



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Transportadores de nucleótidos de azúcar:
mecanismo de transporte y relevancia funcional**

Directores de Tesis

Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer

Dr. Carlos B. Hirschberg

Lugares de Trabajo

Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Universidad de Buenos Aires

Molecular and Cell Biology Department. Boston University

Carolina E. Caffaro

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

2006

*A mi abuelo José,
por ser un ejemplo de esfuerzo y perseverancia,
por alentarme en mis estudios,
por todo su amor.*

Agradecimientos

Creo que es esta, la parte más importante de una tesis porque demuestra que el hombre es un animal social que busca y necesita del continuo apoyo de otras personas, sean familiares, amigos o compañeros de trabajo. Escribir los agradecimientos lleva a una profunda reflexión en la que se hace evidente que durante los años de estudiante de doctorado, uno no sólo ha crecido a nivel profesional sino también en lo personal y resulta difícil discernir quienes han contribuido en uno u otro aspecto porque ambas áreas terminan estrechamente entrelazadas constituyendo la integridad de una persona. Con todo esto pretendo, en cierta forma, justificar el desorden en los agradecimientos y la cantidad de nombres que quiero dejar plasmados en estas páginas porque hacia todos ellos me siento profundamente agradecida.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Carlos Hirschberg, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haber aceptado la responsabilidad de dirigir mi tesis. Gracias por la libertad que tuve para trabajar y pensar, por su paciencia y aún más agradecida estoy por su apoyo en los momentos difíciles, su generosidad, su calidez y comprensión.

Quiero agradecer también a la Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer, por su confianza en mi trabajo y su ayuda desinteresada.

Al Dr. Miklos Sahin-Toth, por haber escuchado y discutido mis experimentos una y mil veces con infinita paciencia y buena predisposición.

A Patricia, por su apoyo permanente y motivación.

A Marcos y a Luigi, por la paciencia que tuvieron para explicarme experimentos a distancia, por teléfono o por email.

A mis compañeros de laboratorio, todos. No hay quien no haya contribuído a mi tesis, ya sea con un plásmido, una sugerencia, una conversación extra laboral. Gracias Paula por tantos almuerzos juntas, por tantas charlas de amigas, por tanta contención en momentos difíciles.

A Dolly, Keri y Liz, por el buen humor y predisposición a ayudarme.

A Mariana, por tansmitirme fuerza cuando más la necesitaba, por su transparencia y afecto.

A Guada y Miguel, por estar siempre, por no dejar que la distancia nos aleje.

A todos mis amigos en Boston, no hubiese podido seguir adelante sin ellos. A Laurent, por su compañía y ayuda durante la redacción de esta tesis y en especial a Jorge, por la gran amistad y cuidado que me brindó estos años en Boston.

Finalmente, quiero agradecer a las personas que constituyen mi familia, biológica y por elección:

Mis padres, quienes siempre me apoyaron y estimularon para seguir adelante. Gracias por cuidarme y quererme tanto.

Mis hermanos, María Julia e Ignacio, quienes han enriquecido mi vida inmensamente y a quienes admiro profundamente.

Mis sobrinos, Santiago y Matías, quienes sin saberlo me han transmitido un enorme amor a la vida.

Lucila y Eliana, amigas del alma, amigas siempre.

Elisa, mi hermana en Boston, gracias por tu empatía, por todos los momentos que nos reímos y lloramos juntas. Gracias por apoyarme en todo.

Dani, por animarme a esta experiencia y por los proyectos compartidos.

***Nucleotide Sugar Transporters: transport mechanism
and functional relevance***

In eukaryotes, half of cellular proteins are secreted or membrane bound. Both groups of proteins are synthesized on membrane bound polysomes and translocated into the lumen of the endoplasmic reticulum and thereafter migrate via vesicles to the Golgi apparatus. In the lumen of the Golgi apparatus, most of these proteins become glycosylated by substrates which are nucleotide-sugars. These nucleotide derivatives must be transported from the cytosol, the site where most are synthesized, into the lumen of the above organelle. Transport into the lumen of the Golgi apparatus is mediated by specific transporters, named nucleotide sugar transporters.

C.elegans is a genetically and developmentally well characterized organism for which only 2 out of 18 putative nucleotide sugar transporter-like proteins have been described. Here we have characterized a nucleotide sugar transporter of *C. elegans* encoded by the gene CO3H5.2 which translocates UDP-*N*-acetylglucosamine and UDP-*N*-acetylgalactosamine. Evidence was obtained that the two substrates are translocated via an independent and simultaneous manner, a novel mechanism that is different from the previously described multisubstrate nucleotide sugar transporters which are competitive and non cooperative.

We also obtained evidence for functional redundancy between CO3H5.2 and SRF-3, another nucleotide sugar transporter from *C.elegans*. This suggests a mechanism to ensure adequate glycoconjugate biosynthesis in multicellular organisms which in turn may be necessary for proper tissue development.

Leukocyte Adhesion Deficiency II is a human syndrome caused by mutations in the GDP-fucose transporter. We have designed and performed experiments that show that mutants in this transporter have partial activity. Thus it is not necessary to invoke other proteins to explain the residual transport activity observed in Golgi vesicles of patient cells.

Key words: transporters, nucleotide sugars, Golgi apparatus, glycoconjugates, *C.elegans*, functional redundancy.

Transportadores de nucleótidos de azúcar: mecanismo de transporte y relevancia funcional

En eucariontes, la mitad de las proteínas celulares son secretadas o permanecen unidas a membrana. Ambos tipos de proteínas son sintetizadas en ribosomas unidos a membrana y translocados al lumen del Retículo Endoplasmático. Desde allí, migran vía vesículas al aparato de Golgi y luego al destino final ya sea dentro o fuera de la célula. En el lumen del aparato de Golgi, un gran porcentaje de estas proteínas son glicosiladas por glicosiltransferasas que usan nucleótidos de azúcar como sustratos. Estos derivados nucleotídicos deben ser transportados desde el citosol, donde la mayoría son sintetizados, hacia el lumen del aparato Golgi. El transporte al lumen de esta organela es mediado por transportadores específicos, llamados transportadores de nucleótidos de azúcar.

C.elegans es un organismo bien caracterizado tanto desde el punto de vista genético como en cuanto al desarrollo, para el cual sólo se han descrito 2 de 18 putativos transportadores de nucleótidos de azúcar. En esta tesis, se caracterizó un transportador de nucleótidos de azúcar de *C.elegans* codificado por el gen C03H5.2 que transloca UDP-*N*-acetilglucosamina y UDP-*N*-acetilgalactosamina. Se obtuvo evidencia que los dos sustratos son transportados en forma independiente y simultánea, un mecanismo nuevo que es diferente del transporte competitivo no cooperativo previamente descrito para otro transportador de nucleótido de azúcar.

También hemos obtenido evidencia de redundancia funcional entre C03H5.2 y otro transportador de nucleótidos de azúcar de *C.elegans*, SRF-3. Esto sugiere un mecanismo que asegura una adecuada biosíntesis de glicoconjugados en organismos multicelulares que a su vez, es necesario para un correcto desarrollo tisular.

El Síndrome de Adhesión Leucocitaria II es un síndrome humano causado por mutaciones en el transportador de GDP-fucosa. Hemos establecido y realizado los experimentos que muestran que las mutantes en este transportador tienen actividad parcial. Entonces, no es necesario invocar otras proteínas para explicar la actividad de transporte residual observada en vesículas del aparato de Golgi de células de pacientes.

Palabras claves: transportadores, nucleótidos de azúcar, aparato de Golgi, glicoconjugados, *C.elegans*, redundancia funcional.

AG	Aparato de Golgi
ATP	Adenosina trifosfato
CMP	Citidina monofosfato
CS	Condroitín sulfato
DIDS	Acido 4,4'-diisotiocianato de estilbeno 2,2'-disulfónico
dsRNA	Double strain RNA (ARN doble cadena)
FACS	Fluorescent activated cell scanner (Lector de células fluorescentes)
GAG	Glicosaminoglicanos
GDP	Guanosina difosfato
GDPasa	Guanosina difosfatasa
GDP-Fuc	GDP-fucosa
GDP-Man	GDP-manosa
GMP	Guanosina monofosfato
HA	Acido hialurónico
HS	Heparán sulfato
IdoA	Acido idurónico
KS	Keratán sulfato
NDPasa	Nucleósido difosfatasa
NMR	Nuclear magnetic resonance (RMN, resonancia magnética nuclear)
PG	Proteoglicanos
RE	Retículo endoplasmático
RNAi	RNA interference (ARN interferente)
TSR	Transport specificity ratio(Relación de especificidad de transporte)
UDP-Gal	UDP-galactosa
UDP-GalNAc	UDP-N-acetilgalactosamina
UDP-GlcA	UDP-ácido glucurónico
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetilglucosamina
UDP-Xil	UDP-xilosa
UMP	Uridina monofosfato
WGA	Wheat Germ Agglutinin (Aglutinina de Germen de Trigo)

INDICE GENERAL

INTRODUCCION

Parte I. Transportadores de Nucleótidos de Azúcar

<i>Introducción</i>	1
<i>Características bioquímicas</i>	2
<i>Reconstitución en proteoliposomas</i>	4
<i>Los transportadores de nucleótidos de azúcar funcionan como antiporter</i>	5
<i>Expresión heteróloga</i>	9
<i>Características estructurales</i>	10
<i>Determinantes de especificidad de sustrato</i>	11
<i>Fenotipo de mutantes de transportadores de nucleótidos de azúcar</i>	16
<i>Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar en organismos multicelulares:</i>	
1- <i>Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar de humanos</i>	17
<i>Deficiencia de Adhesión Leucocitaria II (LAD II)</i>	19
a) <i>Manifestaciones a nivel celular</i>	20
b) <i>Bases moleculares de la enfermedad</i>	21
2- <i>Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar de C.elegans</i>	27
3- <i>Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar de Drosophila melanogaster</i>	30
4- <i>Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar de bovinos</i>	31
<i>Malformación Vertebral Compleja (CVM)</i>	31

Parte II. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans como modelo de estudio

<i>Ventajas</i>	33
<i>Dimorfismo sexual</i>	34
<i>Ciclo de vida</i>	36
<i>Glicoconjugados en C.elegans</i>	
1- <i>Proteoglicanos en C.elegans: mutantes sqv (squashed vulva)</i>	38
a) <i>Características generales de estructura y síntesis en vertebrados</i>	38

b) <i>Proteoglicanos en C.elegans: análisis estructurales</i>	39
c) <i>Enzimas involucradas en la biosíntesis de GAGs en C.elegans</i>	40
d) <i>Fisiología de proteoglicanos a partir de estudios genéticos y bioquímicos en C.elegans</i>	43
2- <i>N- y O-glicanos en C.elegans: mutantes srf-3 (surface)</i>	46
a) <i>Características generales de la síntesis</i>	46
b) <i>N-glicanos en C.elegans</i>	48
c) <i>Alteraciones en las estructuras de glicanos como consecuencia de mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar</i>	51
3- <i>Glicolípidos</i>	52
a) <i>Glicolípidos en C.elegans</i>	53
Parte III. Redundancia genética y mecanismos de RNAi	
<i>Redundancia genética en C.elegans</i>	54
<i>Mecanismos de RNAi en C.elegans</i>	55
RESULTADOS	
Parte I. Caracterización bioquímica de C03H5.2	
1- <i>C03H5.2 transporta UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc. Demostración mediante técnicas in vitro e in vivo</i>	59
2- <i>C03H5.2 transporta UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc en forma simultánea e independiente</i>	68
3- <i>Búsqueda de mutaciones que afecten selectivamente el transporte de uno de los sustratos</i>	74
a) <i>Estrategia basada en mutaciones puntuales previamente descritas</i>	74
b) <i>Una delección de 16 aminoácidos en la proteína C03H5.2 causa una pérdida asimétrica de la especificidad de sustrato</i>	77
Parte II. Relación entre mecanismo y divergencia evolutiva	
<i>Relación entre mecanismo y divergencia evolutiva</i>	86
Parte III. Redundancia funcional de transportadores de nucleótidos de azúcar en C.elegans	
<i>Patrón de expresión de C03H5.2 y fenotipo sintético en mutantes srf-3</i>	89
Parte IV. Deficiencia de Adhesión Leucocitaria II (LAD II)	

a) Estudios de incorporación de fucosa en células de pacientes	103
b) Reconstitución en proteoliposomas	104
DISCUSION	
Parte I.	
Caracterización bioquímica del transportador C03H5.2	107
Interpretación bioquímica de la existencia de transportadores competitivos y no competitivos	112
Parte II.	
Redundancia funcional de transportadores de nucleótidos de azúcar. Significado biológico	114
Parte III.	
Actividad residual de mutantes humanas del transportador de GDP-fucosa. Significado biológico	121
PARTE EXPERIMENTAL	
1. Medios y Soluciones	
1.1 Medios de cultivo	123
1.2 Soluciones	124
2. Sustratos radioactivos	126
3. Mantenimiento de cepas	126
4. Técnicas electroforéticas	
4.1 Geles de agarosa	127
4.2 Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	127
5. Biología molecular	
5.1 Técnicas generales para la manipulación de DNA	128
5.2 Expresión heteróloga	130
5.2.1 Expresión heteróloga en bacterias	130
5.2.2 Expresión heteróloga en levaduras	132
6. Detección de proteínas mediante Western blot	
6.1 Preparación de extractos de bacteria	134
6.2 Preparación de extractos de levaduras	135
7. Fraccionamiento subcelular de levaduras	135

8. Reconstitución de proteínas expresadas en membrana bacteriana en liposomas	
8.1 Preparación de liposomas	136
8.2 Preparación de proteoliposomas	136
9. Ensayo de transporte de nucleótidos de azúcar	
9.1 Ensayo de transporte en proteoliposomas	137
9.2 Ensayo de transporte en vesículas de levaduras	137
10. Técnicas empleadas en los experimentos con <i>C.elegans</i>	
10.1 Montaje de animales (<i>C.elegans</i>) para observación con microscopía óptica (DIC)	138
10.2 Ensayo de RNAi	138
RESUMEN	140
REFERENCIAS	146

INTRODUCCION

PARTE I. TRANSPORTADORES DE NUCLEOTIDOS DE AZUCAR

Introducción

En eucariontes, un 80% de las proteínas sintetizadas son modificadas post traslacionalmente mediante la adición covalente de residuos azúcar. Este proceso de glicosilación es llevado a cabo en el lumen del Retículo Endoplasmático (RE) o en el aparato de Golgi (AG) por medio de diferentes glicosiltransferasas. Muchos lípidos sintetizados en la célula también son susceptibles a diversos tipos de glicosilación. En ambos casos, los donores de azúcar son derivados nucleotídicos de los mismos, cuya estructura general se ejemplifica en la figura 1.

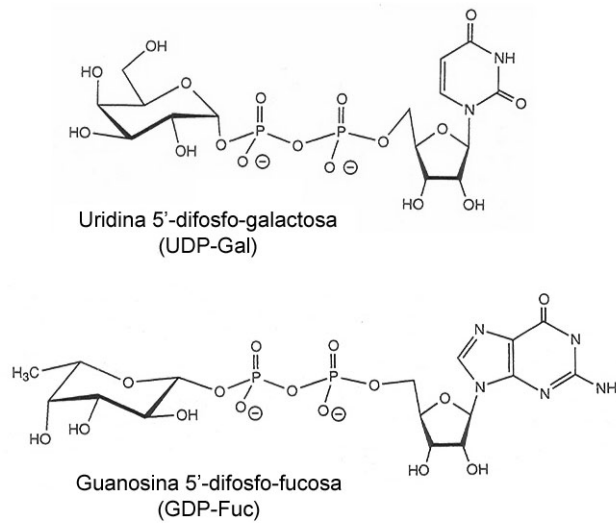


Figura 1. Estructura de nucleótidos de azúcar con diferentes nucleósidos (Carolina E. Caffaro, *in press*).

Todos estos sustratos deben, entonces, ser translocados desde su lugar de síntesis, en general citosol (Coates et al., 1980), al lumen del RE o AG por medio de transportadores específicos. La actividad de estos transportadores podría regular la disponibilidad de estos sustratos en el RE y AG y de este modo, la cantidad y calidad de los productos finales correspondientes. (Berninsone and Hirschberg, 2000; Hirschberg et al., 1998).

Hasta el momento, se han identificado transportadores de nucleótidos de azúcar en levaduras (Dean et al., 1997), mamíferos (Ashikov et al., 2005; Suda et al., 2004), insectos (Goto et al., 2001; Selva et al., 2001), plantas (Norambuena et al., 2002), nematodos (Berninsone et al., 2001; Hoflich et al., 2004) y protozoos (Bredston et al., 2005). Mutantes de estos transportadores han sido descritos en *C. elegans* (Berninsone et al., 2001; Hoflich et al., 2004), levaduras (Abeijon et al., 1996a), *Leishmania donovani* (Ma et al., 1997), *Drosophila melanogaster* (Goto et al., 2001; Selva et al., 2001), *Bos taurus* (Thomsen et al., 2006) y *Homo sapiens* (Hirschberg, 2001). Los mismos presentan alteraciones en el desarrollo, acompañado de deficiencias en los correspondientes azúcares presentes en proteínas, proteoglicanos y lípidos.

Características bioquímicas

Antes que los transportadores de nucleótidos de azúcar fuesen clonados, la caracterización bioquímica se llevaba a cabo utilizando preparaciones de vesículas del tejido correspondiente. En términos generales, la estrategia consiste en preparar vesículas enriquecidas en la fracción correspondiente al RE o AG de hígado de rata, intactas y de la misma orientación que *in vivo* (Hirschberg et al., 1998). Estas vesículas se incuban con potenciales sustratos radioactivos y con estándares que penetran o no la membrana. Por medio de técnicas de filtración (Kuhn and White, 1976) o centrifugación (Capasso et al., 1989; Perez and Hirschberg, 1987) las vesículas se recuperan nuevamente, separándolas de la solución de sustrato y finalmente se determina la cantidad de soluto que ha ingresado a las vesículas. Ambos métodos, filtración y centrifugación, dan resultados de Km aparente y velocidad máxima (Vmax) comparable. Los volúmenes accesibles a los solutos radioactivos se determinan y comparan con los de estándares que penetran membrana, observándose que los volúmenes accesibles para nucleótidos de azúcar son mayores que para los estándares. Esto sugiere que la translocación de los donores de azúcar es dependiente de la concentración de proteína.

Los ensayos *in vitro* han demostrado que:

1- El transporte de nucleótidos de azúcar es específico de cada organela, con excepciones de unos pocos que son transportados en ambas organelas aunque con diferente velocidad. En la siguiente tabla se observa la distribución aproximada de especificidades encontradas.

Tabla 1. Localización subcelular de las diferentes actividades de transporte de nucleótidos de azúcar. El número de cruces refleja una aproximación semicuantitativa de la velocidad relativa de las diferentes actividades medidas. Adaptado de (Hirschberg et al., 1998).

Nucleótido de azúcar	Retículo Endoplasmático	Aparato de Golgi	Referencia
CMP-ácido siálico	—	++++	(Carey et al., 1980)
GDP-fucosa	—	++++	(Capasso and Hirschberg, 1984a; Sommers and Hirschberg, 1982)
UDP-galactosa	—	++++	(Kuhn and White, 1976)
GDP-manosa	—	++++	(Abeijon et al., 1989)
UDP- <i>N</i> - acetilglucosamina	++	++++	(Capasso and Hirschberg, 1984a; Milla and Hirschberg, 1989)
UDP- <i>N</i> - acetilgalactosamina	++	++++	(Abeijon and Hirschberg, 1987)
UDP-xilosa	++	++++	(Kearns et al., 1993; Milla et al., 1992)
UDP-ácido glucurónico	++++	++++	(Kearns et al., 1993; Milla et al., 1992)
UDP-glucosa	++++	+	(Perez and Hirschberg, 1986)

2- La molécula es transportada intacta (nucleótido y azúcar) al lumen de la organela. El transporte es temperatura dependiente y saturable con valores de K_m en el orden 1-30 μM .

3- Los nucleótidos de azúcar se concentran en el lumen de las vesículas en relación a su concentración en el medio, sin consumo de ATP. La entrada del nucleótido de azúcar está acoplada a la salida del correspondiente nucleósido monofosfato. Es un sistema antiporte análogo al intercambiador ATP-ADP de mitocondria y al cloruro-bicarbonato de glóbulos rojos (Capasso and Hirschberg, 1984b; Segawa et al., 2005; Tiralongo et al., 2006; Waldman and Rudnick, 1990).

4- No se observa inhibición ni estímulo mediado por ionóforos. El transporte es inhibido competitivamente por nucleósidos mono- y difosfato, pero no por monosacáridos libres.

Reconstitución en proteoliposomas

La reconstitución de transportadores de nucleótidos de azúcar, tanto nativos como recombinantes, ha sido una herramienta muy útil con distintos objetivos:

1- Demostrar que el transporte de nucleótidos de azúcar está mediado por proteínas específicas sin necesidad de proteínas accesorias.

2- Medir actividad durante la purificación de transportadores.

3- Estudiar la especificidad de sustrato y determinar los parámetros cinéticos del transporte.

4- Demostrar mecanismo antiporter.

5- Discriminar entre mutantes con pérdida parcial de actividad y mutantes con pérdida total de actividad intrínseca pero compensada parcialmente por la actividad de otra proteína (presente trabajo).

En términos generales, la reconstitución en proteoliposomas se lleva a cabo mediante la solubilización de proteínas de membrana o proteínas purificadas en buffer con detergente, eliminación del detergente con resinas apropiadas e intercalado de las proteínas en liposomas unilaminares de fosfatidilcolina seguido de ciclos de congelado/descongelado. Esta técnica se empleó para la reconstitución de varios transportadores, entre ellos el de CMP-ácido siálico (Milla and Hirschberg, 1989), UDP-galactosa (Milla et al., 1992), UDP-ácido glucurónico (Milla et al., 1992) y UDP-N-acetilgalactosamina (Puglielli et al., 1999). En el caso particular de la reconstitución del transportador de UDP-xilosa, fue necesario el uso de liposomas preparados a partir de lípidos del AG (Milla et al., 1992).

Los transportadores de nucleótidos de azúcar funcionan como antiporter

El hecho que los nucleótidos de azúcar estén significativamente concentrados en el interior de las vesículas en relación al medio de incubación, sugiere un transporte activo (Hirschberg and Snider, 1987). Sin embargo, como ATP e ionóforos no tienen efecto en la velocidad del transporte ni en las concentraciones de los nucleótidos de azúcar en equilibrio, se propuso que la energía proviene, al menos en parte, de la salida de solutos siguiendo un gradiente de concentración desde el lumen de la organela hacia el citosol. Existen cuatro líneas de evidencia que apoyan dicha hipótesis.

Los primeros estudios corroborando esta idea fueron realizados con vesículas enriquecidas en la fracción correspondiente al AG de hígado de rata en las que se midió transporte de GDP-Fuc usando como sustratos GDP[³H]-Fuc tritiada en la guanosina y GDP-[¹⁴C]Fuc marcada en la fucosa. En estas condiciones, se observó la salida de GMP tritiado en cantidades estequiométricas con la entrada de GDP-[¹⁴C]Fuc. Para corroborar

que la salida de GMP está acoplada a la entrada del nucleótido de azúcar, se repitió el experimento reemplazando la GDP- ^{14}C Fuc con GDP- ^{14}C Man, que no es transportada en estas vesículas. En este caso, no se observó salida de GMP tritiado (Capasso and Hirschberg, 1984b). Se obtuvieron resultados similares con otros nucleótidos de azúcar. Se considera que el nucleósido monofosfato se genera en el interior de las vesículas mediante una nucleósido difosfatasa que usaría como sustrato los nucleósidos difosfato liberados durante la transferencia del azúcar al aceptor correspondiente (Brandan and Fleischer, 1982; Kuhn and White, 1976). La figura 2 esquematiza el mecanismo de intercambio propuesto.

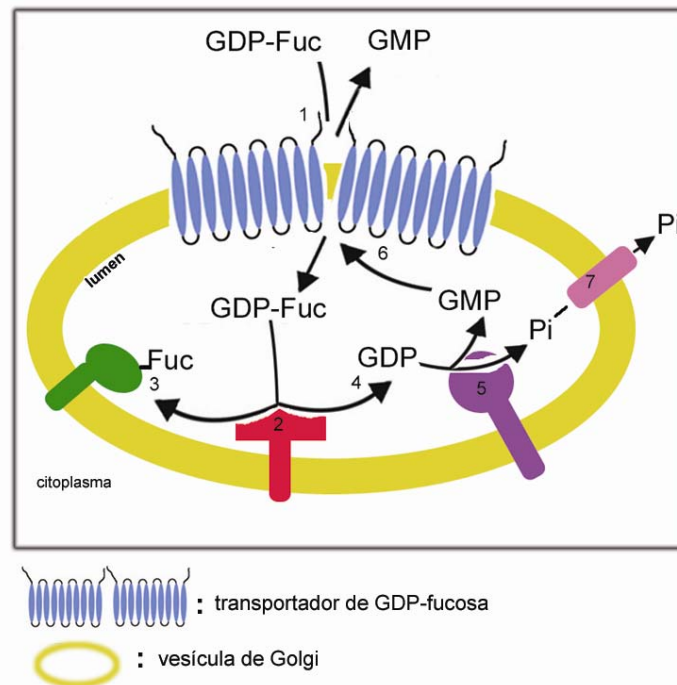


Figura 2. Ciclo de transporte/antiporte de GDP-Fuc en el aparato de Golgi (Carolina E. Caffaro, *in press*). La GDP-Fuc es sintetizada en el citosol y luego es transportada en forma intacta al lumen del aparato de Golgi (1) (Sommers and Hirschberg, 1982) donde es sustrato de fucosiltransferasas (2). Estas enzimas transfieren fucosa a proteínas (3). El otro producto de reacción, guanosina difosfato (GDP) (4), es convertido a guanosina monofosfato (GMP) y fosfato inorgánico por una nucleósido difosfatasa luminal (5). El GMP sale del aparato de Golgi en intercambio acoplado a la entrada de GDP-Fuc (6) y el fosfato probablemente sale vía un transportador de fosfato, GOLAC (7) (Nordeen et al., 2000).

La segunda línea de evidencia que apoya el mecanismo de antiporter fue dada por el trabajo con el transportador de UDP-GlcNAc que demuestra que el transporte del nucleótido de azúcar ocurre mediante el intercambio electroneutro de UMP dianiónico (Waldman and Rudnick, 1990). En estos ensayos se prepararon vesículas precargadas con UMP o con buffer solo y se midió el transporte de UDP-GlcNAc a pH=7.5 y a pH=5.45. UMP es monoiónico a pH=5.45 y dianiónico a pH=7.5 mientras que UDP-GlcNAc es dianiónico a ambos pHs. Los resultados muestran que el transporte de UDP-GlcNAc en vesículas enriquecidas en la fracción correspondiente al AG tiene lugar a mayor velocidad cuando se trabaja a pH=7.5 en el que UMP es dianiónico. Este intercambio electroneutro requiere también la existencia de un transporte de fosfato inorgánico desde el lumen hacia el citosol.

Los ensayos de reconstitución de transportadores de nucleótidos de azúcar en proteoliposomas han provisto de una evidencia adicional al mecanismo de intercambio nucleótido de azúcar-nucleósido monofosfato (Milla et al., 1992; Milla and Hirschberg, 1989). Corroborando los resultados del experimento descrito anteriormente, el transporte de CMP-ácido siálico o UDP-ácido glucurónico, -xilosa o -galactosa aumenta 2 a 3 veces cuando se precargan los proteoliposomas con CMP o UMP según corresponda.

La cuarta línea de evidencia del sistema antiporter proviene de estudios realizados en levaduras en las que se ha inactivado el gen que codifica para la enzima GDPasa del AG. En estas condiciones se observó una reducción significativa en la manosilación de proteínas y de manosil inositol esfingolípidos *in vivo* (Abeijon et al., 1993). Además, estudios *in vitro* muestran una reducción de al menos 5 veces en el transporte de GDP-Man en vesículas enriquecidas en el AG (Berninsone et al., 1994), remarcando la importancia del GMP en el lumen para el transporte del nucleótido de azúcar.

