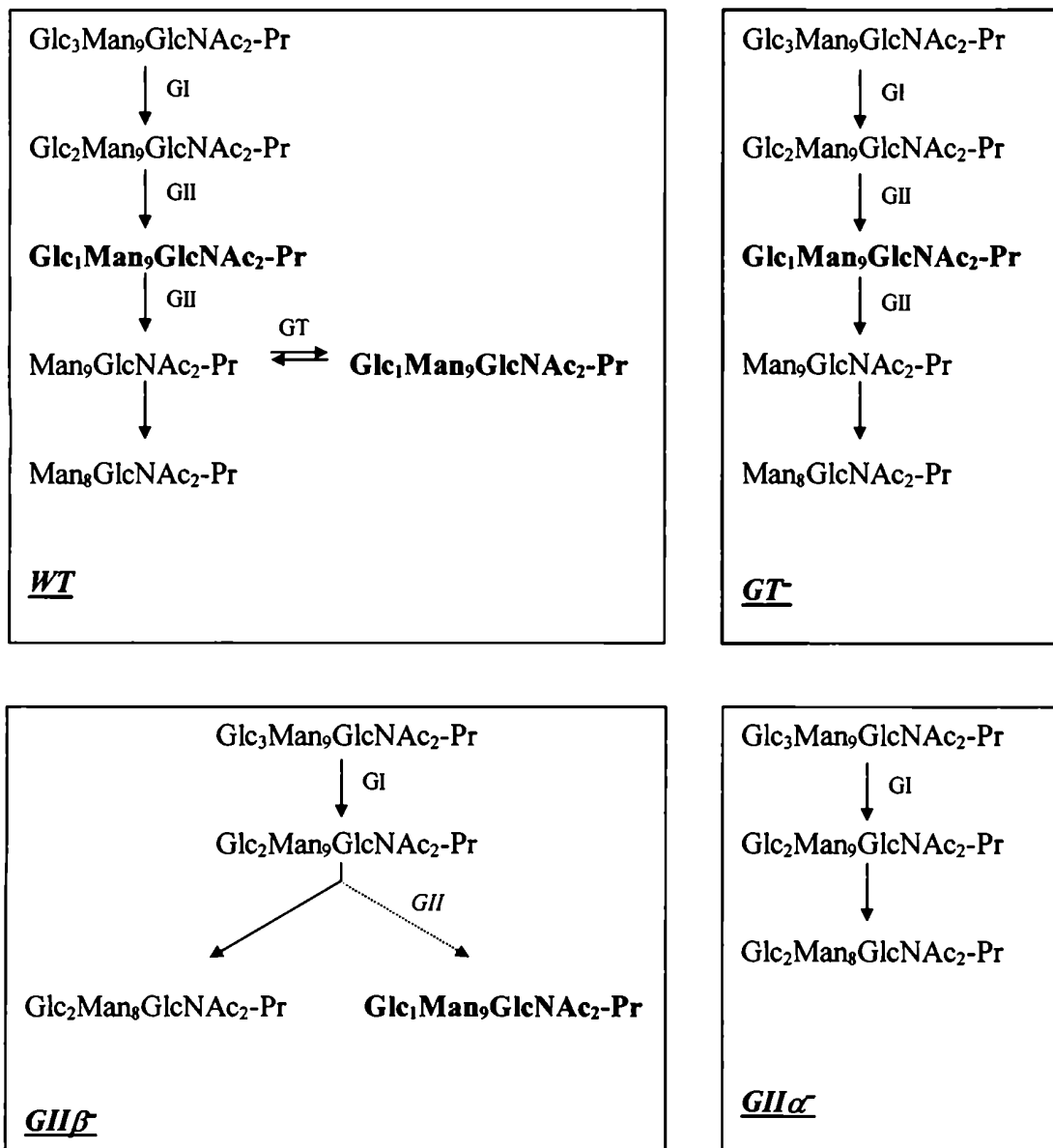


Figura 22. Rutas de glicosilación y procesamiento de oligosacáridos unidos a proteínas en el RE de células WT y en mutantes defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados. GI

Las células *S. pombe* carentes de oligosacáridos monoglucosilados son viables en un amplio rango de temperaturas

Las células $GII\alpha^-$ son incapaces de formar oligosacáridos monoglucosilados. Sin embargo, estas células son viables y cuando su crecimiento es comparado con el de células WT en condiciones normales de cultivo (medio rico, 28°C) no presenta diferencias, en términos de duración de período lag, velocidad de duplicación durante la fase exponencial, ni OD a 600nm en la fase estacionaria final.

Con el objetivo de ver si en una mutante incapaz de producir $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, un estrés adicional como es la incubación a una temperatura extrema provoca alguna alteración en el crecimiento, se analizó el crecimiento de células WT y $GII\alpha^-$ a tres temperaturas diferentes: 18°C, 28°C y 39°C. No se observaron diferencias entre las dos cepas en la velocidad de crecimiento a 18°C ni a 28°C y si bien existe un período de lag ligeramente mayor en la cepa GII^- a 39°C, tampoco a esta temperatura extrema hay diferencias en la velocidad de crecimiento una vez ingresada a la fase exponencial (**Figura 23**).

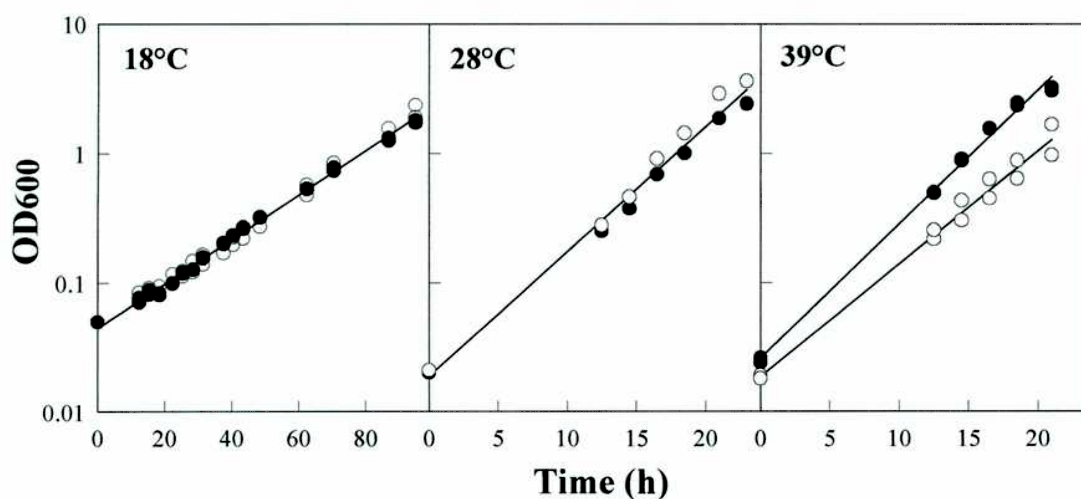


Figura 23. Crecimiento de cepas WT y mutante $GII\alpha^-$ a diferentes temperaturas. Las células WT (●) o $GII\alpha^-$ (○) fueron crecidas en medio YE suplementado con adenina a las temperaturas indicadas. Todos los cultivos se iniciaron a una $OD_{600nm} = 0.05$. Las determinaciones se hicieron por duplicado. En el gráfico se muestra la fase exponencial de las curvas de crecimiento, indicándose la OD a 600 nm en escala logarítmica.

Las mutantes de *S. pombe* $GII\alpha^-$ no presentan diferencias morfológicas con las células WT

Para determinar si existen diferencias morfológicas apreciables entre las células WT y las mutantes $GII\alpha^-$ incapaces de formar oligosacáridos monoglucosilados, ambas cepas fueron observadas al microscopio óptico de contraste de fases en distintas etapas de la curva de crecimiento. Las células mutantes $GII\alpha^-$ no presentaron diferencias morfológicas notables con las salvajes (**Figura 24**).

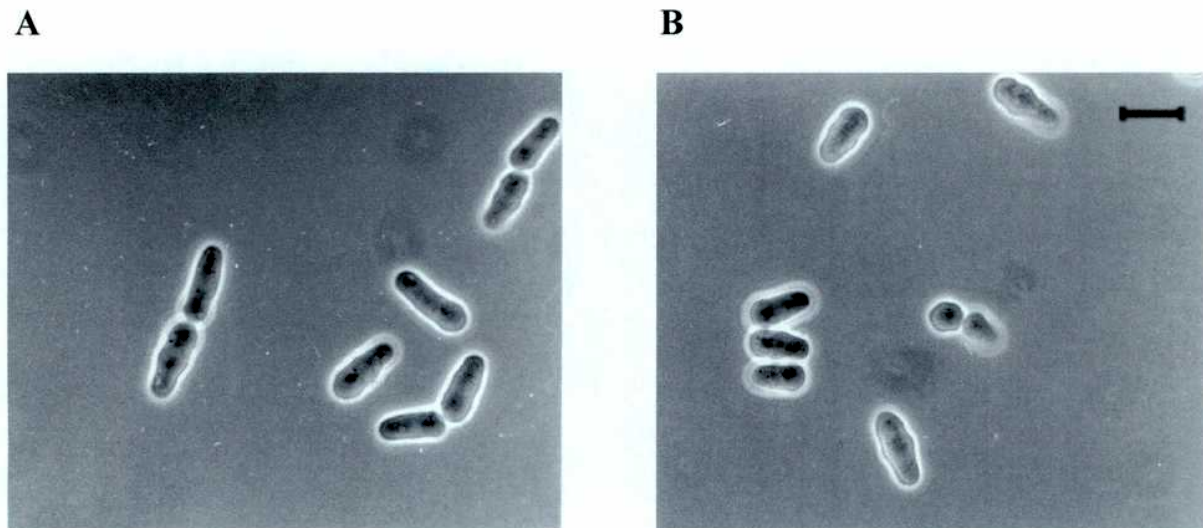


Figura 24. *Microscopía de contraste de fases de células WT y $GII\alpha^-$.* Células WT (A) y $GII\alpha^-$ (B) se crecieron en medio rico YE + adenina hasta la mitad de la fase exponencial. La barra equivale a 10 μm .

Hemos obtenido células de *S. pombe* a las que se les abolió totalmente la capacidad de formar oligosacáridos monoglucosilados. Las mutantes no presentaron diferencias morfológicas con las WT y mostraron ser viables a todas las temperaturas ensayadas. Estos experimentos demuestran que la formación de oligosacáridos monoglucosilados no es esencial para la viabilidad celular. Se ha reportado que la disrupción del gen que codifica la CNX en *S. pombe* es letal (71, 72). Dado que hemos demostrado que los oligosacáridos monoglucosilados que se unen a la CNX no son esenciales, alguna otra función adicional que la hace indispensable debe postularse para la CNX, quizá relacionada con la interacción con otras chaperonas del RE o con la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} (Ver Discusión).

III - LOS OLIGOSACÁRIDOS MONOGLUCOSILADOS FACILITAN EL PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS EN *S. pombe*

Si bien como se demostró anteriormente la formación de oligosacáridos monoglucosilados N-unidos a proteínas ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) no es esencial para la viabilidad celular de *S. pombe* en condiciones normales, recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que la formación de oligosacáridos monoglucosilados es esencial para la viabilidad de dicha levadura en condiciones de estrés severo del RE como ser simultáneamente la hipoglicosilación de proteínas y alta temperatura (88). No se presentó evidencia de que los oligosacáridos monoglucosilados facilitaran el plegamiento de las glicoproteínas en esta levadura.

Se planteó la hipótesis de que si los oligosacáridos monoglucosilados de las glicoproteínas facilitan su plegamiento, como propone el modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE, entonces su ausencia debería conducir a una acumulación de glicoproteínas mal plegadas en el RE aún en ausencia de un estrés exógeno. Por otra parte, la velocidad de arribo de glicoproteínas a sus destinos finales debería verse alterada, ya que el paso limitante en la secreción es precisamente el plegamiento de las proteínas en el RE.

La función de los oligosacáridos monoglucosilados en facilitar el plegamiento de glicoproteínas en el RE de *S. pombe* en condiciones normales de crecimiento se analiza en esta sección.

Acumulación de glicoproteínas mal plegadas con oligosacáridos RE-específicos en mutantes defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados

Las mutantes $\text{GII}\alpha^-$ y GT^- presentan una alta proporción de oligosacáridos específicos del RE

En células de *S. pombe* WT el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transferido a las proteínas es procesado en el RE a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y luego elongado en el Golgi por la adición de unidades de manosa y galactosa por manosil- y galactosil-transferasas (14, 97). Si los oligosacáridos monoglucosilados facilitaran el plegamiento de las glicoproteínas, las mutantes en las cuales la formación de dichos compuestos está abolida completamente ($\text{GII}\alpha^-$) o parcialmente (GT^- , ver **Figura 22**) deberían mostrar una acumulación de glicoproteínas mal plegadas que posean oligosacáridos RE-específicos y una disminución de oligosacáridos con modificaciones típicas del compartimento de Golgi en condiciones normales de crecimiento de estas levaduras.

Con el objetivo de analizar la composición de los oligosacáridos N-unidos a proteína en mutantes de *S. pombe* defectuosas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados, células WT y mutantes $\text{GII}\alpha^-$ y GT^- se crecieron a 28°C en medio rico hasta la mitad de la fase exponencial y se marcaron durante 60 min con $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$, seguido de un chase de 30 min con un exceso de monosacárido frío. La incubación con la marca durante un tiempo prolongado permite analizar tanto los oligosacáridos del RE como las elongaciones que se les producen a los oligosacáridos correctamente plegados que prosiguen la vía secretoria. Se obtuvieron las proteínas

totales de las tres cepas, y se liberaron y purificaron los oligosacáridos sensibles a Endo H, que se analizaron en una cromatografía en papel. Los resultados se muestran en la **Figura 25**.

El patrón de oligosacáridos de las cepas *S. pombe* mutantes mostró grandes diferencias con el de células WT (**Figura 25**). En las células WT los oligosacáridos RE-específicos $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ son componentes relativamente menores de los oligosacáridos unidos a proteínas y hay un patrón complejo de oligosacáridos de mayor tamaño del tipo de los procesados en Golgi (A). En las células mutantes los oligosacáridos obtenidos fueron principalmente los específicos del RE: $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_2\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ en las mutantes $\text{GII}\alpha^-$ (B) y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ en mutantes GT^- (C). El aumento en la proporción de oligosacáridos típicos del RE a oligosacáridos complejos de mayor tamaño, observado en las células defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados crecidas en ausencia de estrés adicional, indica que hay una retención de glicoproteínas en el RE de estas mutantes.

Las células WT tratadas con DTT presentan un patrón de oligosacáridos similar al de las mutantes en ausencia del agente reductor.

Para analizar si el mal plegamiento de glicoproteínas fue responsable de la acumulación de especies que poseen oligosacáridos RE-específicos en las mutantes $\text{GII}\alpha^-$ y GT^- , se comparó el patrón de oligosacáridos en estas células con el de células WT tratadas con DTT. Este agente reductor previene el plegamiento correcto de glicoproteínas del RE que contienen puentes disulfuro (98, 99, 86). Las levaduras WT se marcaron como antes 60 min con $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ pero en presencia de DTT 5 mM. Como se muestra en la **Figura 25 D**, en presencia de DTT las células WT acumularon glicoproteínas conteniendo $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, oligosacáridos específicos de RE. También se observaron tres oligosacáridos más largos que los mencionados, que probablemente correspondan a glicoproteínas que no poseen puentes disulfuro. Es decir, el patrón de oligosacáridos en las células salvajes tratadas con un agente reductor que previene el plegamiento de glicoproteínas es similar al de las mutantes con alteraciones en la capacidad de formar oligosacáridos $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en ausencia de la droga, a excepción de las dos Glc adicionales presentes en los oligosacáridos de las mutantes $\text{GII}\alpha^-$.

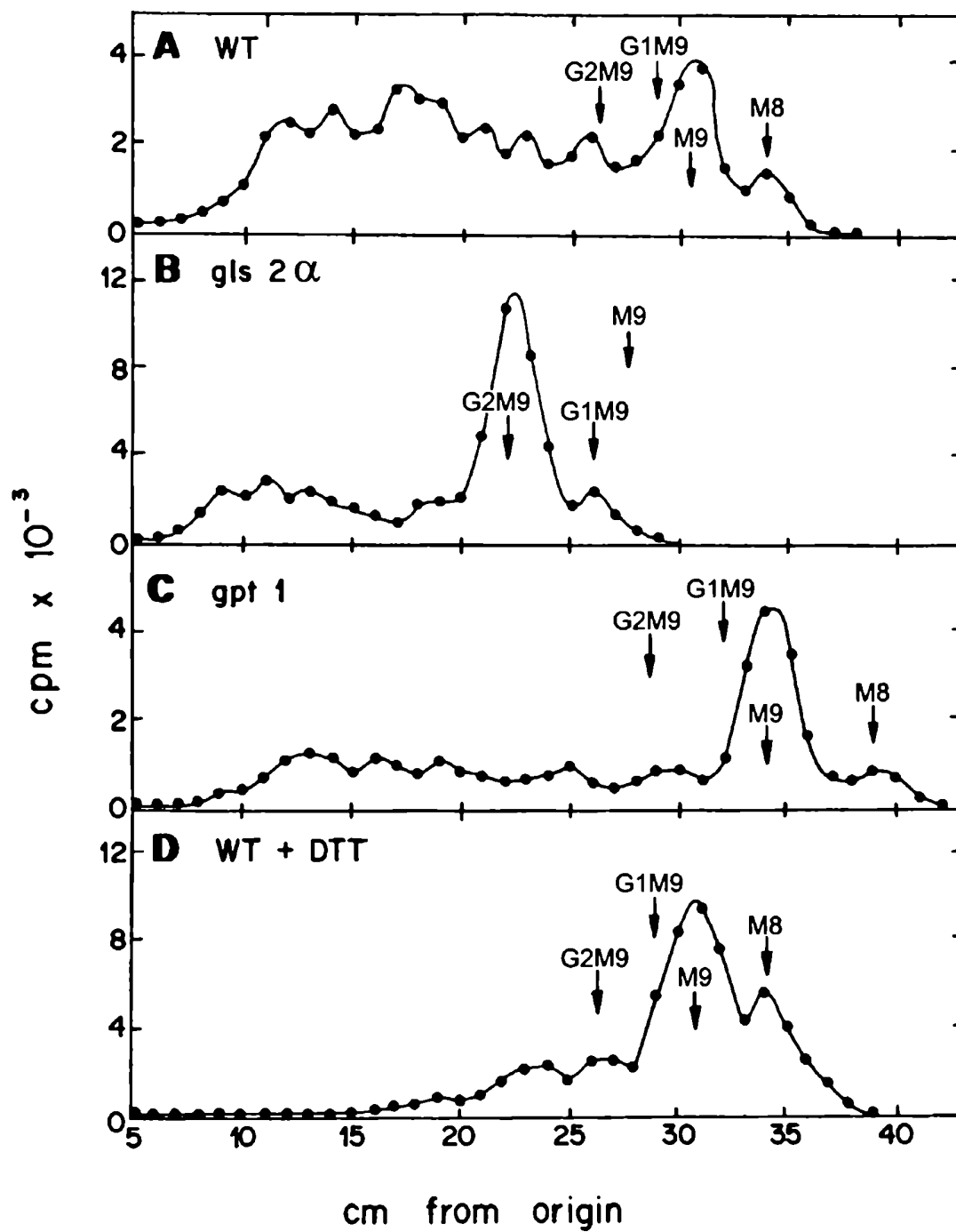


Figura 25. Acumulación de glicoproteínas con oligosacáridos específicos del RE en *S. pombe* defectivas total (*GII α*) o parcialmente (*GT*) en la formación de oligosacáridos monoglucosilados. Células WT (A y D), *GII α* ⁻ (B) y *GT* (C) se incubaron con [¹⁴C]Glc por 60 min seguido de 30 min de chase con un exceso de Glc sin marcar. Los oligosacáridos liberados de las proteínas con Endo H fueron corridos en una cromatografía en papel con 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:4). En D, se agregó DTT 5 mM 5 minutos antes que la marca. *Estándares:* G2M9, Glc₂Man₉GlcNAc; G1M9, Glc₁Man₉GlcNAc; M9, Man₉GlcNAc y M8, Man₈GlcNAc.