En oposición a estos resultados, es importante destacar los resultados obtenidos por D'alessio (D'Alessio et al., 2005) en el RE. En este trabajo, se estudió la glucosilación mediada por la enzima UDP-glucosa:glucoproteína glucosiltransferasa (GT) responsable del control de calidad en el RE (ver capítulo de biosíntesis de *N*-glicanos), en condiciones donde se afecta tanto el tránsito vesicular anterógrado/retrógrado RE-AG como las actividades NDPasas de Golgi. Se emplearon células *S.cerevisiae* transfectadas con un vector que codifica para la enzima GT de *S.pombe*. Se recurrió a este sistema por

dos diferentes motivos: por un lado, no se ha identificado una enzima GT en *S.cerevisiae* y por otro lado, a diferencia de *S.cerevisiae*, las mutantes de *S.pombe* que carecen de actividad NDPasa son no viables. Los resultados de los experimentos llevados a cabo por este grupo muestran que bajo esas condiciones, la actividad de la enzima GT no dependería de la actividad NDPasa ni del tráfico vesicular. Esto sugiere que la actividad del transportador de UDP-Glc no dependería de la disponibilidad de UMP en el lumen del RE considerada necesaria para transportar el nucleótido de azúcar mediante el mecanismo antiporter propuesto anteriormente. Más aún, en este trabajo se observa que bajo las condiciones descritas, la *N*- y *O*- manosilación de proteínas no está afectada o sólo ligeramente reducida. Esto contrasta con trabajos anteriores en los que se describe una fuerte reducción de la *N*-glicosilación de proteínas en mutantes *gda-1* deficientes en actividad GDPasa (Abeijon et al., 1993). Debe mencionarse que en este estudio sólo se analizaron los efectos en determinadas glicoproteínas y no el grupo total de glicoproteínas celulares. A pesar de la evidente controversia de los resultados obtenidos por uno y otro grupo, los mismos deben interpretarse con extrema cautela considerando las condiciones experimentales empleadas en cada caso. *S.cerevisiae* carece de sistema de control de calidad de plegamiento de proteínas mediado por GT y hasta el momento la única función asociada a la actividad glucosiltransferasa de RE que se ha sugerido es la síntesis de $\beta(1,6)$ glucano (Shahinian et al., 1998). Esto junto al hecho que las levaduras *S.cerevisiae* mutantes en NDPasas son viables, podría indicar que la regulación de la GT exógena (de *S.pombe*) expresada en *S.cerevisiae* podría ser diferente en este sistema que en condiciones endógenas. Por otro lado, la imposibilidad de identificar la proteína que lleva a cabo la actividad de transporte de UDP-glucosa, puede ser indicativo de que la misma presenta características bioquímicas y mecánicas diferentes al punto de no requerir el sistema de intercambio con UMP descrito para otros transportadores de nucleótidos de azúcar. En apoyo de esta hipótesis se encuentran las consideraciones realizadas por D'alessio en cuanto a los valores de K_m correspondientes a diferentes glucosiltransferasas y las concentraciones de nucleótidos de azúcar determinadas en diferentes compartimentos subcelulares. Las concentraciones de UDP-Gal y UDP-GalNAc citosólicas se encuentran en el mismo rango de valores que las K_m de glucosiltransferasas del AG, justificando entonces la necesidad de concentración de los

mismos en lumen del AG (Chiaramonte et al., 2001). Por el contrario, la concentración de UDP-Glc citosólica es aproximadamente $170\mu\text{M}$ (Chiaramonte et al., 2001), mientras que la K_m de la GT del RE es $18\mu\text{M}$ (Trombetta, 1992). Esta marcada diferencia podría sugerir que la transferencia de UDP-Glc no depende de una actividad que concentre UDP-Glc en el RE y podría justificar la falta de NDPasas en este compartimento en *S.pombe*.

Expresión heteróloga

Mediante técnicas de clonado molecular, se ha logrado la expresión funcional de transportadores de nucleótidos de azúcar de una especie eucariota en otra, lo cual ha constituido una importante herramienta en la identificación y estudio de nuevos transportadores (Berninsone et al., 1997; Guillen et al., 1998). Esta metodología fue utilizada por primera vez para el clonado del transportador de UDP-GlcNAc de mamíferos por corrección del fenotipo de superficie de una mutante de levadura *K.lactis* (Guillen et al., 1998). Esta mutante, *mnn2-2* carece de *N*-acetilglucosamina terminal en sus manoproteínas de superficie debido a un defecto en el transportador de UDP-GlcNAc del AG. Este defecto genera una reducción en la interacción con la lectina *Griffonia simplicifolia* (GSII) que une específicamente α o β -*N*-acetilglucosamina terminal. De este modo, usando una biblioteca de cDNA de mamíferos se identificó el clon que restaura la interacción a la lectina en esta mutante. Se utilizó una lectina conjugada a fluoresceína para seguir el ensayo mediante FACS (fluorescent activated cell sorter) (Abeijon et al., 1996b). El hecho que el cDNA de mamíferos pueda corregir el defecto de la mutante anteriormente descrita demuestra también que las señales que determinan la localización de estos transportadores en el AG están conservados entre especies, inicialmente demostrado entre mamíferos y levaduras pero luego aplicado a otras especies (Hirschberg et al., 1998).

Posteriormente, se utilizó esta estrategia para demostrar la actividad de putativos transportadores de nucleótidos azúcar identificados mediante bioinformática y caracterizar la especificidad de los mismos. En estos casos, se llevó a cabo la expresión

heteróloga en levaduras de *S.cerevisiae* que sólo presentan dos actividades de transporte de nucleótidos azúcar endógenas: UDP-Glc y GDP-Man. Una vez expresada la proteína, se estudia la actividad en vesículas enriquecidas en el AG. Los parámetros a tener en cuenta son que la señal sea: dependiente de la temperatura, siendo mayor a 30 °C que a 0 °C; lineal con la concentración de proteína; saturable con valores de Km en el orden 1-30 µM y que la señal para la actividad heteróloga sea mayor que cuando se emplean vesículas de levadura transformadas con vector vacío.

Características estructurales

El clonado molecular de estos transportadores también ha servido para el estudio topográfico de los mismos. Los transportadores de nucleótidos de azúcar son proteínas hidrofóbicas que atraviesan la membrana entre seis y diez veces (Berninsone and Hirschberg, 2000). Es importante tener en cuenta que la mayoría de los algoritmos utilizados para predecir topología están diseñados para proteínas de membrana plasmática y que la membrana del AG es un 20% más delgada, por lo cual se requieren evidencias directas que corroboren las predicciones.

Estudios en tres diferentes transportadores han sugerido que tanto el extremo amino como el carboxilo terminal están orientados hacia el citosol, lo cual es consistente con un número par de dominios transmembrana (Eckhardt et al., 1999; Gao and Dean, 2000; Ishida et al., 1999). Mediante técnicas en las cuales se insertan epitopes en diferentes posiciones de la proteína y luego se estudia la accesibilidad de los mismos en ambas caras de la membrana del AG mediante inmunofluorescencia o western blot, se estableció un modelo topológico para el transportador de CMP-ácido siálico murino (Eckhardt et al., 1999). El modelo predice diez dominios transmembrana, aunque dos de los mismos cercanos al extremo carboxilo terminal no han sido establecidos inequívocamente, ya que no han podido ser inmunodetectados. Esto podría sugerir que tales dominios se encuentran dentro de la membrana lipídica. La misma estrategia aplicada al transportador de UDP-GlcNAc de *K.lactis* sugiere que este transportador contiene entre seis a ocho dominios transmembrana.

Los transportadores de GDP-Fuc y UDP-GalNAc de hígado de rata fueron purificados a aparente homogeneidad. En ambos casos, la masa molecular aparente es de aproximadamente 40kDa determinado por SDS-PAGE, mientras que en gradientes de glicerol, las actividades respectivas se encuentran en las fracciones de sedimentación correspondiente a proteínas de 80-90kDa (Puglielli and Hirschberg, 1999; Puglielli et al., 1999). Esto sugiere que al menos estos transportadores se presentan como homodímeros en su forma funcional. El transportador de GDP-manosa de *S.cerevisiae*, VRG4, también fue caracterizado como homodímero (Gao and Dean, 2000). En este caso, se identificaron también dos dominios importantes para la oligomerización y localización subcelular. Un segmento del dominio carboxilo terminal que abarca el último segmento transmembrana, parece ser crítico para la dimerización y estabilidad de la proteína. Mutantes truncadas en este segmento no son funcionales y se acumulan en el RE (Abe et al., 1999; Gao et al., 2001). El otro dominio identificado en este trabajo corresponde al segmento que abarca los primeros 44 aminoácidos del extremo amino terminal. La delección de este segmento genera retención de la proteína en el RE pero no afecta la capacidad de formar dímeros. La fusión de este segmento a otras proteínas características del RE, promueve la exportación de las mismas al AG, sugiriendo que la etapa de oligomerización ocurre en el RE y luego es transportado activamente al AG. En otros estudios (Hong et al., 2000) se ha demostrado que el transportador de GDP-Man de *Leishmania*, LPG2 forma complejos hexaméricos que se presume corresponden a la forma funcionalmente activa.

Determinantes de especificidad de sustrato

Las técnicas de clonado molecular han servido a la identificación de residuos esenciales para el reconocimiento de sustratos y transporte. Estudios de sustitución de un único aminoácido donde no se afecta la localización de la proteína pero sí su actividad resultan útiles para identificar residuos esenciales para el transporte. Experimentos realizados con el transportador de CMP-ácido siálico de células Lec2 (Eckhardt et al., 1998), sugieren que el residuo de glicina 189 (Gly189), altamente conservado, forma

parte de un dominio que podría ser necesario para el proceso de translocación común entre transportadores de nucleótidos de azúcar. Las células Lec2, mutantes en las cuales este residuo es sustituido por ácido glutámico, son defectuosas para dicho transporte. La sustitución de este residuo glicina por glutamina o isoleucina no restaura la actividad, mientras que mutantes donde se reemplazó la glicina por alanina, son activas. Esto indicaría que para la posición 189 es más importante el tamaño que la carga del aminoácido para la actividad del transportador. En ensayos similares con el transportador de UDP-Gal en células Had-1, el reemplazo de la glicina 178 por ácido aspártico destruye la actividad sin afectar su localización mientras que su reemplazo por alanina resulta en una proteína funcionalmente activa (Ishida et al., 1999). La alta conservación del residuo de glicina entre transportadores con diferente especificidad de sustrato descarta la posibilidad de que este sustrato sea crítico en el reconocimiento específico del nucleótido de azúcar. En este mismo trabajo se generaron mutantes donde se eliminaron 29 residuos del extremo amino terminal o 39 residuos del extremo carboxilo terminal. En ambos casos, el transportador sigue siendo activo y aún siendo reemplazadas por segmentos similares del transportador de CMP-ácido siálico, la expresión o actividad no se ve afectada.

En otras ocasiones, la pérdida de actividad asociada a la inserción de epitopes puede ser indicativo de la importancia de un dominio. Esta situación fue descrita para el transportador de CMP-ácido siálico para el cual la inserción de epitopes en el segundo o cuarto loop causan pérdida de actividad (Eckhardt et al., 1999).

Las siguientes observaciones generales deben tenerse en cuenta en los estudios de especificidad de sustratos y determinación de sitios activos:

1- La secuencia primaria, en general, no es un indicador de especificidad de sustrato. Por ejemplo, como se observa en la figura 3, los transportadores de CMP-ácido siálico y UDP-Gal presentan un 40-50% identidad en la secuencia de aminoácidos (Berninsone and Hirschberg, 2000; Ishida and Kawakita, 2004).

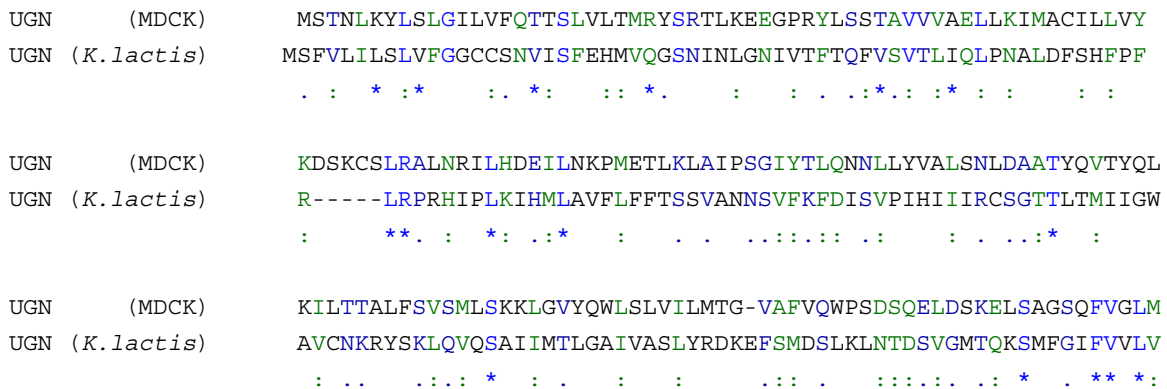
```

UDP-Gal-T      MAAVGAGGSTAAPGPGAVSAGALEPGTASAAHRRLLKYISLAVLVVQNASLILSIRYARTL
CMP-Sia-T      -----MAPARENVSL-----FFKLYCLAVMTLVAAAYTVALRYTRTT
                **      **                      :*  .***:.:  * :  :::**:**
    
```



Figura 3. Alineación de secuencias de aminoácidos usando el método ClustalW. Las secuencias utilizadas corresponden a los siguientes números de acceso en Entrez-Protein NCBI: UDP-Gal-T de *Homo sapiens*, [BAA12673](#) y CMP-Sia-T de *Mus musculus*, [CAA95855](#).

2- La misma especificidad de sustrato puede estar mediada por proteínas con muy baja identidad aminoacídica como ocurre con el transportador de UDP-GlcNAc de células MDCK y levaduras *K.lactis* (Berninsone and Hirschberg, 2000). La figura 4 muestra la reducida similitud en secuencia de aminoácidos que existe entre dichos transportadores.



```

UGN      (MDCK)      AVLTACFSSSGFAGVYFEKILKETKQSVWIRN-IQLGFFGSIFGLMGVYIYDGELVSKNGF
UGN (K.lactis)      ATALMSLLSLLNEWTYNKCGKHWKETLFYSHFLALPLFMLGYTRLRDEFRD-LLISSDSM
                *.  .: * :      ::* *. *::: : : * :* : : : * *:*...:

UGN      (MDCK)      FQGYNRLTWIVVILQALGGLVIAAVIKYADNILKG--FATSLSIILST-----LISYFWL
UGN (K.lactis)      DIPIVKLPIATKLFMLIANNVTQFICIKGVNMLASNTDALTLSVVLLVRKFVSLLLSVYI
                :*. . : : .. * : . *:* . * :***:* . * : : :

UGN      (MDCK)      QDFVPTSVFFLGAILVITATFLYGYDPKPTGNPTKA
UGN (K.lactis)      YKNVLSVTAYLGTITVFLGAGLYSGSVKTALPR--
                . * : . :***:* * : : **.*.. * . *

```

Figura 4. Alineación de secuencias de aminoácidos usando el método ClustalW. Las secuencias utilizadas corresponden a los siguientes números de acceso en Entrez-Protein NCBI: UGN (MDCK), [NP_001003385](#) y UGN (*K.lactis*), [CAH02066](#).

SQV-7, una proteína de *C.elegans* descrita en el siguiente capítulo, es el primer transportador de nucleótidos azúcar con especificidad por más de un sustrato: UDP-Gal, UDP-GlcA y UDP-GalNAc (Berninsone et al., 2001). Desde entonces, diversos transportadores multisustrato han sido caracterizados en mamíferos (Ashikov et al., 2005; Goto et al., 2001; Segawa et al., 2005; Selva et al., 2001), *Drosophila melanogaster* (Segawa et al., 2005; Suda et al., 2004), *C.elegans* (Hoflich et al., 2004), protozoos (Bredston et al., 2005) y plantas (Norambuena et al., 2002). Sin embargo, sólo para SQV-7 se han realizado estudios completos de competición entre sustratos. Como se muestra en la figura 5, la capacidad de UDP-GlcA y UDP-GalNAc de inhibir en forma competitiva el transporte de UDP-Gal mediado por SQV-7, sugiere que los tres sustratos son transportados mediante el mismo sitio activo (Berninsone et al., 2001). UDP-GlcNAc que no es sustrato de este transportador, no inhibe el transporte de UDP-Gal. Esto sugiere que la inhibición por UDP-GlcA y UDP-GalNAc depende de todo el nucleótido de azúcar y no sólo de la porción nucleotídica. Esta evidencia es consistente con estudios previos que muestran que si bien el nucleótido es necesario para el reconocimiento del sustrato, no es suficiente para el transporte; el transporte depende del azúcar que se encuentra unido al nucleótido (Capasso and Hirschberg, 1984a).

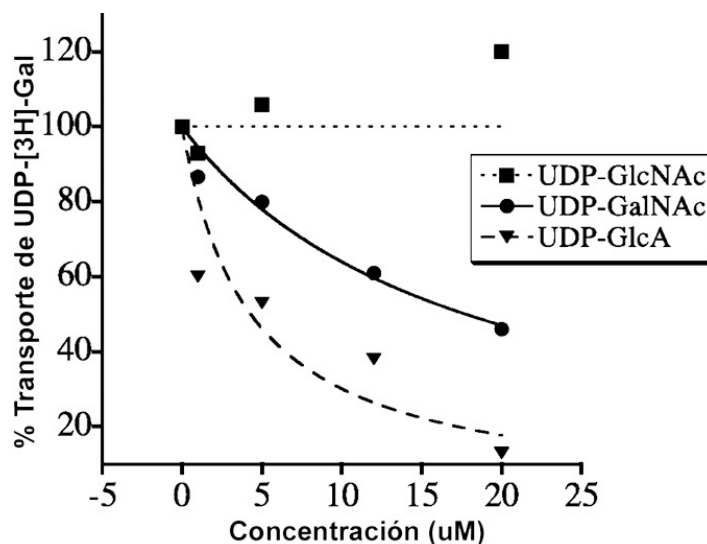


Figura 5. UDP-GlcA y UDP-GalNAc son sustratos competitivos del transporte de UDP-Gal mediado por SQV-7. Se determinó el transporte de $0.1 \mu\text{M}$ UDP-[^3H]Gal en presencia de concentraciones variables de UDP-GlcA, UDP-GalNAc o UDP-GlcNAc no radioactivos, empleando fracciones enriquecidas en el AG de *S.cerevisiae* que expresa SQV-7. Las actividades de transporte se graficaron como porcentaje del transporte obtenido para UDP-Gal en ausencia de otros nucleótidos de azúcar.

Dos alelos mutantes de *sqv-7* codifican polipéptidos que son defectuosos en el transporte de los 3 nucleótidos de azúcar identificados como sustrato de la proteína salvaje, lo cual es consistente con el mecanismo de competición propuesto según el cual los sustratos comparten el sitio activo en el transportador (Berninsone et al., 2001). En base a los resultados obtenidos con SQV-7, los transportadores multisustrato descritos posteriormente fueron considerados implícitamente competitivos aún cuando en ningún caso se realizaron los experimentos pertinentes.

En la presente tesis, mediante técnicas de biología molecular, se estudiaron mutaciones puntuales y deleciones para tratar de identificar dominios involucrados en el reconocimiento de sustratos y mecanismo de transporte.

Fenotipo de mutantes de transportadores de Nucleótidos de Azúcar

La existencia de mutantes en transportadores de nucleótidos de azúcar ha sido de gran utilidad para identificar el rol de glicoconjugados en células y organismos. Los primeros estudios de mutantes de transportadores de nucleótidos de azúcar fueron realizados en líneas celulares de cultivo. Las primeras mutantes caracterizadas fueron células CHO (Chinese Hamster Ovary) identificadas por su resistencia a lectinas citotóxicas (Briles et al., 1977), en particular a Wheat Germ Agglutinin (WGA). Vesículas enriquecidas en la fracción correspondiente al AG preparadas a partir de estas células CHO Lec2 presentan niveles de transporte de CMP-ácido siálico que son un 2% del transporte observado en células CHO salvajes. Se trata de una deficiencia específica ya que los niveles de transporte correspondiente a otros nucleótidos de azúcar son comparables a los obtenidos para las células salvajes. Estas mutantes presentan además un 90% de reducción en sialilación de glicoproteínas y gangliósidos. Junto con estas mutantes, se describieron otras dos, CHO Lec8 y CHO clon 13 que son resistentes al efecto citotóxico de la ricina. En este caso, se encontró una deficiente actividad de transporte de UDP-Gal con un 95% de reducción en galactosa y ácido siálico de lípidos y proteínas (Briles et al., 1977; Deutscher and Hirschberg, 1986; Deutscher et al., 1984).

Posteriormente, se describió una mutante de *Kluyveromyces lactis*, mnn2-2, que carece de *N*-acetilglucosamina en sus manoproteínas de superficie. Como se mencionó anteriormente, estas células presentan niveles normales de actividad y correcta localización subcelular de *N*-acetilglucosaminiltransferasa. Tampoco se observaron diferencias en los niveles endógenos de aceptores manano ni en los niveles de UDP-GlcNAc (Douglas and Ballou, 1982). Vesículas enriquecidas en el AG de células mutantes presentan un defecto específico en el transportador de UDP-GlcNAc *in vitro* (Abeijon et al., 1996a). Estas células, al igual que las CHO son empleadas actualmente para caracterizar la especificidad de sustrato de nuevos transportadores mediante ensayos de complementación *in vivo*.

En otro trabajo, se han presentado evidencias que el transportador de GDP-Man de *S.cerevisiae*, VRG-4 es importante para la viabilidad de la célula (Dean et al., 1997). Mutaciones en este gen causan defectos generales de manosilación que afectan N- y O-glicoproteínas y esfingolípidos.

Recientemente, se identificó el transportador de GDP-Man de *Leishmania donovani* codificado por el gen LPG-2 (Ma et al., 1997). Este transportador fue clonado y su actividad fue demostrada *in vitro* luego de su reconstitución en proteoliposomas (Segawa et al., 2005). Estas mutantes son deficientes en lipofosfoglicanos, un glicolípido complejo de superficie importante en la supervivencia e infectividad del parásito.

Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar en organismos multicelulares

1-Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar humanos

Deficiencia de Adhesion Leucocitaria II (LAD II)

Hasta la fecha se han descrito tres deficiencias de adhesión leucocitaria en humanos: LADI, LADII y LAD III. En los tres casos, se encuentra afectada la “cascada de adhesión leucocitaria” esquematizada en la figura 6 (Butcher and Picker, 1996). El primer evento en esta cascada está dado por la interacción de E- y P-selectinas del endotelio con sus ligandos glicoproteicos presentes en la superficie del leucocito. Esto origina sucesivos eventos de arresto y migración de leucocitos sobre el endotelio, colocando a los leucocitos en proximidad con quimoquinas derivadas de células endoteliales. Mediante la acción de quimoquinas, los leucocitos son activados adquiriendo un estado de alta afinidad que provoca el arresto total o adhesión firme caracterizado por la interacción de integrinas activadas en la superficie de leucocitos y el receptor ICAM-1 en la superficie del endotelio. A esta etapa le sigue la extravasación de leucocitos hacia el sitio de inflamación. Cualquier interferencia en esta secuencia de

eventos provoca una reducción en la migración de leucocitos, comprometiendo la respuesta inmune.

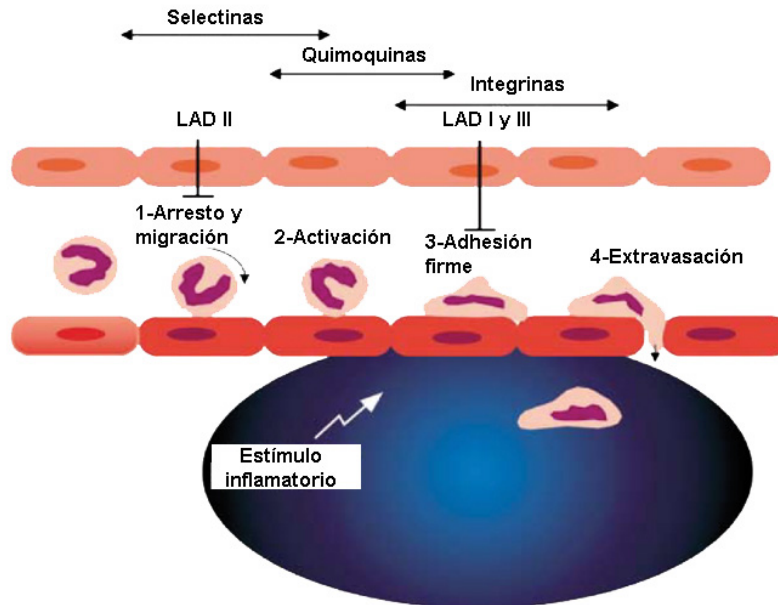


Figura 6. Cascada de adhesión leucocitaria. Adaptado de (Wild et al., 2002).

En pacientes con Deficiencia de Adhesión Leucocitaria I (LAD I), el hallazgo común es la ausencia o deficiente expresión de moléculas de adhesión que normalmente contienen la subunidad β_2 CD18, en particular LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$), Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$) y p150/95 (CD11c/CD18; $\alpha_X\beta_2$) (Anderson and Springer, 1987). La base molecular del síndrome está dada por mutaciones en el gen que codifica dicha subunidad (Fischer et al., 1988). En consecuencia, las integrinas afectadas presentan una reducida intensidad de la adhesión al endotelio. Como CD18 también participa en activación de linfocitos B y T, el síndrome en estos pacientes es de gran severidad.

La Deficiencia de Adhesión Leucocitaria II (LAD II), también llamada Desorden de Glicosilación Congénito IIc (CDG IIc) es una enfermedad congénita que afecta la cascada de adhesión leucocitaria en una etapa más temprana que LAD I. En este caso, la causa del síndrome es una reducida actividad del transportador de GDP-Fuc debido a mutaciones en el gen correspondiente. En consecuencia, los pacientes presentan una

disminuida fucosilación de glicoproteínas que en términos de adhesión leucocitaria, reduce la interacción de glicoproteínas en la superficie del leucocito con las correspondientes moléculas de adhesión en el endotelio (Etzioni et al., 2002).

Recientemente se ha descrito una nueva Deficiencia de Adhesión Leucocitaria (LAD III) caracterizada por defectos en la activación de la mayoría de los miembros de la subfamilia de integrinas expresadas en leucocitos y plaquetas circulantes. Al momento no se conoce con exactitud el defecto a nivel molecular (Alon and Etzioni, 2003; Etzioni and Alon, 2004).

Deficiencia de Adhesión Leucocitaria II

El síndrome de Deficiencia de Adhesión Leucocitaria II fue descrito por primera vez en 1992 en dos niños árabes no relacionados, de 3 y 5 años de edad al momento del diagnóstico, hijos de matrimonios relacionados por consanguineidad (Etzioni et al., 1992; Frydman et al., 1992). Ambos niños mostraban severo retraso psicomotor y de crecimiento y una apariencia facial distintiva caracterizada por cara plana con depresión del tabique nasal, narinis invertidas y largas pestañas. La figura 7 muestra la expresión facial de un paciente con LAD II que corresponde a un niño de origen turco identificado posteriormente (Marquardt et al., 1999).



Figura 7. Expresión facial de niño con LADII. (Marquardt et al., 1999)

Se observó también que los niños presentaban el grupo sanguíneo llamado Bombay, en el cual los glóbulos rojos expresan una variante no fucosilada del antígeno

H. Otro grupo de moléculas de superficie de células sanguíneas que contienen fucosa estaban ausentes, como el antígeno sialil Lewis X, SLe^X tetrasacárido (NeuAc α 2,3-Gal β 1,4[Fuc α 1,3]GlcNAc) que es un importante ligando de selectinas en la superficie de leucocitos. La deficiente fucosilación de proteínas claramente afecta la respuesta inmune en estos pacientes. Durante los primeros años de vida presentan infecciones recurrentes haciéndose menos frecuentes con el transcurso del tiempo y finalmente la manifestación más persistente es una importante periodontitis (Etzioni et al., 1992).

a) Manifestaciones a nivel celular

A nivel celular, la manifestación más importante es a nivel del funcionamiento de neutrófilos, con una disminución de hasta un 80% de neutrófilos activos debido a fallas en la interacción con E- y P-selectinas (Etzioni et al., 1992) y un aumento en la velocidad de migración de los neutrófilos residuales.

Los neutrófilos de pacientes con LAD II presentan una adherencia muy débil a la superficie de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) previamente estimuladas para aumentar la expresión de E-selectina. En estas condiciones, los neutrófilos control presentan altos niveles de adhesión (Etzioni et al., 1992). El mismo experimento, pero estimulando la expresión de P-selectina, mostró también una baja adhesión de neutrófilos que podía eliminarse totalmente con anticuerpos anti-CD18 pero no con anticuerpos anti-SLe^X. Por otro lado, cuando se incuban los neutrófilos de pacientes con HUVEC tratado con acetato miristato de forbol (PMA), los resultados obtenidos son comparables a los controles. Dado que la adhesión inducida con PMA es dependiente de CD18, se confirma que la falla en adhesión no se debe a deficiencias en actividad de la subunidad β_2 integrina (Phillips et al., 1995).

En estudios *in vitro*, también se observa una disminución en la capacidad de extravasación, sugiriendo que las etapas de adhesión firme y extravasación dependen de la capacidad de migración previa. Sin embargo, el éxtasis vascular y edema en los sitios de inflamación generan una disminución del flujo que permite la extravasación de los neutrófilos (von Andrian et al., 1993). Esto explicaría la menor severidad de las infecciones en LAD II comparado con LAD I.

Los pacientes con LAD II presentan una marcada neutrofilia que podría explicarse por una combinación de factores: extravasación disminuida y por tanto, aumento de neutrófilos periféricos, junto a una mayor producción de neutrófilos a nivel medular que en conjunto sobrecompensan la menor vida media observada de los neutrófilos de estos pacientes.

b) Bases moleculares de la enfermedad

Como se mencionó anteriormente, los pacientes con LAD II carecen de antígeno Lewis de grupo sanguíneo y presentan fenotipo Bombay. Ambas estructuras resultan de la adición de residuos fucosa a diferentes precursores por medio de la acción de distintas fucosiltransferasas que emplean GDP-Fuc como sustrato. La figura 8 muestra las estructuras correspondientes a los diferentes antígenos determinantes de grupo sanguíneo resaltando en círculos los residuos fucosa que forman parte de los mismos.