Las mutantes defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados presentan UPR

La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE conduce a una respuesta llamada “respuesta a proteínas mal plegadas” o UPR (por Unfolded Protein Response), que consiste en la inducción de RNAs mensajeros que codifican para chaperonas y proteínas de plegamiento del RE (100). La chaperona BiP pertenece a la familia de las Hsp70 y se une en forma transitoria a una variedad de proteínas mal plegadas, mutantes, o parcialmente ensambladas y es requerida para el correcto plegamiento de proteínas en el RE. Los tratamientos que causan una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (agregado de tunicamicina, shock de calor, ionóforos de calcio, etc.) inducen la expresión de BiP (101). La detección de la UPR en *S. pombe* es bastante simple dado que en estas levaduras las condiciones que provocan la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE desencadenan la inducción tanto del mRNA normal codificante de BiP (una de las chaperonas más abundante del RE) como la de otro de menor tamaño. El mRNA normal de la BiP tiene una longitud de 2.5 kb y el que aparece durante la UPR 2.4 kb.

Si los oligosacáridos monoglucosilados están involucrados en la facilitación del plegamiento de glicoproteínas, se espera que haya un aumento de la UPR (evidenciado por la inducción del mRNA de BiP) en mutantes de *S. pombe* incapaces de formar derivados monoglucosilados ($GII\alpha^-$) o en aquellas en que su formación está severamente disminuida ($GII\beta^-$ y GT^-) (ver **Figura 22**). Se extrajo RNA total de células salvajes y mutantes crecidas hasta la misma $OD_{600\text{ nm}}$ en ausencia de estrés exógeno (a 28°C y en medio rico) y se analizó mediante un Northern Blot la expresión del mRNA de BiP y de los mensajeros constitutivos de la actina (**Figura 26**).

En todas las mutantes que tienen afectada total o parcialmente la formación de oligosacáridos monoglucosilados, se observó además de la banda de BiP del tamaño normal, la aparición del mensajero de menor tamaño, indicativo de una respuesta UPR. El mensajero más corto no está presente en células WT (**Figura 26 A**). Los resultados fueron escaneados y las intensidades obtenidas para los mRNA de BiP fueron normalizadas con las obtenidas para el mRNA de actina. Los valores obtenidos para células WT se tomaron con valor 1. En tres experimentos independientes los valores obtenidos fueron 1.8, 2.6 y 2.2 para células $GII\alpha^-$ y 2.4, 2.7 y 2.1 para células GT^- . En dos experimentos, los valores del cociente obtenidos para células $GII\beta^-$ fueron 2.1 y 2.2. (**Figura 26 B**).

Se puede concluir que en condiciones normales de crecimiento, se acumulan proteínas mal plegadas en el RE de células incapaces de formar derivados monoglucosilados ($GII\alpha^-$), de células en que su formación está disminuida ($GII\beta^-$) o de células que son incapaces de formar oligosacáridos monoglucosilados vía reglucosilación por GT (GT^-).

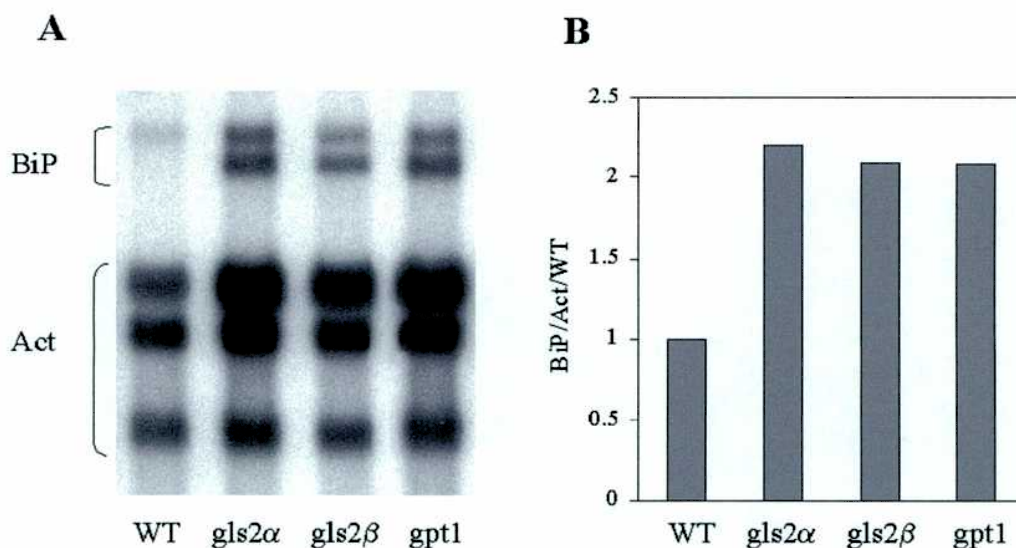


Figura 26. Inducción del mRNA de BiP en células de *S. pombe* defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados. **A:** Se extrajo RNA total de células de *S. pombe* salvaje (WT) o mutantes en los genes *gls2α*, *gls2β* y *gpt1* (células $GII\alpha^-$, $GII\beta^-$ y GT^- respectivamente) crecidas en condiciones normales (28°C en medio rico YE) hasta la mitad de la fase exponencial. Se realizó un Northern Blot utilizando como sondas simultáneamente DNA codificante para BiP y para actina. Las posiciones de los dos mensajeros de BiP o actina se indican por medio de una llave. **B:** Los resultados que se muestran en A fueron escaneados en autorradiogramas menos expuestos para asegurar la proporcionalidad de las intensidades y cuantificados con el programa NIH Image. Los cocientes de las intensidades de mRNA BiP/Act se representan en las ordenadas. El valor obtenido para células WT se tomó con valor 1.

Procesamiento de CPY en células que no poseen oligosacáridos monoglucosilados

Ha sido reportado que la interacción de las glicoproteínas con CNX/CRT a través de sus oligosacáridos monoglucosilados retrasa la velocidad pero aumenta la eficiencia del plegamiento de hemaglutinina del virus de influenza traducida en un sistema de reticulocitos de conejo/pancreas de perro (80). Para analizar si lo mismo ocurre en *S. pombe*, se utilizó como modelo a la CPY. La CPY es una serin carboxipeptidasa glicosilada de vacuola (que equivale al lisosoma de mamíferos). Un análisis de pulso y "chase" y posterior inmunoprecipitación de la CPY demostró que en *S. pombe* esta proteasa se sintetiza como un pre-pro-precursor y se transloca al lumen del RE, donde ocurre el clivado del péptido señal y la N-glicosilación (102). La forma de RE de la CPY es una proteína de 110 kDa. Esta es transportada al Golgi y luego a la vacuola donde es procesada proteolíticamente a una especie de 51 kDa con un puente disulfuro intramolecular. Esta forma intermedia a su vez es clivada por proteasas de la vacuola a un heterodímero formado por dos polipéptidos de 19 y 32 kDa unidos por el puente disulfuro. Esta última subunidad se detectó por SDS-PAGE en condiciones reductoras con un antisuero específico (**Figura 27**).

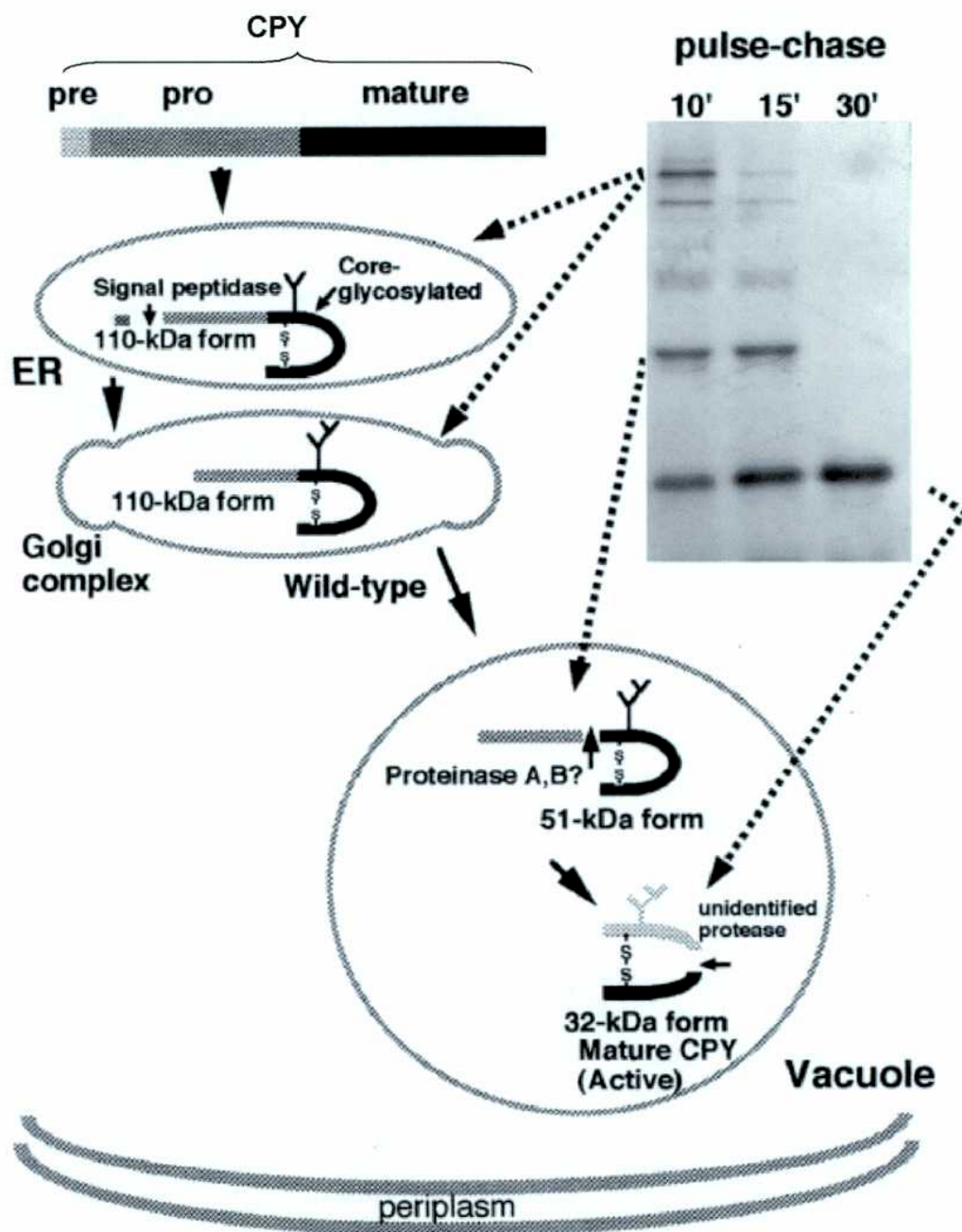


Figura 27. Modelo para el camino biosintético de la CPY de *S. pombe*. Tomado parcialmente de referencia 102. Ver el texto para detalles.

Se analizó la velocidad y la eficiencia del plegamiento de la CPY de *S. pombe* mediante un experimento de pulso y chase y posterior inmunoprecipitación de la forma madura de la proteasa. Células enteras WT y $GII\alpha^-$ fueron depletadas de Met y marcadas con $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ y $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ por 10 min. Se agregaron luego un exceso de Met y Cys sin marca, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de chase y se inmunoprecipitó la CPY como se describe en materiales y métodos. El antisuero utilizado para la inmunoprecipitación reconoce específicamente el fragmento de 32 kDa. Las muestras inmunoprecipitadas se sometieron luego a una electroforesis en condiciones reductoras seguida de autoradiografía. En la **Figura 28** se muestra la progresión de la aparición de la banda de 32 kDa para las cepas WT y mutante.

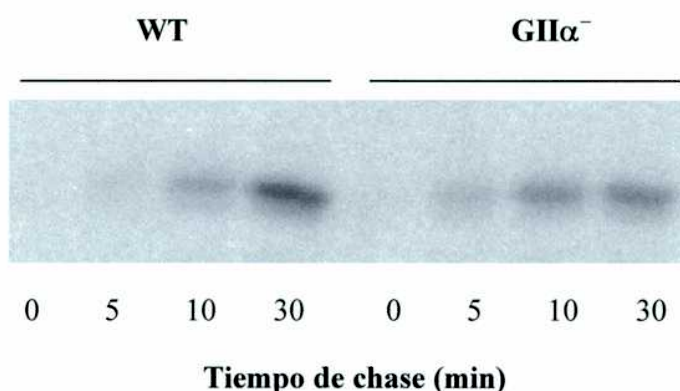


Figura 28. Procesamiento de CPY en células WT y $GII\alpha^-$. Células salvajes o mutantes fueron marcadas por 10 min con $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ y $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ y sometidas a distintos tiempos de chase. La CPY fue inmunoprecipitada y corrida en SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Las autorradiografías fueron escaneadas y las intensidades de la banda de 32 kDa cuantificadas y normalizadas respecto de la marca en proteínas celulares totales precipitada por 10% TCA en cada muestra. Para analizar la *velocidad* de secreción las intensidades normalizadas de las muestras a los 30 min de chase de cada cepa fueron consideradas como 100% y se graficaron las intensidades relativas a este valor de cada punto (**Figura 29 A**). Se puede observar que la CPY llega más rápido a la vacuola en células $GII\alpha^-$ que en células WT.

Para analizar la *eficiencia* de secreción, la intensidad de la muestra de 30 min de chase de la cepa WT fue considerada como 100% y tanto las intensidades de las muestras WT como $GII\alpha^-$ se graficaron relativas a ese valor (**Figura 29 B**). Se puede observar que la cantidad de CPY madura que llegó a la vacuola en la cepa incapaz de formar oligosacáridos monoglucosilados fue aproximadamente la mitad que en la salvaje.

Se puede concluir por lo tanto que tal como fue descripto para células de mamífero, en células intactas de *S. pombe* la formación de oligosacáridos monoglucosilados reduce la velocidad de plegamiento, pero incrementa la eficiencia de este proceso, de manera que facilita el plegamiento de las glicoproteínas.

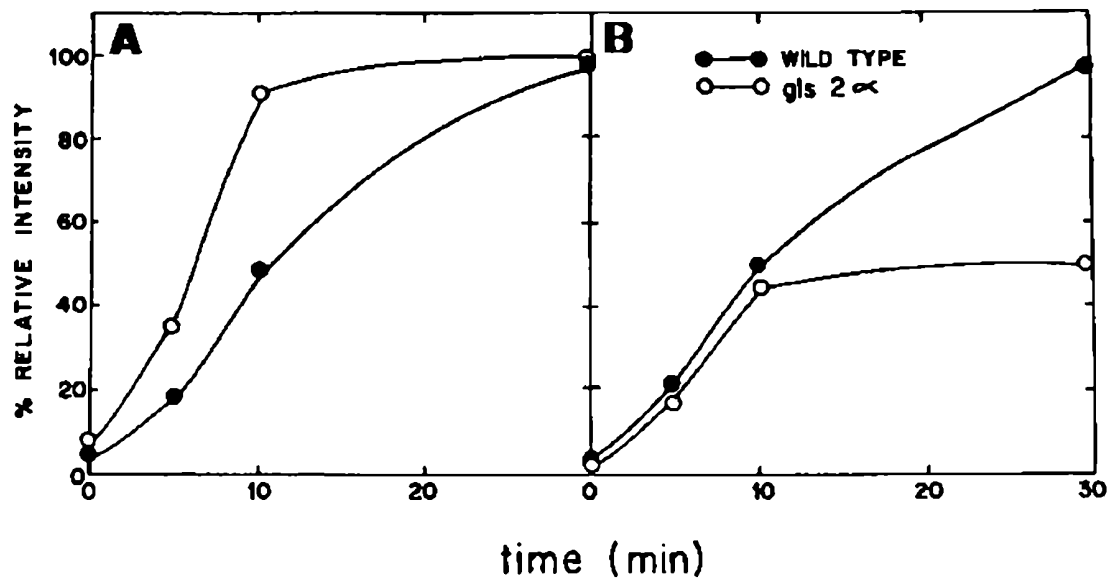


Figura 29. Velocidad y eficiencia de secreción de CPY en células WT y *GIIα*⁻. La autorradiografía presentada en la figura 15 fue escaneada y las intensidades de las bandas fueron normalizadas respecto de la marca precipitada con 10% TCA de cada muestra. En A, las intensidades relativas de las muestras a los 30 min de chase de cada cepa fueron consideradas como 100% (velocidad de secreción). En B, la intensidad relativa de la muestra de 30 min de chase de la cepa WT fue considerada como 100% para todas las muestras (eficiencia de secreción).

IV - UNA CONFORMACIÓN MAL PLEGADA NO ES CONDICIÓN SUFICIENTE PARA LA GLUCOSILACIÓN *IN VIVO* POR LA GT

La GT, enzima responsable de la glucosilación transitoria de oligosacáridos en el RE, es un elemento central en el control de calidad de glicoproteínas en el RE. En ensayos libres de células, esta enzima glucosila únicamente glicoproteínas desnaturalizadas pero no aquellas que adoptaron su estructura terciaria nativa (33). Esta propiedad es compartida por las GT purificadas de muy diversas fuentes como ser mamíferos, levaduras e insectos. Una conformación mal plegada del sustrato glicosilado, mostró ser condición necesaria y suficiente para la glucosilación de glicoproteínas *in vitro*. El objetivo del presente trabajo es determinar si dicha conformación es una condición suficiente para la glucosilación *in vivo* de los N-oligosacáridos por la GT.

Para promover el mal plegamiento de glicoproteínas en el RE de células intactas han sido utilizados varios procedimientos. Los más comúnmente usados son la inhibición de la glucosilación, el agregado de un ionóforo de calcio al medio, el agregado de un agente reductor o un “shock” de calor. Para este trabajo, los dos primeros fueron descartados debido a que la glucosilación de proteínas es precisamente el objeto de estudio y carece de sentido su inhibición y además la GT requiere Ca^{2+} para su actividad, por lo que no es factible la utilización de un ionóforo de Ca^{2+} . Por lo tanto, la glucosilación de glicoproteínas fue estudiada en células de *S. pombe* en condiciones de mal plegamiento de las mismas provocado por un agente reductor (DTT) o calor (37°C).

Para analizar exclusivamente la glucosilación proveniente de la GT se requiere una doble mutante *S. pombe* $\text{GII}\alpha^-/\text{ALG6}^-$

Se ha reportado que en células de *S. pombe* WT el oligosacárido transferido a las proteínas, de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, es deglucosilado a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en el RE y que el procesamiento posterior en el Golgi de estas levaduras involucra la adición de unidades de Man y Gal (14). En estas células, los oligosacáridos monoglucosilados que se producen pueden provenir tanto de la actividad GT como de la deglucosilación parcial del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transferido. Con el fin de asegurar que la glucosilación ensayada en un análisis de oligosacáridos unidos a proteínas *in vivo* provenga únicamente de la actividad de GT, se requiere del uso de una mutante ALG6^- . El gen *alg6* (por “asparagine linked glycosylation”) codifica la glucosiltransferasa dolicol-P-Glc dependiente, que transfiere la primera unidad de glucosa a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (residuo I en **Figura 1**), de manera que en una mutante en este gen el oligosacárido transferido a las cadenas polipeptídicas nacientes es de composición $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (88). Los oligosacáridos de composición $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ provendrán entonces únicamente de la actividad GT.

Requerimiento de una mutante *GIIα*⁻

Células de *S. pombe* WT crecidas en medio rico y luego privadas de Glc, fueron incubadas en medio YNB con [¹⁴C]Glc durante 15 min en presencia o ausencia de DNJ, un inhibidor de GI y GII. Se extrajeron las glicoproteínas, se purificaron los oligosacáridos sensibles a Endo H y se analizaron por cromatografía en papel como se describe en materiales y métodos. El tratamiento con DNJ de las células, produjo la síntesis de Glc₂Man₉GlcNAc₂, Glc₁Man₉GlcNAc₂, Man₉GlcNAc₂ y Man₈GlcNAc₂ (Figura 30 A). La omisión del inhibidor de glucosidasas produjo en cambio sólo Man₉GlcNAc₂ y Man₈GlcNAc₂ (Figura 30 B). Esto mostró que la deglucosilación del oligosacárido transferido Glc₃Man₉GlcNAc₂ es extremadamente rápida en *S. pombe* y que el DNJ *in vivo* no afectó la actividad GI y sólo inhibió parcialmente la actividad GII.

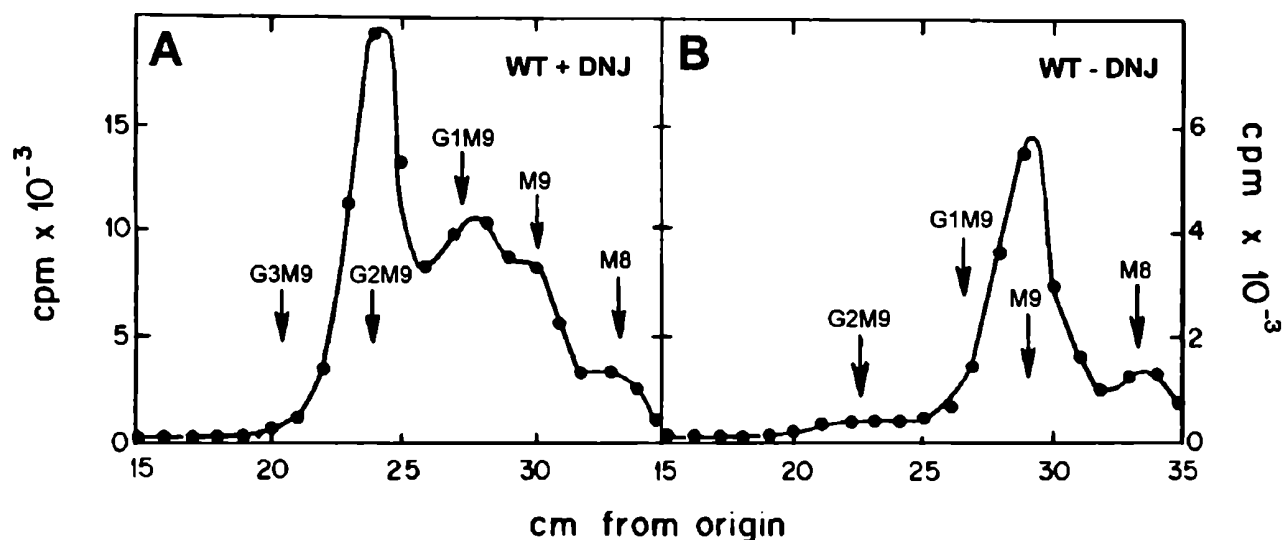


Figura 30. Inhibición parcial de actividades GI y GII en el tratamiento con DNJ *in vivo*. Células de *S. pombe* WT fueron preincubadas en presencia (A) o ausencia (B) de DNJ 5 mM por 15 min y luego marcadas con [¹⁴C]Glc por el mismo periodo de tiempo a 28°C. Los oligosacáridos Endo H sensibles se cromatografiaron en papel con solvente A. *Estándares:* G3M9, Glc₃Man₉GlcNAc; G2M9, Glc₂Man₉GlcNAc, G1M9, Glc₁Man₉GlcNAc, M9, Man₉GlcNAc y M8, Man₈GlcNAc.

Debido entonces a que el uso de DNJ solo produce una inhibición parcial de las actividades glucosidasas y para evitar que la Glc agregada por la GT sea removida por la GII y sea posible analizarla, se requiere que la mutante ALG6⁻ sea además *GIIα*⁻. En la Figura 31 se muestra un esquema del procesamiento de oligosacáridos unidos a glicoproteínas en células WT, ALG6⁻ y *GIIα*⁻/ALG6⁻.

Construcción de doble mutante *S. pombe* $GII\alpha^-/ALG6^-$

Para obtener *S. pombe* $GII\alpha^-/ALG6^-$, necesarias para el análisis de la glucosilación *in vivo* por la GT, se partió de la mutante $GII\alpha^-$ (h^{90} , *ura4-D18*, *ade6-M216*, *leu1-32*, *gls2 α ::ura4⁺*), a la que fue necesario eliminarle el marcador de selección *ura4⁺*. Esto se realizó por recombinación del genoma mutado *gls2 α ::ura4⁺* con un fragmento lineal conteniendo una parte de ambos genes (ver Materiales y Métodos). El reemplazo del gen *ura4⁺* por un DNA lineal que contiene el gen deletado *in vitro* convierte a las células a un fenotipo resistente a 5-FOA. Esta droga inhibe el crecimiento de células que poseen la enzima orotidina-5'-fosfato decarboxilasa activa (producto del gen *ura4⁺*) debido a la acumulación de un producto tóxico (87). Las células *Ura⁻* fueron entonces seleccionadas con 5-FOA y de esta manera se obtuvieron *S. pombe gls2 α ::ura4*, que carecen de actividad $GII\alpha$ y que además son auxótrofas para uracilo. Estas células fueron a su vez utilizadas para la transformación con un DNA lineal conteniendo el gen *alg6* interrumpido por *ura4⁺*, y se seleccionaron las colonias que convirtieron nuevamente a protótrofas para uracilo. De esta manera se generó la doble mutante $GII\alpha^-/ALG6^-$ (*gls2 α ::ura4 / alg6::ura4⁺*)

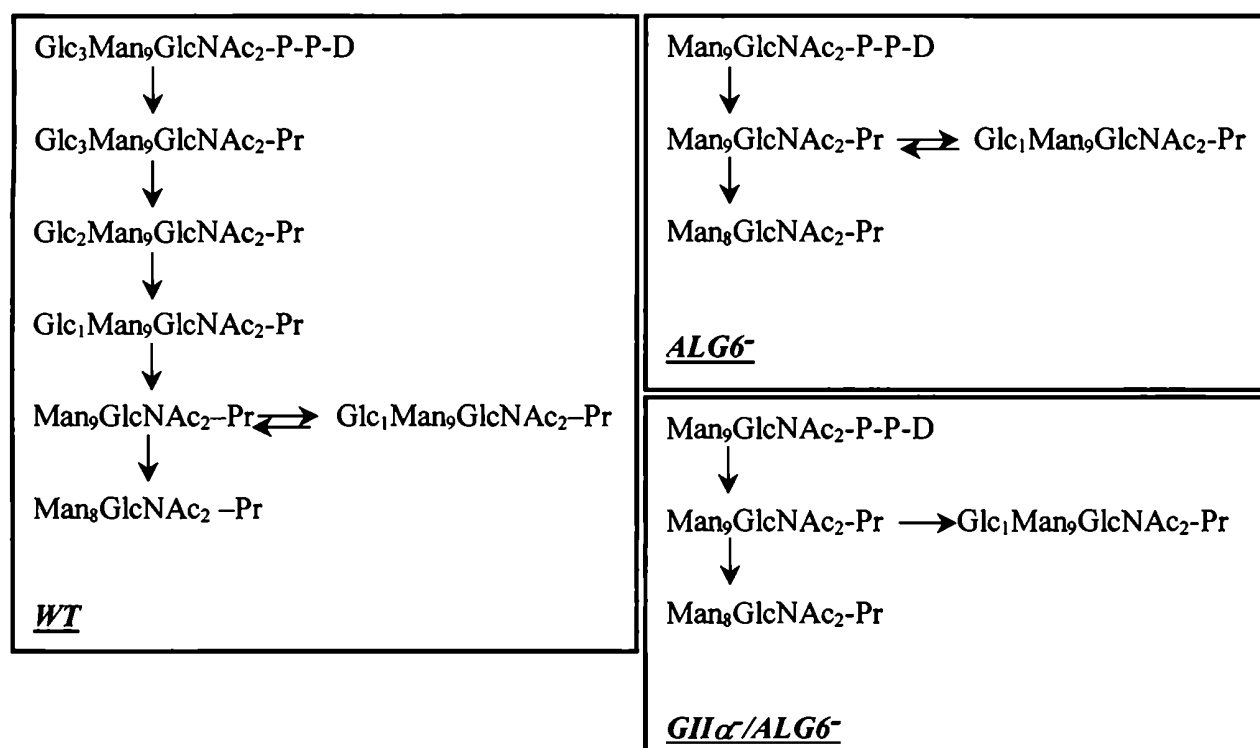


Figura 31. Esquema del procesamiento de los oligosacáridos en el RE de las células de *S. pombe* WT, $ALG6^-$ y $GII\alpha^-/ALG6^-$. D: dolicol. Pr: proteína.

Caracterización genética de *S. pombe* doble mutante

Para verificar que las *S. pombe* que recuperaron la capacidad de crecer en ausencia de uracilo luego de la transformación con la construcción *alg6::ura4⁺* eran efectivamente las doble mutantes *gls2 α ::ura4/alg6::ura4⁺* buscadas, el DNA preparado de células WT, *GII α ⁻* y *GII α /ALG6⁻* se analizó por PCR. Se utilizaron dos pares de primers sobre cada DNA, uno específico para el gen *alg6⁺* (par A) y otro para el gen *gls2 α* . (par G). En el par A (A6S/uraSC), el primer A6S es complementario a una región de *alg6* hacia el extremo 5' del gen, por fuera del fragmento utilizado para realizar la transformación, y uraSC es complementario al gen *ura4⁺*. En el par G (GIISb/GIIAb) ambos primers son complementarios a porciones del gen *gls2 α* flanqueantes a la delección. En la **Figura 32** se esquematizan las posiciones de los primers y el tamaño esperado de la amplificación por PCR.

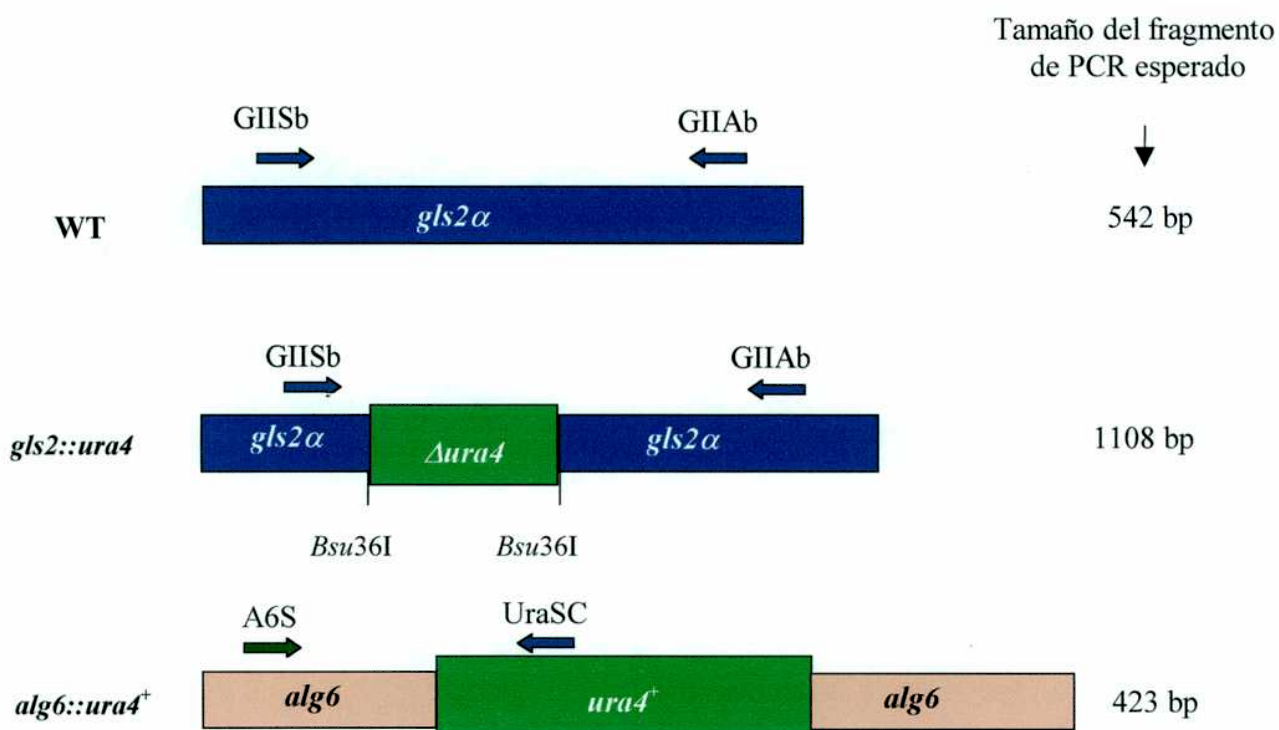


Figura 32. Esquema de genes *gls2 α ⁺*, *gls2 α ::ura4* y *alg6::ura4⁺*. Se indican las posiciones de los oligonucleótidos y tamaño esperado en una amplificación por PCR. La secuencia de dichos oligonucleótidos se detalla en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 33** cuando la reacción de PCR se realizó usando el par G de oligonucleótidos se obtuvo la banda esperada de 542 pb sobre el DNA WT y bandas de 1108 pb utilizando DNA de ambas mutantes $GII\alpha^-$ como templado. Cuando el par utilizado fue el par A no se amplificaron bandas por PCR sobre DNA de células WT o $GII\alpha^-$, pero el fragmento esperado de 423 pb se sintetizó con el DNA de las dobles mutantes $GII\alpha^-/ALG6^-$.

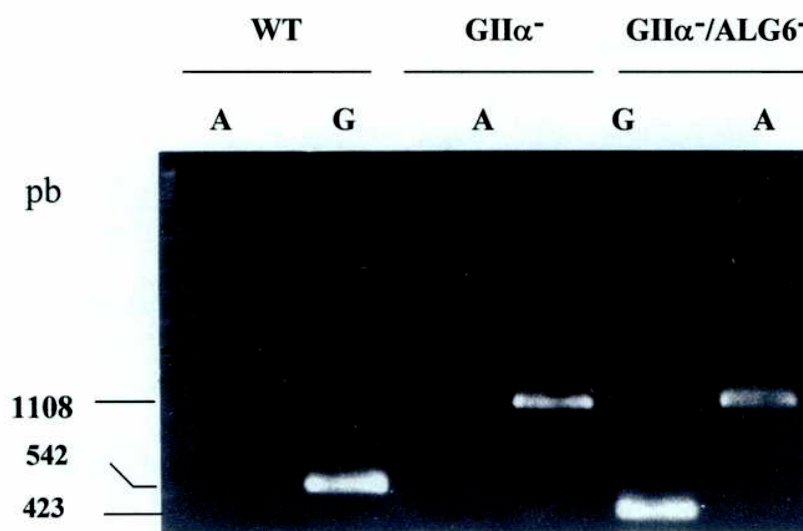


Figura 33. Caracterización genética de *S. pombe* doble mutantes $GII\alpha^-/ALG6^-$. Se realizaron reacciones de PCR usando DNA de células WT, $GII\alpha^-$ (*gls2 α ::ura4*) y $GII\alpha^-/ALG6^-$ (*gls2 α ::ura4/alg6::ura4*) como templado, y los pares de primers A (A6S/uraSC) o G (GIIbS/GIIbA) según se indica. La secuencia de los primers se describe en Materiales y Métodos.

Caracterización bioquímica de la cepa de *S. pombe* doble mutante $GII\alpha^-/ALG6^-$

La doble mutante $GII\alpha^-/ALG6^-$ carece completamente de actividad GII:

Se prepararon microsomas de células *S. pombe* WT y doble mutantes, y se analizó la actividad GII como la capacidad de liberar $[^{14}C]Glc$ del sustrato $[^{14}C-Glc]Glc_1Man_9GlcNAc$. A juzgar por los resultados presentados en la **Figura 34 A**, la cepa $GII\alpha^-/ALG6^-$ carece completamente de actividad GII.

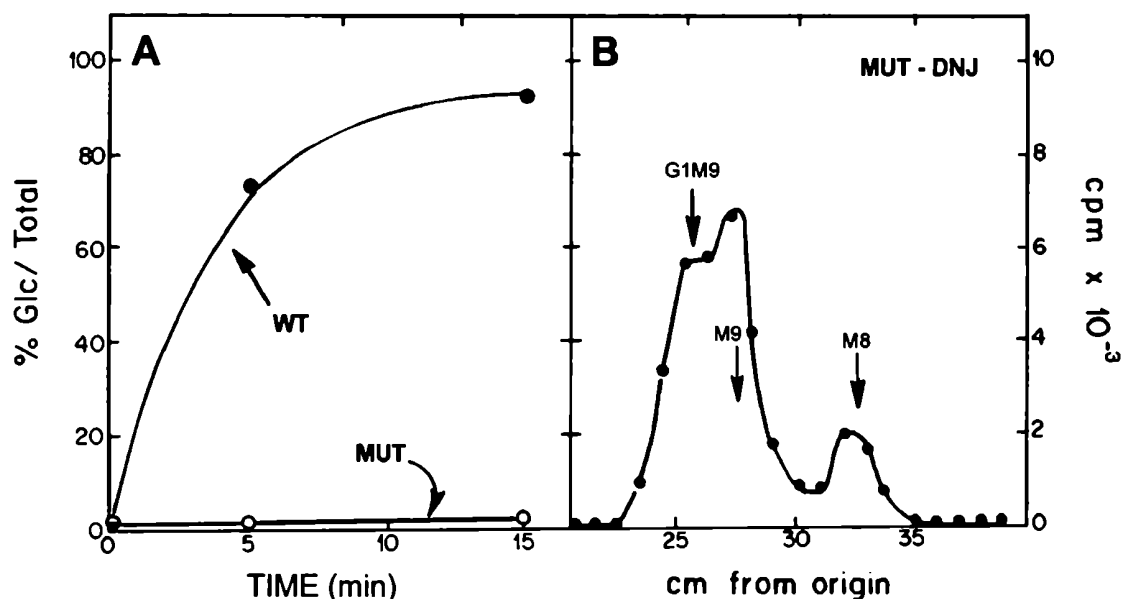


Figura 34. Caracterización bioquímica de células $GII\alpha^-/ALG6^-$. (A) Actividad GII: microsomas de células WT (●), o $GII\alpha^-/ALG6^-$ (○) se incubaron a 30°C por los tiempos indicados con $[^{14}C-Glc]Glc_1Man_9GlcNAc$ como sustrato para ensayar actividad GII. En las ordenadas se representa la actividad como % de $[^{14}C]Glc$ liberada respecto del total de marca (100% = 1150 cpm). (B) Marcación *in vivo* con $[^{14}C]Glc$ de *S. pombe* $GII\alpha^-/ALG6^-$: las levaduras fueron preincubadas en ausencia de DNJ por 15 min y luego marcadas con $[^{14}C]Glc$ por el mismo periodo a 28°C. Los oligosacáridos Endo H sensibles se cromatografiaron en papel con solvente A. Estándares: G1M9, $Glc_1Man_9GlcNAc$, M9, $Man_9GlcNAc$ y M8, $Man_8GlcNAc$.

Patrón de oligosacáridos unidos a proteína en la doble mutante a tiempos cortos (RE):

Células de *S. pombe* $GII\alpha^-/ALG6^-$ intactas fueron marcadas con $[^{14}C]Glc$ durante 15 min a 28°C, en ausencia de DNJ, y se analizaron los oligosacáridos N-unidos. Estas mutantes produjeron $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, $Man_9GlcNAc_2$ y $Man_8GlcNAc_2$ (**Figura 34 B**) unidos a proteínas. El mismo patrón fue obtenido cuando la incubación fue realizada en presencia de DNJ (resultado no mostrado), consistente con la ausencia de actividad GII. Comparando el patrón de oligosacáridos de la doble mutante (**Figura 34 B**) con el de la WT (**Figura 30 B**) en ausencia de DNJ. Se demostró que la mutante obtenida retiene la unidad de Glc agregada por la actividad GT, a juzgar por la presencia del oligosacárido $Glc_1Man_9GlcNAc_2$.