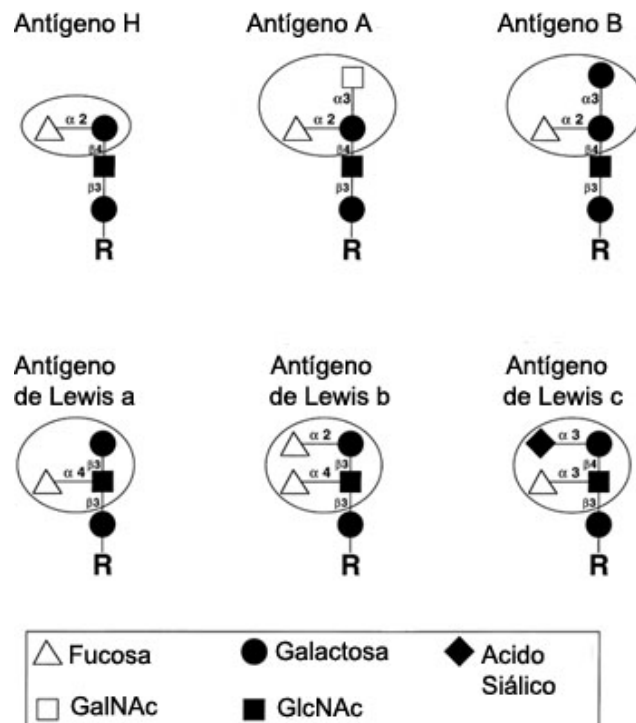


Figura 8. Esquema representativo de las estructuras de los diferentes antígenos determinantes de grupo sanguíneo. El fenotipo Bombay corresponde al antígeno H. Adaptado de (Becker and Lowe, 1999).

En consecuencia, se consideró inicialmente que el fenotipo Bombay y Lewis negativo de estos pacientes se debía a homocigocidad del locus que codifica para las enzimas responsables de su biosíntesis. Sin embargo, estudios citogenéticos descartaron esta hipótesis (Frydman et al., 1992). Además se corroboró que, al menos en un paciente, las actividades α -1,2- y α -1,3-fucosiltransferasa presentan niveles normales tanto en suero como en saliva (Shechter et al., 1995). Esto permitió descartar un defecto en las actividades transferasas y sugirió que el defecto debería encontrarse en una etapa previa en el metabolismo de la fucosa.

La síntesis de GDP-Fuc tiene lugar en el citosol por dos vías diferentes representadas en la figura 9: la síntesis *de novo* (Ginsburg, 1960) que aporta un 90% del reservorio celular de GDP-Fuc, y una vía alternativa (Yurchenco and Atkinson, 1977).

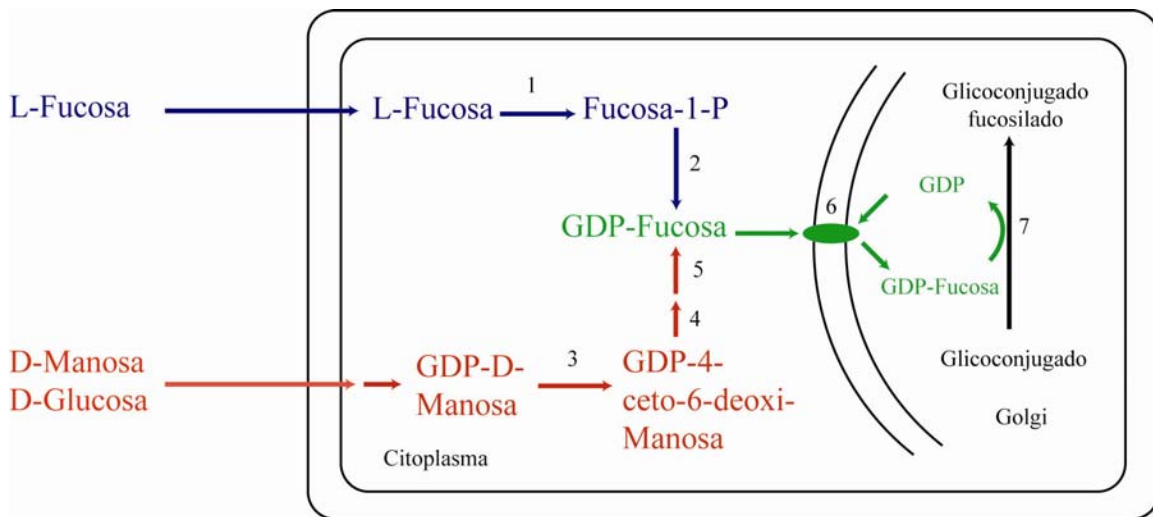


Figura 9. Biosíntesis de GDP-Fuc. Se esquematizan las vías de síntesis alternativa (azul) y *de novo* (rojo). Las actividades involucradas son: 1- fucosa kinasa; 2- GDP-fucosa-pirofosforilasa; 3- GDP-Manosa-4,6-dehidratasa; 4- 3,5-epimerasa; 5- 4-reductasa; 6- Transportador de GDP-Fucosa; 7- Fucosiltransferasa. Las actividades 4 y 5 son parte de la misma enzima, proteína FX. Adaptación de (Becker and Lowe, 1999).

La síntesis *de novo* de GDP-Fuc involucra tres etapas altamente conservadas evolutivamente. La primer reacción es llevada a cabo por la GDP-D-manosa-4,6-

deshidratasa que convierte GDP-Man a GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa que es convertida luego a GDP-4-ceto-6-desoxi-L-galactosa por una 3,5-epimerasa (Ohyama et al., 1998). La etapa final es la reducción a GDP-Fuc por la actividad 4-reductasa. Las dos últimas actividades son realizadas por la misma proteína que en el caso de mamíferos se la conoce como proteína FX (Tonetti et al., 1996). El punto de regulación más importante tiene lugar a nivel de la reductasa, la cual sería inhibida por la acumulación de GDP-Fuc.

La vía alternativa o “scavenger” utiliza fucosa ya sea proveniente del medio extracelular y translocada al citosol mediante un transportador de membrana, o alternativamente, fucosa producto de degradación de glicoproteínas endógenas. En ambos casos, la fucosa citosólica es fosforilada a fucosa-1-fosfato y esta es finalmente convertida a GDP-Fuc por una GDP-L-fucosa pirofosforilasa (Ishihara and Heath, 1968; Ishihara et al., 1968).

El hallazgo de Lubke (Lubke et al 1999) muestra una reducción de aproximadamente el 80% en la incorporación de GDP-Fuc en el AG. Esta fue la primera evidencia que sugirió que la base molecular de la enfermedad era un defecto en el transporte de GDP-Fuc hacia el AG. Dos proteínas están involucradas en este transporte: el transportador de GDP-Fuc en si mismo (que importa GDP-Fuc hacia el lumen en intercambio con GMP) y la GDPasa (que hidroliza GDP a GMP en el lumen del AG y mantiene así los niveles de GMP necesarios para el intercambio) (Figura 10). Luego de demostrar que la actividad GDPasa en uno de los pacientes era normal, el transportador de GDP-Fuc pasó a ser el candidato responsable del defecto en LAD II.

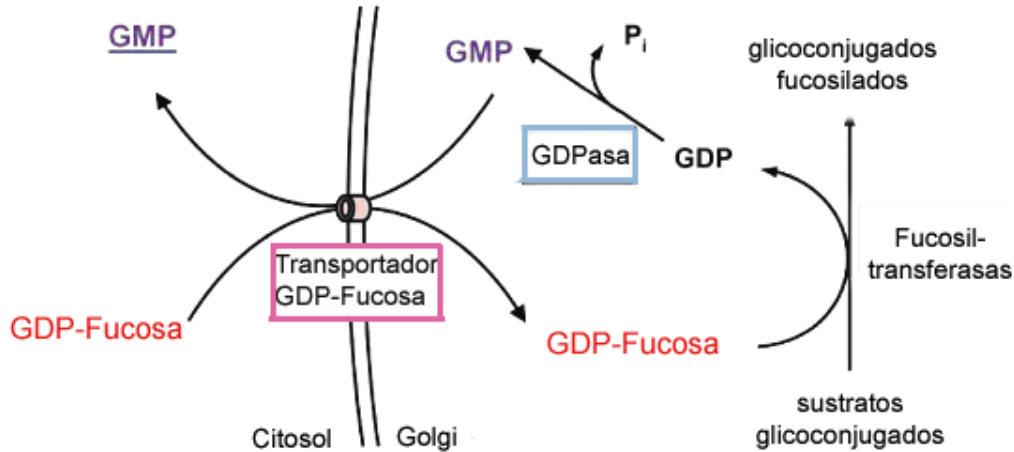


Figura 10. Transporte de GDP-Fuc al lumen del aparato de Golgi. Mecanismo de antiporte en intercambio con GMP (Wild et al., 2002).

Hasta ese momento ningún transportador de GDP-Fuc había sido clonado. La estrategia empleada para identificar el gen que codifica dicho transportador consistió en transfectar fibroblastos de los pacientes con secuencias cDNA de *C.elegans* que presentaban similitud con transportadores de nucleótidos de azúcar para identificar aquellos que corrigiesen la deficiente fucosilación (Luhn et al., 2001). Para ese entonces, el genoma de *C.elegans* ya había sido secuenciado y se sabía que tiene glicoconjugados fucosilados, lo cual sugería que también debía tener un transportador de GDP-Fuc. Así se identificaron dos cDNA: ORF-11 con un efecto leve y ORF-7 que al ser transfectado en fibroblastos de pacientes, restauró la fucosilación (Luhn et al., 2001). A continuación se buscaron secuencias similares a ORF-7 en una base de datos humana y se identificó una proteína con un 55% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Este gen, al ser expresado en fibroblastos de pacientes, corrigió la fucosilación en forma más eficiente que el ortólogo de *C.elegans*. Simultáneamente, otro grupo (Lubke et al., 2001) expresó una biblioteca de cDNA humano en fibroblastos de paciente con LAD II y de esta forma también se identificó el clon de cDNA humano que corregía la fucosilación en estas células y resultó ser idéntico al identificado por el otro grupo. Además, este grupo verificó la actividad de transporte de GDP-Fuc de la proteína codificada por este cDNA en un ensayo de transporte *in vitro* usando una fracción microsomal enriquecida en el AG de fibroblastos de paciente transfectados con ese cDNA. Ambos grupos secuenciaron el

gen que codifica el transportador de GDP-Fuc en uno de los pacientes, encontrando una mutación puntual C439T que origina un cambio de la arginina 147 por una cisteína (Lubke et al., 2001; Luhn et al., 2001) dentro de una región conservada en el 4to dominio transmembrana. El otro paciente presenta una mutación puntual C923G que reemplaza la treonina en la posición 308 por arginina.

A partir de los resultados de la terapia oral con fucosa, se plantearon interesantes preguntas relacionadas con la bioquímica del transportador humano y el efecto de las diferentes mutaciones en su actividad. En voluntarios sanos, este tratamiento incrementaba los niveles séricos de fucosa sin originar efectos colaterales. Cuando se implementó el tratamiento en los pacientes inicialmente descritos, se observó que el paciente con la mutación A147C respondía exitosamente mientras que no se observaron mejoras en la sintomatología del paciente T308R (Etzioni and Tonetti, 2000). Esta respuesta diferencial frente al mismo tratamiento podría explicarse si la mutación A147C redujese la afinidad del transportador por la GDP-Fuc de forma que, aumentando los niveles de GDP-Fuc, se podría lograr la misma velocidad máxima (condiciones de saturación). Por otro lado, se podría especular que la mutación T308R ocasiona una reducción de la velocidad máxima y por tanto la deficiencia es refractaria a la compensación con GDP-Fuc exógena. Los trabajos de Sturla demostraron que cuando se mide transporte de GDP-Fuc en vesículas del AG de linfoblastos del paciente refractario a la terapia oral con fucosa, hay una significativa reducción en la V_{max} mientras que la K_m no se ve afectada (Figura 11) (Sturla et al., 2001).

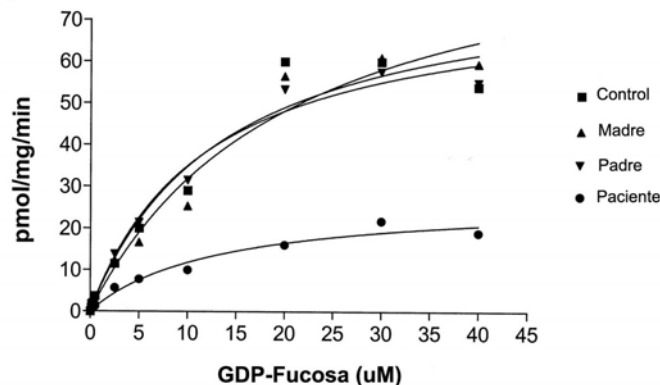


Figura 11. Curvas de saturación correspondientes al transporte de GDP-L-Fuc en vesículas enriquecidas en el AG de linfoblastos (Sturla et al., 2001).

Hasta el momento, se han diagnosticado 6 pacientes con LAD II, y para 5 de ellos se identificó el defecto genético. Además de las mutaciones originalmente descritas, R147C y T308R, se encontraron 3 nuevas mutaciones:

- Una delección G588 que ocasiona un corrimiento del marco de lectura luego de la S195, introduciendo 34 aminoácidos seguidos de un codón de terminación. La proteína resultante es no funcional pero no se han realizado estudios que verifiquen la correcta localización de la misma (Hidalgo et al., 2003) (Figura 12, mutación 2).
- Una transición G969A que genera un codón de terminación prematuro. En consecuencia, la proteína resulta truncada luego del aminoácido L322 (W323Stop) y carece del último dominio transmembrana y dominio C-terminal. Se ha sugerido que la proteína resultante queda retenida en el RE y no llega al AG (Helmus et al., 2006), lo cual será discutido más adelante (Figura 12, mutación 4).
- Una transición A1010G que provoca la sustitución Y337C. Al momento, no hay estudios publicados de este caso (Figura 12, mutación 5).

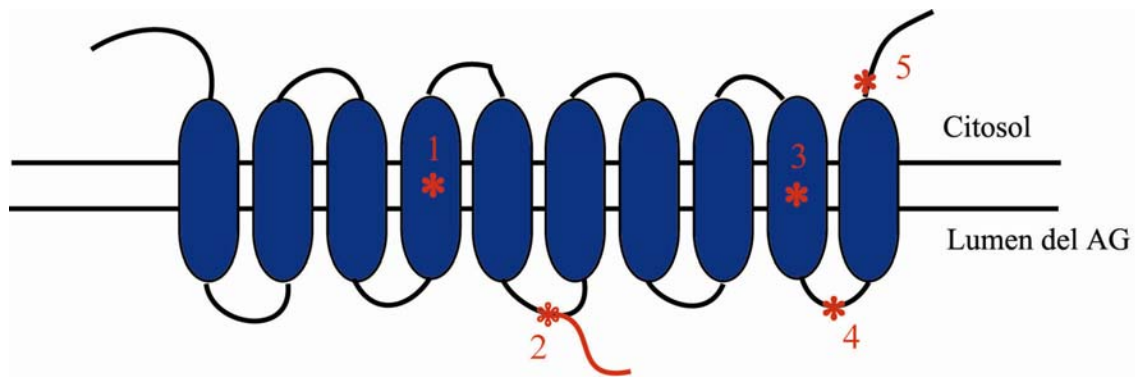


Figura 12. Esquema representativo de la topología del transportador de GDP-Fuc humano. Se indican con asteriscos las posiciones relativas de las mutaciones encontradas hasta el momento. 1- R147C; 2- Δ 588 que ocasiona corrimiento del marco de lectura y la introducción de 34 nuevos aminoácidos seguidos de un codón de terminación; 3-T308R; 4- W323Stop; 5- Y337C.

Otra importante pregunta que motivó parte del trabajo realizado en esta tesis se refiere al efecto de las mutaciones en la actividad intrínseca del transportador. Como se explicó en capítulos anteriores, existen en el genoma humano un mayor número de putativos transportadores de nucleótidos de azúcar, predichos por homología de secuencia, que el número de sustratos requeridos para la síntesis de glicoconjugados. Esta potencial redundancia funcional (ver capítulo correspondiente) abre un nuevo interrogante: ¿la actividad de transporte residual observada en preparaciones del AG de células de pacientes y el hecho que estas células mantengan cierto grado de fucosilación es consecuencia de una pérdida parcial de actividad de la proteína afectada o existe(n) otro(s) transportador(es) que puede(n) llevar a cabo dicha actividad? En la presente tesis, se emplearon técnicas de expresión heteróloga en bacterias del transportador de GDP-Fuc salvaje y mutantes y reconstitución en proteoliposomas para determinación de actividad y así tener una primera aproximación a dicho interrogante.

2- Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar de *Caenorhabditis elegans*

C.elegans constituye el organismo multicelular en el cual se ha realizado la mayor cantidad de estudios recientes relacionados a transportadores de nucleótidos de azúcar. El genoma de *C.elegans* ha sido completamente secuenciado y mediante búsqueda por homología de secuencia, se predicen 18 putativos transportadores de nucleótidos de azúcar (Figura 13). Sin embargo, de acuerdo a los análisis del contenido de azúcar de estos animales, sólo se requieren siete donores de azúcar para la síntesis de glicoconjugados. Esta situación similar a la encontrada en mamíferos, sumada al hallazgo de que estos transportadores pueden ser multisustrato y que se expresan en determinados tejidos específicamente, sugiere la posibilidad que más de un transportador lleve a cabo la misma función en forma redundante o en diferente tejido y/o estadio (Ver capítulo correspondiente a redundancia funcional).

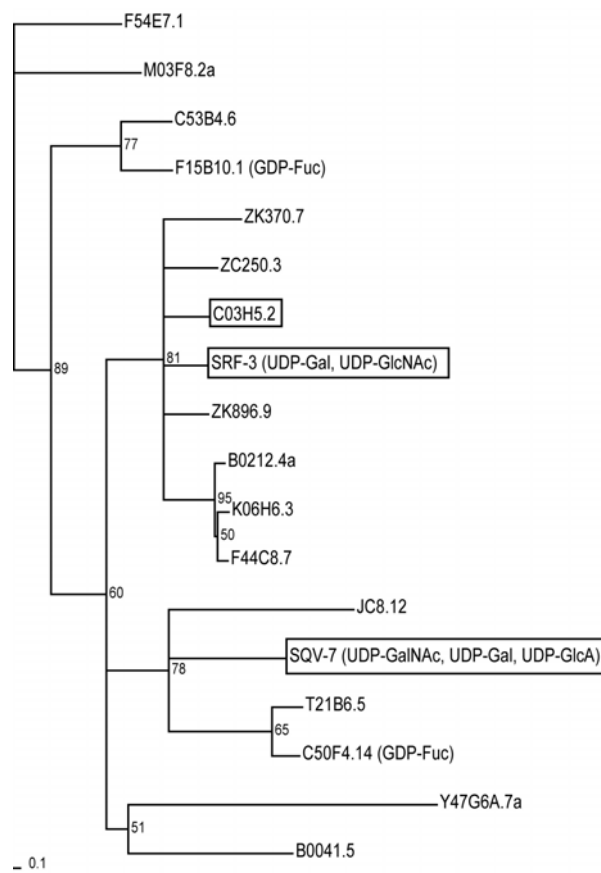


Figura 13. Arbol filogenético de transportadores de nucleótidos de azúcar de *C.elegans* conocidos y putativos usando el software Tree Puzzle (<http://www.tree.puzzle.de/>). Se muestra entre paréntesis la especificidad de sustrato demostrada experimentalmente.

Como se mencionó anteriormente, SQV-7 es un transportador de nucleótidos de azúcar identificado en un screening de mutantes con fenotipo de vulva aplanada (Herman et al., 1999). Mediante expresión heteróloga en levaduras se demostró que presenta especificidad por múltiples sustratos: UDP-Gal, UDP-GalNAc y UDP-GlcA. El transporte de cada uno de estos sustratos es saturable con valores de K_m entre 1-10 μM y se demostró también que el transporte de UDP-Gal es inhibido por los otros dos sustratos en forma competitiva no cooperativa pero no es inhibido por UDP-GlcNAc que no es sustrato del mismo y sólo difiere de UDP-GalNAc por la estequiometría del C4 en el azúcar. Dos mutaciones puntuales descritas en este transportador presentan una reducción en el transporte de todos los sustratos simultáneamente. SQV-7 es el único

transportador para el cual se realizaron estudios concluyentes de competencia de sustratos y desde entonces, este fue el mecanismo considerado válido para todos los transportadores de nucleótidos de azúcar (Berninsone et al., 2001).

SRF-3 es otro transportador de nucleótidos de azúcar identificado en un screening de mutantes susceptibles a la marcación de superficie con la lectina Wheat Germ Agglutinin (WGA). SRF-3 transporta UDP-Gal y UDP-GlcNAc en forma saturable *in vitro* y se demostró la actividad *in vivo* por complementación de células MDCK defectuosas en el transporte de UDP-Gal y células *K.lactis* que carecen de transporte de UDP-GlcNAc. Hasta el momento no se han realizado ensayos de competencia entre sustratos. La expresión de este transportador también está restringida a determinados tejidos: células seam, células g1 y g2 de faringe y espermateca, todos ellos son tejidos o células secretoras. Si bien las mutantes *srf-3* no presentan un fenotipo visual evidente cuando crecen en *Escherichia coli*; presentan resistencia a la infección por la bacteria patógena *Microbacterium nematophilum* y previenen la formación del biofilm cuando crecen en presencia de *Yersinia pseudotuberculosis*. Animales salvajes en presencia de *M. nematophilum* sufren constipación debido a una inflamación post anal. En consecuencia, se reduce la alimentación y la velocidad de crecimiento disminuye en un 20%. La resistencia observada en mutantes *srf-3* no es alelo específica ya que todos los diferentes alelos testeados, a excepción de uno, exhiben resistencia. Así mismo, todos los alelos testeados, presentan resistencia a la formación del biofilm por *Y.pseudotuberculosis* que, en animales salvajes, produce redondez de las cabezas, bloqueo de la alimentación y consecuente inhibición del desarrollo larval (Hoflich et al., 2004).

Como se mencionó en la sección anterior, se ha identificado el transportador de GDP-Fuc mediante complementación de fibroblastos de pacientes con LADII, estrategia que sirvió para determinar el gen afectado en dicha enfermedad (Luhn et al., 2001).

3-Mutaciones en Transportadores de nucleótidos de azúcar en *Drosophila melanogaster*

Al momento se han descrito 3 transportadores de nucleótidos de azúcar en *D.melanogaster*.

Uno de ellos presenta alta homología con los transportadores de GDP-Fuc humano y de *C.elegans* y complementa fibroblastos de pacientes con LADII (Luhn et al., 2004).

El otro es un transportador de UDP-Gal que complementa células CHO Lec 8 deficientes en esta actividad pero no CHO Lec 2 cuya mutación afecta el transporte de CMP-ácido siálico. En ninguno de los dos casos se corroboró que se trate realmente de sistemas saturables ni se determinaron la Km ni la Vm (Segawa et al., 2002).

El tercer transportador de nucleótidos de azúcar descrito presentó mayor controversia desde el punto de vista de la especificidad de sustrato pero a la vez mayor relevancia en cuanto al fenotipo de las mutantes. Dos estudios independientes mostraron que mutantes homocigotas para el gen *fringe connection (frc)*, el cual codifica para un transportador de nucleótidos de azúcar, presentan alteraciones del desarrollo que incluyen acortamiento de patas y pequeños cortes en las alas. La especificidad de sustrato fue determinada mediante expresión heteróloga en *L.donovani* (Selva et al., 2001) y *S.cerevisiae* (Goto et al., 2001). Según el primer grupo, FRC transporta UDP-xilosa, UDP-GlcNAc y UDP-GlcA. Sus estudios mostraron también que el transporte de UDP-GlcNAc y UDP-GlcA es inhibido por la presencia de DIDS, un inhibidor aniónico de transporte, en el medio de reacción. Además reportaron que el transporte de UDP-GlcNAc es inhibido por la presencia de UDP-GlcA sugiriendo competencia entre sustratos. Sin embargo, estos ensayos fueron realizados solamente a una concentración aislada y no se caracterizó el comportamiento cinético del mismo. Por otro lado, el otro grupo reportó que esta proteína tiene especificidad para UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-Glc, UDP-GlcNAc y UMP cuando se trabaja con la fracción microsomal de levaduras que expresan este transportador en forma heteróloga. En este trabajo, sólo se presentaron resultados individuales de transporte realizados a una única concentración de sustrato. Probablemente la discrepancia sea el resultado de problemas técnicos pero ilustra la

importancia de un análisis bioquímico riguroso en la determinación de sustratos. A pesar de la controversia en cuanto a especificidad de sustrato, es interesante remarcar la importancia de este transportador en el desarrollo de la mosca. El fenotipo observado en mutantes *frc* es similar al observado para mutantes *sugarless (sgl)*, *sulfateless (sfl)* y *tout-velu (ttv)* que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de proteoglicanos, sugiriendo que participaría en la misma vía que estas. La necesidad de *frc* para la biosíntesis de proteoglicanos fue confirmada mediante el análisis del depósito de HS y modificación post translacional de HSPG Dally-like, un miembro de la familia de glicoproteínas (proteoglicanos unidos a GPI) (Baeg et al., 2001; Khare and Baumgartner, 2000). También se describió la participación de *frc* en la regulación de Notch. Notch es una proteína transmembrana con dominios *N*- y *O*-glicanos. La interacción del receptor Notch con sus ligandos Delta (Dl) y Serratia (Ser) es modulada por la glicosilación mediada por *fringe (fng)*, una fucosa β 1,3-*N*-acetilglucosaminiltransferasa. Esta glicosilación dependiente de *fringe* potencia el binding Notch-Delta e inhibe la activación transcripcional dependiente de Notch de *jagged 1*, un homólogo de Ser en mamíferos. De esta manera, *fringe* regula la activación de Notch estableciendo centros organizativos en varios procesos de desarrollo y *frc* actuaría regulando la disponibilidad de sustrato de *fringe*.

4- Mutaciones en transportadores de nucleótidos de azúcar en bovinos: Malformación Vertebral Compleja (CVM)

El síndrome de Malformación Vertebral Compleja es un desorden recesivo del ganado bovino que causa aborto de fetos o muerte prematura y anomalías vertebrales como fusión de vértebras en la articulación cervico-torácica (Figura 13). El síndrome fue detectado en 1999 en ganado bovino Holstein dinamarqués, pero rápidamente se extendió a otros países como Holanda, Inglaterra, Estados Unidos y Japón alcanzando niveles de incidencia del 20-30%. Una de las causas de la rápida propagación es el carácter recesivo del mismo y la dificultad del diagnóstico. En general, se realiza diagnóstico presuntivo mediante combinación de necropsia e información genealógica (Thomsen et al., 2006).

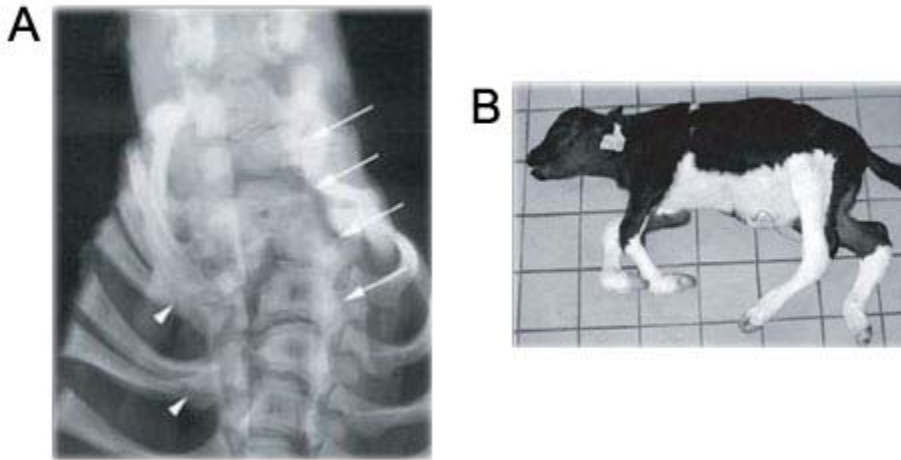


Figura 13. Ternero afectado con Malformación Vertebral Compleja. A) Radiografía cervico-torácica de la columna vertebral. Se observa la fusión de varias vértebras en la porción proximal. B) Acortamiento del cuello y contracción de articulaciones distales (Thomsen et al., 2006).

Estudios recientes han identificado la mutación responsable de la enfermedad. Se trata de una transversión G a T en un gen que codifica para el transportador de UDP-GlcNAc y ocasiona una sustitución de la valina (V) 180 por fenilalanina (F). La funcionalidad de la proteína codificada por este gen se comprobó mediante el ensayo de complementación de la cepa mutante *mnn2-2* de *K.lactis* explicado anteriormente.

Si bien todavía no se conocen cuáles son los glicoconjugados afectados por la falta de transporte de UDP-GlcNAc, es el primer transportador de nucleótidos de azúcar involucrado en el desarrollo del esqueleto axial, demostrando una vez más la importancia de estos transportadores durante el desarrollo.

Es importante destacar también que la identificación de las bases genéticas del síndrome permite evitar la transmisión de la enfermedad mediante el chequeo de DNA de los animales. Esto tiene un gran impacto en la economía ganadera.

PARTE II. *Caenorhabditis elegans*.

Caenorhabditis elegans como modelo de estudio

Ventajas

Caenorhabditis elegans es un organismo multicelular nematodo ampliamente utilizado como modelo de estudio en las áreas de biología del desarrollo, neurobiología y biología de comportamiento. Los descubrimientos realizados en este organismo por los Drs. Brenner, Horvitz y Sulston en las áreas de regulación genética de órganos y tejidos y muerte celular programada han abierto nuevos campos de estudio médico y biológico y les ha merecido el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2002.

Hay varias características que hacen de *C.elegans* un atractivo modelo de estudio:

1- *C.elegans* es un organismo eucarionte y por tanto comparte características celulares y moleculares de otros organismos superiores. Además, el hecho de que sea un organismo multicelular significa que atraviesa procesos de desarrollo desde embriogénesis, morfogénesis y crecimiento hasta alcanzar el estadio adulto. De este modo, mucha de la información obtenida con este sistema, puede extrapolarse a organismos más complejos que son más difíciles de estudiar en el laboratorio. Desde el punto de vista genético, aproximadamente un 35% de los genes de *C.elegans* presentan un homólogo en humanos. Genes humanos pueden reemplazar a sus homólogos en *C.elegans* cuando se introducen en este animal y de la misma forma, genes de *C.elegans* pueden comportarse en forma similar a sus homólogos en mamíferos. Un ejemplo interesante es el descrito en el capítulo correspondiente al síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria. Como se describe en dicho capítulo, la homología de genes entre *C.elegans* y humanos fue utilizada como herramienta para identificar el gen afectado en dicha patología. Una biblioteca de genes de *C.elegans* fue utilizada para complementar el defecto en células de pacientes y de esta forma se encontró que el transportador de GDP-Fuc estaba afectado en estas células.

2- *C.elegans* tiene un genoma relativamente pequeño (97 Megabases) comparado con el genoma humano que tiene aproximadamente 3000 Mbases. Además todo el genoma ha sido secuenciado y es posible llevar a cabo, con relativa facilidad, técnicas de manipulación genética que son más complicadas en otros organismos.

3- Es un organismo de fácil mantenimiento en el laboratorio y posee un ciclo de vida corto.

4- Es transparente, lo cual facilita la observación de sus estructuras internas.

5- Posee 959 células somáticas cuyo patrón de desarrollo ha sido bien establecido.

Dimorfismo sexual

Existen dos sexos: hermafroditas y machos, siendo los hermafroditas la forma más abundante. Esta capacidad de autofecundación conduce a homocigocidad de alelos y por tanto, los gusanos individuales se consideran genéticamente idénticos. El genoma de *C.elegans* está compuesto por seis cromosomas: cinco pares de autosomas y uno o dos cromosomas sexuales, X. Los hermafroditas tienen dos cromosomas X (denominado XX) y los machos, uno (denominado XO). Los machos participan en fecundación cruzada con los hermafroditas. Los machos poseen la misma organización general pero a partir del estadio L2, cuando los órganos sexuales comienzan a desarrollarse, se observa cierto grado de dimorfismo sexual. La figura 14 muestra esquemáticamente las diferencias generales en cuanto a estructura anatómica entre machos y hermafroditas. El aparato reproductor masculino posee una sola gónada en comparación con las dos de los hermafroditas. Esta se abre al exterior a la altura de la cloaca o ano vía el proctodeum, una cavidad epitelial rectal modificada. El proctodeum posee dos espículas sensoriales usadas durante la fecundación para localizar la vulva de los hermafroditas y mantenerla abierta durante la transferencia de esperma (Liu and Sternberg, 1995). Las figuras 15 y 16 corresponden a imágenes de microscopía DIC de adultos hermafrodita (Figura 15) y

macho (Figura 16), indicándose en la imagen correspondiente al animal macho, las principales estructuras diferenciales, a saber: gónada unilobular, espículas sensoriales y morfología de la cola.

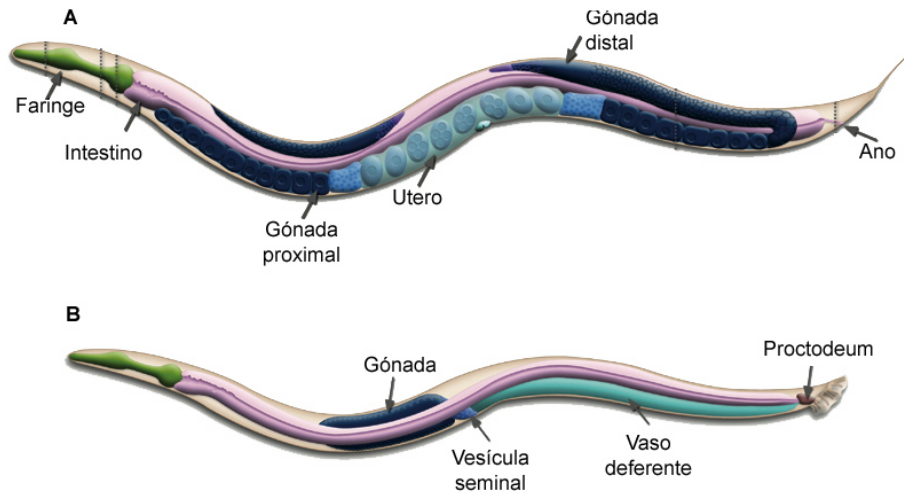


Figura 14. Esquema comparativo de las estructuras anatómicas de hermafroditas A) y machos B). Adaptado de <http://www.wormatlas.org>.



Figura 15. Imagen DIC de gusano adulto hermafrodita. Escala 0.1mm. Adaptado de <http://www.wormatlas.org>.

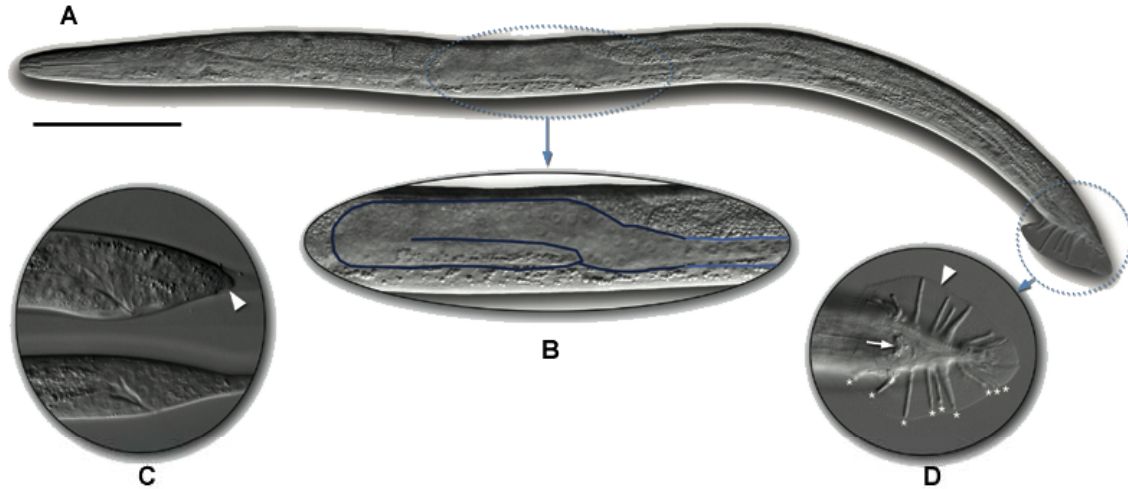


Figura 16. A) Imagen DIC de adulto macho, lateral izquierdo. Scala 0.1mm. B) Ampliación de la gónada distal unilobular. C) Cola, vista lateral. La flecha señala la cloaca. D) Vista ventral de la cloaca ampliada. Se observan las espículas copulatorias. Adaptado de <http://www.wormatlas.org>.

Ciclo de vida

Como se mencionó anteriormente, *C.elegans* posee un ciclo de vida corto, temperatura dependiente que oscila entre 5.5 días a 15 °C, 3.5 días a 20 °C y 2.5 días a 25 °C, desde el huevo hasta el adulto maduro sexualmente.

La figura 17 esquematiza el ciclo de vida de *C.elegans*. Los huevos son fertilizados dentro del adulto hermafrodita y se liberan al exterior unas horas más tarde. Una vez que los huevos eclosionan, los animales atraviesan 4 estadios larvales (L1-L4), cada uno de los cuales termina con una muda, durante la cual se pierde la cutícula vieja y se sintetiza una nueva específica del estadio (Cassada and Russell, 1975). La muda de cutícula se lleva a cabo en tres etapas: 1- separación de la vieja cutícula de la hipodermis, proceso denominado apólisis, 2- formación de una nueva cutícula a partir de la hipodermis y 3- pérdida de la vieja cutícula o ecdisis. La síntesis de proteína de la cutícula es activa durante las mudas y baja durante los períodos intermedios. Además, la composición y ultraestructura de la cutícula es específica de cada estadio. Una vez

alcanzada la adultez, los animales comienzan a autofecundarse. Existe además una forma de vida alternativa llamada Dauer en la que se mantienen viables por períodos de 3 meses durante los cuales no se alimentan. Generalmente ingresan en este estadio larval cuando las condiciones del medio son adversas. Luego, si las condiciones externas mejoran, los gusanos Dauer pueden reingresar al estadio L4.

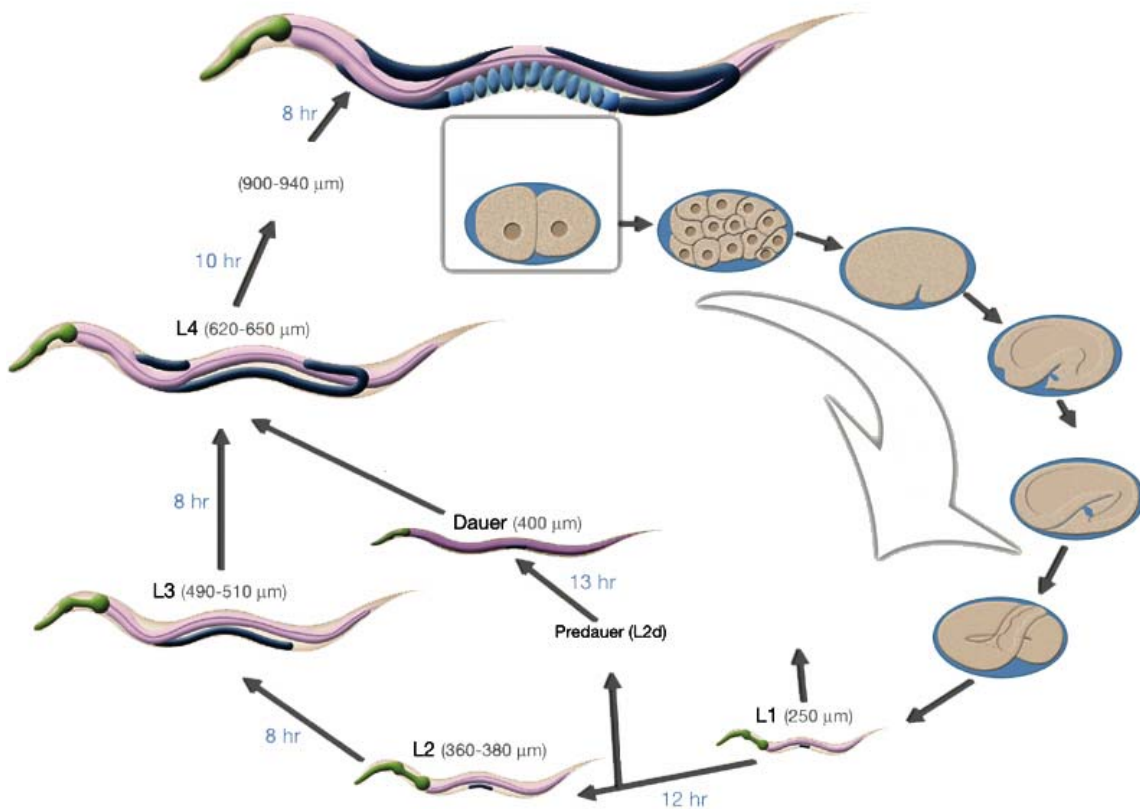


Figura 17. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C. El minuto 0 corresponde a la fertilización. Los números en azul indican la duración del estadio. La primera división celular ocurre aproximadamente 40min post fertilización y los huevos salen al exterior en el estadio de gástrula. Adaptado de <http://www.wormatlas.org>.

Glicoconjugados en *C.elegans*

1-Proteoglicanos en *C.elegans*: mutantes *sqv* (squashed vulva).

a) Características generales de estructura y síntesis de proteoglicanos en vertebrados.

Los proteoglicanos (PG) están formados por un core proteico al cual están unidas cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son polisacáridos lineales que consisten en un aminoazúcar (GlcN o GalN) y un ácido urónico (GlcA o IdoA) o galactosa unidos en secuencias disacarídicas alternadas y lineales con sustituciones de residuos sulfato en diferentes posiciones. Los GAGs más comunes (incluyendo hialuronano (HA) que no ocurre como proteoglicano sino en forma libre) incluyen: los galactosaminoglicanos (condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS)) y los glucosaminoglicanos (heparina, heparán sulfato (HS) y keratán sulfato (KS)). Debido a la gran variabilidad en las posiciones y grado de sulfatación, existe gran heterogeneidad dentro y entre GAGs (Figura 18). Además de las cadenas de GAGs, muchos PG presentan también cadenas de *O*- y *N*-glicanos similares a las de otras glicoproteínas.

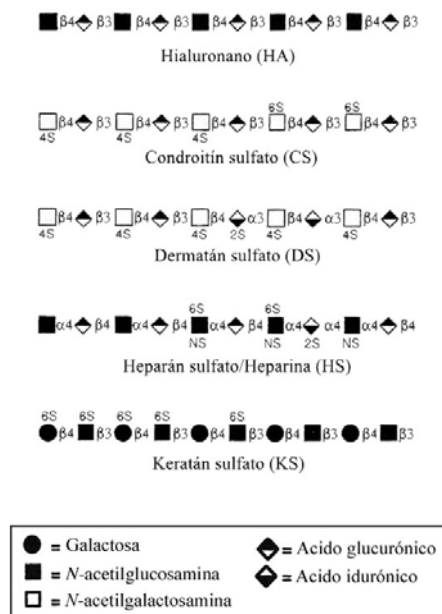


Figura 18. Estructura de glicosaminoglicanos. Adaptado de (Varki, 1999).

Con la excepción de HA, todos los GAGs se sintetizan unidos covalentemente a proteínas. La región de unión es básicamente la misma para CS/DS o heparina/HS. Esta consiste de un tetrasacárido GlcA-Gal-Gal-Xyl-O-Serina que hace de puente entre el GAG y la proteína. La síntesis comienza con la actividad de la xilosiltransferasa (XylIT) que usa UDP-Xyl como donador de azúcar. Luego del agregado de xilosa continúa el agregado de residuos para formar el tetrasacárido que a su vez puede sufrir fosforilación del C2 de la xilosa y sulfatación de los residuos galactosa. En general, la fosforilación y sulfatación ocurren en forma subestequiométrica. Si bien la mayoría de los GAGs se generan a partir del tetrasacárido descrito, algunas células generan GAGs con unión a la proteína como *N*-glicanos.

La biosíntesis de heparina y heparán sulfato se inicia con la formación de una cadena polisacárida con estructura [GlcNAc α 1-4GlcA β 1-4]. A medida que ocurre la polimerización sufre desacetilación de GlcNAc seguida de sulfatación de los residuos aminos libres generados, epimerización de GlcA adyacentes a GlcNS seguida de 2-O-sulfatación del IdoA generado, sulfatación de 6-OH de residuos GlcN adyacentes a ácidos urónicos y 3-O-Sulfatación de algunos azúcares previamente sulfatados y ácidos urónicos epimerizados.

Condroitín sulfato y dermatán sulfato se generan a partir de la formación de un polisacárido de estructura [GlcA β 1-3GalNAc β 1-4]. En este caso también ocurre sulfatación de residuos GalNAc en posición 4 y 6, epimerización a IdoA en DS y sulfatación de C-2 de ácidos urónicos. Sin embargo, como los residuos GalNAc permanecen acetilados, los galactosaminoglicanos presentan menor diversidad estructural que glucosaminoglicanos.

Los KSs se generan a partir de una estructura de polilactosamina [Gal β 1-4GlcNAc β 1-3] que es sulfatada en el C6 de residuos GlcNAc o Gal, o en ambos, generando unidades disacáridas mono-y disulfatadas.

b) Proteoglicanos en *C.elegans*: análisis estructurales

Análisis de GAGs de *C.elegans* han demostrado la presencia de condroitín y heparán sulfato similares a los de vertebrados. Estudios de disacáridos liberados

enzimáticamente han revelado gran cantidad de condroitín no sulfatado y menores cantidades de heparán sulfato. El tratamiento con condroitinasa ABC libera $\Delta\text{HexA}\alpha 1\text{-}3\text{GalNAc}$ que derivaría de condroitín y no de dermatán. Bajo condiciones alcalinas suaves, en condiciones reductoras, se aislaron las siguientes estructuras características de condroitín: $\text{-GalNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcA}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc-ol}$, $\text{-GlcA}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcA}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc-ol}$, $\text{-GalNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcA}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcA}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc-ol}$, que estarían como cadenas *O*-glicosídicas. No se detectó xilosa fosforilada ni galactosa sulfatada (Toyoda et al., 2000; Yamada et al., 1999).

La fracción de GAGs también fue tratada con mezclas de heparinasas para determinar la composición disacárida de HS. Los resultados indican que un 50% corresponde a $\Delta\text{HexA}\alpha 1\text{-}4\text{GlcNAc}$, un 14-18% a $\Delta\text{HexA}\alpha 1\text{-}4\text{GlcN(NS)}$, un 18% a $\Delta\text{HexA(2S)}\alpha 1\text{-}4\text{GlcN(NS)}$, un 11-16% a $\Delta\text{HexA(2S)}\alpha 1\text{-}4\text{GlcN(NS, 6S)}$ y un 6% a $\Delta\text{HexA}\alpha 1\text{-}4\text{GlcNAc(6S)}$ (Toyoda et al., 2000; Yamada et al., 1999).

En estudios independientes, se obtuvieron resultados que sugieren la síntesis de cadenas de GAGs en el core proteico vía el mismo tetrasacárido de unión encontrado en vertebrados, lo cual sugiere que los pasos iniciales, al menos, estarían conservados evolutivamente. También se cree que hay cadenas cortas similares a condroitín unidas a proteína directamente vía *O*-GalNAc (Guerardel et al., 2001; Yamada et al., 2002).

c) Enzimas involucradas en la biosíntesis de GAGs en *C.elegans*

De estudios de screening de mutantes con problemas en la invaginación de la vulva, se aislaron 25 mutantes que correspondían a defectos en 8 genes diferentes: *sqv-1* a *sqv-8*. Estas mutantes presentan también una reducida fertilidad de hermafroditas, y muchos de los huevos de la progenie se arrestan durante la embriogénesis. Desde el punto de vista químico, mutantes *sqv-7* presentan defectos en condroitín y heparán sulfato mientras que en mutantes *sqv-3* y *sqv-8* sólo se vieron afectados los proteoglicanos modificados tipo condroitín (Bulik et al., 2000).

Estudios funcionales revelaron que *sqv-1* codifica una UDP-GlcA decarboxilasa (Hwang and Horvitz, 2002); *sqv-2*, una galactosiltransferasa II (GalT II) (Hwang et al., 2003a); *sqv-3* codifica una galactosiltransferasa I (GalT I) (Bulik et al., 2000); *sqv-4*, una

UDP-Glc deshidrogenasa (Hwang and Horvitz, 2002); *sqv-5*, condroitín sulfato sintasa (Hwang et al., 2003b); *sqv-6*, una xilosiltransferasa (XylIT) (Hwang et al., 2003a); *sqv-7*, un transportador de nucleótidos de azúcar (Berninsone et al., 2001) y *sqv-8* codifica una glucuroniltransferasa I (GlcAT I) (Bulik et al., 2000).

Además de genes *sqv*, *C.elegans* tiene homólogos para otras enzimas responsables de biosíntesis y modificación de GAG de proteoglicanos de mamíferos:

rib-2 : α 1-4GlcNAc T I y II

hst-1 : *N*-deacetilasa/*N*-sulfotransferasa

hse-5 : 5'-uronosil epimerasa

hst-2 : heparán sulfato-2-*O*-sulfotransferasa

hst-6 : heparán sulfato glucosamina-6-*O*-sulfotransferasa

hst-3 : heparán sulfato glucosamina-3-*O*-sulfotransferasa

La figura 19 esquematiza la biosíntesis de GAGs de proteoglicanos en mamíferos y en *C.elegans*. A pesar de las diferencias en complejidad biológica entre mamíferos y *C.elegans*, los estudios estructurales y bioquímicos indican que *C.elegans* es un modelo animal atractivo para el estudio del rol de proteoglicanos en desarrollo.

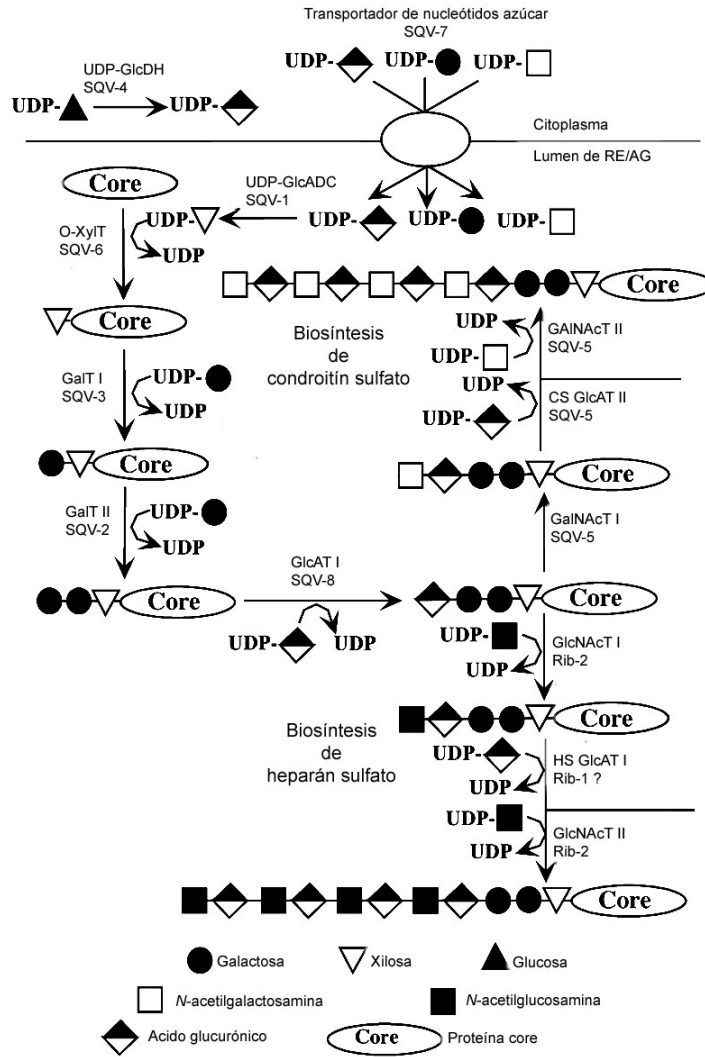


Figura 19. Esquema de la síntesis de condroitín sulfato y heparán sulfato. Se indican las enzimas responsables de cada etapa, seguido de las correspondientes enzimas identificadas en *C.elegans*. Abreviaciones usadas: UDP-GlcDH, UDP-glucosa deshidrogenasa; UDP-GlcADC, UDP-ácido glucurónico decarboxilasa; O-XylIT, polipéptido O-xilosiltransferasa; GalT I, xilosa- β 1,4-galactosiltransferasa (β 4GalT-7); GalT II, galactosa- β 1,3-galactosiltransferasa (β 3GalT-6); GlcAT I, galactosa- β 1,3-glucuronosiltransferasa; GalNAcT I, ácido glucurónico- β 1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa; CS GlcAT II, condroitín sulfato GalNAc- β 1,3-glucuronosiltransferasa (parte de condroitín sulfato sintasa); GalNAcT II, ácido glucurónico- β 1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa (parte de condroitín sulfato sintasa); GlcNAcT I, ácido glucurónico- α 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa; HS GlcAT II, heparán sulfato GlcNAc- β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa (parte de heparán sulfato copolimerasa); GlcNAcT II, ácido glucurónico- α 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa (parte de heparán sulfato copolimerasa). Adaptado de (Haltiwanger and Lowe, 2004).

d) Fisiología de proteoglicanos a partir de estudios genéticos y bioquímicos en *C.elegans*.

Como se mencionó anteriormente, mutantes *sqv* fallan en la expansión del espacio extracelular de la vulva que es la apertura para el pasaje de espermia proveniente de los machos y salida de huevos en el animal hermafrodita adulto. Todas las células están presentes pero no ocurre la invaginación de la vulva durante la transición L3/L4 (Figura 20).

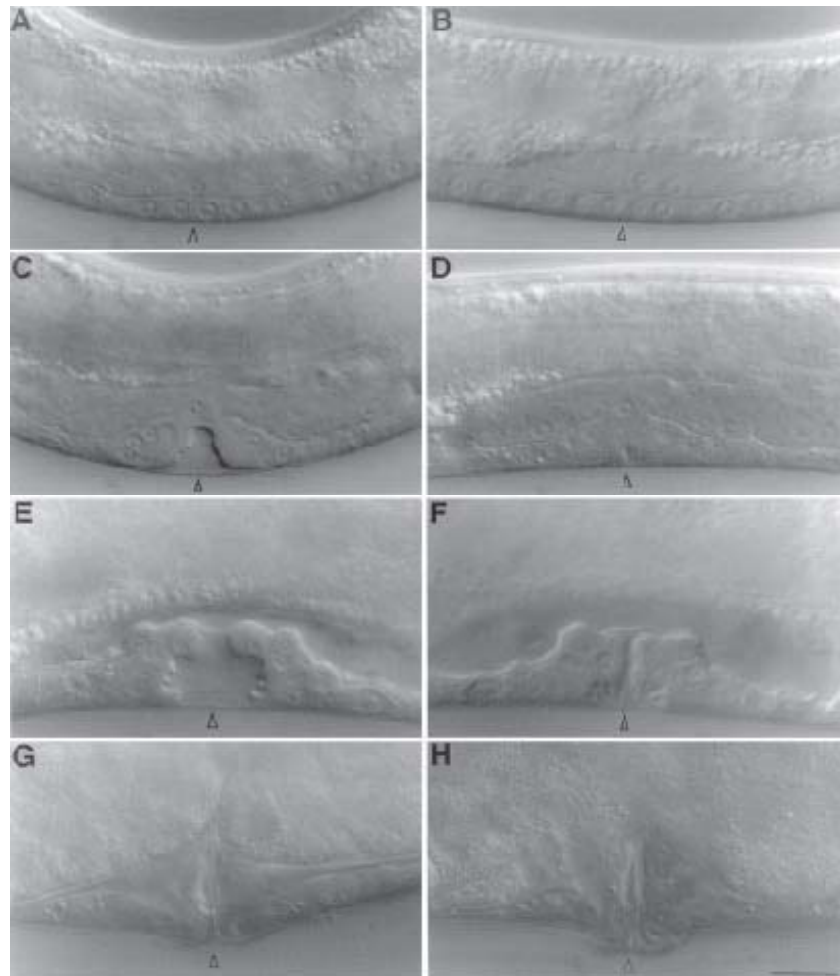


Figura 20. Mutantes *sqv* con invaginación de la vulva parcialmente colapsada. Fotos Nomarski de la región de la vulva de animales salvajes (A, C, E y G) y *sqv-3* (n2841) (B, D, F y H). A y B corresponden al estadio L3 tardío. En ambos casos, los precursores de la

vulva ya dieron origen a las 4 células que se encuentran en un mismo plano rodeadas por el epitelio. Las puntas de flecha indican el centro de la vulva. C y D corresponden al estadio L4 temprano. La división celular de la vulva se ha completado. En ambos casos, se produjo el desprendimiento de las células del epitelio pero en el mutante, el espacio entre células de la vulva y cutícula es mucho menor. E y F corresponden al estadio L4 medio. La invaginación de la vulva en el mutante está parcialmente colapsado. G y H corresponden al estadio adulto. Si bien la diferencia no es tan evidente, cuando el útero se llena de huevos, la vulva del mutante protrude en forma anormal. La barra indica la escala 10µm y la orientación de los animales es anterior hacia la izquierda y ventral es hacia abajo. Adaptado de (Herman et al., 1999).

Además del defecto en la invaginación de la vulva, se observa un arresto del desarrollo embrionario de la progenie en el estadio de 1 célula. Todas las etapas desde la fertilización hasta la división nuclear postmitótica ocurren normalmente pero falla la división celular o citoquinesis (Figura 21).

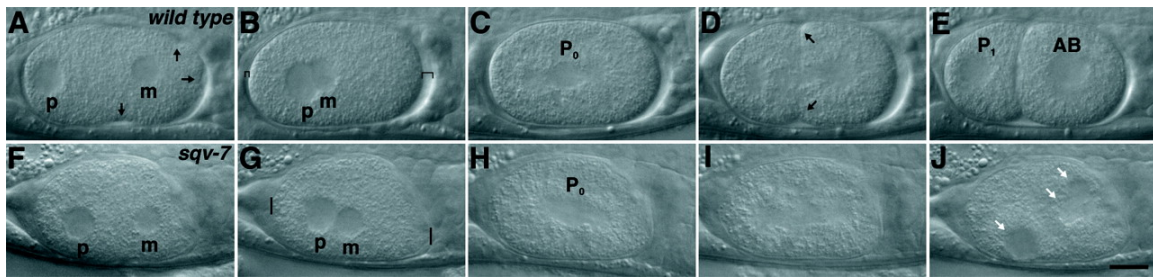


Figura 21. Fotos Nomarski de la embriogénesis de animales salvajes (A-E) y mutantes *sqv-7* (F-J). A y F muestran la constricción de la membrana plasmática (indicado con flechas) en el embrión salvaje pero no en el embrión mutante. Se indican los pronúcleos materno (m) y paterno (p). B y G corresponden a la unión de los pronúcleos. En el embrión salvaje se observa la formación de un espacio entre la membrana plasmática y la pared del huevo (indicado entre barras), que no está presente en el mutante. C y H corresponden al comienzo de la división nuclear a lo largo del eje A-P. D e I corresponden a la primer mitosis. En el embrión salvaje se observa el comienzo de la citoquinesis, ausente en el mutante. E y J, células hijas luego de la primera división. El embrión *sqv-7* tiene más de dos núcleos (indicados con flechas) en un mismo citoplasma. Escala barra=10µm. Adaptado de (Herman et al., 1999).