Caracterización fenotípica de la doble mutante $GII\alpha^-/ALG6^-$

Las células doble mutantes $GII\alpha^-/ALG6^-$ crecen en ausencia de estrés exógeno (medio rico YE a 28°C) a la misma velocidad que las células WT y ambas presentan la misma morfología bajo el microscopio óptico. Sin embargo, si son crecidas a 37°C estas células presentan una morfología termosensible, con forma de peras o redondeadas (88). Además, estas células presentan inducción del mensajero de BiP en condiciones normales de crecimiento, como se puede observar en la **Figura 35**

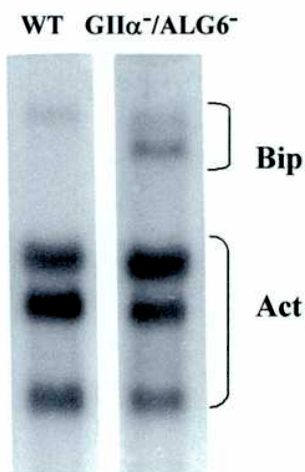


Figura 35. Inducción de BiP en doble mutantes $GII\alpha^-/ALG6^-$. Los mRNA de BiP y actina (Act) fueron detectados por Northern Blot en células WT y $GII\alpha^-/ALG6^-$ ($gls2\alpha::ura4/alg6::ura4^+$) crecidas en ausencia de estrés (medio YE, a 28°C) como se describe en Materiales y Métodos.

La explicación más plausible para esto último es que como estas células son $ALG6^-$, exista una hipoglicosilación de proteínas debido a que el oligosacárido transferido es $Man_9GlcNAc_2$ y no $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. En mutantes de *S. cerevisiae* que transfieren el oligosacárido no glucosilado existe un patrón de hipoglicosilación de la proteínas destinadas a la secreción, como es el caso de la invertasa o la CPY (10). En extractos libres de células fue demostrado que en la mayoría de las células eucarióticas el oligosacárido con las tres glucosas terminales ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) se transfiere con una eficiencia de 10 a 20 veces superior que $Man_9GlcNAc_2$ (92). Es más, la hipoglicosilación es uno de los factores que provocan la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (8, 50).

Para confirmar que existe hipoglicosilación en estas mutantes, células de *S. pombe* WT, $GII\alpha^-$ y $GII\alpha^-/ALG6^-$ fueron marcadas con una mezcla de $[^{35}S]Met$ y $[^{35}S]Cys$, lisadas en presencia de iodoacetamida y el material inmunoprecipitado con un suero policlonal anti-CNX fue sometido a un SDS-PAGE en condiciones reductoras. En la **Figura 36** se observa que mientras

una sola banda de CNX aparece en las células WT, en la doble mutante $GII\alpha^-/ALG6^-$ aparecen dos bandas. La diferencia de tamaño de estas dos bandas fue de aproximadamente 2 kDa, consistente con la presencia de un único oligosacárido en la CNX de *S. pombe* (71, 72). La mutante $GII\alpha^-$ produjo una sola banda que migró ligeramente menos que la de las células WT, consistente con el hecho de que en esta mutante el oligosacárido retiene dos unidades de Glc.

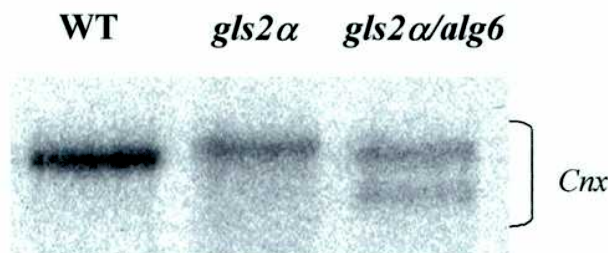


Figura 36. Hipoglicosilación de glicoproteínas en mutantes *S. pombe* $ALG6^-$. Células WT, $GII\alpha^-$ (*gls2 α*) y $GII\alpha^-/Alg6^-$ (*gls2 α /alg6*) se crecieron en medio YE, se cosecharon y lavaron. Luego fueron preincubadas en YNBD w/o (suplementado con adenina, leucina y uracilo) durante 2 h a 28° C e incubadas con [35 S]-Met y [35 S]-Cys 10 min a la misma temperatura. Se prepararon extractos celulares como se describe en Materiales y Métodos, y la CNX se inmunoprecipitó con suero anti-CN X 1/200. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE 9 % y reveladas por autoradiografía.

El DTT no induce un aumento de la glucosilación *in vivo* de glicoproteínas de *S. pombe*

El plegamiento incorrecto de glicoproteínas en *S. pombe* fue provocado por un agente reductor (DTT) o calor (37°C), y posteriormente se analizó si esos tratamientos inducen un aumento de la glucosilación por la acción de la GT *in vivo*.

Ha sido reportado que el agregado de DTT en concentraciones milimolares a células de mamíferos y de *S. cerevisiae* retrasa el plegamiento (y por lo tanto la secreción) de proteínas que contienen puentes disulfuro en el RE, al modificar el potencial redox del lumen de la organela. La remoción de la droga o la adición de glutatión oxidado permitió el correcto plegamiento y la secreción de las proteínas retenidas indicando que las especies retenidas no estaban en forma de agregados irreversibles (98, 99). Por otra parte, el plegamiento y la secreción de proteínas libres de puentes disulfuro no fueron afectados por DTT.

*El DTT no afecta la actividad enzimática de la GT de *S. pombe**

Previo a analizar el efecto del DTT en la glucosilación de glicoproteínas en células intactas de *S. pombe*, es necesario verificar que la concentración de DTT a utilizar (5 mM) no afecte la actividad GT en sí misma. Para ello se midió actividad GT en un ensayo libre de células usando tiroglobulina desnaturalizada como aceptor y microsomas de *S. pombe* WT como fuente de enzima. Los microsomas fueron preincubados 10 min en presencia o ausencia de DTT 5 mM. Los resultados se muestran en la **Tabla I**: las cpm incorporadas a tiroglobulina desnaturalizada son similares en ambos casos, por lo que se concluye que una concentración de DTT 5 mM no afecta la actividad de la GT.

Agregado	Resultado
-----	319-227
Tiroglobulina	3526-3519
Tiroglobulina + DTT	3520-3452

Tabla I. Efecto del DTT sobre la actividad GT. Se prepararon microsomas de *S. pombe* WT, y se preincubaron en presencia o ausencia de 5 mM DTT durante 10 min. Luego se agregaron tiroglobulina desnaturalizada y UDP-[¹⁴C]Glc, y se incubó por 30 min adicionales. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan las cpm presentes en el material insoluble en TCA 10 %.

El DTT no provoca un aumento de la glucosilación

Para determinar si la adición de DTT a células intactas promueve un aumento de la glucosilación de glicoproteínas, células *S. pombe* doble mutantes *GII α ⁻/ALG6⁻* fueron preincubadas por 10, 20 o 30 min en presencia o ausencia de DTT 5 mM y luego marcadas con [¹⁴C]Glc por 10 min. Las proteínas totales celulares fueron degradadas con una proteasa no específica (Pronasa) y los oligosacáridos Endo H sensibles fueron liberados de los glicopéptidos resultantes.

Los perfiles cromatográficos de los oligosacáridos obtenidos en todos los casos fueron muy similares (si no idénticos) y revelaron, como se esperaba, la presencia de Glc₁Man₉GlcNAc₂, Man₉GlcNAc₂ y Man₈GlcNAc₂. Una hidrólisis ácida fuerte de los oligosacáridos mostró la presencia de unidades de Glc y Man marcadas. Los patrones de oligosacáridos unidos a proteína de la preincubación por 30 min en presencia o ausencia de DTT, así como su respectiva composición de monosacáridos se muestran en la **Figura 37**. Como puede observarse, los perfiles cromatográficos de los oligosacáridos (**Figura 37 A y B**) y la de los monosacáridos (**Figura 37 C y D**) son prácticamente superponibles.

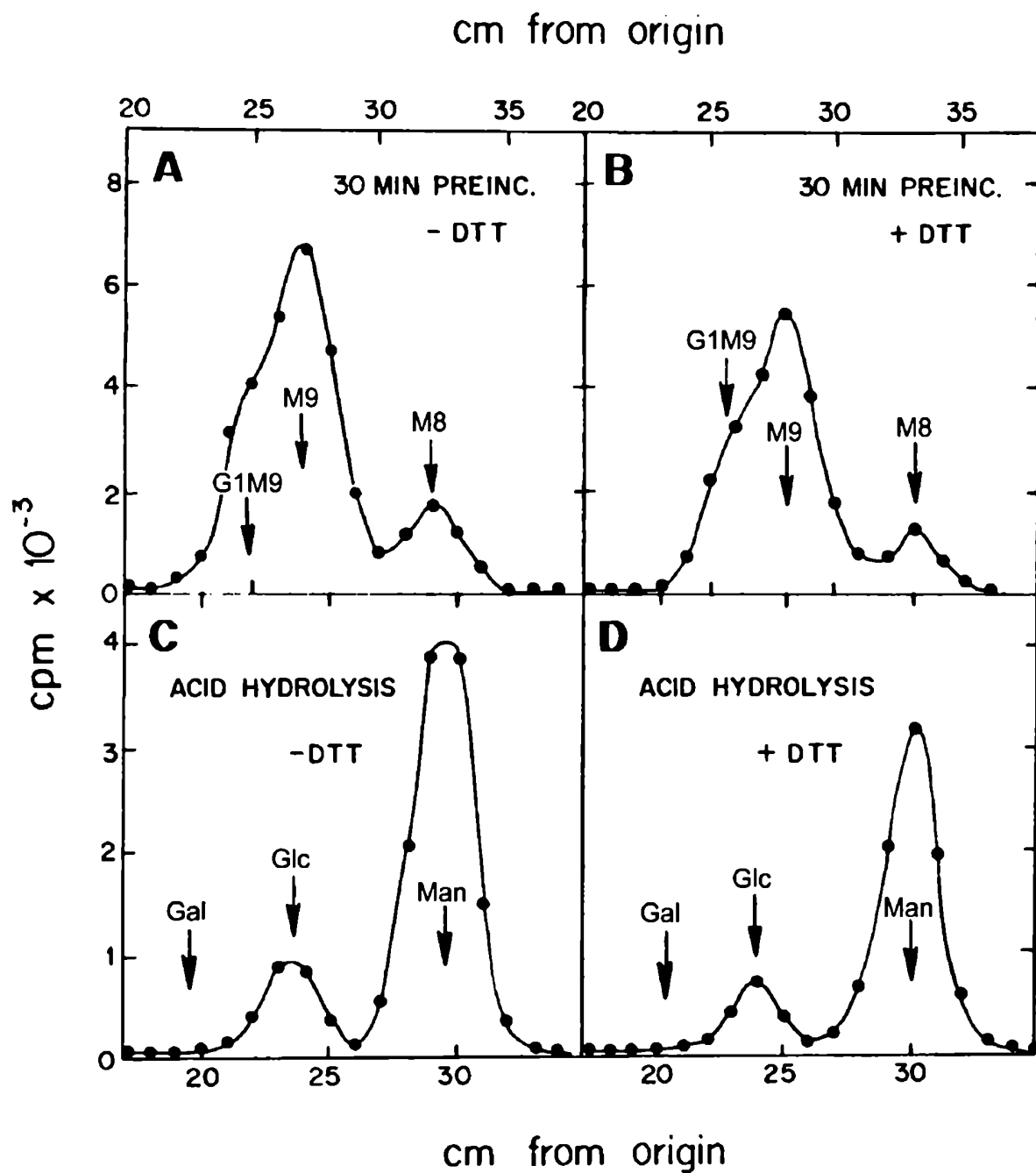


Figura 37. Efecto del DTT en la glucosilación de proteínas *in vivo*. *S. pombe* doble mutantes *GII α ⁻/ALG6⁻* fueron preincubadas 30 min a 28°C y luego incubadas por 10 min con [¹⁴C]Glc en ausencia (A) o presencia (B) de 5 mM DTT. Se obtuvieron los oligosacáridos liberados por tratamiento con Endo H y se sometieron a una cromatografía en papel con solvente A. Las sustancias de A y B fueron eluidas del papel, sometidas a una hidrólisis ácida fuerte y corridas en una cromatografía en papel con solvente B (C y D, respectivamente). Estándares: G1M9, Glc₁Man₉GlcNAc, M9, Man₉GlcNAc; M8, Man₈GlcNAc, Gal, galactosa, Man, manosa y Glc, glucosa.

Debido al corto período de incubación con la marca, no se produjeron modificaciones Golgi específicas (agregado de unidades de Gal y Man al oligosacárido Man₉GlcNAc₂) en las muestras incubadas o sin incubar con DTT. Por lo tanto, la marca en los residuos de Man en los oligosacáridos, es una indicación de *glucosilación* de proteínas, mientras que la marca en residuos de Glc es indicación de *glucosilación* de proteínas.

Para comparar la glucosilación de proteínas en las diferentes condiciones experimentales empleadas y para compensar las pérdidas diferenciales de muestras en la manipulación, la glucosilación de proteínas se expresó en todos los casos como la relación de marca en Glc sobre la presente en Man. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

Dado que fueron obtenidos valores similares en todos los casos, debe concluirse que *no ocurrió un aumento de glucosilación en presencia de DTT*. Es decir, la inducción de la formación de proteínas mal plegadas por DTT no altera la proporción de glicoproteínas con oligosacáridos monoglucosilados. Además, estos resultados muestran que no sólo la actividad GT sino también otros pasos involucrados en la glucosilación de proteínas (síntesis de UDP-Glc, transporte del nucleótido-azúcar a través de la membrana, etc.) no fueron afectados por el agente reductor.

Agregados	Pre-incubación	Glc/Man
---	10 min	0.18
DTT 5 mM	10 min	0.16
---	20 min	0.18
DTT 5 mM	20 min	0.17
---	30 min	0.18
DTT 5 mM	30 min	0.16

Tabla 2. *Efecto del DTT en la glucosilación de glicoproteínas in vivo.* Células de *S. pombe* GII α^- /ALG6 $^-$ fueron preincubadas por 10, 20 o 30 minutos en presencia o ausencia de DTT 5 mM. Luego se agregaron 150 μ Ci de [¹⁴C]Glc y se incubó 10 min más. Se obtuvieron los oligosacáridos unidos a proteína Endo H sensibles y se corrieron en una cromatografía en papel. Los picos se eluyeron y se sometieron a una hidrólisis ácida fuerte, que fue re-cromatografiada en papel con solvente B. Las cpm correspondientes al pico de Glc dividido las cpm correspondientes al pico de Man se indican para cada tratamiento. La marca en Glc es un indicador de glucosilación, mientras que la marca en Man es un indicador de glucosilación.

Posibles hipótesis para explicar que el DTT no induzca un aumento de la glucosilación.

Varias causas podrían ser responsables de la ausencia de una glucosilación aumentada de las glicoproteínas en el RE por la GT en presencia de DTT:

- 1) Contrariamente a lo que pasa en células de mamífero y de *S. cerevisiae*, el DTT a las concentraciones utilizadas no impide un plegamiento correcto de glicoproteínas en *S. pombe*.
- 2) Las mutantes GII α ⁻/ALG6⁻ tienen poca cantidad de GT y por lo tanto son incapaces de glucosilar todos los oligosacáridos que se están transfiriendo continuamente (saturación).
- 3) La proporción de glicoproteínas sintetizadas que poseen puentes disulfuro es muy baja y por lo tanto prácticamente no hay especies mal plegadas generadas por DTT.
- 4) Una conformación mal plegada no es suficiente para que se glucosilen los oligosacáridos de glicoproteínas N-glicosiladas.

El tratamiento con DTT provoca un plegamiento incorrecto de la CNX, glicoproteína de RE de S. pombe.

Con el objetivo de analizar la primera posibilidad, es decir, si el tratamiento con DTT no provoca un aumento de glucosilación *in vivo* porque no induce un mal plegamiento de glicoproteínas del RE de *S. pombe*, se analizó el estado de oxidación de la CNX en células tratadas con esta droga. Hay cuatro residuos de Cys conservados en CNX de diversos orígenes, incluyendo mamíferos y *S. pombe* (71) y por lo menos dos de dichos residuos forman un puente disulfuro (56).

Células de *S. pombe* WT fueron preincubadas 10 min en presencia o ausencia de DTT y luego marcadas con [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys por otros 10 min. Se rompieron las células en presencia de NEM de manera de “congelar” el estado de oxidación de los grupos -SH en las proteínas. Las proteínas marcadas fueron luego inmunoprecipitadas con suero de conejo anti-CNX recombinante. Los inmunocomplejos se sometieron a una electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras de manera de visualizar un cambio en el estado de plegamiento de la lectina por un cambio en su movilidad electroforética. Como se puede observar en la **Figura 38**, cuando la electroforesis se realizó en condiciones reductoras, la CNX migró a la misma posición independientemente de si las células fueron preincubadas o no con DTT (CNXred). Sin embargo, bajo condiciones no reductoras, la CNX sintetizada en presencia de DTT tuvo la misma migración que la CNX completamente reducida, mientras que la sintetizada en ausencia de la droga migró mas rápido (CNXox), indicando que el tratamiento con DTT condujo la formación de CNX con una conformación distinta de la nativa.

Estos resultados demuestran que el DTT a una concentración 5 mM efectivamente inhibió el plegamiento a la forma nativa de una glicoproteína del RE durante un período similar al utilizado para la marcación de oligosacáridos con [¹⁴C]Glc, y por lo tanto la hipótesis de que el DTT no afecta el plegamiento de las glicoproteínas de *S. pombe* debe ser descartada.

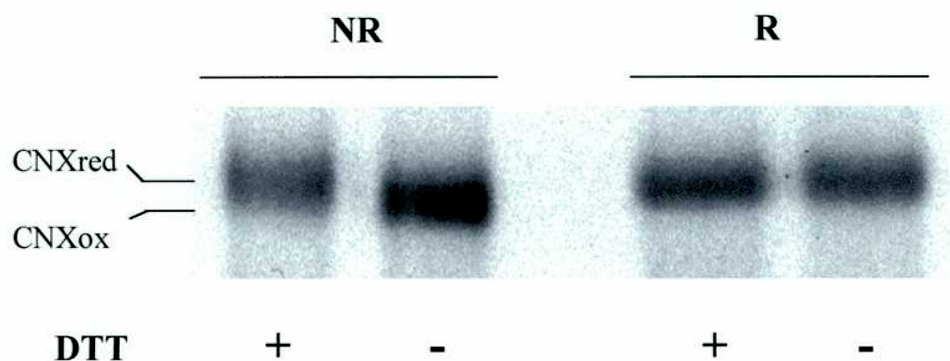


Figura 38. Inducción de síntesis de glicoproteínas mal plegadas por DTT. Células de *S. pombe* WT fueron preincubadas 10 min en presencia o ausencia de DTT 5 mM y luego incubadas con [35 S]-Met y [35 S]-Cys 10 min a 30°C. Se prepararon extractos celulares como se describe en materiales y métodos, y la CNX se inmunoprecipitó con suero anti-CNX 1/200. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones no reductoras (NR) o reductoras (R). Las posiciones de la CNX completamente reducida (CNXred) u oxidada (CNXox) se indican en el gráfico.

La inhibición de la glicosilación no produce un aumento de la glucosilación de los oligosacáridos unidos a proteínas

Para descartar la segunda hipótesis, es decir, que la cantidad de GT de las mutantes *gls2/alg6* no es suficiente para glucosilar todos los oligosacáridos que se están transfiriendo continuamente y que además permanecen en el RE debido al tratamiento con DTT, células de *S. pombe* doble mutantes fueron tratadas con dicha droga en presencia de cicloheximida. Esta droga detiene la nueva N-glicosilación al detener la síntesis proteica, pero no afecta la glucosilación por la GT. Las células fueron pre-incubadas por 10 min en presencia de DTT 5 mM y luego incubadas 10 min con [14 C]Glc por 10 min. Se agregó cicloheximida (50 μ g/ml) y las muestras fueron incubadas por 15 min adicionales. Experimentos control realizados con incubaciones con [35 S]Met mostraron que en las condiciones empleadas se detiene en más del 90 % la síntesis proteica dentro de los 2 min de agregado de la droga. Se analizó luego el patrón de oligosacáridos unidos a proteínas y de los monosacáridos constituyentes de alícuotas tomadas antes y después del agregado de cicloheximida. Se determinó la relación de marca en Glc a marca en Man de la misma manera que ya se describió. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Como se puede observar, valores similares de la relación Glc/Man se obtuvieron para ambas muestras, independientemente de si habían sido o no tratadas con cicloheximida. Dado que esta droga inhibe la glicosilación pero no la glucosilación, y que su adición a los cultivos tratados con DTT no alteró la proporción Glc/Man, se puede concluir que no se produjo un aumento de la glucosilación en ausencia de N-glicosilación. Por lo tanto se puede descartar la hipótesis de que la GT no sea suficiente para glucosilar todos los oligosacáridos que se acumulan.