Si bien no se ha elucidado totalmente el mecanismo por el cual una disminución en GAGs genera defectos en morfogénesis, se han propuesto varios modelos que explicarían los mecanismos de invaginación de epitelios que involucrarían GAGs. Uno de los modelos propuestos para la invaginación de epitelios que tiene lugar durante la gastrulación en erizos de mar (Burke et al., 1991) y *Drosophila* (Sweeton et al., 1991)

sugiere que las células involucradas sufrirían cambios en el citoesqueleto que resultan en una constricción de la superficie apical relativa a la superficie basal y provoca la invaginación hacia adentro del epitelio. Otro modelo (Gustafson and Wolpert, 1963) sugiere un aumento en la adhesividad entre células del epitelio que genera un mayor área de contacto y por ende un aumento en la altura del epitelio. Si la base se mantiene constante, el aumento de altura se compensa con una disminución de la superficie apical que genera el plegamiento del epitelio hacia adentro. Un tercer modelo, también aplicado a la gastrulación del erizo de mar (Lane et al., 1993), postula que las células que van a invaginarse depositan una matriz extracelular higroscópica entre sus ápices y la matriz vieja menos higroscópica. La mayor hidratación de la nueva matriz hace que esta se hinche y aumente la superficie en relación a la vieja ocasionando que la bicapa se doble hacia adentro. Probablemente, todos estos mecanismos estén involucrados en mayor o menor medida de acuerdo al sistema.

La localización de las proteínas SQV por inmunomarcación es consistente con la participación de las mismas en la morfogénesis de la vulva. SQV-1 se localiza en forma de puntos discretos en el citoplasma de muchas células, entre ellas, células de la vulva y uterinas, además de oocitos y coelomocitos. Se cree que el patrón observado en forma de puntos discretos corresponde a la localización en un compartimiento subcelular, como el AG. Anticuerpos que reconocen el extremo carboxilo terminal de SQV-7 también presentan tinción en forma de puntos discretos en el citoplasma, diversos tejidos en animales salvajes, incluyendo vulva, seam cells, células distales (DTC) y oocitos. Más aún, combinando ambos anticuerpos se observa colocalización de ambas proteínas al menos en la vulva. SQV-4 se expresa en el citoplasma de células de la vulva, uterinas, seam, de faringe y espermateca. También se observa expresión en oocitos donde sería necesaria para el normal desarrollo embrionario.

SQV-1, SQV-5 y SQV-7 se expresan constitutivamente en todas las células de la vulva, mientras que los niveles de expresión para SQV-4 aumentan significativamente en la transición L3/L4 lo cual podría interpretarse como una mayor síntesis de UDP-GlcA que podría usarse para una mayor síntesis y/o mayor longitud de las cadenas de condroitín y heparán sulfato. Esta expresión diferencial sugiere una regulación temporal y tal vez espacial de *sqv-4*, actuando como punto de control para una síntesis rápida de

GAGs. Por otro lado, el hecho que la conversión de UDP-Glc a UDP-GlcA es irreversible, justifica los bajos niveles de expresión de SQV-4 en estadios en los cuales no se requiere UDP-GlcA y se conservaría UDP-Glc por tanto, glucosa.

2- *N*- y *O*-glicanos en *C.elegans*: mutantes *srf-3* (surface)

a) Características generales de la síntesis de *N*-glicanos en vertebrados

El primer evento en la síntesis de *N*-glicanos constituye la formación del oligosacárido precursor unido al lípido dolicol (Figura 22). Los primeros tres pasos tienen lugar en la cara citosólica de la membrana del RE y consisten en la unión de dos residuos GlcNAc al dolicol a partir de UDP-GlcNAc (paso I y II) por medio de la actividad GlcNAc-1-fosfotransferasa y GlcNAc transferasa respectivamente. El tercer paso es la adición sucesiva de cinco residuos manosa a partir de GDP-Man para dar Man₅GlcNAc₂-Dol que es translocado al lumen del RE (paso III). Una vez en el lumen, el ensamblado del oligosacárido-lípido precursor se completa con el agregado de tres residuos glucosa usando Dol-P-Glc como donador (paso V).

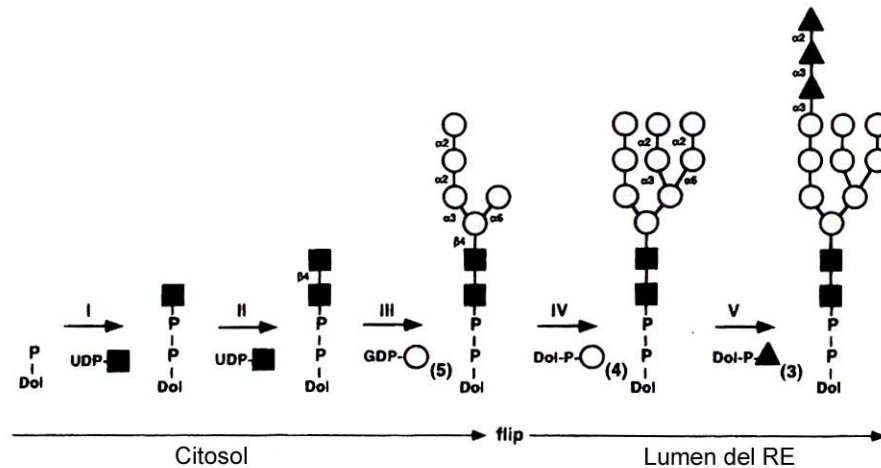


Figura 22. Biosíntesis del oligosacárido-lípido precursor. Adaptado de (Varki, 1999)

Este oligosacárido es transferido mediante un complejo proteico de membrana del RE (OST, oligosaciltransferasa) al residuo de asparragina de la proteína naciente. Aún en el lumen del RE tienen lugar procesos de remoción de residuos glucosa mediante las actividades de glucosidasas I y II y reglucosidación mediante una UDP-glucosa:glicoproteína glucosiltransferasa (GT) que aseguran el adecuado plegamiento de la proteína (control de calidad en el RE). El oligosacárido resultante de esta etapa es un $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ que continúa siendo modificado en el lumen del RE por una α -manosidasa para dar $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ que es la estructura que llega al AG para su posterior modificación a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$. Esta estructura conocida como alta manosa (high mannose) es el punto de partida de la diversificación de los *N*-glicanos a estructuras “híbridas” y “complejas”. Las estructuras híbridas quedan definidas por la presencia de residuos de manosa sustituidos (unidos a GlcNAc) y no sustituidos, mientras que las estructuras complejas son aquellas donde ambas manosas ($\alpha 3$ y $\alpha 6$) están sustituidas con motivos GlcNAc. La primer enzima que participa en la diversificación de *N*-glicanos es la GlcNAcT I que esta codificada por un sólo gen en mamíferos y agrega GlcNAc en unión $\beta 1-2$ generando el oligosacárido sustrato de una α -manosidasa II que remueve $\alpha 1-3$ -manosa y $\alpha 1-6$ -manosa (ver figura 23). La estructura híbrida generada ($\text{GlcNAc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$) es el sustrato de la enzima GlcNAcT II que da lugar a los glicanos complejos.

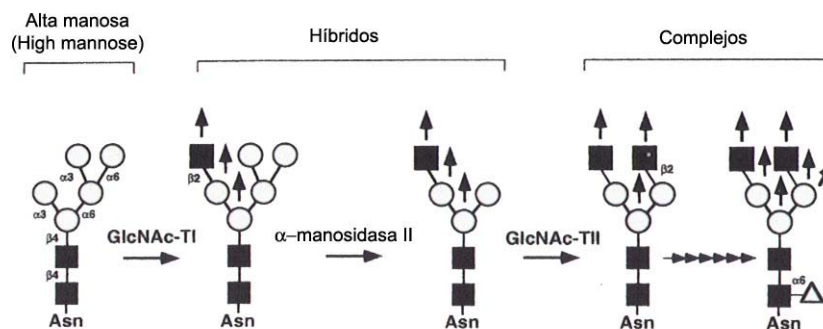


Figura 23. Diversificación de *N*-glicanos en el AG de vertebrados. Las flechas verticales indican formación de nuevas ramas; no todas ocurren en un mismo *N*-glicano. Adaptado de (Varki, 1999).

Tanto en estructuras híbridas como complejas, puede haber más de dos ramas formando estructuras multiantenarias por medio de las enzimas GlcNAcT I a VI (Figura 24). Otra característica de *N*-glicanos es la fucosilación en unión α 1-6 del residuo GlcNAc unido a Asn. En general ocurre luego de la actividad GlcNAcT I y es inhibida por el agregado de GlcNAc bisectante por GlcNAcT III.

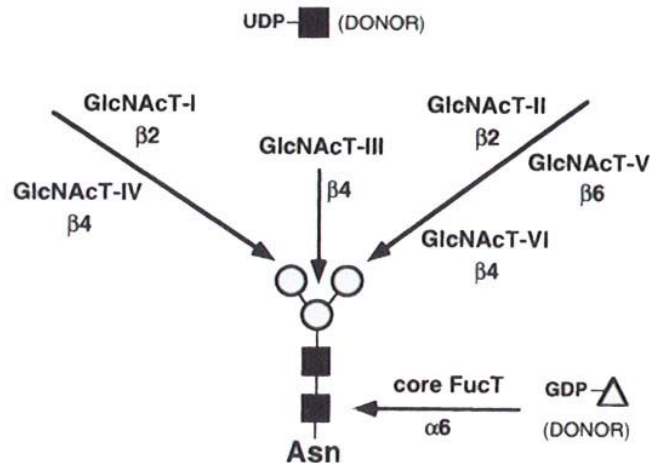


Figura 24. Enzimas aisladas y caracterizadas en la diversificación de *N*-glicanos. Adaptación de (Varki, 1999).

b) *N*-glicanos en *C.elegans*

Estudios con extractos de *C.elegans* (mezcla de estadios) permitieron identificar cinco clases principales de *N*-glicanos (Figura 25) (Cipollo et al., 2002):

- Alta manosa (high mannose)
- Complejos
- Híbridos
- Fucopausimanósidos
- Oligosacáridos con fosfocolina

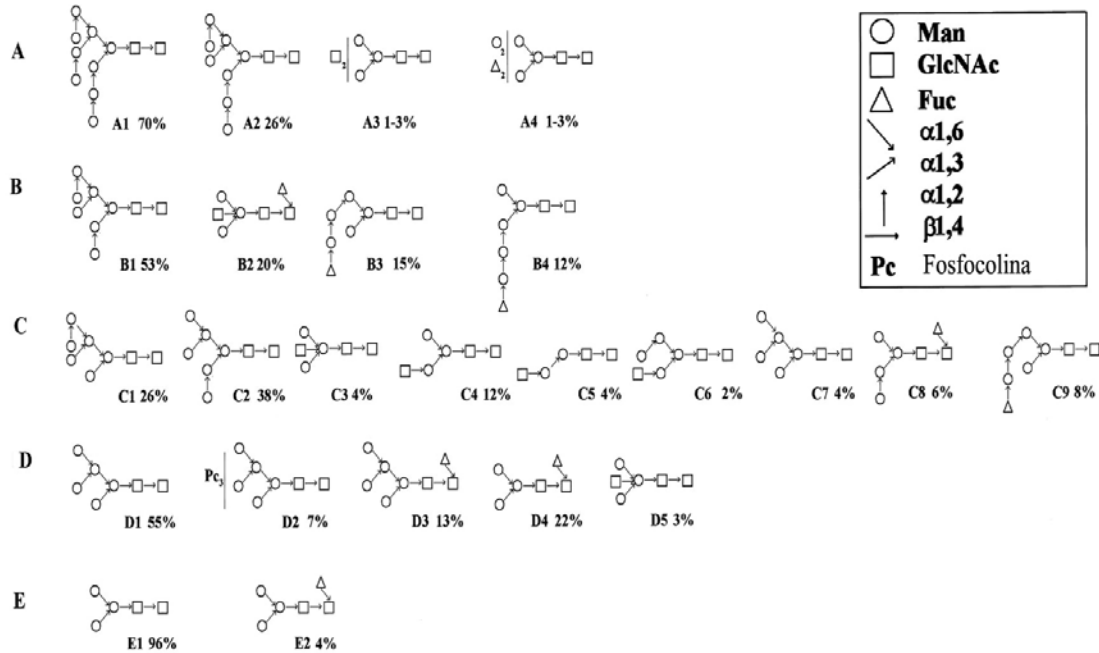


Figura 25. Los *N*-glicanos liberados con PNGase F fueron separados en cinco grupos mediante BioGel P4. En esta figura se muestran las estructuras identificadas dentro de cada grupo, con su abundancia relativa.

Las tres primeras clases presentan un alto grado de conservación con las estructuras descritas para mamíferos. La presencia de estructuras $\text{Man}_{3-9}\text{GlcNAc}_2$ sugiere que *C.elegans* posee una actividad manosidasa idéntica a las actividades $\alpha 1,2$ -manosidasa del RE y manosidasas I y II del AG (Herscovics, 1999). Además, análisis mediante RMN revelan la presencia de glicanos de estructura híbrida con evidencia de actividad GlcNAcT I y GlcNAcT III que adicionan $\beta 1,2$ -GlcNAc a la rama inferior y $\beta 1,4$ -GlcNAc bisectante a la $\beta 1,4$ -manosa. Ambas enzimas fueron clonadas y se demostraron 3 actividades GlcNAcT I (Herscovics, 1999). En cuanto a los *N*-glicanos complejos, se identificaron estructuras con hasta 6 residuos de HexNAc y cadenas complejas e híbridas con hasta 5 HexNAc ($\text{Hex}_5\text{HexNAc}$), que sugieren presencia de actividades GlcNAcT II y GlcNAcT IV, responsables de la adición de $\beta 1,2$ -GlcNAc al brazo superior en unión a $\alpha 1,6$ -Man y $\beta 1,4$ -GlcNAc al brazo inferior en unión a $\alpha 1,3$ -Man respectivamente (Brockhausen et al., 1992; Hard et al., 1991).

Si bien se encontraron residuos de α 1,6-fucosa unida al core de quitobiosa como se observa en mamíferos, estas estructuras carecen de sustitución de GlcNAc en el brazo inferior, GlcNAc bisectante o directamente sin GlcNAc. Esto sugiere que la fucosiltransferasa de *C.elegans* involucrada en esta etapa posee mayor flexibilidad en cuanto a la estructura del sustrato.

Se encontraron también nuevas estructuras como los fucopausimanósidos en los que la fucosa se encuentra bloqueando residuos de manosa terminal y que revelan una nueva actividad fucosiltransferasa. En general estas estructuras se encuentran metiladas al igual que glicanos nativos.

El quinto grupo identificado corresponde a los oligosacáridos alta manosa sustituidos con fosfocolina que habían sido previamente identificados en *Acanthocheilonema viteae*, *Onchocerca volvulus* y *Trichinella spiralis* (Haslam et al., 1999; Haslam et al., 1997; Morelle et al., 2000). En este sentido, *C.elegans* podría servir como modelo para la búsqueda de drogas dirigidas a esta vía biosintética que es común a parásitos nematodos y trematodes, con la ventaja de estar trabajando con un sistema no parásito.

Debe indicarse también que en diversos estudios se observó la existencia de glicanos *O*-metilados en *C.elegans* (Altmann et al., 2001; Cipollo et al., 2005; Haslam et al., 2002).

Posteriormente, Cipollo *et al* (Cipollo et al., 2005) analizaron la composición de *N*-glicanos a lo largo del ciclo de vida del animal, observando que presentan un perfil único para cada estadio y que el estadio Dauer y larva L1 son los que presentan mayor abundancia de glicanos. Una hipótesis propuesta hace referencia a la gran cantidad de cambios involucrados en ambos estadios. En el estadio larva L1, el animal terminó su desarrollo embrionario y comienza el crecimiento vegetativo mientras que el estadio Dauer implica la salida de un estado de crecimiento vegetativo para pasar a un estado de detención del desarrollo.

Finalmente se demostró que *C.elegans* sintetiza estructuras LacNAc, lo cual se refuerza por el hecho que el genoma de *C.elegans* presenta tres homólogos de UDP-Gal: β -GlcNAc β 1,4-galactosiltransferasa II.

En cuanto a *O*-glicanos, la síntesis en mamíferos comienza, en el caso de mucinas, con la adición inicial de GalNAc por miembros de la familia de UDP-*N*-acetilgalactosamina:polipéptido *N*-acetilgalactosaminiltransferasa a residuos Ser y Thr de proteínas. Se conocen al menos 12 miembros de esta familia. Se han identificado 13 enzimas en el genoma de *C.elegans*, codificadas por 9 genes *gly-3*, *-4*, *-5*, *-6*, *-7*, *-8*, *-9*, *-10*, *-11*, siendo *gly-5* y *gly-6* sustratos de actividades de corte y empalme que dan lugar a 3 variantes cada uno. Wang et al. (Wang et al., 2005) llevaron a cabo ensayos de RNAi para estudiar el rol de estas proteínas en el desarrollo embrionario. Se evaluó la presencia de huevos multinucleados o células poliploides en embriones tempranos pero no se encontró ninguno de estos defectos como consecuencia de la inactivación de estas enzimas. Para eliminar la posibilidad de que la falta de defectos fuese consecuencia de redundancia genética (ver a continuación redundancia funcional), se repitió el ensayo inactivando grupos de genes en forma simultánea. Esto tampoco ocasionó defectos en el desarrollo embrionario.

c) Alteraciones en las estructuras de glicanos como consecuencia de mutaciones en transportador de nucleótidos de azúcar.

Como se mencionó anteriormente, SRF-3 es un transportador de nucleótidos de azúcar presente en células seam, faringe y espermateca de *C.elegans* con especificidad para UDP-Gal y UDP-GlcNAc. Mutantes *srf-3* sólo presentan un fenotipo de locomoción afectada (Hoflich et al., 2004) pero son susceptibles a la marcación de superficie con la lectina WGA (fenotipo *srf*) y se vuelven resistentes a la infección por *Microbacterium nematophilum* así como también previenen la formación de biofilms por *Yersinia pseudotuberculosis*. El análisis comparativo de los *N*- y *O*-glicanos en mutantes *srf-3* y animales salvajes muestra una reducción de casi un 65% de *O*-glicanos que contienen ácido glucurónico y galactosa así como una reducción de *N*-glicanos que contienen galactosa y fucosa (Cipollo et al., 2004).

Estos resultados sugieren que los glicoconjugados afectados serían responsables de las interacciones entre la superficie del animal y la bacteria patógena o biofilm según el caso, aunque no puede descartarse que haya glicolípidos y proteoglicanos

involucrados. Por otro lado, el fenotipo *srf* ha sido explicado según dos modelos diferentes. Según uno de ellos, la lectina une dominios normalmente enmascarados en animales salvajes pero que quedan expuestos en la superficie de los mutantes. El otro modelo, no excluyente, propone que la susceptibilidad a la marcación con lectina es el resultado de fallas en el procesamiento de glicoproteínas que produce una secreción aberrante de componentes de superficie.

Otra observación importante que resulta de este trabajo y está muy relacionada a uno de los temas centrales de esta tesis es el hecho que si bien el transportador SRF-3 presenta especificidad por UDP-Gal y UDP-GlcNAc, no se encontró una disminución en la incorporación de GlcNAc a glicoproteínas. Dos diferentes situaciones podrían conducir al resultado observado: por un lado, la existencia de otro transportador que pudiese estar translocando UDP-GlcNAc en el AG de esos tejidos pero no UDP-Gal; o, se podría postular que la mutación estudiada solo presenta defectos en el transporte de UDP-Gal pero no UDP-GlcNAc.

3- Glicolípidos

Los glicosfingolípidos constituyen una familia amplia y heterogénea de glicolípidos que forman patrones complejos. La mayor parte de los glicolípidos de mamíferos presentan una estructura core de glucosilceramida que se sintetiza en el citosol por la glucosilceramida sintasa (Ichikawa et al., 1998). Las modificaciones más comunes son la sulfatación para dar sulfátidos y la sialilación para formar gangliósidos. Luego, pasan al AG donde son modificados por diferentes glicosiltransferasas. El resto de los glicolípidos, deriva de galactosilceramida, a partir de UDP-galactosa y ceramida por la enzima UDP-galactosa:ceramida galactosiltransferasa. Las enzimas que transfieren glucosa y galactosa a ceramida catalizan reacciones similares pero presentan diferente topología del sitio activo y no comparten homología de secuencia de aminoácidos (Ichikawa and Hirabayashi, 1998).

a) Glicolípidos en *C.elegans*

A diferencia de los glicosfingolípidos encontrados en la mayoría de los mamíferos, *C.elegans* posee glicosfingolípidos con un core de Man- β 1,4-Glc- β 1-Ceramida (serie artro) que puede ser posteriormente extendido por la adición de azúcares neutros o fosforilcolina. El screening de mutantes resistentes a la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* constituyó un avance importante en la elucidación de las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos glicolípidos. Estas proteínas se unen a receptores en el epitelio intestinal de insectos y nematodos formando poros que llevan a la muerte del animal y son usadas como insecticidas. En consecuencia, las mutantes identificadas en este estudio fueron denominadas *bre* (Bt-toxina resistente) y los genes afectados se numeraron del 2 al 5 (Figura 26). *Bre-2* presenta homología con la familia de β 1,3-glicosiltransferasas; *bre-3* presenta una alta similitud de secuencia con el gen que codifica para la enzima GDP-manosa: β Glc- β 1,4-manosiltransferasa de *D.melanogaster* (egghead); *bre-4* es idéntica a la enzima UDP-GalNAc: β GlcNAc β 1,4-*N*-acetilgalactosaminiltransferasa y *bre-5* es homólogo a *brainiac* de *D.melanogaster* que codifica para una UDP-GlcNAc: β Man- β 1,3-*N*-acetilglucosaminiltransferasa que adiciona β 1,3-GlcNAc a Man- β 1,4-Glc- β 1-ceramida. Estudios estructurales de los glicosfingolípidos presentes en las diferentes mutantes *bre* permitió corroborar la actividad propuesta para dichas proteínas (Griffitts et al., 2005; Griffitts et al., 2003).

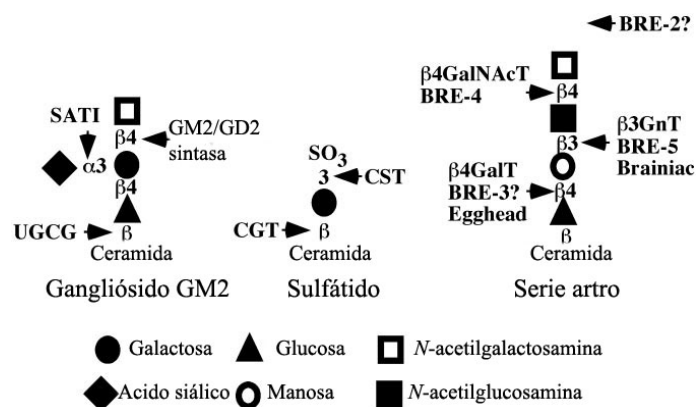


Figura 26. Esquema simplificado de la síntesis de glicosfingolípidos. Se indican las enzimas de mamíferos y las correspondientes a *D.melanogaster* y *C.elegans*. Adaptado de (Haltiwanger and Lowe, 2004).

PARTE III. Redundancia genética y mecanismos de RNAi

Redundancia genética en *C.elegans*

El fenómeno de redundancia genética implica que una mutación en un gen exacerba el fenotipo causado por una mutación en otro gen, pero el fenotipo resultante debe exceder lo que se esperaría de la simple suma de fenotipos de las mutaciones individuales. Cuando el doble mutante presenta un fenotipo no observado en las mutaciones aisladas, se denomina sintético.

La redundancia genética puede provenir de diferentes tipos de interacción genética:

- dos genes que proveen la misma función en forma redundante,
- dos genes que son ambos importantes para la misma función, ya sea porque codifican diferentes componentes de un mismo complejo o diferentes pasos de una misma vía.

Si se considera que mutaciones o la inactivación de sólo un 20-35% de los genes de *C.elegans* ocasiona un fenotipo visual observable, resulta evidente que hay muchos genes que codifican para proteínas cuyas actividades pueden ser total o parcialmente reemplazadas por proteínas codificadas por otros genes. Si bien la explicación más simple a la existencia de redundancia funcional es la necesidad de asegurar el funcionamiento de determinadas vías vitales para la célula, se observa muy baja redundancia entre genes que codifican para enzimas involucradas en funciones celulares muy importantes como el Ciclo de Krebs, por ejemplo (Cooke et al., 1997). Thomas (Thomas, 1993) sugiere cuatro posibles explicaciones que intentan justificar el mantenimiento de redundancia genética evolutivamente:

- a) Los genes redundantes contribuyen a la cantidad de un producto génico en particular.
- b) La redundancia funcional asegura la alta fidelidad de algunos procesos en particular.
- c) Los genes redundantes no se eliminan porque se preserva la función no común de las proteínas codificadas por genes parcialmente redundantes.
- d) Se mantiene la redundancia genética para preservar una función emergente que depende de ambos genes.

Se han descrito muchos casos de redundancia genética en *C.elegans* pero hasta el momento no involucran genes que codifican para proteínas que participan en síntesis de

glicoconjugados. En la presente tesis, se estudió la posible redundancia genética entre dos genes que codifican para transportadores de nucleótidos de azúcar. La estrategia utilizada consiste en evaluar primero la especificidad de sustrato y localización tisular de los respectivos transportadores. En caso de observar superposición total o parcial en ambos criterios, la etapa siguiente es estudiar el efecto causado por la inactivación individual de cada uno de ellos, y el resultante de la doble inactivación.

Mecanismos de RNAi en *C.elegans*

C.elegans fue el primer organismo en el cual se llevaron a cabo ensayos de RNAi (silenciamiento de genes mediante interferencia de RNA). Se empleó RNA sentido (sense RNA), RNA antisentido (antisense RNA) y RNA doble cadena (dsRNA), siendo este último unas 10 veces más potente que los anteriores. El hallazgo de que la inyección de dsRNA que codifica para un gen causa el silenciamiento de dicho gen y que la proteína codificada por el mismo ya no se forma, fue el motivo que les valió el Premio Nobel en Medicina o Fisiología 2006 a los Dres. Andrew Fire y Craig Mello.

Las características más importantes del silenciamiento de genes mediante dsRNA son:

- a) Se induce por el dsRNA que es procesado a pequeños RNA interferentes (small interference RNA o siRNA).
- b) Ocasiona un efecto sistémico (en nematodos y plantas pero no en otros animales) (Timmons and Fire, 1998).
- c) Es heredable (Grishok and Mello, 2002).
- d) Puede inducirse mediante la introducción del dsRNA por inyección en las gónadas o en alguna cavidad del animal; mediante la alimentación de los mismos con bacterias modificadas genéticamente para expresar el dsRNA (Timmons and Fire, 1998) o simplemente mediante la inmersión de los gusanos en solución con dsRNA. Estas dos últimas técnicas han sido de gran utilidad en el screening a gran escala (Tabara et al., 1998).

Existen al menos dos niveles de interferencia generada por dsRNA:

a) Post transcripcional: causa la pérdida del correspondiente mRNA (Timmons and Fire, 1998).

b) Transcripcional: debido a cambios en la cromatina (Grishok et al., 2005).

Además, existen mecanismos endógenos que "protegen" contra el silenciamiento causado por dsRNA (Kennedy et al., 2004; Knight and Bass, 2002; Simmer et al., 2002)

La vía clásica o silenciamiento post transcripcional (Figura 28) se inicia con el reconocimiento del dsRNA por un complejo que lo cliva en fragmentos de aproximadamente 21 a 25 nucleótidos. La enzima involucrada pertenece a la familia de las RNase III ribonucleasas. Esta familia se clasifica en tres subfamilias de acuerdo a las estructuras de los dominios: las RNases III de bacteria contienen un único sitio catalítico y un dominio de unión al dsRNA; la familia de nucleasas Droscha contienen dos dominios catalíticos (Filippov et al., 2000) y la tercera familia que también tiene dos dominios catalíticos pero además tiene un dominio helicasa y un motivo PAZ (Bernstein et al., 2001). Las enzimas involucradas en el reconocimiento del dsRNA y formación de siRNA pertenecen a esta tercera familia y están ampliamente conservadas evolutivamente y se las denomina enzimas Dicer. Además del Dicer, participan del complejo inicial una helicasa relacionada al Dicer (Drh-1), y dos proteínas de unión a dsRNA, Rde-1 y Rde-4. Probablemente Rde-4 reconoce el dsRNA y lo acerca al Dicer y Rde-1 une los fragmentos siRNA y los acerca a la siguiente etapa del proceso. A este nivel participaría Eri-1 como mecanismo antagonista del silenciamiento de genes, degradando siRNAs.

En la siguiente etapa del proceso, se forma un complejo RISC que reconoce y destruye el mRNA. Además, un complejo que contiene Mut-7 y Rde-2/Mut-8 actuaría como intermediario entre el complejo Dicer y RISC, siendo ambos importantes para la acumulación de siRNA *in vivo* (Tops et al., 2005). El complejo RISC estaría formado al menos por las proteínas Tudor-SN y VIG. Se cree que los siRNA identifican el sustrato mediante apareamiento de bases, produciéndose entonces un clivaje endonucleolítico que destruye el mRNA en la zona de homología a siRNA. Simultáneamente, dos RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRPs) participan amplificando los niveles de siRNA. *Ego-1* es el gen que codifica para la RdRP específica de la línea germinal (Smardon et al., 2000) y *rrf-1* es necesario para la amplificación de siRNAs en células somáticas (Sijen et al., 2001). En esta actividad participa también Rde-3, que pertenece a

la superfamilia de las β polimerasas nucleotidiltransferasas. De esta forma, el siRNA producido por el Dicer actúa como primer de RdRP usando mRNA como templado y generando más dsRNA que vuelve a ser sustrato del Dicer. A este nivel actúa otro mecanismo antagonista, en el que una RdRP, Rrf-3, actúa amplificando el mRNA y por ende, compitiendo con las RdRPs involucradas en la vía de RNAi (Simmer et al., 2002).

El silenciamiento a nivel transcripcional (Figura 27) estaría mediado por la formación de dsRNA mediante transcripción bidireccional. Este dsRNA es sustrato de un complejo similar al Dicer que genera siRNA y estos, a su vez, actuarían como primers de RdRPs que actúan a nivel del transcrito naciente. Este complejo formado con siRNA induciría la metilación mediada por H3K9 y H3K27 generando la formación de heterocromatina (Volpe et al., 2002). El mecanismo antagonista a nivel transcripcional está dado por proteínas deaminasas de adenosina (ADARs) que convierten adenosinas de dsRNA en inosinas. A medida que aumentan las mutaciones de pares A-U por I-U, disminuye la eficiencia del RNAi (Scadden, 2005).

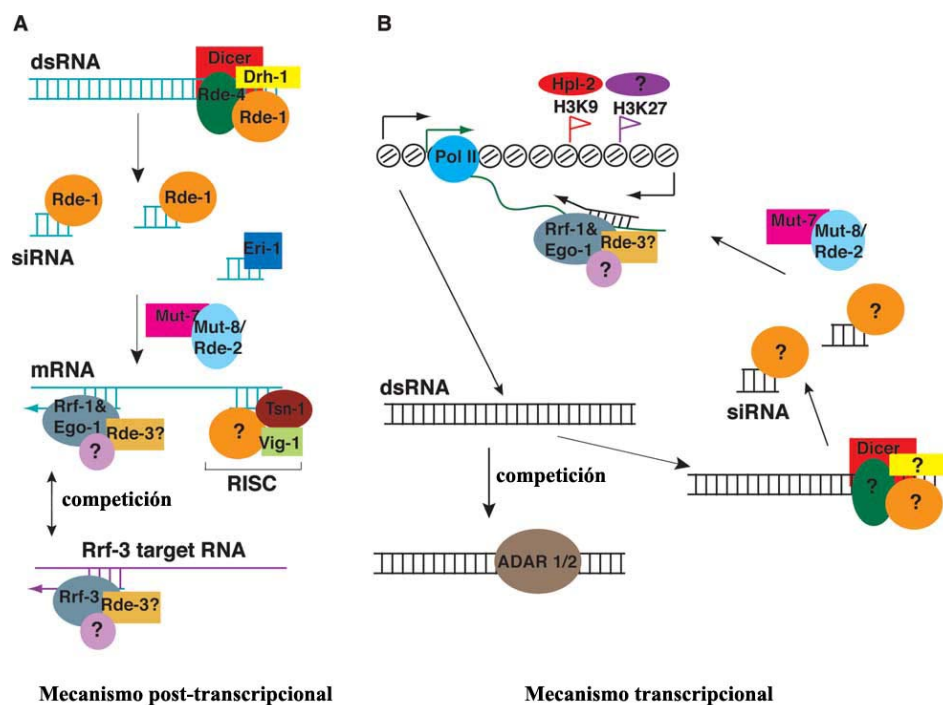


Figura 27. Representación esquemática de los mecanismos de RNAi en *C.elegans*. Adaptado de (Grishok, 2005).

Como se mencionó inicialmente, una característica del RNAi en *C.elegans* es su naturaleza sistémica dada por la capacidad de propagarse a células alejadas del sitio de ingreso del dsRNA inicial y que resulta en la transmisión del efecto del RNAi a la progenie. En general, el efecto en la progenie es más importante que en la línea parental pero se propaga menos eficientemente entre tejidos (Timmons and Fire, 1998). Se observó que la inyección de siRNAs en las gónadas es más eficiente cuando afecta genes de la línea germinal pero el efecto es bajo cuando involucra genes que se expresan en otros tejidos. Se demostró experimentalmente que el siRNA inyectado en una gónada no es transportado a la otra (Tijsterman et al., 2002). Por otro lado, las técnicas de RNAi donde el dsRNA se aporta a través de la alimentación o sumergiendo los animales en solución de dsRNAs permite el screening a gran escala y de esta forma se lograron identificar genes importantes en la transmisión sistémica del efecto de RNAi. El clonado de los mismos reveló que todos ellos están involucrados en endocitosis y tráfico vesicular (Feinberg and Hunter, 2003; Tijsterman et al., 2004). Esto podría explicar por qué el dsRNA expresado desde un transgen en un tejido del animal no es tan eficiente en generar un efecto sistémico, pero si se administra el dsRNA exógenamente se logra una mayor eficiencia ya que este último estaría empacado en vesículas mientras que el primero no (Timmons et al., 2003).

RESULTADOS

PARTE I. Caracterización bioquímica

1- C03H5.2 transporta UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc. Demostración mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*.

Como se mencionó en la introducción, el genoma de *C.elegans* contiene 18 potenciales transportadores de nucleótidos de azúcar basado en homología de secuencia con otros transportadores de nucleótidos de azúcar previamente caracterizados. Al momento de iniciar este proyecto, sólo dos de ellos, SQV-7 y SRF-3, habían sido caracterizados. Ambos transportadores son multisustrato de acuerdo a los estudios de especificidad de sustrato. Sin embargo, sólo para SQV-7, el primer transportador multisustrato descrito, se realizaron ensayos de competencia entre sustratos demostrando un mecanismo competitivo no cooperativo. A partir de entonces, cada vez que se identificó un nuevo transportador de nucleótidos de azúcar con especificidad por múltiples sustratos, se asumió un mecanismo competitivo pero no se llevaron a cabo los experimentos correspondientes. Cabe aclarar, que si bien se identificó el transportador de GDP-Fuc en *C.elegans*, los estudios estaban orientados a la identificación de la causa del síndrome de LAD II más que a la caracterización bioquímica y estudio del rol fisiológico del transportador de *C.elegans*.

En el presente trabajo, se eligió como objeto de estudio el transportador de nucleótidos de azúcar de *C.elegans*, C03H5.2. El mismo presenta alta homología a nivel de secuencia de aminoácidos con SRF-3 (37.8%) (Figura 28) y relativa baja homología con SQV-7 (14.0%) (Figura 29).

```

SRF-3 (C.e)          -----MKTALIWLTQLNSIHLLIRYSRAREVD-AMFVSTVAVWLTEVIKCFIC
C03H5.2 (C.e)      MNRANDTSSNLKLISLVVLI VQT TALVLT L RYSQTQKSEGPRYLSSTAVVCAEIIKLTIC
                   :*  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

```

SRF-3 (C.e)          LFLVAQEETPRR--FIHALRTQILEQP---YDTLKVCI PAMIYIVQNNLFYVAASHLDAA
C03H5.2 (C.e)      FFVIYRNNGYRFGMLNLELNREIFAS PQTRADSLKVAVP AIMYVIQNNLLFFALKKLDAA
                   :*: :*: * :*: * :*: * :*: * :*: * :*: * :*: * :*: * :*: *

```

```

SRF-3 (C.e)          TFMITSQLKIFTAAIFTVIILRRSLNRTQWFALAVL FVGVSLVQLQG-----TKAKES
C03H5.2 (C.e)      TYQVTYQLKILT TAI FSV TMLGKSLHRYNWMAL ILLTAGVALVQYPSGDSTTSKSTAAEH
                   * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

```

SRF-3 (C.e)          SGESPFVGFVAVVVACCLSGFAGIYFEKILKGSAPVSLWMRNVQMAVFSIPASFSAIYMQ
C03H5.2 (C.e)       DASDNILGLGAVLAACFSSGFAGVYFEKILK-TSKVSLWIRNIQLAFFSVFGALLVCWLY
... : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
SRF-3 (C.e)          DSKTVNEYGLLYGFDSIVWLTVLWYGVGGLSVAVCIKYADNIAKNFATSVAILSTIGSI
C03H5.2 (C.e)       DWQAISDDGFLRGYNGVIWIVLLQAYGGLVIALVVKYADNILKGFVLSIILSSFTSW
* : : : : * : * : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
SRF-3 (C.e)          FLF-DFIPSFTFLGASLVIFSIFLYSSHQSMVAALGRLRGEIPSTKEAFCL
C03H5.2 (C.e)       LVLGDLTITTTFAIGATVVI FATFLYGHEPKSTPAEAHNA-----
: : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 28. Alineación de secuencias de aminoácidos de los transportadores SRF-3 (NP_502447) y C03H5.2 (AAB66127) de *C.elegans*. Se usó el método Clustal W (<http://seqtool.sdsc.edu/>). Se indican con un asterisco(*), los aminoácidos totalmente conservados; con dos puntos (:), la conservación de grupos fuertes y con un punto(.), la conservación de grupos débiles.

```

SQV-7 (C.e)          MTSTVQSPLYSRVFSAVFYGVISVLIIVFNKILLTN----YKFPSTFLVGVGQMMATILI
C03H5.2 (C.e)       MNRANDTSSNLKLI SLVVLIVQTTALVLT LRYSQTKSEGPRLSSTAVVCAEIIKLTIC
* . : : . : : * * . * : . : * : : : * * * : : : *
SQV-7 (C.e)          LFFAKMFRIVQFPSLDSSIPRKIMPLP-----LLYFFNLISGLGGTQMINLP
C03H5.2 (C.e)       FFVIYRNNGYRFSGMLNELNREIFAS PQTRADSLKVAVPAIMYVIQNNLLFFALKKLDAA
* . : : . : * : : : * : : * : : : : : : : : : : : :
SQV-7 (C.e)          MFTVLRRF SILMTMILEFYILNVKASKAVKISVGLMIG-----GSFIAAIY
C03H5.2 (C.e)       TYQVTYQLKILT TAI FSVTMLGKSLHRYNWMALILLTAGVALVQYPSGDSTTSKSTAAEH
: * : : * * * * : : . : * : : : : : : * : . . * : :
SQV-7 (C.e)          DLSFDALGYTMIFINNICTAALGVYTKQKLDKDLGKYGLMFYNCLFMLLPALCVVQYTG
C03H5.2 (C.e)       DASDNILGLGAVLAACFSSGFAGVYFEKILKTSKVS L WIRNIQLAFFSVFGALLVCWLY-
* * : * * : : : : : * : : * : : : : : : : * : : * * *
SQV-7 (C.e)          DLDRAYSFMLS D SMTSSVWTCFLLSCICGFVLNYSVLVCTHHNSALTTTCVGP IKNLFVT
C03H5.2 (C.e)       DWQAISDDGFLRGYNGVIWIVLLQAYGGLVI----ALVVKYADNILKGFVLSIILSS
* : . : : . . . : * * : : * : : * : : : . : . : . : : :
SQV-7 (C.e)          YVGMFSSGDYVFQWANFTGINVSVFSGSILYTYVTFRSKSTTISYKPLPMTMPIDVHKPRN
C03H5.2 (C.e)       FTSWLVLDL TITTTFAIGATVVI FATFLYGHE-----PKSTPAEAHNA--
: . : * * . : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 29. Alineación de secuencias de aminoácidos de los transportadores SQV-7 (NM_063035.2) y C03H5.2 (AAB66127) de *C.elegans*. Se usó el método Clustal W (<http://seqtool.sdsc.edu/>). Se indican con un asterisco(*), los aminoácidos totalmente conservados; con dos puntos (:), la conservación de grupos fuertes y con un punto(.), la conservación de grupos débiles.


```

UGal (H.s)      SASASASGPCVHQPPGQPPPPQLSSHRGDLITEPFLPKSVLVK
UGN (H.s)       GNPTKA-----
C03H5.2 (C.e)  AEAHNA-----
                . . . *

```

Figura 30. Alineación de secuencias de aminoácidos de los transportadores UDP-Gal (UGal) (BAA95615) y UDP-GlcNAc (UGN) (NP_036375) de *Homo sapiens* con el transportador C03H5.2 (AAB66127) de *C.elegans*. Se uso el método Clustal W (<http://seqtool.sdsc.edu/>). Se indican con un asterisco(*), los aminoácidos totalmente conservados; con dos puntos (:), la conservación de grupos fuertes y con un punto (.), la conservación de grupos débiles.

En consecuencia, en la presente tesis, se clonó el marco abierto de lectura correspondiente a la proteína C03H5.2 en el vector de expresión pG426. Se agregó el epítipo FLAG en el extremo amino terminal de C03H5.2 (pG426-FLAG-C03H5.2) para poder verificar la expresión del mismo mediante Western Blot. Se transformaron levaduras *S.cerevisiae* y se evaluó la especificidad de sustratos de C03H5.2 mediante ensayos de transporte en vesículas de levaduras correspondientes a la fracción microsomal. Previamente había sido demostrado que preparaciones microsomales de *S.cerevisiae* presentan actividad de transporte para sólo dos nucleótidos de azúcar, UDP-Glc y GDP-Man. Esto facilita entonces la determinación de la especificidad de otros sustratos de un potencialmente nuevo transportador de otra especie expresado en esta levadura. Esta estrategia ha sido empleada para determinar la especificidad de sustrato de transportadores de mamíferos (Ashikov et al., 2005), *C.elegans* (Berninsone et al., 2001; Hoflich et al., 2004), plantas (Norambuena et al., 2002) y protozoos (Bredston et al., 2005). Como se muestra en la figura 31, levaduras *S.cerevisiae* transformadas con el vector que codifica la proteína C03H5.2 expresan esta proteína en la fracción de membrana mientras que levaduras transformadas con el vector vacío no. La movilidad de la proteína de fusión en SDS-PAGE es un poco mayor que la predicha para una proteína de 37.2 KDa que es el peso molecular correspondiente a C03H5.2. Una observación similar se realizó previamente en este y otros laboratorios cuando se expresan transportadores de nucleótidos de azúcar heterólogos en *S.cerevisiae* (Berninsone et al., 2001; Bredston et al., 2005; Hoflich et al., 2004). Sin embargo, no se conoce la razón de este fenómeno.

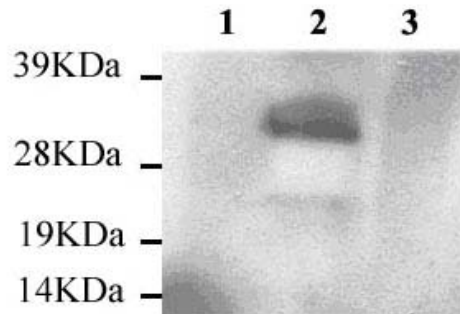


Figura 31. Expresión de pG426-FLAG-C03H5.2 en *S.cerevisiae*. Se sembraron 50ug de proteína correspondiente a la fracción de membrana, se separaron por SDS-PAGE y se visualizó mediante inmunodetección con anticuerpos anti-FLAG. 1) y 3) pG426-vacío, 2) pG426-FLAG-C03H5.2 .

A continuación se aislaron vesículas de *S.cerevisiae* transformadas con el vector que codifica la proteína de fusión o el vector vacío. La integridad de las vesículas se determinó midiendo el transporte endógeno de UDP-Glc. Como se observa en la figura 33, las vesículas correspondientes a levaduras transformadas con el vector vacío o con el vector que codifica la proteína de fusión FLAG-C03H5.2 presentan actividades comparables de transporte de UDP-Glc, sugiriendo que ambas preparaciones son de igual calidad. Se midió entonces, la capacidad de las mismas vesículas de transportar diferentes nucleótidos de azúcar (Figura 32). El transporte de UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc en la preparación que expresa FLAG-C03H5.2 es 3 a 4 veces mayor que en la preparación que corresponde al vector vacío. La baja señal de transporte obtenida para UDP-Gal es comparable en ambas preparaciones sugiriendo que la proteína C03H5.2 no transporta dicho sustrato. En un experimento separado, se demostró que C03H5.2 tampoco transporta GDP-Fuc o UDP-GlcA (Figura 33).

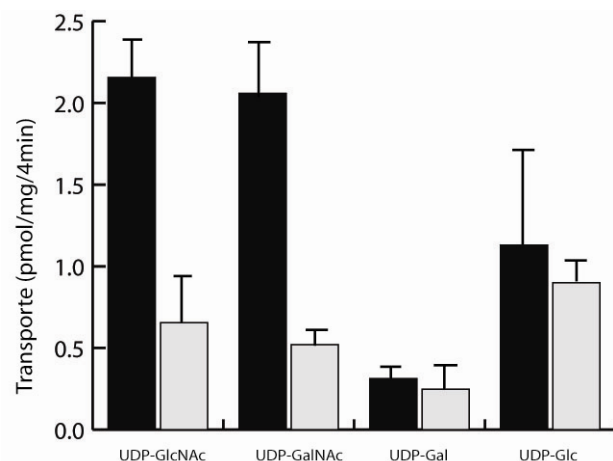


Figura 32. Transporte de nucleótidos de azúcar en vesículas de levaduras que expresan C03H5.2. La actividad de transporte se muestra como la cantidad de nucleótidos de azúcar dentro de las vesículas a 25 °C menos el valor correspondiente a 0 °C. Levaduras *S.cerevisiae* fueron transformadas con pG426 (barras claras) o pG426-FLAG-C03H5.2 (barras oscuras). Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar. La concentración de nucleótidos de azúcar en la mezcla de reacción es 2 μ M.

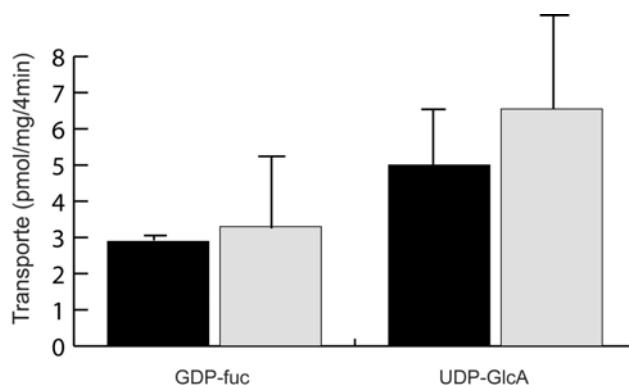


Figura 33. Transporte de nucleótidos de azúcar en vesículas de levaduras que expresan C03H5.2. La actividad de transporte se muestra como la cantidad de nucleótidos de azúcar dentro de las vesículas a 25 °C menos el valor correspondiente a 0 °C. Levaduras *S.cerevisiae* fueron transformadas con pG426 (barras claras), o pG426-FLAG-C03H5.2 (barras negras). Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar. La concentración de nucleótidos de azúcar en la mezcla de reacción es 2 μ M.

A continuación, se estudió la cinética de las actividades de transporte identificadas. Como se muestra en la figura 34A y B, el transporte de UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc mediante C03H5.2 es saturable con una K_m aparente de $25.2\mu\text{M}$ y $24.9\mu\text{M}$, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con valores de K_m descritas anteriormente para otros transportadores de nucleótidos de azúcar (Berninsone et al., 2001; Hoflich et al., 2004).

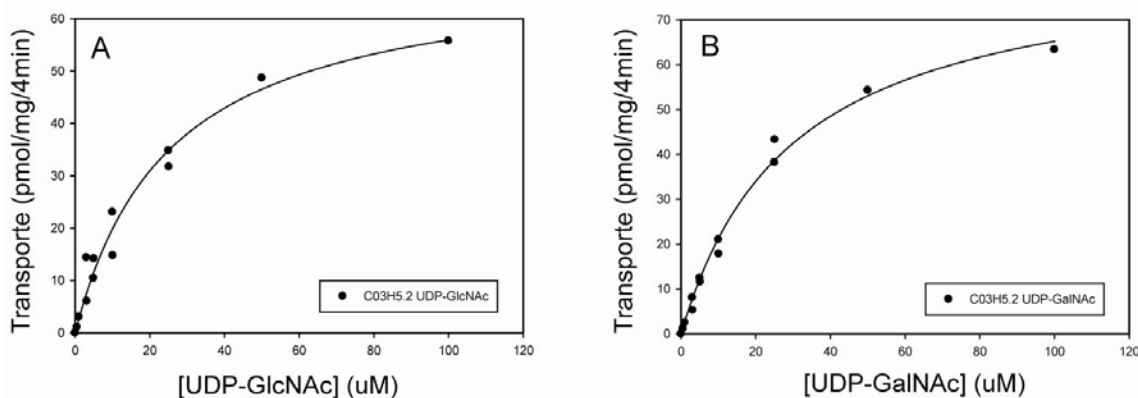


Figura 34. Curvas de saturación para el transporte de A) UDP-GlcNAc y B) UDP-GalNAc en vesículas de levaduras que expresan C03H5.2.

Para demostrar que el transporte *in vitro* de UDP-GlcNAc también ocurre *in vivo*, se utilizó una estrategia explicada previamente en la introducción. La misma consiste en emplear levaduras *K.lactis* mutantes, *mnn2-2*, deficientes en el transporte de UDP-GlcNAc al lumen del AG. Como consecuencia, carecen de *N*-acetilglucosamina terminal en sus cadenas manano y presentan una disminuída interacción de superficie con la lectina *Griffonia simplicifolia II* (GSII) (Abeijon et al., 1996a). También se demostró previamente y se describió con mayor detalle en la introducción de esta tesis, la capacidad de reestablecer dicha actividad mediante la complementación con el transportador de UDP-GlcNAc de levaduras *K.lactis* salvajes (Abeijon et al., 1996b), de humanos (Guillen et al., 1998) y bovino (Thomsen et al., 2006). Siguiendo la misma

estrategia, se transformaron levaduras *K.lactis* mnn2-2 con el vector de expresión pE4 vacío o el vector pE4 que codifica la proteína C03H5.2. La corrección fenotípica se monitoreó mediante marcación de la superficie con la lectina GSII conjugada a fluoresceína y se midió la fluorescencia empleando un fluorímetro y un FACS (fluorescent activated cell scanner). Como se observa en las figuras 35 y 36, las células que expresan C03H5.2 muestran interacción con la lectina GSII que recupera un 90% de la señal obtenida para las células salvajes. Esto sugiere fuertemente que la actividad de transporte de UDP-GlcNAc de C03H5.2 puede reestablecer la adición de *N*-acetilglucosamina a las proteínas de *K.lactis in vivo* y no menos importante, que C03H5.2 alcanza la correcta localización subcelular en el AG en esta levadura.

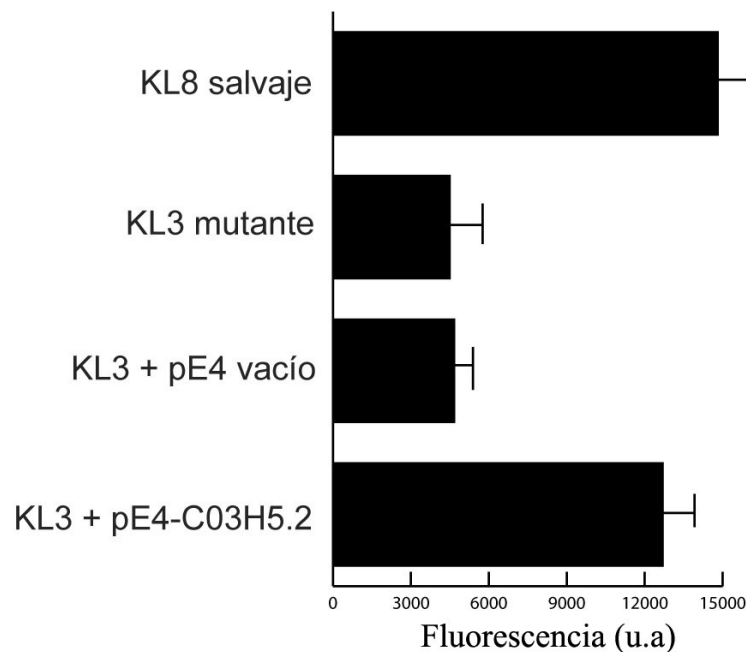


Figura 35. Ensayo de complementación de células *K.lactis* mutantes en el transportador de UDP-GlcNAc. Se indica la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias para cada construcción.

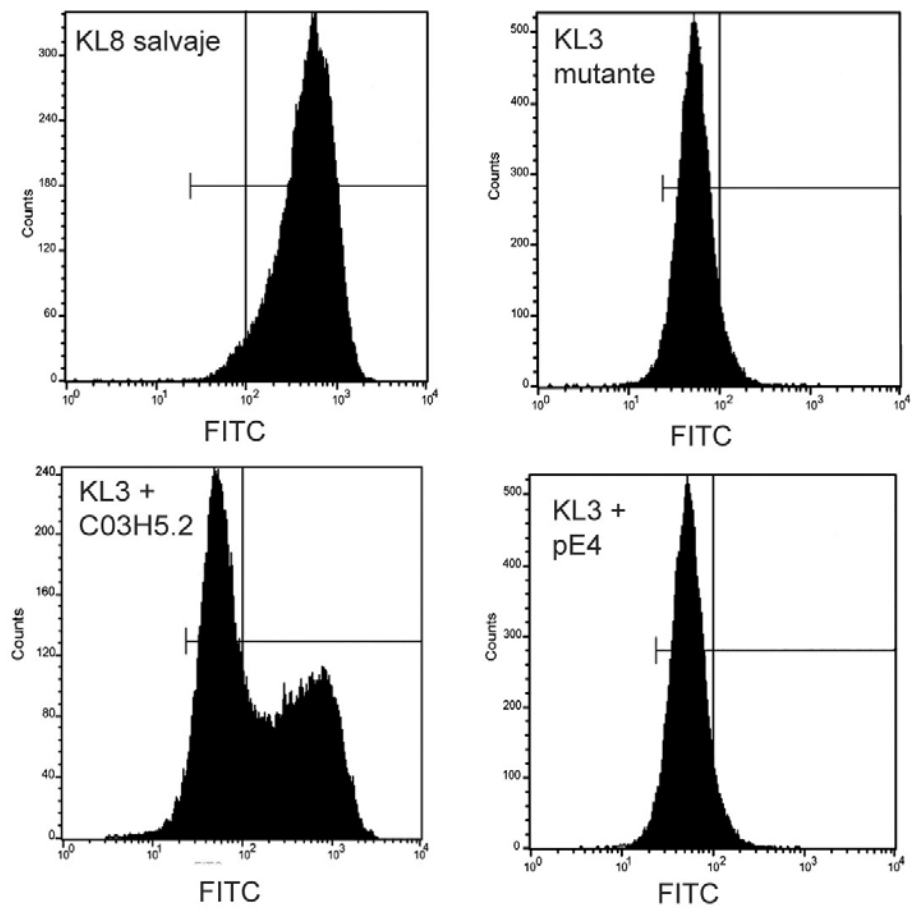


Figura 36. Separación de células *K.lactis* mediante FACS. Las células fueron marcadas previamente con la lectina *Griffonia simplicifolia* II conjugada a fluoresceína.

2- C03H5.2 transporta UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc en forma simultánea e independiente.

Como se mencionó en la introducción, SQV-7, el primer transportador de nucleótidos de azúcar multisustrato descrito, transporta UDP-GlcA, UDP-Gal y UDP-GalNAc en forma competitiva no cooperativa. Inicialmente se postuló que C03H5.2 presentaba el mismo mecanismo de transporte, único descrito hasta la presente tesis. Si C03H5.2 transportara sus sustratos en forma competitiva, el transporte de UDP-[³H]GlcNAc disminuiría en presencia de UDP-GalNAc no radioactivo en el medio de reacción. Del mismo modo, el agregado de UDP-GlcNAc no radioactivo, provocaría una disminución en el transporte de UDP-[³H]GalNAc. Este fenómeno se debería manifestar mediante un corrimiento hacia la derecha (mayor Km) de las correspondientes curvas de saturación. Sin embargo, como se muestra en la figura 37 este no es el caso. El agregado de 20 μM de UDP-GalNAc no radioactivo a la mezcla de reacción no causa un corrimiento hacia la derecha de la curva de saturación de UDP-[³H]GlcNAc, sino hacia la izquierda (mayor Vmax). Este resultado sugiere una estimulación o cooperación entre sustratos por un mecanismo no dilucidado.

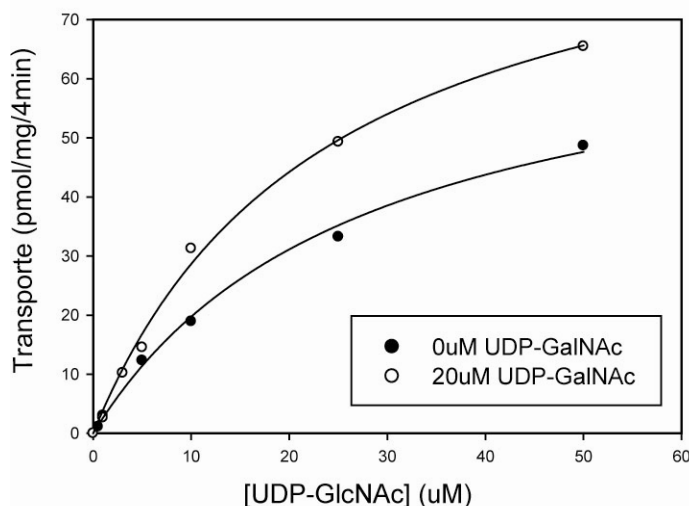


Figura 37. Transporte de UDP-[³H]GlcNAc en vesículas de *S.cerevisiae* transformadas con pG426-FLAG-C03H5.2. Se comparan las curvas de saturación obtenidas sin (círculos oscuros) o con (círculos claros) el agregado de 20 μM de UDP-GalNAc no radioactivo.