Agregado	Glc / Man
	0.18
5 mM DTT	0.18
5 mM DTT + cicloheximida	0.16

Tabla 3. Efecto sobre la glucosilación del DTT en células tratadas con cicloheximida. Las células de *S. pombe* doble mutantes fueron preincubadas con DTT por 10 min, y marcadas a continuación con [¹⁴C]Glc por 10 min más. La muestra se dividió en dos y una parte fue tratada con cicloheximida 50 µg/ml durante 15 min, antes de la obtención y análisis de oligosacáridos unidos a proteína. Estos fueron hidrolizados y se analizó la relación de cpm incorporada como Glc a cpm incorporada como Man en dichos oligosacáridos. Las diferencias observadas no son significativas.

El tratamiento con DTT afecta el plegamiento de la mayor parte de las glicoproteínas sintetizadas en S. pombe

Dado que se demostró que el agregado de DTT 5 mM a células de *S. pombe* provoca el mal plegamiento de las glicoproteínas de RE que contienen puentes disulfuro (como la CNX) y que la GT de estas células es suficiente en principio para glucosilar todos los oligosacáridos generados, las dos últimas posibilidades para explicar por qué no hay un aumento de la glucosilación de las glicoproteínas inducido por DTT son: o bien que hay una baja proporción de las glicoproteínas de RE que contienen puentes disulfuros y por lo tanto una baja cantidad de sustratos aceptores de la GT son generados por el DTT o, alternativamente, que una condición de conformación mal plegada inducida por el agente reductor no es suficiente para la glucosilación de todos los oligosacáridos N-unidos.

Como se mencionó más arriba, se describió que en células de mamífero y de *S. cerevisiae* que el DTT afecta el plegamiento y por lo tanto la secreción de proteínas que contienen puentes disulfuro, pero no afecta la secreción de las especies libres de los mismos. Se hipotetizó que si el agente reductor no generase una cantidad significativa de glicoproteínas mal plegadas en *S. pombe*, el procesamiento específico de Golgi de sus oligosacáridos (adición de unidades de Man y Gal a Man₉GlcNAc₂) debería ser similar ya sea en presencia o ausencia de DTT. Por el contrario, si el DTT afectase el plegamiento y la secreción de una parte mayoritaria de las moléculas de glicoproteína formadas, la adición de residuos Man y Gal a los oligosacáridos debería verse disminuida en las células incubadas con DTT respecto de la adición de dichos residuos en células sin tratar con el agente reductor.

Oligosacáridos formados por doble mutantes a tiempos largos en condiciones normales

Para analizar el procesamiento de los oligosacáridos unidos a proteína específico de Golgi de *S. pombe* crecidas en condiciones normales (ausencia de DTT, y 28°C), células doble mutantes $GII\alpha^-/ALG6^-$ fueron pre-incubadas por 15 min, luego incubadas por 60 min en presencia de $[^{14}C]$ Glc e incubadas 30 min más con un exceso de Glc no marcada. La incubación con la marca durante un tiempo más prolongado y el “chase” en presencia de Glc no marcada permite analizar las modificaciones que se producen a los oligosacáridos que salen del RE. Se obtuvieron los oligosacáridos Endo H sensibles unidos a proteína y se analizaron en una cromatografía en papel. La marcación larga en ausencia de DTT reveló un patrón complejo de $[^{14}C]$ oligosacáridos unidos a proteínas (**Figura 39, panel superior**). El pico principal (región A entre corchetes) migró como el estándar $Glc_1Man_9GlcNAc$ pero se observó una cola que corrió como el estándar de $Man_9GlcNAc$. Además, se obtuvieron varios compuestos más grandes (región B), que migran entre 7 y 23 cm.

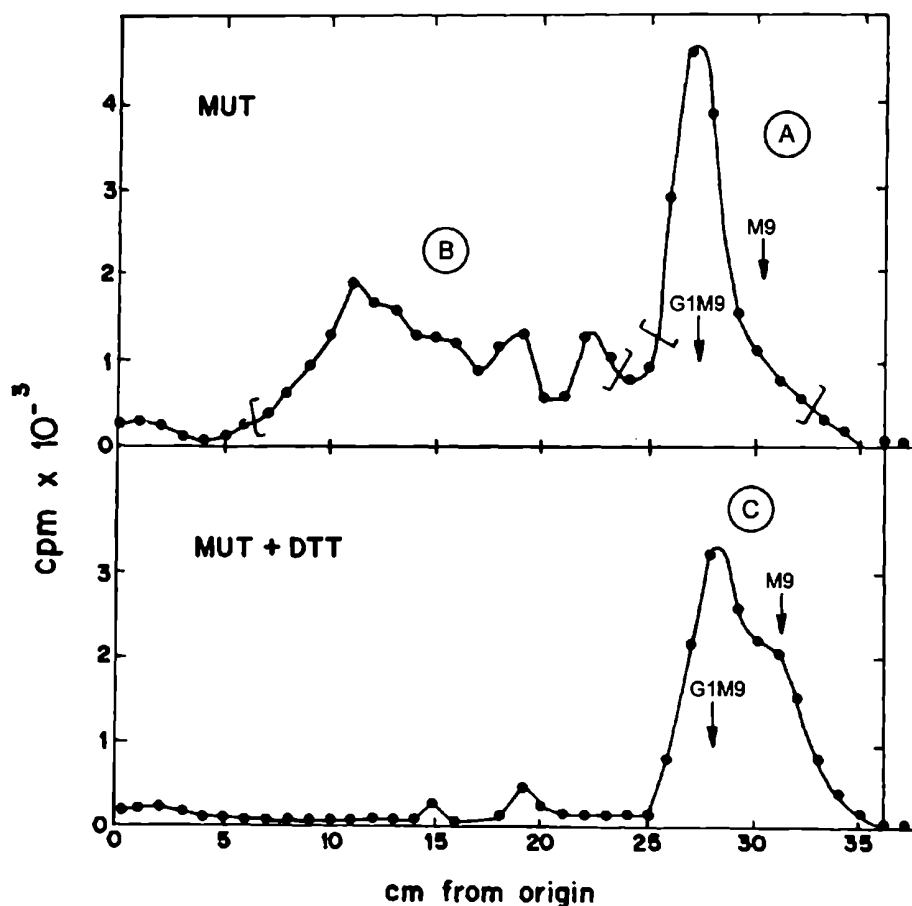


Figura 39. Oligosacáridos unidos a proteína formados por células de *S. pombe* $GII\alpha^-/ALG6^-$ en marcaciones largas. Las levaduras fueron preincubadas 15 min, marcadas con $[^{14}C]$ Glc por 60 min e incubadas 30 min más con Glc no marcada, en presencia (*panel inferior*) o ausencia (*panel superior*) de DTT 5 mM. Los oligosacáridos unidos a proteína liberados por tratamiento con Endo H se sometieron a una cromatografía en papel con solvente A. *Estándares:* G1M9, $Glc_1Man_9GlcNAc$ y M9, $Man_9GlcNAc$.

Análisis de la región A

Con el objetivo de determinar la identidad de los compuestos que integran la región A y que migran como los estándares $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$, éstos fueron eluidos del papel, tratados con α -manosidasa, y sometidos a una nueva cromatografía. Como ya se explicó, la presencia de un residuo Glc o Gal protege de la degradación por α -manosidasa a las Man de la rama que la contiene (Ver **Figura 1**), y por lo tanto permite aumentar la diferencia de composición entre oligosacáridos de un monosacárido a cuatro o cinco. Los resultados de este tratamiento para la región A se observan en la **Figura 40 A**.

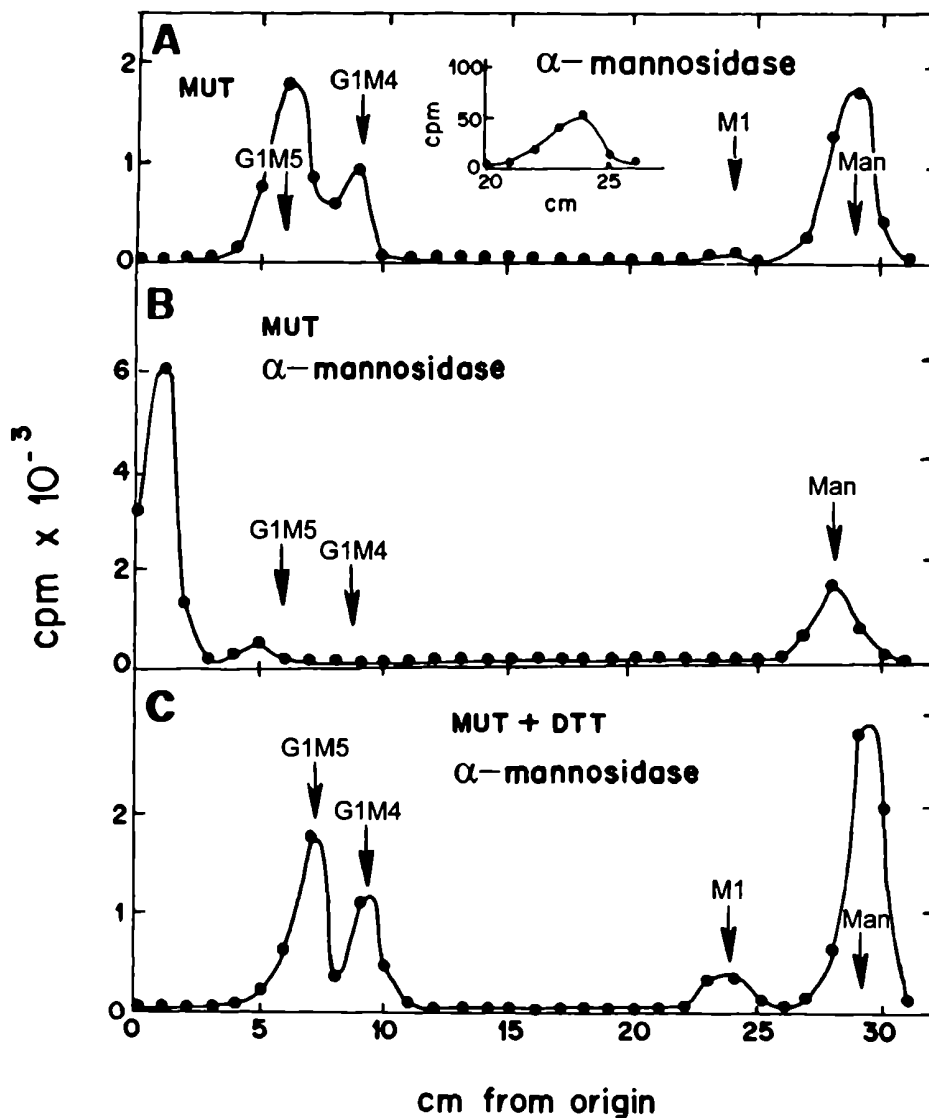


Figura 40. Caracterización de las regiones A, B y C. Los compuestos indicados como A, B, y C en la **Figura 39** se eluyeron y fueron sometidos a una degradación con α -manosidasa como se explica en Materiales y Métodos. Los productos de la degradación fueron recromatografiados con solvente C, y los resultados se muestran en los paneles A, B y C respectivamente. *Estándares:* Man, manosa; M1, ManGlcNAc ; G1M4, $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y G1M5, $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$.

Los sacáridos producidos por la degradación con α -manosidasa de los compuestos de la región A migraron como los estándares Glc₁Man₃GlcNAc, Glc₁Man₄GlcNAc y Man. Además, se obtuvo una pequeña cantidad de un compuesto que migra como el estándar ManGlcNAc (**Figura 40 A, inserto**). Esto último confirma la presencia de Man₃GlcNAc en la muestra ya que la degradación con α -manosidasa produce Man y ManGlcNAc (en el disacárido ManGlcNAc los monosacáridos están unidos por una unión β que por lo tanto es resistente a la degradación por α -manosidasa).

Para analizar la composición monosacáridica de los compuestos que migraron como Glc₁Man₃GlcNAc y Glc₁Man₄GlcNAc en la **Figura 40 A** se realizó una hidrólisis ácida fuerte de los mismos con HCl 1 N por 4 h a 100°C, y los productos fueron cromatografiados con solvente B. La hidrólisis ácida de ambos compuestos produjo unidades de Gal, Glc y Man. Como ejemplo, el cromatograma de la hidrólisis ácida del compuesto que migra como Glc₁Man₃GlcNAc se presenta en la **Figura 41 A**.

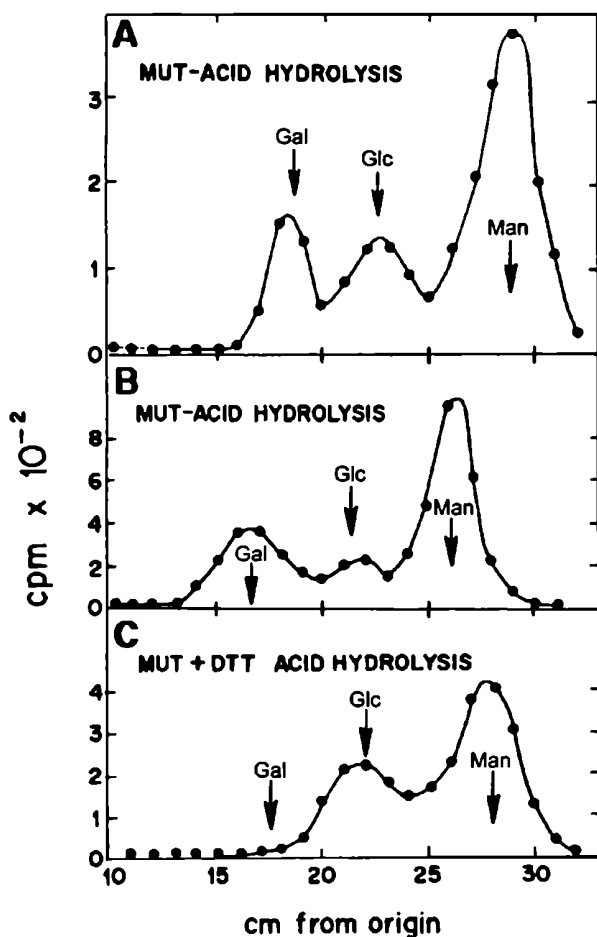


Figura 41. Composición de monosacáridos de oligosacáridos unidos a proteínas en mutantes *GII α /ALG6*. Los compuestos que migraron como GIM5 en la **Figura 40 A** (A), los que migraron entre 0 y 5 cm en la **Figura 40 B** (B) o lo que migraron como los estándares GIM5 en la **Figura 40 C** (C) se sometieron a una hidrólisis ácida fuerte y se corrieron en una cromatografía en papel con solvente B.

Dado que los compuestos que migraron como los estándares $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ dieron por degradación con α -manosidasa manosa, ManGlcNAc y compuestos que migran como $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, y que la hidrólisis ácida de estos últimos produjo Man, Glc y Gal, se puede concluir que la región A de la **Figura 39** está compuesta de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (modificación propia del aparato de Golgi) y una pequeña cantidad de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$. En la **Figura 42** se esquematizan los oligosacáridos contenidos en la región A, así como los productos obtenidos por el tratamiento con α -manosidasa. La presencia de $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Gal}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ se produce por una hidrólisis incompleta: el tratamiento de dichos oligosacáridos nuevamente con α -manosidasa produce $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ y $\text{Gal}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ (no mostrado).

Análisis de la región B

La degradación con α -manosidasa de los compuestos de la región B en la **Figura 39** produjo Man libre y compuestos resistentes a α -manosidasa (que migran entre 0 y 5 cm). Estos últimos fueron de un tamaño mayor que el estándar $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (**Figura 40 B**). La hidrólisis ácida fuerte de los mismos reveló la presencia de residuos de Gal, Man y Glc (**Figura 41 B**).

Se concluye, por lo tanto, que después de la transferencia del oligosacárido $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a la proteína, parte del compuesto fue glucosilado por la GT para formar $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, parte fue galactosilado para formar $\text{Gal}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y la adición posterior de unidades de Man y Gal a los compuestos mencionados más arriba produjo la formación de los sacáridos más grandes que migran entre 7 y 23 cm en la **Figura 39 B**.

Consecuentemente, las células doble mutantes en condiciones normales (es decir, sin el agregado de ningún agente reductor ni sometidas a estrés exógeno de ningún tipo) dieron compuestos estructuralmente similares a los descritos para las células WT (Ver **Figura 25** en sección III), excepto por la retención de unidades de Glc causada por la mutación *gls2 α* . Como se mencionó previamente, la adición de Glc a $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ocurre en el RE mientras que en el Golgi se agregan Gal y más Man.

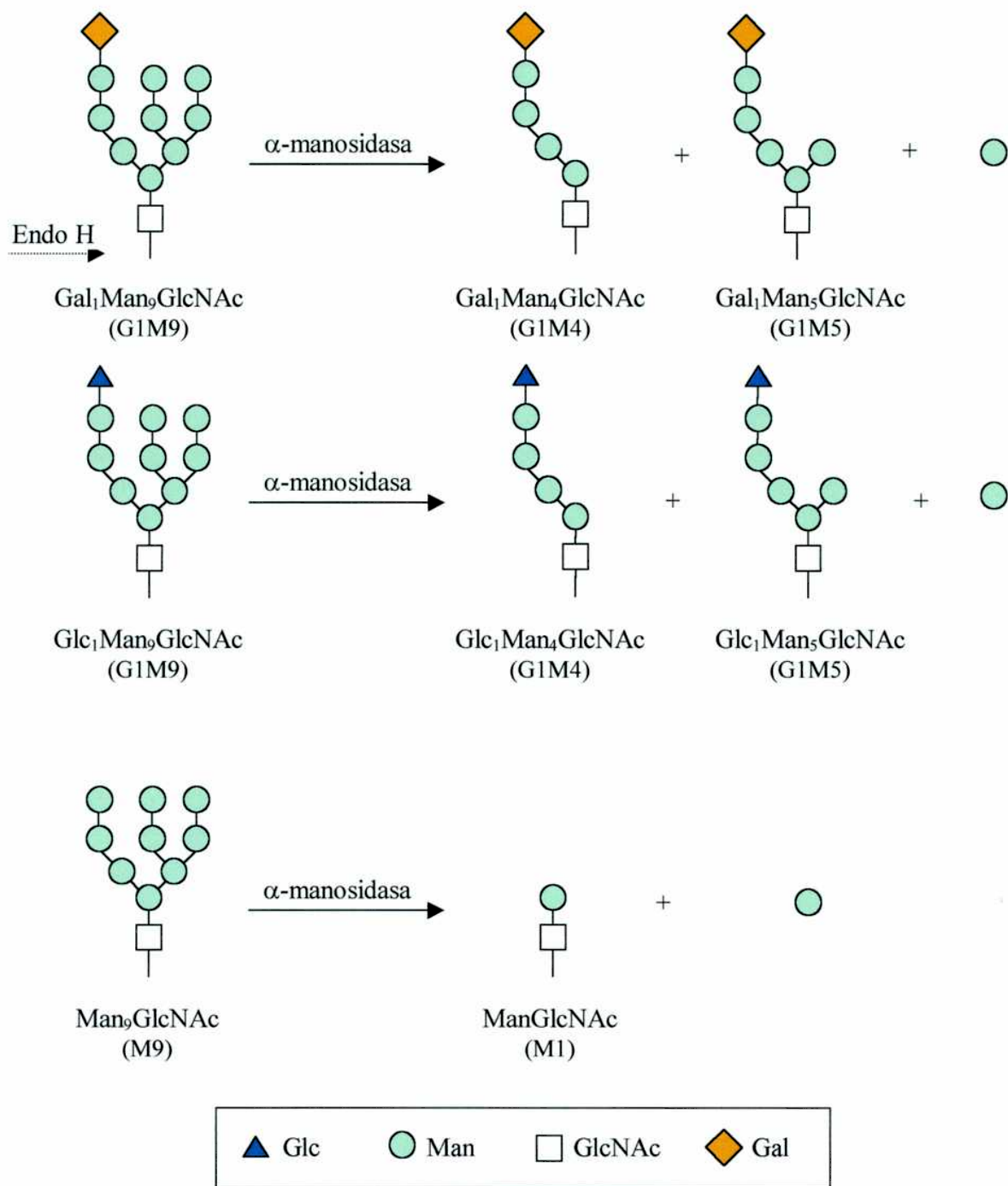


Figura 42. Esquema del procesamiento de los oligosacáridos que integran el Pico A con α -manosidasa. Entre paréntesis se indica el estándar de la posición de migración de cada oligosacárido.

Oligosacáridos formados a tiempos largos por S. pombe doble mutante en condiciones que impiden el plegamiento correcto(+DTT)

Como se vio en la sección anterior, las células *S. pombe* $\text{GII}\alpha^-/\text{ALG6}^-$ marcadas en condiciones normales presentan en sus glicoproteínas oligosacáridos con modificaciones específicas del aparato de Golgi. Si el DTT generase sólo una pequeña proporción de glicoproteínas mal plegadas implicaría que la secreción de glicoproteínas del RE al Golgi sería similar a la obtenida en condiciones normales. Por el contrario, si el DTT afectase el plegamiento de una gran proporción de las glicoproteínas, y por lo tanto inhibiese la secreción de las mismas del RE al Golgi, sus oligosacáridos deberían carecer de las modificaciones que ocurren en esta última organela.

Para discernir entre las dos posibilidades, se repitió el mismo protocolo de marcación larga que en la sección anterior pero con la presencia de DTT 5 mM en el medio. La marca total incorporada (principalmente en polisacáridos y aminoácidos en las proteínas) fue casi idéntica en condiciones normales y en aquellas que provocan el mal plegamiento de proteínas. Esto indica que dichas condiciones no afectaron significativamente la producción energética general de la célula (la marca en los compuestos liberados por Endo H fue siempre 0.5 % del total).

El patrón de oligosacáridos unidos a proteínas de las levaduras $\text{GII}\alpha^-/\text{ALG6}^-$ marcados en presencia de DTT se muestra en la **Figura 39 panel inferior**. De la comparación entre los paneles superior (-DTT) y el inferior (+DTT) surge claramente la ausencia del patrón complejo de oligosacáridos unidos a proteína en las levaduras tratadas con DTT, que aparece entre 7 y 23 cm de las células en condiciones normales (región B). El pico principal (Pico C) migró como el estándar $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, con un hombro claro en la posición del estándar $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ (región C).

El tratamiento de la región C con α -manosidasa produjo compuestos que migraron como los estándares $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$, $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$, ManGlcNAc y Man (**Figura 40 C**). Al igual que en el tratamiento sin DTT, la presencia de Man y el disacárido ManGlcNAc confirman la presencia de $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ en la región C.

Para determinar la identidad de los productos del tratamiento con α -manosidasa que migran como los estándares $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ y $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}$ se realizó una hidrólisis ácida fuerte de los mismos y se recromatografiaron por separado. La hidrólisis ácida de ambos compuestos produjo Glc y Man , *pero no Gal* (**Figura 41 C**). Esto demuestra que la región C está compuesta de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ y que carece de $\text{Gal}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$.

Exceptuando a un pequeñísimo pico que migra 18-20 cm presente en la **Figura 39** y que corresponde a material más grande que el estándar $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$, no se observó modificación alguna específica de Golgi, indicando que la mayor parte de glicoproteínas sintetizadas en *S. pombe* tienen puentes disulfuro y que han sido retenidas en el RE. Por lo tanto, la hipótesis de que el DTT no produce un aumento general de la glucosilación por la GT debido a que no genera una gran cantidad de especies mal plegadas debe ser descartada.

Una conformación mal plegada no es suficiente para que se glucosilen todos los oligosacáridos de las glicoproteínas

En las secciones anteriores se demostró que el DTT induce el mal plegamiento de la mayor parte de las glicoproteínas en *S. pombe* y que sin embargo no hay un aumento de la glucosilación por la GT de todo el compuesto $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ presente, y esto no es atribuible a que la GT esté saturada de dichos sustratos no glucosilados. La proporción relativa de oligosacáridos glucosilados y no glucosilados presentes en las células $\text{GII}\alpha^-/\text{ALG6}^-$ tratadas con DTT (región C de **Figura 39**, *panel inferior*) se calculó como ya se ha descrito (23). Brevemente, la marca presente en Man en el compuesto ManGlcNAc , dividido por la marca en manosa en ese compuesto más la presente en el mismo monosacárido en $\text{Glc}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}/4$ más la presente en $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}/5$, da la proporción relativa de compuestos no glucosilados. La hidrólisis ácida de la región C no reveló la presencia de glucosamina, indicando que dichos residuos no se marcaron significativamente durante los 60 min de incubación con $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$, lo que facilita la cuantificación de la marca en Man en ManGlcNAc . La proporción relativa de oligosacáridos no glucosilados en las células tratadas con DTT fue aproximadamente 45 %, indicando que una conformación mal plegada de las proteínas inducida por esta droga no es suficiente para que la GT las glucosile.

El shock de calor tampoco induce un aumento generalizado de la glucosilación

Ha sido reportado que un “shock” de calor provoca el mal plegamiento de proteínas del RE de *S. pombe*, ya que este tratamiento dispara una fuerte inducción del mRNA que codifica para la chaperona BiP (101). Para confirmar este resultado y evaluar la cantidad de glicoproteínas sintetizadas en condiciones de “shock” de calor que son incapaces de plegarse correctamente, células de *S. pombe* WT crecidas en condiciones normales (28°C, ausencia de agentes reductores) fueron sometidas a un pulso y “chase” con $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ como se describió, pero a 38°C. Los oligosacáridos Endo H sensibles fueron analizados y los resultados se presentan en la **Figura 43 A**. Como se puede observar, sólo se detectaron $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ unidos a proteína aún a tiempos largos de marcación. La ausencia de elongación de oligosacáridos específica de Golgi indica que todas las glicoproteínas sintetizadas durante el shock de calor fueron incapaces de plegarse correctamente durante este período y que han sido retenidas en el RE.

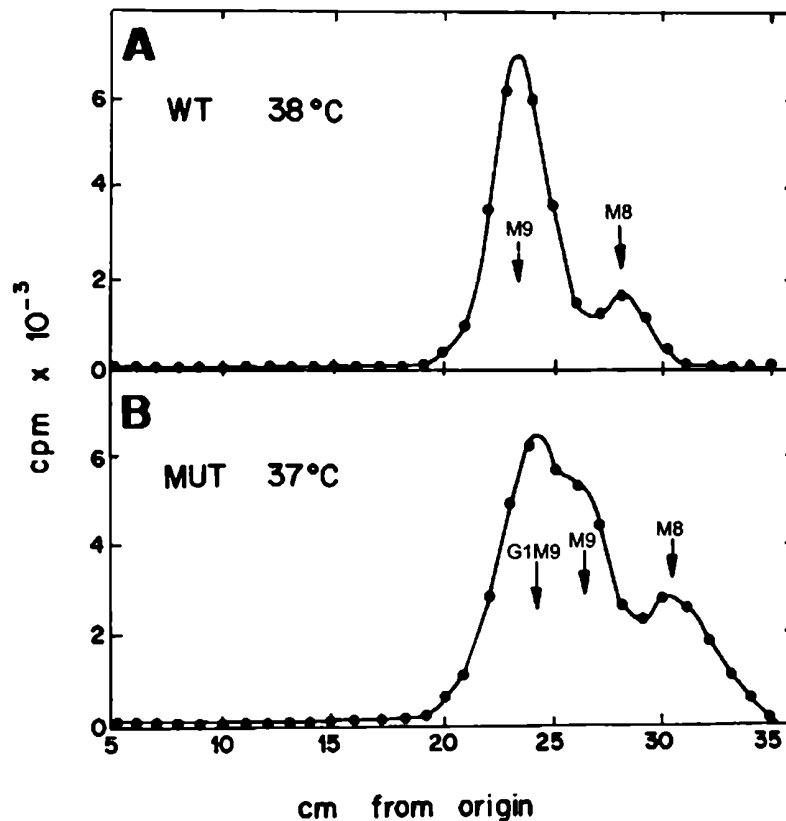


Figura 43. Oligosacáridos N-unidos a proteínas formados por *S. pombe* WT y *GIIα*⁻/*ALG6*⁻ en condiciones de “shock de calor”. Células WT (A) o doble mutantes *GIIα*⁻/*ALG6*⁻ (B) fueron pre-incubadas 15 min, incubadas 60 min con [¹⁴C]Glc y 30 min con un exceso de Glc fría a 38°C o 37°C respectivamente. Los oligosacáridos Endo H sensibles liberados de las glicoproteínas fueron sometidos a una cromatografía en papel con solvente A. *Estándares*: G1M9, Glc₁Man₉GlcNAc, M9, Man₉GlcNAc y M8, Man₈GlcNAc.

Es de suponer *a priori* que el plegamiento de glicoproteínas en la *S. pombe* doble mutante *GIIα*⁻/*ALG6*⁻ debería ser especialmente sensible al “shock” de calor, debido a que las células doble mutantes presentan una morfología termosensible a 37°C y además sus glicoproteínas están hipoglicosiladas (Ver **Figura 36**). Esto implica una condición de inducción de mal plegamiento en sí misma ya que los oligosacáridos ayudan a evitar la formación de agregados durante el proceso de plegamiento. Se testeó entonces en esta cepa si existen oligosacáridos no-glucosilados cuando se aplica un shock de calor.

El patrón de oligosacáridos sintetizado por las células doble mutantes sometidas al mismo tratamiento que las WT pero a 37°C (**Figura 43 B**) fue muy similar al formado en presencia de DTT pero a 28°C (**Figura 39, panel inferior**). Los oligosacáridos migraron como los estándares de Glc₁Man₉GlcNAc, Man₉GlcNAc₂ y Man₈GlcNAc₂, es decir, no se detectó procesamiento específico de Golgi en las muestras sometidas a un golpe de calor. Además, no todos los oligosacáridos unidos a proteína fueron glucosilados. Este último resultado mostró que al igual

que ocurre con el agregado de DTT, la inducción de un mal plegamiento de proteínas generado por el calor no conduce a la glucosilación de todos los oligosacáridos N-unidos a proteína potencialmente glucosilables.

En la sección anterior se mostró que los oligosacáridos monoglucosilados facilitan el plegamiento de las glicoproteínas de *S. pombe*. Sin embargo, los resultados aquí presentados demuestran que el hecho de que una glicoproteína esté mal plegada no es un factor suficiente para que sea glucosilada por la GT.

DISCUSIÓN

DISCUSION

I - Evidencias genéticas de la estructura heterodimérica de la GII

La enzima GII juega un papel fundamental en el modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE de células eucariotas. Los oligosacáridos de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transferidos a partir del derivado Dol-P-P a las secuencias Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se están sintetizando en el RE, son deglucosilados por la GI, que remueve la Glc más externa y luego por la GII, que remueve las dos Glc restantes. La GII tiene dos funciones paralelas. Por un lado, al deglucosilar al oligosacárido de composición $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ producido por la GI permite la unión del oligosacárido $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ resultante a CNX y CRT, lectinas que retienen a las glicoproteínas en el RE durante su proceso de plegamiento. Por otro lado, la remoción de la glucosa restante libera a las glicoproteínas del ancla de las lectinas. Si las proteínas no han adoptado aún su estructura terciaria nativa la GT transfiere nuevamente una unidad de Glc. La GII interviene también en la deglucosilación de los compuestos monoglucosilados producidos por la GT y los ciclos de glucosilación por la GT – unión a lectina-deglucosilación por la GII continúan hasta que las glicoproteínas adquieren el plegamiento correcto o son finalmente degradadas (6, 61).

Se ha propuesto que la GII es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica ($\text{GII}\alpha$) y una de retención en el RE ($\text{GII}\beta$) (75). La propuesta se basó en el hecho de que se purificó la GII como dos cadenas polipeptídicas estrechamente unidas que no podían separarse sin pérdida de la actividad y en el hecho de que la putativa subunidad catalítica carece de señal de retención en el RE. Esta propuesta resultó controvertida ya que dicha estructura fue detectada en células T de linfoma de ratón (79) y en hígado de rata (75), pero no en GII purificada a homogeneidad de plantas, de riñón o de hígado de cerdo (77, 78). La posibilidad existía entonces de que la estructura heterodimérica estuviese restringida a tejidos de rata y ratón o de que fuese un artefacto de la purificación.

Hemos identificado en el genoma de *S. pombe* secuencias homólogas a las postuladas subunidades α y β de la GII de ratón. Los genes que codifican tanto para los homólogos $\text{GII}\alpha$ como $\text{GII}\beta$ en *S. pombe* (*gls2 α ⁺* y *gls2 β ⁺*) fueron interrumpidos, y no se detectó actividad GII en ensayos *in vitro* efectuados sobre fracciones microsomales aisladas de las respectivas mutantes. Por otro lado, la actividad GI en microsomas de ambas mutantes presentó niveles similares a aquellos encontrados en cepas salvajes. El hecho de que la disrupción de los genes *gls2 α* y *gls2 β* haya provocado en *ambos* casos la eliminación de la actividad GII en microsomas purificados demostró genéticamente la naturaleza heterodimérica de la GII.

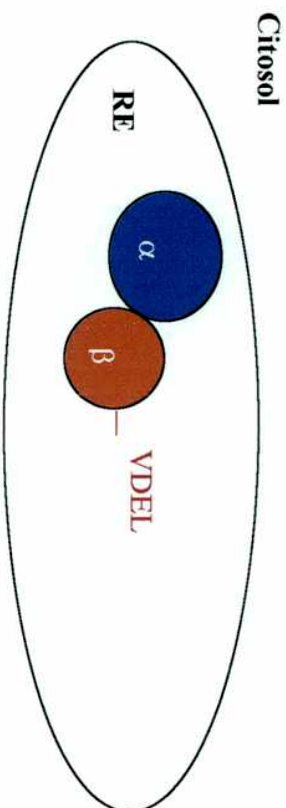
El análisis estructural de los oligosacáridos unidos a proteínas en cepas salvajes y mutantes confirmó que la subunidad catalítica es la $\text{GII}\alpha$. Esto se desprende de la total ausencia de actividad GII en las células mutantes en el gen *gls2 α* revelada por los ensayos *in vitro* y de que los oligosacáridos $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Glc}_2\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ sean los únicos compuestos sintetizados en la mutante *GII α* . La noción de que la $\text{GII}\alpha$ es la subunidad catalítica está de acuerdo además con el hecho de que muestra significativa similaridad con la familia 31 de glucosil hidrolasas, y que presenta un segmento corto de aminoácidos diagnóstico de la familia 31 (FXWNDMNEPSVF) incluyendo un ácido aspártico que participaría en la catálisis enzimática (103, 104).

A pesar de la ausencia total de actividad GII en microsomas aislados de mutantes en el gen *gls2 β* , se detectó en estas células la formación de pequeñas cantidades de Glc₁Man₉GlcNAc₂ *in vivo* que sólo pueden provenir de una actividad glucosidasa II residual. La GII β muestra una secuencia de retención VDEL, y como tal su rol primario probablemente sea el de retener a la GII α en el retículo. Se puede especular que el compuesto Glc₁Man₉GlcNAc₂ producido por las mutantes GII β ⁻ fue formado por la subunidad α , transitoriamente presente en el RE antes de la secreción (**Figura 44**). Vale la pena mencionar que también se ha detectado un homólogo de GII β en el genoma humano. Este hecho, junto con los resultados presentados en esta Tesis sugieren fuertemente que GII es un heterodímero en la mayoría si no en todas las células eucariotas. La presencia de subunidades de retención en el retículo ha sido también descrita para la prolil 4-hidroxilasa y para las proteínas de transferencia de triglicéridos, que carecen de señales de retención del RE. En ambos casos la proteína de retención es la PDI (proteína disulfuro isomerasa), esencial para la viabilidad de la célula, por lo que se imposibilita la confirmación de la función de retención mediante disrupción del gen.

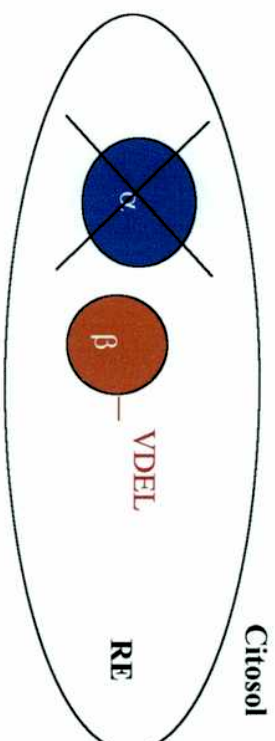
Si bien el rol primario de la GII β sea probablemente el de retención en el RE de la subunidad catalítica GII α , no puede descartarse que también pueda contribuir a la estabilización de esta última subunidad. Recientemente se propuso que ambas subunidades de la GII son necesarias para la expresión de actividad catalítica de la GII de hígado humano (105). Sin embargo los mismos autores han reportado la purificación de la GII α de hígado de cerdo aislada como una subunidad de 107 kDa catalíticamente activa (106). La explicación que se ha dado es que quizá la subunidad β podría estar involucrada en la maduración de la subunidad α pero que no sería necesaria para la actividad catalítica una vez que la maduración se ha completado. Más recientemente aún, otros autores postularon que la subunidad β de la GII humana es necesaria para mantener soluble a la GII α , ya que la sobreexpresión de la subunidad α provocó la formación de agregados de la proteína que revirtieron con la sobreexpresión concomitante de la GII β (107). La eliminación de la señal de retención de la subunidad β provocó la aparición de actividad GII en el medio de cultivo de las células utilizadas, confirmando la función de esta subunidad en la retención en el RE. El hecho de que la sobreexpresión de la GII α sola resulte en una agregación de la proteína podría provenir de que los niveles de expresión son mayores a los fisiológicos, lo que puede contribuir a la formación de agregados. Para confirmar o descartar la hipótesis de que la GII β tiene como función estabilizar a la GII α además de retenerla en el RE, se podría realizar una complementación parcial de la mutante de *S. pombe* GII β ⁻ con el gen *gls2 β* carente de señal de retención. Si la función fuese sólo de retención no habría diferencias entre la mutante GII β ⁻ y la complementada en cuanto a la formación residual de oligosacáridos monoglucosilados. Por el contrario, si esta subunidad contribuye a la estabilización de la enzima, se debería observar una mayor proporción de oligosacáridos monoglucosilados en esta mutante que posee el gen *gls2 α* WT y por lo tanto expresado a niveles fisiológicos.

Por qué la GII del RE es un heterodímero, y más grande que otras glucosidasas? Una posible explicación es que además de interaccionar con los oligosacáridos monoglucosilados para deglucosilarlos, interaccione con otras moléculas. Estas podrían ser CNX o CRT. Otra explicación posible es que la subunidad β funcione como una molécula de retención no sólo para la GII α sino también para alguna otra proteína del RE, o alternativamente, que la subunidad β tenga en sí misma alguna función adicional aún desconocida.