En un experimento similar, la curva de saturación correspondiente al transporte de UDP-GalNAc radioactivo fue comparada con la obtenida cuando se agregan 20 μ M de UDP-GlcNAc no radioactivo a cada punto de la curva. En estas condiciones, no se observó un corrimiento hacia la derecha de la curva de saturación (menor afinidad), como se esperarí­a si UDP-GlcNAc inhibiese el transporte de UDP-GalNAc (Figura 38). Estos resultados muestran que UDP-GalNAc y UDP-GlcNAc no se inhiben mutuamente para el transporte a trav­és de C03H5.2.

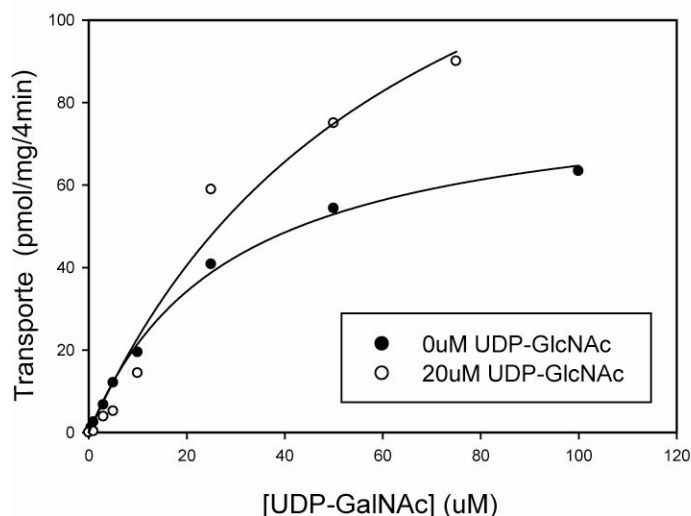


Figura 38. Transporte de UDP-[3 H]GalNAc en vesículas de *S.cerevisiae* transformadas con pG426-FLAG-C03H5.2. Se comparan las curvas de saturación obtenidas sin (círculos oscuros) o con (círculos claros) el agregado de 20 μ M de UDP-GlcNAc no radioactivo.

Una segunda evidencia a favor de un mecanismo de transporte no competitivo a trav­és de C03H5.2 se obtuvo mediante el siguiente experimento. Vesículas de levaduras que expresan C03H5.2 fueron incubadas con 0.5 μ M UDP-[3 H]GlcNAc en presencia de concentraciones crecientes de UDP-GalNAc no radioactivo como potencial sustrato competitivo. El ensayo se realizó también agregando cantidades crecientes de un no sustrato, UDP-Gal no radioactivo, como control de no competencia (Figura 39).

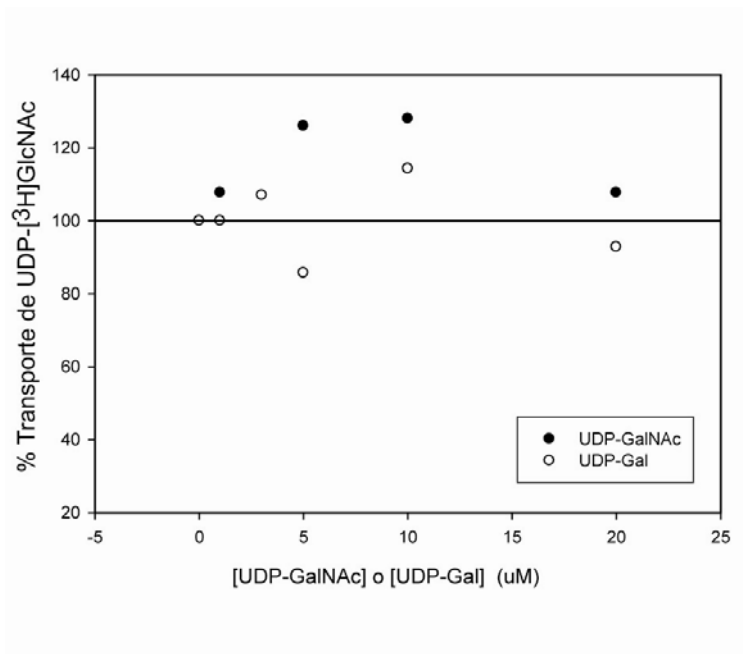


Figura 39. Se incubaron vesículas de levaduras que expresan C03H5.2 con $0.5\mu\text{M}$ UDP- $[\text{}^3\text{H}]\text{GlcNAc}$ en presencia de concentraciones variables de UDP-GalNAc y UDP-Gal no radioactivos. El transporte se expresa como el porcentaje del transporte correspondiente a UDP-GlcNAc en ausencia de otros nucleótidos de azúcar.

La cantidad de UDP-GlcNAc radioactivo que ingresa a las vesículas no es afectado por el agregado de otros nucleótidos de azúcar, sustratos o no sustratos, a cualquier concentración.

Una tercer evidencia que sugiere que UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc son transportados de forma independiente y simultánea a través de C03H5.2 se obtuvo mediante un ensayo de transporte con doble marca. En este experimento, se incubaron vesículas de levadura que expresan el transportador C03H5.2 con ambos sustratos simultáneamente pero marcados con diferente radionucleído. Luego de la incubación, se determinan las dpms correspondientes a cada radionucleído presente en el interior de las vesículas. Como puede verse en la figura 40, la cantidad de UDP- $[\text{}^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}$ dentro de las vesículas es la misma tanto cuando se incuban sólo con $2\mu\text{M}$ de ese sustrato o con la mezcla $2\mu\text{M}$ UDP- $[\text{}^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}$ + $20\mu\text{M}$ UDP- $[\text{}^3\text{H}]\text{GalNAc}$. Igualmente importante es el

hecho que si bien el exceso de UDP-[³H]GalNAc en la mezcla de reacción no afecta el transporte de UDP-[¹⁴C]GlcNAc, UDP-[³H]GalNAc aún entra al lumen de las vesículas en cantidades comparables a las obtenidas cuando UDP-[³H]GalNAc es el único sustrato presente. Estos resultados son consistentes con la hipótesis que los nucleótidos de azúcar son transportados mediante C03H5.2 al lumen del AG mediante un mecanismo no competitivo.

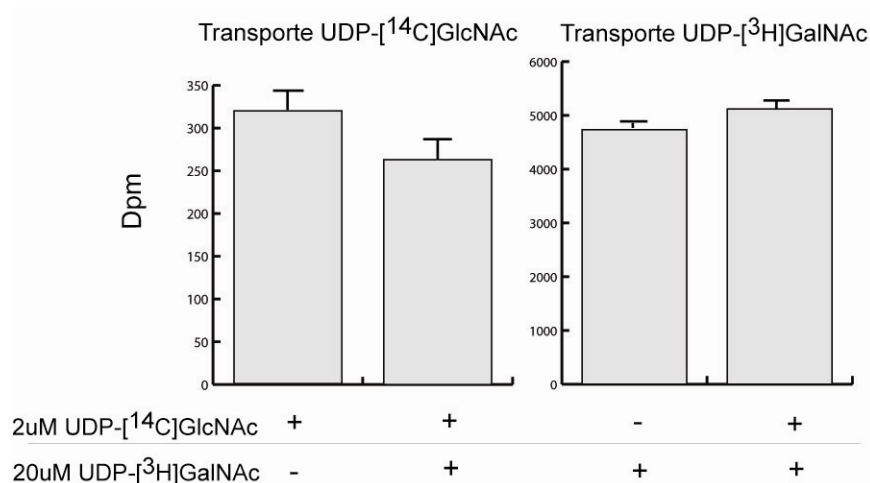


Figura 40. Ensayo de transporte con doble marca. Se indica la cantidad de dpms correspondientes a cada radionucleído dentro de las vesículas luego de incubar vesículas de levaduras que expresan C03H5.2 con 2μM UDP-[¹⁴C]GlcNAc y 20μM UDP-[³H]GalNAc.

Como ensayo control, se llevó a cabo un experimento de autocompetencia usando UDP-[¹⁴C]GlcNAc y UDP[³H]-GlcNAc. El agregado de 10 veces en exceso de UDP-[³H]GlcNAc a la mezcla de reacción que contiene 2μM UDP-[¹⁴C]GlcNAc causa una disminución del 65% de la cantidad de UDP-[¹⁴C]GlcNAc que entra a las vesículas (Figura 41).

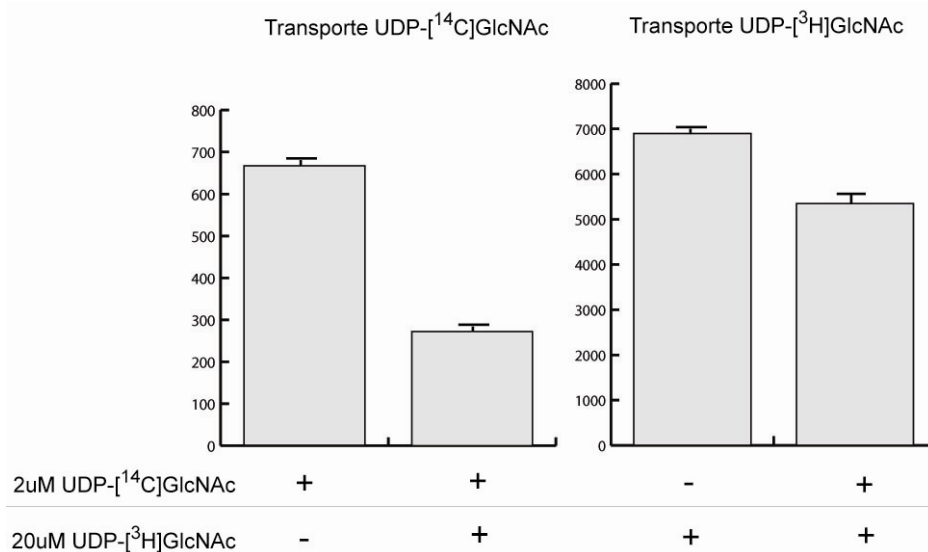


Figura 41. Ensayo de autocompetición con doble marca. Se indica la cantidad de dpms correspondientes a cada radionucleído dentro de las vesículas luego de incubar vesículas de levaduras que expresan C03H5.2 con $2\mu\text{M}$ UDP-[¹⁴C]GlcNAc y $20\mu\text{M}$ UDP-[³H]GlcNAc.

Un segundo ensayo control que se llevó a cabo es el experimento de transporte con doble marca utilizando vesículas de levaduras que expresan el transportador SQV-7. Como se mencionó anteriormente, SQV-7 es el único transportador multisustrato para el cual se habían llevado a cabo ensayos de competencia hasta la presente tesis. Los resultados obtenidos sugerían (Figura 5) que UDP-GalNAc y UDP-GlcA compiten con UDP-Gal (los tres sustratos de dicho transportador) por el transporte a través de SQV-7. La finalidad del siguiente ensayo control es corroborar que en las condiciones establecidas para el ensayo de doble marca, sea posible evidenciar un mecanismo competitivo. De este modo, se prepararon vesículas a partir de levaduras *S.cerevisiae* transformadas con el vector pPB09-*sqv-7*-HA. Para el ensayo de transporte se incubaron las vesículas de levaduras que expresan la proteína SQV-7 con $1\mu\text{M}$ UDP[³H]-GalNAc o con $10\mu\text{M}$ UDP[¹⁴C]-GlcA en forma paralela y con la mezcla de ambos sustratos simultáneamente. Cabe aclarar que se eligieron concentraciones de sustratos mas bajas de forma que cuando se combinan ambos sustratos, la concentración total corresponda aproximadamente con los valores de K_m aparente correspondientes al transportador en

cuestión. En este caso, la K_m descrita para el transporte de UDP-GalNAc mediante SQV-7 es de $8.7\mu\text{M}$. Como se observa en la figura 42, la cantidad de UDP-[^3H]-GalNAc que entra al lumen de las vesículas disminuye significativamente (aproximadamente un 85%) por el agregado de 10 veces de exceso de UDP-[^{14}C]-GlcA a la mezcla de reacción.

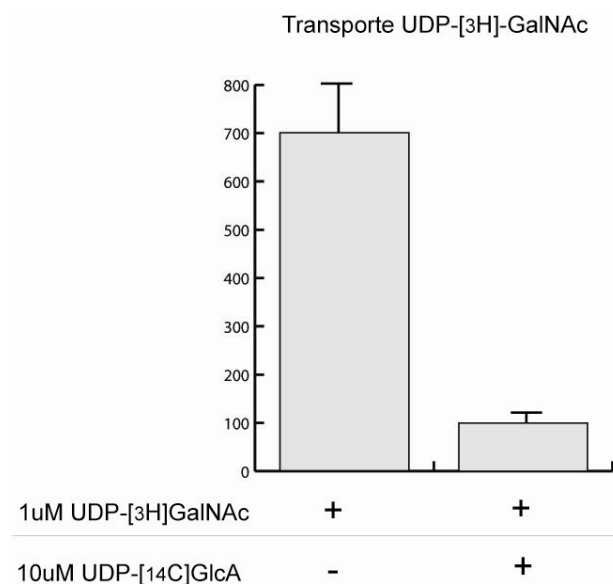


Figura 42. Ensayo de transporte con doble marca. Se indica la cantidad de dpms correspondientes a cada radionucleído dentro de las vesículas luego de incubar vesículas de levaduras que expresan SQV-7 con $1\mu\text{M}$ UDP-[^3H]GalNAc y $10\mu\text{M}$ UDP-[^{14}C]GlcA.

De esta forma, mediante tres estrategias diferentes, se tiene evidencia que C03H5.2 transporta sus sustratos en forma simultánea e independiente, que difiere del mecanismo de transporte previamente descrito para SQV-7.

3- Búsqueda de mutaciones que afecten selectivamente el transporte de uno de los sustratos

a) Estrategia basada en mutaciones puntuales previamente descritas.

Los resultados mostrados anteriormente constituyen una fuerte evidencia a favor de un mecanismo de transporte no competitivo y simultáneo mediado por C03H5.2. Además de lo novedoso del hallazgo, un mecanismo no competitivo sugiere también que los determinantes de especificidad involucrados en el reconocimiento y/o transporte de los sustratos no son exactamente los mismos. Se entiende por determinantes de especificidad, no sólo a los aminoácidos directamente involucrados en las interacciones transportador-nucleótido de azúcar sino también aquellos que participan en interacciones transportador-transportador generando efectos a distancia fundamentalmente mediados por cambios en la conformación tridimensional del transportador.

La primer estrategia implementada consistió en introducir en la secuencia que codifica para el transportador C03H5.2, dos mutaciones puntuales que emulan mutaciones sin sentido descritas en el transportador de UDP-GlcNAc de otros organismos. Una de las mutaciones (V192F) afecta el transportador de UDP-GlcNAc de bovinos causando el síndrome de Malformación Vertebral Compleja debido a una anormal glicosilación de proteínas en los tejidos afectados. La otra mutación, (G267E) descrita en *C.elegans*, afecta el transportador SRF-3 cuyos sustratos son UDP-Gal y UDP-GlcNAc, causando un patrón anormal de glicosilación en animales *srf-3*. Ambas mutaciones puntuales se encuentran dentro de regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos de C03H5.2 (Figura 43).



Figura 43. Alineación de secuencias de aminoácidos de los transportadores UDP-GlcNAc de *Bos Taurus* (XP_599170), SRF-3 (NP_502447) y C03H5.2 (AAB66127) de *C. elegans*. Se usó el método Clustal W (<http://seqtool.sdsc.edu/>). Se indican con un asterisco (*), los aminoácidos totalmente conservados; con dos puntos (:), la conservación de grupos fuertes y con un punto (.), la conservación de grupos débiles. Las líneas horizontales indican los putativos dominios transmembrana asignados mediante el TMHMM Server del Center for Biological Sequence Analysis (CBS) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Se resaltan en amarillo las mutaciones puntuales (V192F) y (G267E).

Se introdujeron entonces dichas mutaciones, en forma separada, en la secuencia codificante de C03H5.2 y se expresaron las proteínas de fusión con las mutaciones puntuales en *S. cerevisiae* en forma paralela a la expresión de la proteína salvaje. Luego

de aislar la fracción microsomal de levaduras, se evaluó la capacidad de las mismas de transportar UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc. Como se observa en la figura 44, la introducción de las mutaciones puntuales no afecta los niveles de expresión del transportador que se mantiene en niveles comparables a los obtenidos para la proteína salvaje. Sin embargo, la actividad de transporte para ambos sustratos fue significativamente menor en vesículas que expresan las proteínas mutadas en comparación con los valores obtenidos con el transportador salvaje (Figura 45). Por otro lado, el transporte de UDP-Glc es comparable en las tres preparaciones lo que permite descartar que la falta de actividad se deba a problemas técnicos que ocasionen una defectuosa calidad de las vesículas preparadas. Si bien no se logró separar las actividades de transporte mediante estas mutaciones puntuales, los resultados obtenidos muestran que los residuos mutados están dentro de regiones conservadas que afectan la actividad de transporte. Además, estos resultados constituyen una evidencia importante que el transporte de UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc mediado por la proteína C03H5.2, depende de la actividad de transporte de esta proteína y no de la simple expresión de la misma.

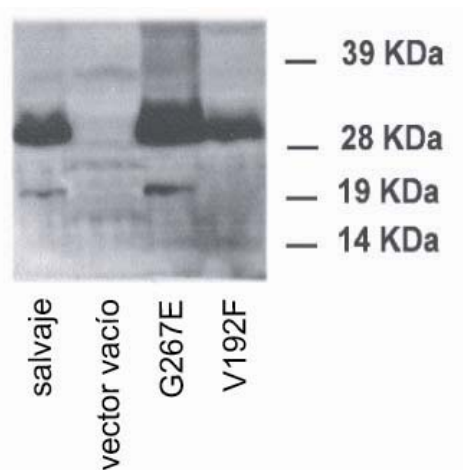


Figura 44. Análisis de proteínas mediante Western Blot. Las proteínas de vesículas de levaduras transformadas con el vector vacío (pG426), con el vector que codifica para la proteína C03H5.2 salvaje o para las proteínas mutadas fueron separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE y visualizadas mediante inmunodetección.

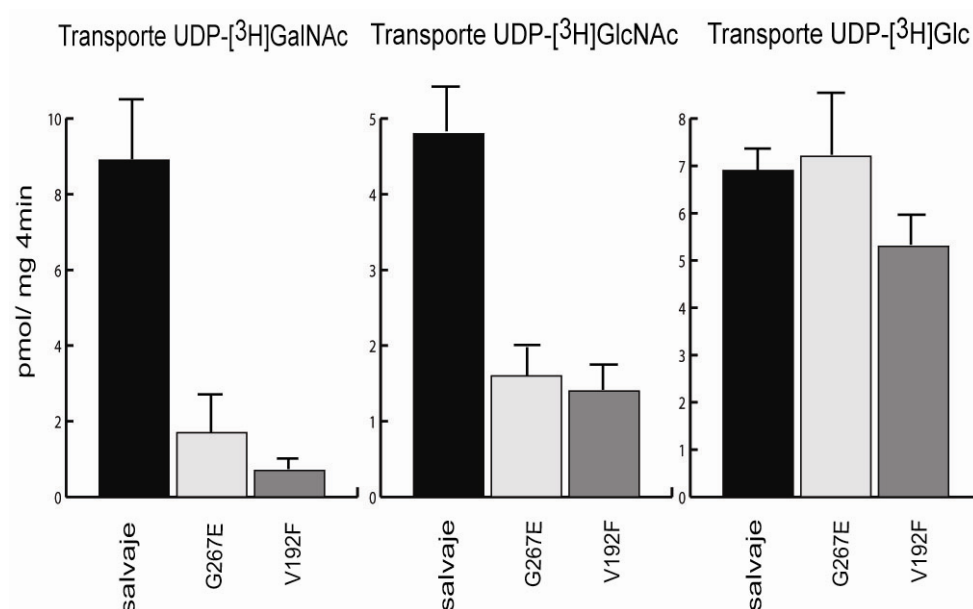


Figura 45. Transporte de nucleótidos de azúcar en vesículas de levaduras que expresan la proteína C03H5.2 salvaje y las mutantes puntuales descritas en el texto. La concentración de nucleótido de azúcar usada fue 1 μ M. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar.

b) Una delección de 16 aminoácidos en la proteína C03H5.2 causa una pérdida asimétrica de la especificidad de sustrato.

La translocación de un sustrato mediante una proteína transportadora, en términos estructurales, debería depender de múltiples determinantes de especificidad que en esencia, trazan el camino del sustrato a través del core de la proteína. Esta consideración es, en cierta forma, una visión más amplia que involucra determinantes de la especificidad que no están necesariamente en contacto con el sustrato, sino en sitios conformacionalmente activos a lo largo de la proteína.

De acuerdo a la predicción de dominios transmembrana mostrada anteriormente, se realizó una delección de 16 aminoácidos en el loop más extenso que se localiza entre el segundo (TMD2) y tercer dominio (TMD3) de la proteína C03H5.2. La elección de esta delección en particular se basó en la observación que las mutaciones puntuales realizadas

anteriormente se ubican dentro de dominios transmembrana y tal vez, la pérdida de la actividad sea consecuencia de cambios en la conformación de la proteína resultante. En consecuencia, se hipotetizó que una delección de un segmento de un loop tendría un menor efecto en la conformación del transportador dentro de la membrana y los cambios en la actividad observados podrían estar más asociados a la participación de dicho segmento en el reconocimiento y/o transporte de los sustratos. En la figura 46 se muestra el segmento deleccionado en la mutante denominada DelA.



Figura 46. Alineación de secuencias de aminoácidos de los transportadores UDP-GlcNAc de *Bos Taurus* (XP_599170), SRF-3 (NP_502447) y C03H5.2 (AAB66127) de *C. elegans*. Se usó el método Clustal W (<http://seqtool.sdsc.edu/>). Se indican en celeste(*), los aminoácidos totalmente conservados; en verde (:), la conservación de grupos fuertes y en azul (.), la conservación de grupos débiles. Las líneas horizontales indican los putativos dominios transmembrana asignados mediante el TMHMM Server del Center for Biological Sequence Analysis (CBS) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). El segmento correspondiente a la delección (DelA) se recuadró en negro.

La mutante resultante de la delección, nombrada DelA, fue clonada como proteína de fusión con el tag FLAG en el extremo amino terminal y expresada en *S. cerevisiae*, nombrada DelA. Se aislaron vesículas de la fracción microsomal de levaduras y se midió

el transporte de UDP-GalNAc y UDP-GlcNAc en paralelo con vesículas de levaduras que expresan la proteína salvaje. Los niveles de expresión de ambas proteínas de fusión se monitorearon por Western Blot, observando que los niveles de expresión de la mutante DelA variaban según el ensayo de expresión entre niveles similares a los de la proteína salvaje o más bajos. La figura 47 muestra un ensayo de expresión analizado por Western Blot que refleja los niveles de expresión obtenidos en la mayoría de los experimentos.

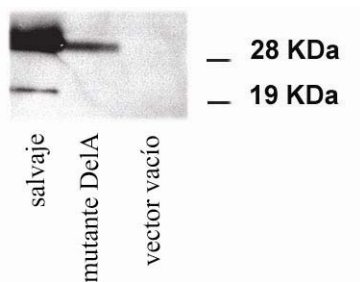


Figura 47. Western Blot correspondiente a la expresión del transportador salvaje C03H5.2 y a la mutante Del A. Se separaron mediante SDS-PAGE las proteínas de vesículas de levaduras transformadas con las construcciones pG426-FLAG-C03H5.2 y pG426-FLAG-C03H5.2(DelA) y luego se detectaron las proteínas de interés mediante inmunomarcación con el anticuerpo anti-FLAG.

Los ensayos de transporte (Figura 48) muestran que el transporte de UDP-GalNAc en vesículas transformadas con la proteína de fusión mutante (DelA) se ve severamente afectado mientras que el transporte de UDP-GlcNAc prácticamente no se encuentra afectado. Claramente, la deleción origina una pérdida selectiva de la especificidad de sustrato de C03H5.2.

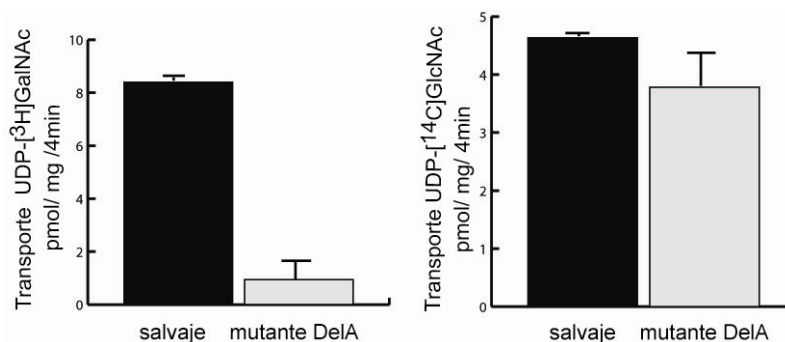


Figura 48. Transporte de 2 μ M UDP-GalNAc, panel de la izquierda; y 2 μ M UDP-GlcNAc, panel de la derecha, en vesículas de levaduras que expresan el transportador salvaje o la mutante DelA. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar.

Debido a la diferencia en los niveles de expresión, se llevaron a cabo dos experimentos diferentes con el objetivo de demostrar mediante distintos enfoques que la pérdida de actividad selectiva es consecuencia de la delección y no de los bajos niveles de expresión.

Por un lado, se realizaron las curvas de saturación correspondientes al transporte de UDP-GalNAc y UDP-GlcNAc, que muestran (Figura 49A) por el perfil de saturación para concentraciones crecientes de UDP-GlcNAc, que la mutante DelA aún transporta UDP-GlcNAc en forma saturable aunque debe indicarse que los valores de V_{max} y K_m difieren de los obtenidos con vesículas de levaduras que expresan la proteína salvaje. Si bien no puede explicarse con certeza la causa de tales diferencias cinéticas, es esperable que una delección de 16 aminoácidos modifique la conformación global de la proteína afectando ambas actividades de transporte. Los resultados muestran que la actividad de transporte para concentraciones crecientes de UDP-GalNAc (Figura 49B) con la mutante DelA es virtualmente independiente de la concentración de sustrato y es muy similar a los valores obtenidos cuando se lleva a cabo el ensayo con vesículas de levaduras transformadas con el vector vacío. Es evidente, que mientras la pérdida de actividad de transporte de UDP-GalNAc es prácticamente absoluta, la mutante es capaz de transportar UDP-GlcNAc en niveles comparables a los obtenidos con la proteína salvaje.

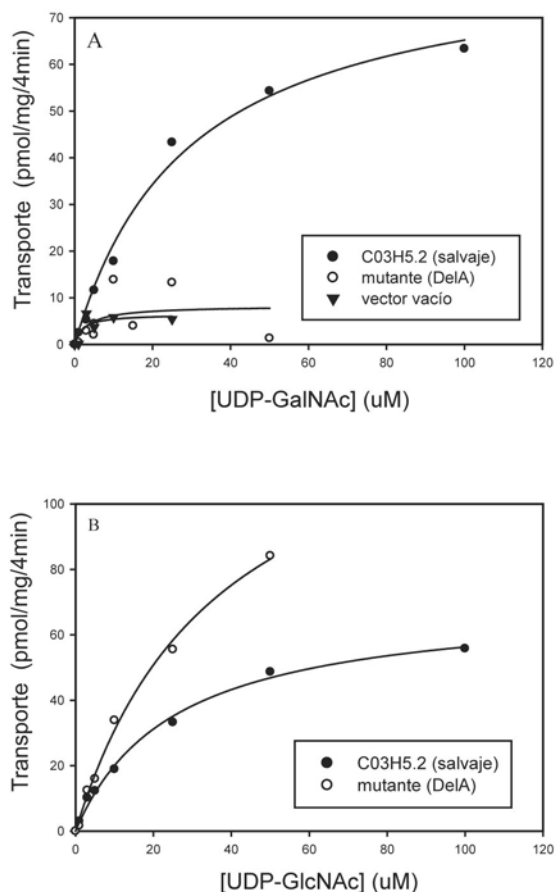


Figura 49. Curvas de saturación para el transporte de UDP-GlcNAc (A) y UDP-GalNAc (B) mediado por el transportador C03H5.2 salvaje, el transportador C03H5.2 mutante DelA o ensayado con levaduras transformadas con el vector vacío.

Por otro lado, la segunda estrategia utilizada para demostrar que la pérdida selectiva de especificidad no es dependiente de los niveles de expresión de la proteína, consiste en calcular un parámetro denominado relación de especificidad de transporte o Transport Specificity Ratio (TSR). Este parámetro detecta cambios en la energía de unión intrínseca de cada sustrato que se reflejan en perturbaciones de la especificidad de sustrato (k_{cat}/K_m). El TSR constituye un índice de la diferente especificidad de una proteína hacia un par de sustratos que es constante e independiente del nivel de expresión de la proteína transportadora en la membrana. Los cambios en el TSR cuando se

comparan proteínas salvajes y mutantes dependen estrictamente de cambios en la energía de unión del sustrato en el estado de transición que se deben a diferencias estructurales.