S. pombe WT



S. pombe GII α -



S. pombe GII β -

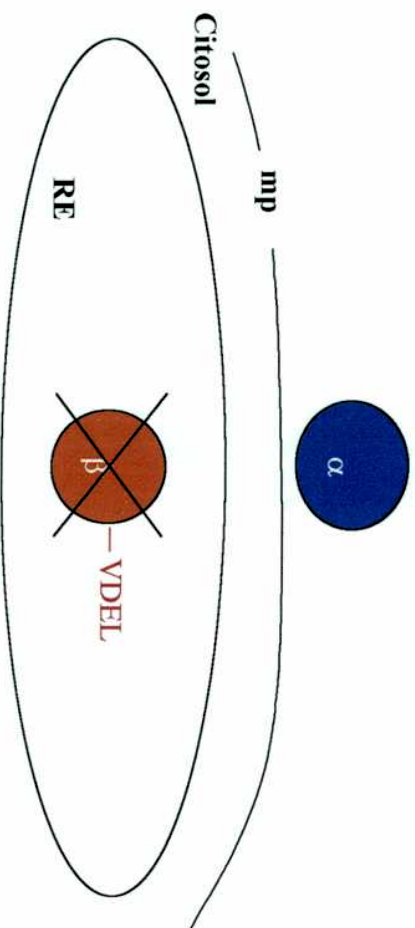


Figura 44. Estructura heterodimérica de la GII y rol de la subunidad β en la retención/recuperación en el RE. mp: membrana plasmática.

II - La CNX y no la formación de oligosacáridos monoglucosilados es esencial para la viabilidad celular de *S. pombe*

Según el modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas en el RE, la CNX y su homóloga soluble CRT interactúan con glicoproteínas monoglucosiladas recién sintetizadas. Según uno de los modelos (modelo “sólo lectina”) esta interacción ocurre exclusivamente vía el oligosacárido monoglucosilado ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) de una manera similar a las lectinas, sin contactos peptídicos (55, 61 y revisado en 108). Otro modelo alternativo (modelo “en dos pasos”) propone una interacción en dos etapas, donde el primer contacto entre la CNX y la glicoproteína que se está sintetizando es a través de un oligosacárido monoglucosilado, y el segundo paso es una interacción proteína-proteína (67, 59). El denominador común es que la interacción de la CNX y CRT con las glicoproteínas monoglucosiladas retiene a dichas estructuras en el RE mientras estas sufren el proceso de plegamiento y de oligomerización, permitiendo la acción de otras chaperonas y proteínas facilitadoras del plegamiento del RE y evitando la formación de agregados entre las proteínas inmaduras. Los oligosacáridos monoglucosilados de las glicoproteínas surgen, como ya se explicó, por la deglucosilación parcial del oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ transferido a las proteínas mediada por las glucosidasas del RE GI y GII, y por la glucosilación transitoria por la GT, sensora del plegamiento de las proteínas (6).

Dos grupos reportaron el aislamiento del gen homólogo de *S. pombe* de la CNX (*cnx1*⁺) y la aparente ausencia de CRT de estas levaduras (71, 72). La CNX es una proteína de membrana del tipo I que posee una región central característica de la familia CNX/CRT que comprende dos series de motivos repetidos en tandem. El motivo 1 participa en células de mamíferos en la unión a Ca^{2+} , importante para la función de la CNX ya que los quelantes evitan la interacción con ligandos *in vitro*. El motivo 2 junto con el motivo 1 se requiere para la unión a glicoproteínas a través de sus glicanos (58). La CNX de *S. pombe* posee cuatro copias de ambos motivos, se une a Ca^{2+} y su presencia es esencial para la viabilidad celular (71, 72).

En lo que parece un resultado contradictorio, en nuestro laboratorio se obtuvo una mutante de *S. pombe* GT⁻ (*gpt1*) en la que no se vio afectado el crecimiento celular (30). En esta mutante no hay actividad de GT, es decir no existe el paso de reglucosilación transitoria de los oligosacáridos transferidos a proteínas en el RE. Sin embargo, persisten aún derivados monoglucosilados $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ que provienen del procesamiento parcial del oligosacárido transferido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ por las actividades de GI y GII, pudiendo ser suficientes para la interacción con la CNX.

Una cuestión importante es entender cuál es la importancia de la interacción oligosacárido monoglucosilado-CN X en la retención de las glicoproteínas en el RE. Una forma de estudiar dicha interacción es aboliéndola. Para suprimir la interacción entre las lectinas y los oligosacáridos monoglucosilados de las glicoproteínas en células de *S. pombe* intactas existirían dos alternativas: la primera sería la disrupción del gen que codifica para la CNX, pero es impracticable debido a que como se mencionó anteriormente la proteína es esencial para la viabilidad celular. La otra posibilidad es prevenir la formación de los oligosacáridos monoglucosilados.

Mediante la disrupción del gen *gls2α*, hemos abolido totalmente la formación de oligosacáridos monoglucosilados tanto por deglucosilación parcial del oligosacárido de

composición Glc₃Man₉GlcNAc₂ transferido a las proteínas que se están sintetizando en el RE, como por reglucosilación por la GT (que sólo adiciona Glc a los oligosacáridos Man₉GlcNAc₂). Las células son viables a todas las temperaturas ensayadas (18°C, 28°C -condiciones normales de crecimiento- y 37°C) lo que demuestra que la formación de oligosacáridos monoglucosilados *no* es esencial para la viabilidad celular.

El hecho de que la CNX de *S. pombe* sea esencial para la viabilidad celular mientras que no lo sea la formación de oligosacáridos monoglucosilados, demuestra la existencia de una función adicional en la CNX que la hace imprescindible para la célula y que no es la unión vía glicanos a las glicoproteínas en proceso de plegamiento.

En concordancia con nuestros resultados, recientemente se observó que la delección del dominio central de la CNX de *S. pombe* conteniendo las repeticiones de los Motivos 1 y 2 de unión a oligosacáridos monoglucosilados y a Ca²⁺ no afectó la viabilidad celular (109). Es más, el dominio central no fue capaz de complementar la letalidad de la CNX y se concluyó que la interacción de intermediarios monoglucosilados del plegamiento con el dominio lectina central de la CNX no es esencial para la viabilidad en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, este dominio se requiere cuando las células se enfrentan a un estrés de RE elevado, como ser la combinación del agregado de DTT y la elevada temperatura. Esto es consistente con resultados previos de nuestro laboratorio que mostraron que células *S. pombe* doble mutantes GT⁻/ALG6⁻, que no forman oligosacáridos monoglucosilados y presentan hipoglicosilación de las proteínas no son viables a 37°C (88). Se propuso que la formación de oligosacáridos monoglucosilados es esencial para la viabilidad celular sólo en condiciones de estrés severísimo del RE, como ser la hipoglicosilación de las proteínas y shock de calor simultáneamente (88), probablemente porque se vio afectado el plegamiento de alguna glicoproteína necesaria para la síntesis de la pared celular. Esto se infirió del hecho de que el fenotipo de las mutantes podría revertirse con el agregado de sorbitol 1 M.

Que es lo que hace esencial a la CNX en condiciones normales? Dado que la CNX de *S. pombe* posee cuatro sitios de unión a Ca²⁺, se postuló que esta proteína tendría un rol en la homeostasis de Ca²⁺ en el RE. Sin embargo, estos sitios están en la región central delecionada cuya ausencia no afectó la viabilidad a 28°C. Por otra parte, se demostró que una secuencia del extremo C-terminal de la CNX que comprende los últimos 52 aa del dominio luminal de la CNX contienen la/s función/es esencial/es de la CNX (109). Esa región es suficiente para la interacción con la chaperona BiP, por lo que una de las funciones esenciales de la CNX podría residir en la formación de complejos con chaperonas del RE, que podrían estar implicados en el plegamiento de las proteínas. Alternativamente esos 52 aa podrían tener en sí mismos alguna otra función desconocida aún. Otros autores demostraron que los últimos 62 aa de la CRT, la homóloga soluble de la CNX, son dispensables para la unión a oligosacáridos monoglucosilados (110), confirmando que lo que hace indispensable a la CNX no es la capacidad de unir oligosacáridos monoglucosilados.

III - Los oligosacáridos monoglucosilados facilitan el plegamiento de glicoproteínas en *S. pombe*

El hecho de que las mutantes $GII\alpha^-$ obtenidas en este trabajo sean viables indicó que la formación de oligosacáridos monoglucosilados N-unidos a proteínas ($Glc_1Man_9GlcNAc_2$) no es esencial para la viabilidad de las levaduras *S. pombe* cuando éstas son crecidas en ausencia de estrés. En nuestro laboratorio se demostró recientemente que la formación de oligosacáridos monoglucosilados sí es esencial para la viabilidad de dicha levadura pero sólo en condiciones de estrés extremo del RE como ser simultáneamente la hipoglicosilación de proteínas y alta temperatura (88). Concordantemente se demostró que el dominio central de unión a oligosacáridos de la CNX no es esencial para la viabilidad en condiciones normales pero sí en condiciones extremas como lo es el agregado de DTT y calor (109). Esto planteó la cuestión de cuál es la función de los oligosacáridos monoglucosilados N-unidos a proteínas en condiciones normales de crecimiento de las levaduras.

Se planteó la hipótesis de que si los oligosacáridos monoglucosilados de las glicoproteínas facilitaran su plegamiento, como ocurre en células de mamífero (80), entonces la falta de los mismos debería conducir a una acumulación de glicoproteínas mal plegadas en el RE aún en ausencia de un estrés exógeno. Como ya se explicó, la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE produce la inducción de mRNAs que codifican para chaperonas y otras proteínas que asisten el plegamiento, respuesta conocida como UPR. La chaperona BiP es una de las más abundantes en el RE y los tratamientos que causan una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE inducen su expresión (101). Hemos abolido totalmente o disminuido fuertemente la formación de oligosacáridos monoglucosilados *in vivo* en *S. pombe* mediante la disrupción de los genes que codifican para las subunidades α y β de la GII, en este trabajo, y la GT en un trabajo previo de este laboratorio (30). Las mutantes crecidas en ausencia de estrés mostraron que en estas células se induce el mRNA codificante de BiP, lo que indica que estas mutantes acumulan proteínas mal plegadas en el RE.

La retención de dos unidades de glucosa en los oligosacáridos unidos a proteína de las mutantes GII^- , no se supone que deba causar *per se* mal plegamiento de las glicoproteínas, ya que ha sido determinado que en el RE de *S. Pombe* los oligosacáridos son principalmente procesados a $Man_9GlcNAc_2$ y que la estructura terciaria de este compuesto es la misma ya tenga uno, dos o ninguna glucosa (14). Además, $GII\alpha$ y $GII\beta$ son proteínas lumbinales menores del RE, por lo que no se espera que su ausencia desencadene la respuesta de UPR por razones inespecíficas. A pesar de ello, mutantes $GII\alpha^-$ y $GII\beta^-$ crecidas en ausencia de estrés exógeno presentan una respuesta UPR. El mal plegamiento de las proteínas (y consiguiente inducción de BiP) en mutantes *gls2 α* y *gls2 β* no fue causado por un efecto de las dos glucosas retenidas sobre la estructura terciaria de las proteínas, sino por una deficiencia en la formación de oligosacáridos monoglucosilados, ya que en las mutantes GT^- (células que carecen de la reglucosilación mediada por GT pero que no acumulan oligosacáridos diglucosilados) también se observó la inducción de BiP.

La inducción del mRNA codificante de BiP en ausencia de estrés exógeno se vio también en una línea celular de mamíferos deficiente en actividad GII (111), pero no puede concluirse en ese caso que la UPR sea consecuencia exclusivamente de la falta de GII, ya que esas mutantes fueron obtenidas por mutagénesis química y posterior selección de células resistentes a leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. Por el contrario, el análisis por Southern Blot de todas las mutantes empleadas en este trabajo mostró que el marcador genético utilizado para las disrupciones (*ura4⁺*) se incorporó una vez en el genoma y en el lugar esperado en cada caso.

La acumulación de glicoproteínas en las células defectivas en la formación de oligosacáridos monoglucosilados se evidenció no sólo por la respuesta UPR sino también por la elevada proporción de oligosacáridos RE-específicos unidos a proteínas detectada en mutantes $GII\alpha^-$ y GT^- comparada con células WT. Dicho aumento de oligosacáridos RE-específicos pudo ser imitado tratando células WT con DTT, agente reductor que al impedir la formación de puentes disulfuro de las proteínas que se están sintetizando y plegando en el RE, provoca la acumulación de proteínas con conformaciones no nativas.

La formación de oligosacáridos monoglucosilados disminuye la velocidad de plegamiento pero aumenta su eficiencia en *S. pombe* al igual que en células de mamífero. Esto se vio siguiendo el procesamiento de CPY, una glicoproteína que se sintetiza como un pre-pro-polipéptido y se secreta a vacuola: su localización en ese compartimento puede ser visualizada por la aparición de una forma madura más corta. En células $GII\alpha^-$, la CPY arribó a vacuola más rápido que en las células WT pero lo hizo en menor cantidad, lo que concuerda con el hecho de que haya glicoproteínas acumuladas en el RE de esta mutante que tiene abolida la capacidad de formar $Glc_1Man_9GlcNAc_2$.

Estos resultados confirman que los oligosacáridos monoglucosilados están involucrados en el rol de facilitar el plegamiento de glicoproteínas en el RE. La ausencia de un fenotipo discernible en células mutantes $GII\alpha^-$, $GII\beta^-$ y GT en la que la formación de oligosacáridos monoglucosilados y por lo tanto la interacción con CNX está abolida o severamente disminuida, puede ser explicado por la inducción de BiP y probablemente de otras chaperonas y proteínas que asisten el plegamiento que compensen la falta total o parcial de oligosacáridos monoglucosilados. Como ya se mencionó, sólo bajo condiciones extremas de estrés la formación de dichos oligosacáridos mostró ser necesaria para la viabilidad de *S. pombe*. Por otra parte, muchas glicoproteínas podrían plegarse correctamente en ausencia de interacción con CNX (80).

En mutantes GII de *S. cerevisiae* crecidas en condiciones no estresantes, no se observa la inducción del mRNA de BiP. Este resultado, como así también la ausencia de GT en esta levadura y la existencia de un homólogo de CNX con variaciones muy importantes en el dominio central involucrado en su función de lectina siembra dudas sobre la existencia en esta levadura de un mecanismo de control de calidad del plegamiento como el propuesto para mamíferos (112).

IV - Una conformación mal plegada *in vivo* no es condición suficiente para la glucosilación de las glicoproteínas mediada por la GT.

La reglucosilación de glicoproteínas incompletamente plegadas en el RE permite su interacción con CNX y CRT, lectinas específicas para oligosacáridos monoglucosilados, que retienen en el RE a las proteínas en proceso de plegamiento y de oligomerización. La enzima responsable de la reglucosilación, GT, es una sensora de plegamiento que posee la propiedad de transferir en extractos libres de células una Glc al oligosacárido $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ de glicoproteínas desnaturalizadas exclusivamente, restituyendo así la posibilidad de interacción con CNX y CRT. Una conformación mal plegada del sustrato aceptor mostró ser una condición necesaria y suficiente para la glucosilación *in vitro* (25, 24).

Como ya se mencionó, la propiedad de glucosilar exclusivamente glicoproteínas mal plegadas como sustrato *in vitro* es compartida por GTs purificadas de mamíferos, insectos, y células de levaduras (25, 26, 27). Se reportó además que la glucosilación es dependiente del reconocimiento por parte de la enzima de dominios expuestos en conformaciones desnaturalizadas pero no en las nativas, ya que ni glicopéptidos ni glicoproteínas nativas son glucosilados por la enzima. De otros estudios se concluyó que la GT requería además de una conformación desnaturalizada, de tener acceso a la GlcNAc más interna del oligosacárido para catalizar la glucosilación (33). Exceptuando esto último, no se conocen aún finamente los mecanismos por los que la GT discrimina entre estructuras proteicas nativas y no nativas.

Se planteó el interrogante de si una conformación mal plegada es suficiente para la glucosilación *in vivo* de todos los oligosacáridos por la GT. Para asegurar que sólo la glucosilación por la GT fuera analizada (es decir, que los oligosacáridos monoglucosilados analizados provienen de la actividad de la GT y no de la deglucosilación parcial del oligosacárido transferido) y para que los residuos de Glc agregados por la GT no fuesen removidos se construyó una doble mutante de *S. pombe* $\text{GII}\alpha^-/\text{ALG6}^-$. Esta mutante transfiere $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a las cadenas polipeptídicas nacies y carece de actividad GII.

Mutaciones de las Cys de las glicoproteínas causan retención en el RE, reflejando el rol central de la formación de puentes disulfuro intra e intercatenarios en el plegamiento en el RE. La adición de concentraciones milimolares de DTT ha sido usado ampliamente para promover la formación de estructuras mal plegadas en proteínas en proceso de síntesis y translocación al RE: en *S. cerevisiae* se vio que la droga previene el plegamiento y la secreción de las especies conteniendo puentes disulfuro mientras que no afecta a las proteínas carentes de dichos puentes (98, 99). Hemos encontrado que la adición de DTT en concentraciones milimolares a células mutantes intactas de *S. pombe* no provocó un aumento de la glucosilación de glicoproteínas mediada por la GT. Se probó que esto no podía deberse 1) a que el DTT no impida el plegamiento correcto de las glicoproteínas, 2) a un efecto deletéreo del DTT en la maquinaria celular de glucosilación, 3) a una baja cantidad o a la saturación de la enzima glucosilante ni 4) a una baja cantidad de glicoproteínas conteniendo disulfuros en el RE de *S. pombe* (es decir, a una baja proporción de especies mal plegadas creadas por DTT). De estos resultados se concluyó que

contrariamente a lo que ocurre en ensayos libres de células, una conformación mal plegada no es una condición suficiente *in vivo* para la glucosilación de las glicoproteínas mediada por la GT.

El otro procedimiento utilizado para promover el mal plegamiento de glicoproteínas (shock de calor) impidió el plegamiento correcto de todas las glicoproteínas sintetizadas en células WT, ya que en experimentos de pulso y chase a tiempos largos de marcación sólo se encontraron oligosacáridos específicos del RE. Cuando el mismo experimento se realizó en células doble mutantes $GII\alpha^-/ALG6^-$ se encontró una proporción significativa de oligosacáridos retenidos en el RE que no estaban glucosilados, confirmando que una conformación mal plegada *no es una condición suficiente* para la glucosilación *in vivo* de todos los oligosacáridos N-unidos a proteínas mediada por la GT.

Esto planteó una contradicción con los resultados obtenidos *in vitro* para la GT. Posteriormente a la publicación de estos resultados (113), Trombetta *et al.* analizaron la actividad de GT con una serie de sustratos compuestos por confórmers bien definidos de la glicoproteína RNAsaB, (114). La RNAsa B nativa no funcionó como sustrato de la GT, como así tampoco las conformaciones con perturbaciones sutiles respecto de la estructura nativa. Sin embargo, tampoco los confórmers *completamente* desnaturalizados de la RNAsaB (obtenidos por reducción de los puentes disulfuro y posterior alquilación para impedir su reoxidación) fueron reconocidos por la GT. Sólo los confórmers *parcialmente* estructurados sirvieron de sustrato a la enzima. Es decir, una conformación parcialmente estructurada fue mejor sustrato para la GT que una forma completamente desnaturalizada, indicando una preferencia por intermediarios estructurados del plegamiento con flexibilidad limitada. El hecho de que no todas las conformaciones no nativas de la RNAsaB sean reconocidas por la GT puede ser una de las razones por las que el mal plegamiento de proteínas causado por la inhibición de la formación de puentes disulfuro durante el proceso de plegamiento, no resultase en un aumento generalizado de la reglucosilación en *S. pombe*. Estos resultados implican la preferencia de la GT por diferentes estructuras no nativas *in vivo*: el DTT pudo haber evitado que las glicoproteínas alcanzaran un hipotético estado avanzado de plegamiento requerido para la acción de la GT.

En *T. cruzi* la formación de oligosacáridos monoglucosilados depende exclusivamente de la actividad GT (ver Figura 4), lo que permitió establecer que hay una reglucosilación selectiva por la GT de estadios avanzados del plegamiento de la glicoproteína lisosomal cruzipaina *in vivo*, después de una oxidación casi completa de sus puentes disulfuro (115), indicando de nuevo un requerimiento de una estructura parcialmente formada para la reglucosilación mediada por GT *in vivo*.

Tomados juntos, el hecho de que el rol de los oligosacáridos monoglucosilados sea el de facilitar el plegamiento de las glicoproteínas en el RE, que una conformación mal plegada de las glicoproteínas del RE no sea suficiente para la glucosilación mediada por la GT *in vivo* y que la GT tenga preferencia por sustratos que presenten una estructura parcialmente plegada sugiere que la GT probablemente participe en la glucosilación de los estadios finales del plegamiento de glicoproteínas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La disrupción de la subunidad α de la GII provocó la pérdida total de actividad en microsomas de *S. pombe* y la formación del oligosacárido unido a proteínas $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ *in vivo*. La secuencia de dicha subunidad reveló que ésta carece de señal de retención en el RE en su extremo C-terminal. La secuencia de la subunidad β contiene la señal VDEL y su disrupción abolió la actividad catalítica de la GII *in vitro*, demostrándose la estructura heterodimérica de la GII. En las mutantes $\text{GII}\beta^-$ se encontraron *in vivo* pequeñas cantidades de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en los oligosacáridos unidos a proteínas. Postulamos que estos oligosacáridos son formados por la actividad catalítica de la GII en su tránsito a través del RE, y que ésta no se ve afectada por la pérdida de la subunidad β , cuya función primaria consistiría en retener a esta proteína en el lumen del RE.

En *S. pombe* la CNX es esencial para la viabilidad celular. Sin embargo, se obtuvieron mutantes de *S. pombe* en la que la capacidad de formar oligosacáridos monoglucosilados fue eliminada mediante la disrupción de la actividad $\text{GII}\alpha$, no afectándose el crecimiento celular. Esto significa que la CNX y no los oligosacáridos monoglucosilados son esenciales en condiciones normales de crecimiento y que la esencialidad de la CNX debe buscarse en otra función de dicha proteína que no sea la unión de oligosacáridos monoglucosilados.

A pesar de no ser esenciales para la viabilidad celular, la falta total (células $\text{GII}\alpha^-$) o parcial (células $\text{GII}\beta^-$ y GT^-) de oligosacáridos monoglucosilados provoca en la célula una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. Esto se evidenció por la inducción del mensajero de la chaperona del RE BiP en las mutantes crecidas en condiciones normales. Además, una mayor proporción de oligosacáridos en estas mutantes resultaron poseer en sus glicoproteínas estructuras específicas del RE.

Tal como fue descripto para células de mamífero, en células intactas de *S. pombe* la formación de oligosacáridos monoglucosilados reduce la velocidad de plegamiento, pero aumenta su eficiencia, indicando un rol de los oligosacáridos monoglucosilados en la facilitación del plegamiento de las glicoproteínas, además del propuesto en la retención en el RE de especies mal plegadas para su posterior degradación.

Contrariamente a lo observado *in vitro*, la formación de proteínas mal plegadas causada tanto por la reducción de puentes disulfuro como por un shock de calor no es una condición suficiente para la glucosilación *in vivo* por la GT. La razón para este resultado debe buscarse en las restricciones de la GT para reconocer sus sustratos: solo glucosilaría glicoproteínas que presenten una estructura parcial o un intermediario del plegamiento con flexibilidad limitada, ausente en las formas completamente desplegadas. Estos resultados sugieren que las glicoproteínas que se pliegan en el RE no son sometidas al sistema de control de calidad mediado por GT en las etapas iniciales del plegamiento sino en las etapas finales del proceso.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- 1 Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M. Roberts, K. y Watson, J.D. *Molecular Biology of the Cell*, 3ra edición. Garland Publishing, Inc. New York & London. Capítulo 12, 577-592.
- 2 Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664
- 3 Helenius, A. y Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans (2001) *Science* **291**, 2364-2369
- 4 Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1979) The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eukariotic cell. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 1-37
- 5 Parodi, A.J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* **348**, 1-13
- 6 Parodi, A.J. (2000) Protein glucosilation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69-93
- 7 Silberstein, S. y Gilmore, R. (1996) Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* **10**, 849-858
- 8 Imperiali, B y Rickert, K.W (1995) Conformational implications of asparagine-linked glycosylation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7466-7470
- 9 Turco, S.J., Stetson, B. y Robbins, P.W. (1977) Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4411-4414
- 10 Ballou, L.; Gopal, P.; Krummel, B.; Tammi, M. y Ballou, C. (1986) A mutation that prevents glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide precursor leads to underglycosilation of secreted yeast invertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 3081-3085
- 11 Abeijon, C.; Hirschberg, C.B. (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 32-66
- 12 Reiss, G., Heesen, S., Zimmerman, J., Robbins, P. and Aebi, M. (1996) Isolation of the ALG6 locus of *Saccharomyces cerevisiae* required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway. *Glicobiology*, **6**, 493-498
- 13 Weng, S. y Spiro, R.G. (1993) Demonstration that a kifunensin-resistant α -mannosidase with a processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells *J. Biol. Chem.* **268**, 25656-25663
- 14 Ziegler, F.D.; Germill, T.R. y Trimble, R.B. (1994) Glicoprotein synthesis in yeast: Early events in N-linked oligosaccharide processing in *Schizosaccaromyces pombe* *J. Biol. Chem.* **269**, 12527-12535
- 15 Parodi, A.J. y Quesada-Allue, L.A.(1982) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi* I: Characterization of dolichol-bound mososaccharides and oligosaccharides synthesized "in vivo". *J. Biol.Chem.* **257**, 7637-7640
- 16 Previato, J.O.; Mendelzon, D.H. y Parodi, A.J (1986) Characterization of dolichol monophosphate- and dolichol diphosphate-linked saccharides in trypanosomatid flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**, 343-353
- 17 Mendelzon, D.H.; Previato, J.O. y Parodi, A.J. (1986) Characterization of protein-linked oligosaccharides in trypanosomatid flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**, 355-367
- 18 Parodi, A.J. y Cazzulo, J.J. (1982) Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi* II: Partial haracterization of protein-bound oligosaccharides labeled "in vivo". *J. Biol. Chem.* **257**, 7641-7645
- 19 Parodi, A.J.; Lederkremer, G.Z.; y Mendelzon, D.H. (1983) Protein glucosilation in *Trypanosoma cruzi*. The mechanism of glycosilation and structure of protein-bound oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **258**, 5589-5595

- 20 Parodi, A.J.; Mendelzon, D.H. y Lederkremer, G.Z. (1983) Transient glucosylation of protein-bound Man₉GlcNAc₂, Man₈GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ in calf thyroid cells: a possible recognition signal in the processing of glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **258**, 8260-8265
- 21 Parodi, A.J.; Mendelzon, D.H.; Lederkremer, G.Z. y Martin-Barrientos, J. (1984) Evidence that transient glycosilation of protein-linked Man₉GlcNAc₂, Man₈GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ occurs in rat liver and *Phaseolus vulgaris* cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 6351-6357
- 22 Trombetta, S.E.; Bosch, M. y Parodi, A.J. (1989) Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry* **28**, 8108-8116
- 23 Gañán, S.; Cazzulo, J.J. y Parodi A.J. (1991) A major proportion of N-glycoproteins are transiently glucosylated in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**, 3098-3104
- 24 Sousa, M.; Ferrero-García, M. y Parodi, A.J. (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase *Biochemistry* **31**, 97-105
- 25 Trombetta, S.E y Parodi, A.J. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 9236-9240
- 26 Fernández, F.; Trombetta, S.E.; Hellman, U. y Parodi, A.J. (1994) Purification to homogeneity of UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 30701-30706
- 27 Parker, C.G.; Fessler, L.I.; Nelson, R.E. y Fessler, J.H. (1995) Drosophila UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. *EMBO J.*, **14**, 1294-1303
- 28 Trombetta, S.E.; Gañán, S. y Parodi, A.J. (1991) The UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum. *Glycobiology* **1**, 155-161
- 29 Trombetta, E.S. y Helenius, A. (1999) Glycoprotein glucosilation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **18**, 3282-3292
- 30 Fernández, F.; Jannatipour, M.; Hellman, U.; Rokeach, L.A. y Parodi, A.J. (1995) 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. *EMBO J.* **15**, 705-713 (1996)
- 31 Tessier, D.C.; Dignard, D.; Zapun, A.; Radominska-Pandya, A.; Parodi, A.J.; Bergeron, J.J.M. y Thomas, D.Y. (2000) Cloning and characterization of mammalian UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase and the development of a specific substrate for this enzyme. *Glycobiology* **10**, 403-412
- 32 Hendrick, J.P. y Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384
- 33 Sousa, M. y Parodi, A.J. (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* **14**, 4196-4203
- 34 Suzuki, C. K., Bonifacino, J. S., Lin, A. Y., Davis, M. M. and Klausner, R. D. (1991) Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. *J. Cell Biol.* **114**, 189-205
- 35 Lodish, H. F. and Kong, N. (1990) Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**, 10803-10899
- 36 Hwang, C., Sinskey, A. J. and Lodish, H. F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**, 1496-1502
- 37 Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992) Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **11**, 1717-1722

- 38 Rothman, J. E. (1989) Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* **59**, 591-601
- 39 Pelham, H. R. B. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**, 959-961
- 40 Braakman, I., Helenius, J. and Helenius, A. (1992) Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature* **356**, 260-262
- 41 Haas, I.G. y Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* (London) **306**, 387-389.
- 42 Sorger, P.K. y Pelham, H.R. (1987) The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J. Mol. Biol.* **194**, 341-344
- 43 Bulleid, N. J. and Freedman, R. B. (1988) Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes. *Nature* **335**, 649-651
- 44 Mazzarella, R.A., Srinivasan, M. Haugejorden, S.M. y Green, M (1990) ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active sites sequences of protein disulphide isomerase. *J. Biol. Chem.* **265**, 1094-1101
- 45 Freedman, R. B. (1989) Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* **57**, 1069-1072
- 46 Bergeron, J.J.M.; Brenner, M.B.; Thomas, D.Y. y Williams, D.B. (1994) Calnexin: a membrane bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 124-128
- 47 Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-430
- 48 Ronnet, G.V.; Knutson, V.P.; Kohanski, R.A.; Simpson, T.L. y Lane, M.D. (1984) Role of glycosylation in the processing of newly translated insulin proreceptor in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 4566-4575
- 49 Sliker, L.J.; Martensen, T.M. y Lane, M.D. (1986) Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**, 15233-15241
- 50 Marquardt, T. y Helenius, A. (1992) Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **117**, 505-513
- 51 Imperiali, B. y O'Connor, S.E. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 643-649
- 52 Wormald, M.R. y Dwek, R.A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability *Structure Fold. Des.* **7**, R155
- 53 Degen, E. y Williams, D.B. (1991) Participation of a novel 88 kDa protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J. Cell Biol.* **112**, 1099-1115
- 54 Ou, W.J.; Cameron, P.H.; Thomas, D.Y. y Bergeron, J.J.M. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* (London) **364**, 771-776
- 55 Hammond, C.; Braakman, I.; y Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 913-917
- 56 Hebert, D.N.; Foellmer, B. y Helenius, A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425-433
- 57 Peterson, J.R.; Ora, A.; Van Nguyen, P. y Helenius, A. (1995) Calreticulin is a lectin-like molecular chaperone for glycoproteins of the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1173-1184
- 58 Vassilakos, A.; Michalak, M.; Lehrman, M.A. y Williams, D.B. (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480-3490

- 59 Ware, F.E.; Vassilakos, A.; Peterson, P.A.; Jackson, M.R.; Lehrman, M.A. y Williams, D.B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc₁Man₉GlcNAc₂ oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins *J. Biol. Chem.* **270**, 4697-4704
- 60 Patil, A.R.; Thomas, C.J. y Surolia, A. (2000) Kinetics and the mechanism of interaction of the endoplasmic reticulum chaperone calreticulin with monoglucosylated (Glc₁Man₉GlcNAc₂) substrate. *J. Biol. Chem.* **275**, 24348-24356
- 61 Hammond, C. y Helenius, A. (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523-529
- 62 Reddy, P.S. y Corley, R.B. (1998) Assembly, sorting and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays* **20**, 564-554
- 63 Zhang, J.X.; Braakman, I.; Matlak, K.E.S y Helenius, A (1997) Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1943-2968
- 64 Oliver, J.D.; Van del Wal, F.; Bulleid, N.J. y High, S. (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**, 86-88
- 65 Zapun, A.; Darby, N.J.; Tessier, D.C.; Michalak, M.; Bergeron, J.J.m y Tomas, D.Y. (1998) Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin and calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.* **273**, 6009-6012
- 66 Molinari, M. y Helenius, A. (1999) Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**, 90
- 67 Zhang, Q.; Tector, M. y Salter, R.D. (1995) Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of Class I Major Histocompatibility complex molecules *J. Biol. Chem.* **270**, 3944-3948
- 68 Ellgaard, L.; Molinari, M. y Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888
- 69 Liu, Y.; Choudhury, P.; Cabral, C. y Sifers, R. (1999) Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **274**, 5861-5867
- 70 Jakob, C.A.; Burda, P.; Roth, J. y Aepli, M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J. Cell. Biol.* **142**, 1223-1233
- 71 Jannatipour, M. y Rokeach, L.A (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J. Biol. Chem.* **270**, 4845-4853
- 72 Parlati, F.; Dignard, D.; Bergeron, J.J.M. y Thomas, D.Y. (1995) The calnexin homologue *cnx1⁺* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J.* **14**, 3064-3072
- 73 Moreno, S.; Klar, A. y Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795-823
- 74 Russell, P.R. y Nurse, P. (1986) *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* **45**, 781-782
- 75 Trombetta, S.E.; Simons, J.F. y Helenius, A. (1996) Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 27509-27516
- 76 Arendt, C.W. y Ostergaard, H.L. (1997) Identification of the CD45-associated 116-kDa and 80-kDa proteins as the α and β subunits of α -glucosidase II. *J. Biol. Chem.* **272**, 13117-13125
- 77 Brada, D. y Dubach, U.D. (1984) Isolation of homogeneous glucosidase II from pig kidney microsomes. *Eur. J. Biochem.* **141**, 149-156

- 78 Kaushal, G.P.; Pastuszak, I.; Hatanaka, K. y Elbein, A.D. (1990) Purification to homogeneity and properties of glucosidase II from mung bean seedlings and suspension-cultured soybean cells. *J. Biol. Chem* **265**, 16271-16279
- 79 Flura, T.; Brada, D.; Ziak, M. y Roth, J. (1997) Expression of a cDNA encoding the glucose trimming enzyme glucosidase II in CHO cells and molecular characterization of the enzyme deficiency in a mutant mouse lymphoma cell line. *Glycobiology* **7**, 617-624
- 80 Hebert, D.N.; Foellmer, B. y Helenius, A. (1996) Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes *EMBO J.* **15**, 2961-2968
- 81 Wright, A. y Robbins, P.W. (1965) Enzymatic synthesis of uridine diphosphate [¹⁴C]glucose *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 594-596
- 82 Alfa, C.; Fantes, P.; Hyams, J.; McLeod, M y Wabrik, E. (1993) *Experiments with Fission Yeast: A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Capítulo 17, 106-110
- 83 Broger, M. (1993) Rapid transformation of criopreserved *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Biotechniques* **15**, 599-600
- 84 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY
- 85 Ausubel, F.M. *et al.* (1997) *Current Protocols in Molecular Biology* Volumen 2, Capítulo 13, Unidad 13.12.2 (suplemento 23)
- 86 D'Alessio, C.; Fernandez, F.; Trombetta E.S. y Parodi A.J. Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunit-encoded genes on glycoprotein folding. *J. Biol. Chem.* (1999) **274** (36), 25899-25905
- 87 Boeke, J.D.; Lacroute, F. y Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 345-346
- 88 Fanchiotti, S.; Fernández, F.; D'Alessio, C. y Parodi, A.J. (1998) The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J. Cell Biol.* **143**, 625-635
- 89 Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- 90 Parodi, A. J., Staneloni, R. J., Cantarella, A. I., Leloir, L. F., Behrens, N. H., Carminatti, H and Levy, J. (1973) *Carbohydr. Res.* **26**, 393-400.
- 91 Parodi, A.J.; Quesada-Allue, L.A. y Cazzulo, J.J. (1981) Pathway of protein glycosylation in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6201-6205
- 92 Bosch, M.; Trombetta, S. Engstrom, U. y Parodi, A.J. (1988) Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa. *J. Biol. Chem.* **263**, 17360-17365
- 93 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- 94 Munro, S. y Pelham, H.R.B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907
- 95 Pelham, H.R.B. (1988) Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* **7**, 913-918
- 96 Nasim, A.; Young, P. y Johnson B.F. (1989) *Molecular Biology of the fission yeast* Academic Press, Inc. Capítulo 7, 260-262.

- 97 Chappell, T.G.; Graham, W. (1989) A galactosyltransferase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* **109**, 2693-2702
- 98 Jamsa, E.; Simonen, M. y Makarow, M. (1994) Selective retention of secretory proteins in the yeast endoplasmic reticulum by treatment of cells with a reducing agent *Yeast* **10**, 355-370
- 99 Simons, J.F.; Ferro-Novick, S.; Rose, M.D. y Helenius, A. (1995) BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J. Cell Biol.* **130**, 41-49
- 100 Kozutsumi, Y.; Segal, M.; Normington, K.; Gething, M.J. y Sambrook, J. (1988). *Nature* **332**, 462-464
- 101 Pidoux, A.L. y Armstrong, J. (1992) Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **11**, 1583-1591
- 102 Tabuchi, T.; Iwaihara, O.; Ohtani, Y.; Ohuchi, N.; Sakurai, J.; Morita, T.; Iwahara, S. y Takegawa, K. (1997) Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport and processing of Carboxipeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **179**, 4179-4189
- 103 Hermans, M.M.; Kross, M.A.; Van Beeumen, J.; Oostra, B.A. y Reuser, A.J. (1991) Human lysosomal α -glucosidase. Characterization of the catalytic site. *J. Biol. Chem.* **266**, 13507-13512
- 104 Iwanami, S.; Matsui, H.; Kimura, A.; Ito, H.; Mori, H.; Honma, M. y Chiba, S. (1995). Chemical modification and amino acid sequence of active site in sugar beet α -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 459-463
- 105 Trembl, K.; Meimaroglou, D. Hengtes, A. y Bause, E. (2000). The α - and β - subunits are required for expression of catalytic activity in the heterodimeric glucosidase II complex from human liver. *Glycobiology* **10**, 493-502
- 106 Hengtes, A. y Bause, E. (1997) Affinity purification and characterization of glucosidase II from pig liver. *Biol. Chem.* **378**, 1031-1038
- 107 Pelletier, M.F.; Marcil, A.; Sevigny, G.; Jakob, C.A.; Tessier, D.C.; Chevet, E.; Menard, R.; Bergeron, J.J.M. y Tomas, D.Y. The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization *in vivo*. *Glycobiology* **10**, 815-827
- 108 Trombetta, E.S. y Helenius, A. (1998) Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 587-592
- 109 Elagöz, A.; Callejo, M. Armstrong, J. y Rokeach, L.A. (1999) Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J. Cell Sci.* **112**, 4449-4460
- 110 Peterson, J.R. y Helenius, A. (1999) In vitro reconstitution of calreticulin-substrate interactions. *J. Cell Sci.* **112**, 2775-2784
- 111 Balow, J.P.; Weissman, J.D. y Kears, K.P. (1995) Unique expression of major histocompatibility complex class I proteins in the absence of glucose trimming and calnexin association. *J. Biol. Chem.* **270**, 29025-29029
- 112 Parodi, A.J. (1999) Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* **1426**(2), 287-295
- 113 Fernández, F.; D'Alessio, C.; Fanchiotti, S. y Parodi, A.J. (1998) A misfolded protein conformation is not a sufficient condition for *in vivo* glucosylation by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase *EMBO J.* **17**, 5877-5886
- 114 Trombetta, E.S. y Helenius, A. (2000) Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **148**, 1123-1129
- 115 Labriola, C.; Cazzulo, J.J. y Parodi, A.J. (1999) *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 1381-1394