Considerando que el transportador C03H5.2 es expuesto simultáneamente a concentraciones arbitrarias de sus dos sustratos, UDP-GalNAc y UDP-GlcNAc, entonces, cada uno de estos sustratos estará en equilibrio con la misma concentración de transportador libre pero con concentraciones desconocidas de complejos sustrato-transportador. Entonces, de acuerdo a las expresiones de velocidad según Michaelis-Menten:

$$v = \frac{k_{cat} C_{total} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Considerando que en condiciones de no saturación $[S] \ll K_m$ y $C_{total} = [C]$,

$$v = \frac{k_{cat} [C] [S]}{K_m} \quad (2)$$

Y haciendo la relación de velocidades para ambos sustratos,

$$\frac{v_{UDP-GalNAc}}{v_{UDP-GlcNAc}} = \frac{(k_{cat}/K_m)_{UDP-GalNAc} [UDP-GalNAc]}{(k_{cat}/K_m)_{UDP-GlcNAc} [UDP-GlcNAc]} \quad (3)$$

Como la ecuación 3 contiene la relación de dos k_{cat}/K_m y esta expresión es formalmente una medida de la especificidad catalítica, se puede reescribir la ecuación 3 en términos del parámetro TSR:

$$TSR = \frac{v_{UDP-GalNAc} [UDP-GlcNAc]}{v_{UDP-GlcNAc} [UDP-GalNAc]} \quad (4)$$

Además, como k_{cat}/K_m es una constante aparente, la teoría del estado de transición sostiene que su valor depende de la altura de la barrera de energía de la translocación (ΔG_T^+) como se indica en la ecuación de Eyring:

$$RT \ln \frac{k_{cat}}{K_m} = RT \ln \frac{kT}{h} - \Delta G_T^+ \quad (5)$$

Donde k es la constante de Boltzman; h , la constante de Planck; R , la constante de gases y T la temperatura absoluta. Un concepto fundamental para el análisis del TSR es que la catálisis mediada por el transportador utiliza la energía de unión del sustrato para disminuir la barrera energética de la translocación. La ecuación 6 establece que la energía de activación de la reacción, en este caso transporte, catalizada (ΔG_T^+) es menor que la energía de activación para la reacción no catalizada (G_0^+) por una cantidad igual a la energía de unión intrínseca del sustrato ΔG_b (que es algebraicamente negativa):

$$\Delta G_T^+ = \Delta G_0^+ + \Delta G_b \quad (6)$$

Combinando las ecuaciones 5 y 6,

$$RT \ln \frac{k_{cat}}{K_m} = RT \ln \frac{kT}{h} - (\Delta G_0^+ + \Delta G_b) \quad (7)$$

Esta ecuación muestra que k_{cat}/K_m varía con la estabilización del estado de transición aportada por ΔG_b . Tomando la relación de las ecuaciones 7 aplicadas a cada sustrato, se obtiene,

$$\text{TSR} = \frac{(k_{cat}/K_m)_{\text{UDP-GalNAc}}}{(k_{cat}/K_m)_{\text{UDP-GlcNAc}}} = e^{(-\Delta\Delta G_b/RT)} \quad (8)$$

Entonces, según esta ecuación, un cambio en el parámetro TSR indica un cambio en las energías de unión intrínsecas de los sustratos que determinan la altura relativa de las barreras energéticas de la translocación. El TSR refleja una diferencia en las afinidades de los sustratos en el estado de transición. Desde el punto de vista experimental, para demostrar que el segmento de los 16 aminoácidos seleccionados para la delección son importantes para determinar la especificidad de sustrato, se llevo a cabo un análisis de TSR. El parámetro TSR se calcula de un ensayo de transporte con doble marcación en el cual se mezclan UDP-[¹⁴C]GlcNAc y UDP-[³H]GalNAc en relaciones 3:7, 5:5. y 7:3 de forma que la concentración total de sustratos es (UDP-[¹⁴C]GlcNAc + UDP-[³H]GalNAc)=10μM. Luego de la incubación de las vesículas de levaduras que expresan la proteína salvaje o la mutante DelA, se miden las dpms presentes en el lumen de las vesículas correspondientes a cada radionucleído. Las actividades específicas de cada sustrato radioactivo fueron elegidas de forma tal que para la mezcla de reacción 5:5 se obtengan valores similares de dpms para cada sustrato trabajando con las vesículas correspondientes al transportador salvaje. Los resultados se expresaron como $TSR = \frac{(^3\text{H}dpm/^{14}\text{C} dpm)}{([\text{UDP-GlcNAc}]/[\text{UDP-GalNAc}])}$. Como se esperaba, se obtuvieron valores constantes para el rango de relaciones ensayado tanto en los experimentos realizados con las vesículas correspondientes al transportador salvaje o a la mutante. Sin embargo, el valor de TSR obtenido para la mutante DelA es considerablemente menor que el calculado para el transportador salvaje sugiriendo una reducción en la especificidad de sustrato para UDP-GalNAc (Figura 50). Estos resultados, entonces, apoyan fuertemente la hipótesis que la delección en C03H5.2 causa una pérdida selectiva de la actividad de transporte de UDP-GalNAc en relación a UDP-GlcNAc, y sugiere que los aminoácidos involucrados en la determinación de la especificidad de sustrato son diferentes para cada sustrato.

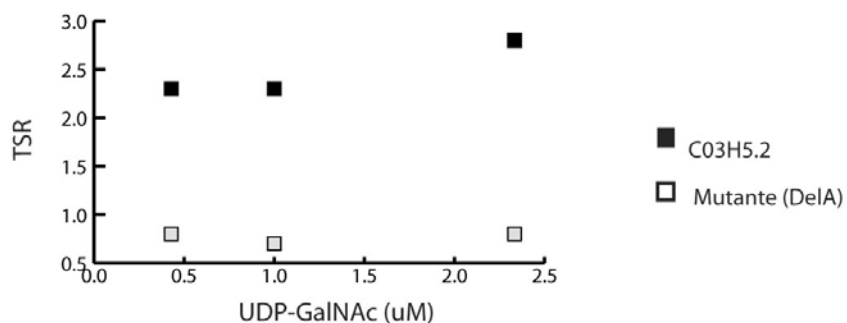


Figura 50. Relación de especificidad de transporte (TSR). Se prepararon mezclas 3:7, 5:5 y 7:3 a partir de $10\mu\text{M}$ UDP- ^3H -GalNAc y $10\mu\text{M}$ UDP- ^{14}C -GlcNAc de forma que la concentración total de sustratos en la mezcla de reacción es siempre $10\mu\text{M}$. El parámetro TSR se calculó según $\text{TSR} = ({}^3\text{H dpm}/{}^{14}\text{C dpm}) \times ([\text{UDP-GlcNAc}] / [\text{UDP-GalNAc}])$.

De esta forma, mediante cuatro diferentes enfoques se ha demostrado que C03H5.2 presenta un mecanismo de transporte no competitivo según el cual sus sustratos son transportados en forma independiente y simultánea.

Parte II. Relación entre mecanismo de transporte y divergencia evolutiva

Como se mencionó en la introducción, el genoma de *C.elegans* codifica veinte putativos transportadores de nucleótidos de azúcar. Hasta el momento de iniciar esta tesis, sólo dos de ellos, SQV-7 y SRF-3, habían sido caracterizados bioquímicamente, y sólo para SQV-7 se había demostrado un mecanismo competitivo no cooperativo. Como parte de esta tesis se caracterizó el transportador C03H5.2 en cuanto a especificidad de sustrato y mecanismo de transporte. Los estudios realizados permitieron establecer un nuevo mecanismo de transporte de nucleótidos de azúcar, diferente al establecido para SQV-7, según el cual los sustratos son transportados en forma simultánea e independiente. Es interesante que el árbol filogenético de los putativos transportadores de nucleótidos de azúcar de *C.elegans* muestra que C03H5.2 y SQV-7 pertenecen a grupos evolutivos que divergieron tempranamente. Por el contrario, C03H5.2 y SRF-3 están cercanamente relacionados desde el punto de vista evolutivo (Figura 51).

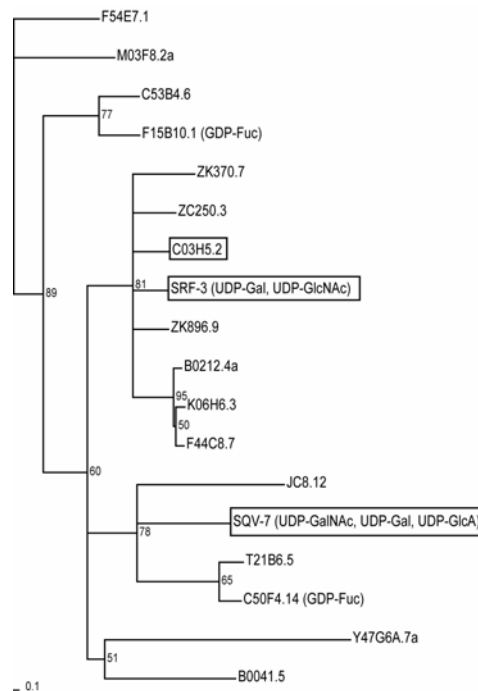


Figura 51. Árbol filogenético de transportadores de nucleótidos de azúcar conocidos y putativos de *C.elegans*. Se empleó el programa Tree Puzzle (<http://www.tree.puzzle.de/>). Se indica entre paréntesis la especificidad de sustrato demostrada previamente.

Los resultados experimentales obtenidos junto a la ubicación de los transportadores en estudio dentro del dendrograma, planteó un nuevo interrogante: ¿existe una relación filogenética entre los transportadores multisustrato y el mecanismo de transporte que presentan? De existir tal relación, se esperaría que los transportadores C03H5.2 y SRF-3 presenten un mismo mecanismo no competitivo debido a la estrecha cercanía filogenética que existe entre ellos, diferente al mecanismo competitivo descrito para SQV-7.

Para contestar esta hipótesis, se prepararon vesículas de levaduras que expresan el transportador SRF-3 y se realizaron ensayos de transporte simultáneo de dos sustratos marcados con diferentes radionucleídos. Vesículas de levaduras que expresan el transportador SRF-3 fueron incubadas con $2\mu\text{M}$ UDP- ^{14}C Gal o $20\mu\text{M}$ UDP- ^3H GlcNAc y se determinó la cantidad de dpms presentes dentro de las vesículas luego de la incubación. En forma paralela, se incubaron vesículas con una mezcla de reacción que contiene tanto $2\mu\text{M}$ UDP- ^{14}C Gal como $20\mu\text{M}$ UDP- ^3H GlcNAc. Como se observa en la figura 52, SRF-3 transporta UDP-Gal y UDP-GlcNAc de forma simultánea e independiente. Cuando ambos sustratos están presentes en la mezcla de reacción, las dpms que entran a las vesículas correspondientes a cada radionucleído son del mismo orden que las que entran cuando se mide transporte en presencia de un único sustrato.

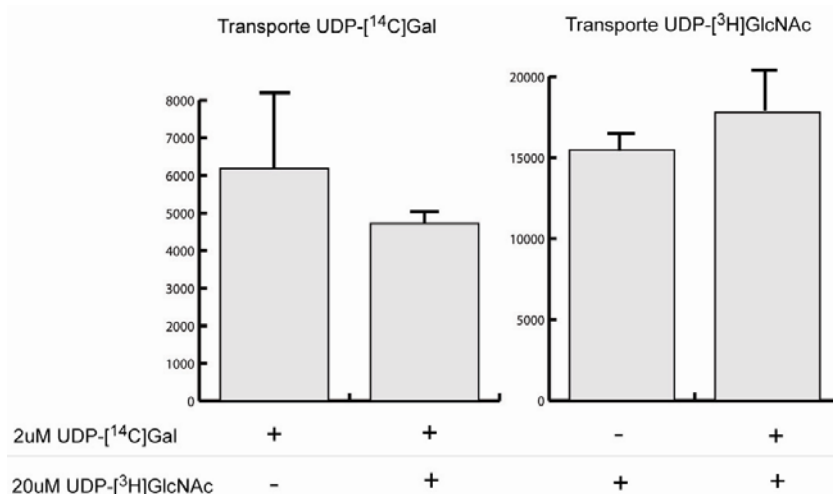


Figura 52. Ensayo de transporte con doble marca. Se indica la cantidad de dpms correspondientes a cada radionucleído dentro de las vesículas luego de incubar vesículas de levaduras que expresan SRF-3 con $2\mu\text{M}$ UDP- ^{14}C Gal y $20\mu\text{M}$ UDP- ^3H GlcNAc.

Estos resultados son consistentes con una divergencia evolutiva del mecanismo de transporte. Un estudio más exhaustivo, que supera los objetivos de esta tesis, analizando el mecanismo de transportadores de nucleótidos de azúcar con diferente grado de relación filogenético y de diferentes especies, podría ser interesante para establecer patrones de evolución del mecanismo de transporte.

Parte III. Redundancia funcional de transportadores de nucleótidos de azúcar en *C.elegans*

Patrón de expresión de C03H5.2 y fenotipos sintéticos en mutantes *srf-3*

Previamente al inicio de esta tesis, sólo dos transportadores de nucleótidos de azúcar de *C.elegans* habían sido caracterizados, SQV-7 y SRF-3. En la presente tesis, se ha caracterizado un nuevo transportador de nucleótidos de azúcar, C03H5.2, para el cual se ha demostrado un mecanismo novedoso donde dos sustratos son transportados en forma simultánea e independiente. De los estudios de especificidad de sustrato realizados previamente para SQV-7 y SRF-3, y los presentados en esta tesis, resulta evidente que existe una superposición en la especificidad de sustrato de estos transportadores. C03H5.2 y SRF-3 tienen UDP-GlcNAc como sustrato común; C03H5.2 y SQV-7 transportan UDP-GalNAc y SRF-3 y SQV-7 transportan UDP-Gal. ¿Existe un significado biológico para esta superposición de actividades? Cualquier intento de responder este interrogante, requiere que se determine la localización tisular de los mismos. Si existiese una superposición en cuanto al patrón de expresión tisular de estos transportadores, podría considerarse que existe una redundancia funcional en relación al transporte de los sustratos en común. El significado biológico más evidente frente a esta situación es que la redundancia funcional permitiría la viabilidad de mutantes debido a la existencia de otra proteína que lleva a cabo esa actividad en el mismo tejido. En consecuencia, la redundancia funcional entre estos transportadores se haría evidente al comparar el fenotipo causado por la inactivación de cada uno de estos transportadores en forma individual, con los fenotipos resultantes de la inactivación de dos de ellos simultáneamente. En caso de existir redundancia funcional debiese observarse un incremento del fenotipo como consecuencia de la doble inactivación que fuera mayor a la suma de fenotipos observados en las inactivaciones individuales.

Cualquiera sea el grupo de transportadores elegido para estudiar una posible redundancia funcional, se requiere primero poder establecer el patrón de expresión de las proteínas involucradas. Estudios de inmunodetección con anticuerpos que reconocen el extremo carboxilo terminal de SQV-7, han servido para determinar la expresión de dicho

transportador en vulva, células seam, células distales de la punta (DTC) y oocitos en forma constitutiva durante los diferentes estadios (Hwang and Horvitz, 2002). Para estudiar la localización de SRF-3, *Hoflich et al* transformaron animales salvajes con la construcción que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a SRF-3 en el amino terminal, GFP-SRF-3, lo cual permitió evaluar la expresión del transportador SRF-3 mediante fluorescencia (Hoflich et al., 2004). Estos experimentos muestran expresión de SRF-3 en células g1 y g2 de la faringe, células seam y espermateca.

C03H5.2 comparte especificidad de sustrato tanto con SRF-3 como con SQV-7. La estrategia diseñada para evaluar la redundancia funcional consiste en comparar el fenotipo previamente descrito de las mutantes *srf-3*, *sqv-7* o el resultante de la inactivación de C03H5.2 mediante ensayos de RNAi con el fenotipo resultante de una doble inactivación, mediante la inactivación de C03H5.2 en mutantes *srf-3* o *sqv-7*. Como se explicó en la introducción, los animales *sqv-7* presentan invaginación de la vulva y arresto del desarrollo embrionario. Este fenotipo dificulta el estudio de dobles mutantes ya que el diseño planteado requiere la observación del fenotipo en la progenie de los animales en los cuales se realizó la inactivación por RNAi. Por otro lado, los animales *srf-3* no presentan un fenotipo visual evidente cuando crecen en *Escherichia coli*. Esta característica, facilita la visualización de un nuevo fenotipo al inactivar C03H5.2 en animales *srf-3*. Más aún, desde el punto de vista teórico, la falta de fenotipo evidente en animales *srf-3* podría ser consecuencia de una actividad compensatoria por parte de otra proteína, idealmente C03H5.2. En base a todas estas consideraciones, resulta importante como paso inicial, determinar los tejidos en los cuales se expresa C03H5.2 para comprobar si existe una superposición con el patrón de expresión de SRF-3. La cepa BC14237 de *C.elegans* presenta un arreglo extracromosomal con la construcción promotor C03H5.2::GFP. La figura 53 muestra que la proteína GFP bajo la regulación del promotor de C03H5.2 se expresa en todas las células en el embrión. Más tarde, cuando comienza la diferenciación de tejidos, puede distinguirse un patrón de expresión más restringido. En los estadios larvales tempranos (Figura 54), lo más evidente es la expresión a nivel de la faringe y musculatura corporal.

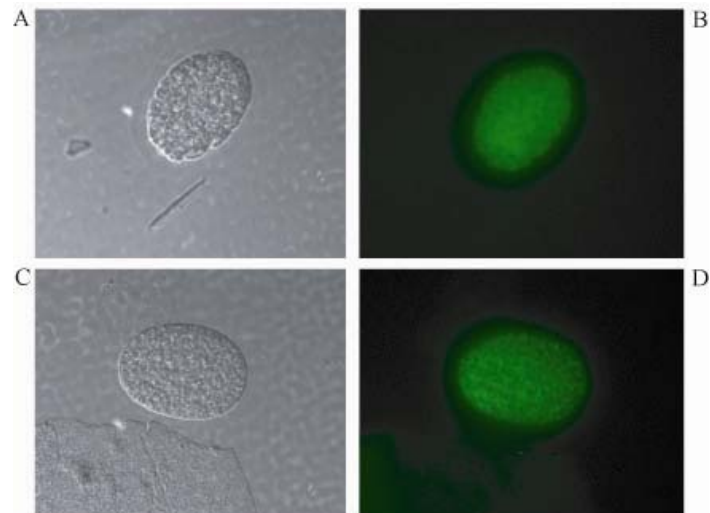


Figura 53. Imágenes Nomarski (A y C) y de fluorescencia (B y D) de embriones de animales transformados con la construcción promotor C03H5.2::GFP.

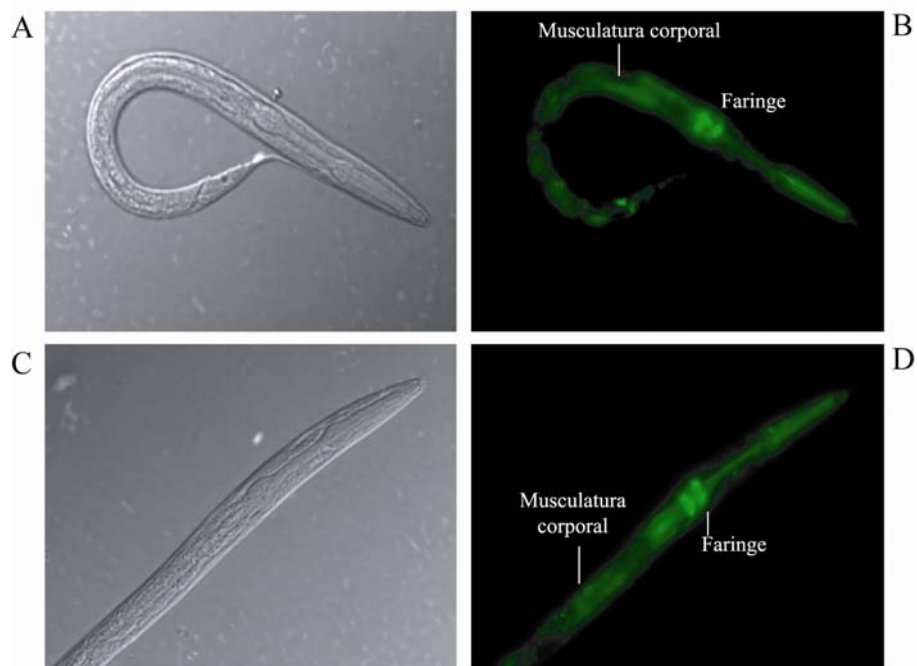


Figura 54. Imágenes Nomarski (A y C) y de fluorescencia (B y D) de larvas L1 que expresan la proteína GFP dirigida por el promotor de C03H5.2. Se observa intensa fluorescencia de faringe y musculatura corporal.

En animales adultos (Figuras 55 y 56), se observa un amplio patrón de expresión de GFP, que incluye por un lado, los mismos sitios donde se observa también expresión de *srf-3* (Figura 55) que son: faringe y células glandulares de faringe, células seam y espermateca. Además, el promotor de C03H5.2 también induce la expresión de GFP en músculo stomatointestinal, en los músculos de la vulva y en los músculos de la pared corporal (figura 56). En consecuencia, SRF-3 y C03H5.2 no sólo comparten la especificidad de sustrato para el transporte de UDP-GlcNAc sino que también presentan una superposición parcial del patrón de expresión tisular.

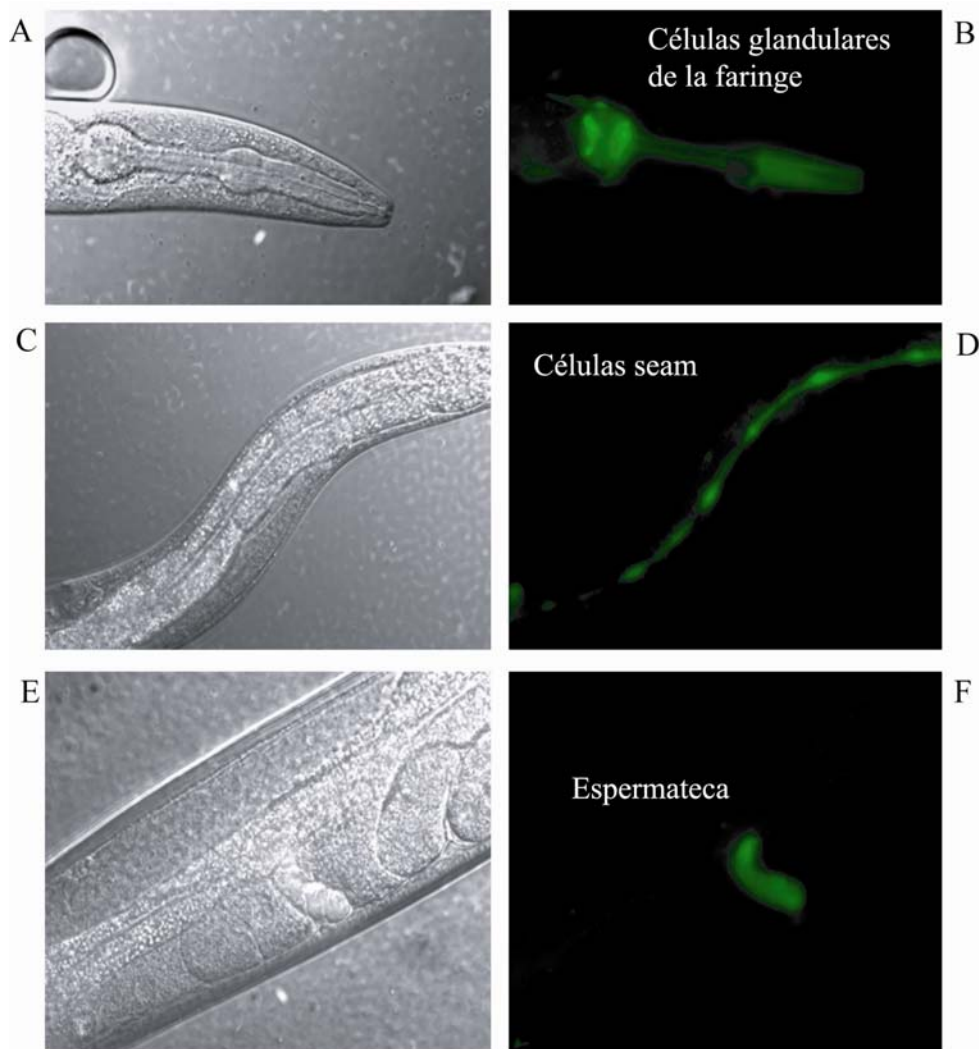


Figura 55. Expresión tisular de GFP dirigida por el promotor C03H5.2. Se observa fluorescencia en las células glandulares de faringe (B), células seam (D) y espermateca

(F). Las figuras A, C y E corresponden al campo claro para las mismas imágenes. C03H5.2 y SRF-3 comparten este patrón de localización tisular.

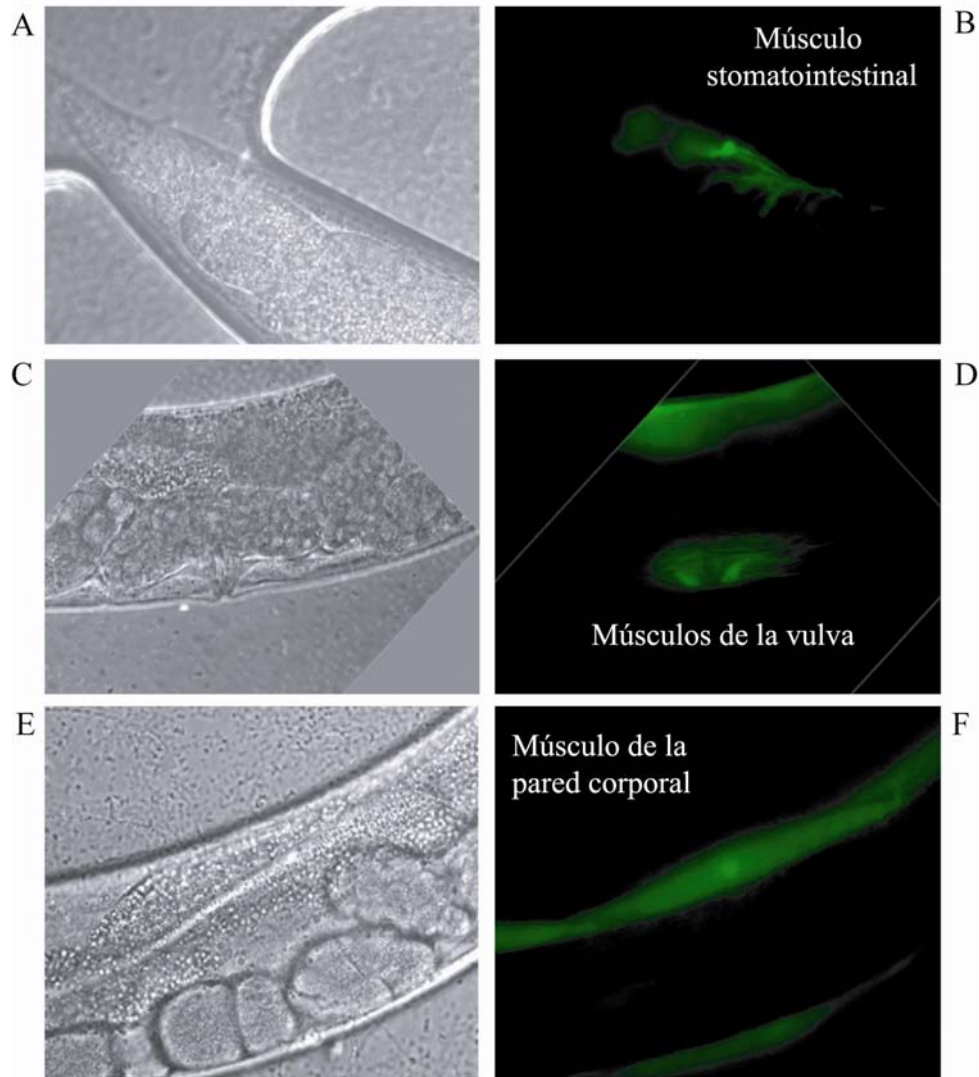


Figura 56. Localización tisular correspondiente a C03H5.2 pero no a SRF-3. C03H5.2 tiene un patrón de expresión más amplio que el descrito para SRF-3 incluyendo músculo stomatointestinal (B), músculos de la vulva (D) y músculo de pared corporal (F). Las figuras A, C y E corresponden al campo claro de las imágenes fluorescentes.

En virtud a los resultados anteriores, los cuales muestran que SRF-3 y C03H5.2 presentan un solapamiento parcial en cuanto a especificidad de sustrato y expresión tisular, se decidió investigar si esta superposición es consistente con un fenómeno de redundancia funcional. En otras palabras, se hizo evidente la importancia de determinar

si la inactivación de ambas proteínas genera un fenotipo que es mayor o diferente al que podría esperarse de la suma de los fenotipos correspondientes a la inactivación de cada proteína en forma individual.

Se estudiaron entonces, los efectos de la inactivación de C03H5.2 mediante RNAi en animales salvajes y en la cepa de animales *rrf-3*. Esta última cepa carece de actividad RNA polimerasa dirigida por RNA (RdRP) lo cual resulta en un aumento sustancial de la sensibilidad a ensayos de RNAi en diversos tejidos. Por tal motivo, *rrf-3* constituye una importante cepa alternativa de gran utilidad para el estudio de genes cuya inactivación mediante RNAi no genera fenotipo evidente en animales salvajes (N2) (Simmer et al., 2002). Como se muestra en las figuras 57, 58C y 58D, no se observaron defectos morfológicos con ninguna de las dos cepas empleadas, N2 y *rrf-3*. Se muestran también los resultados obtenidos en un ensayo de inactivación del transportador SRF-3 mediante RNAi en animales *rrf-3* (figura 58). En este caso, los animales presentan también fenotipo salvaje.

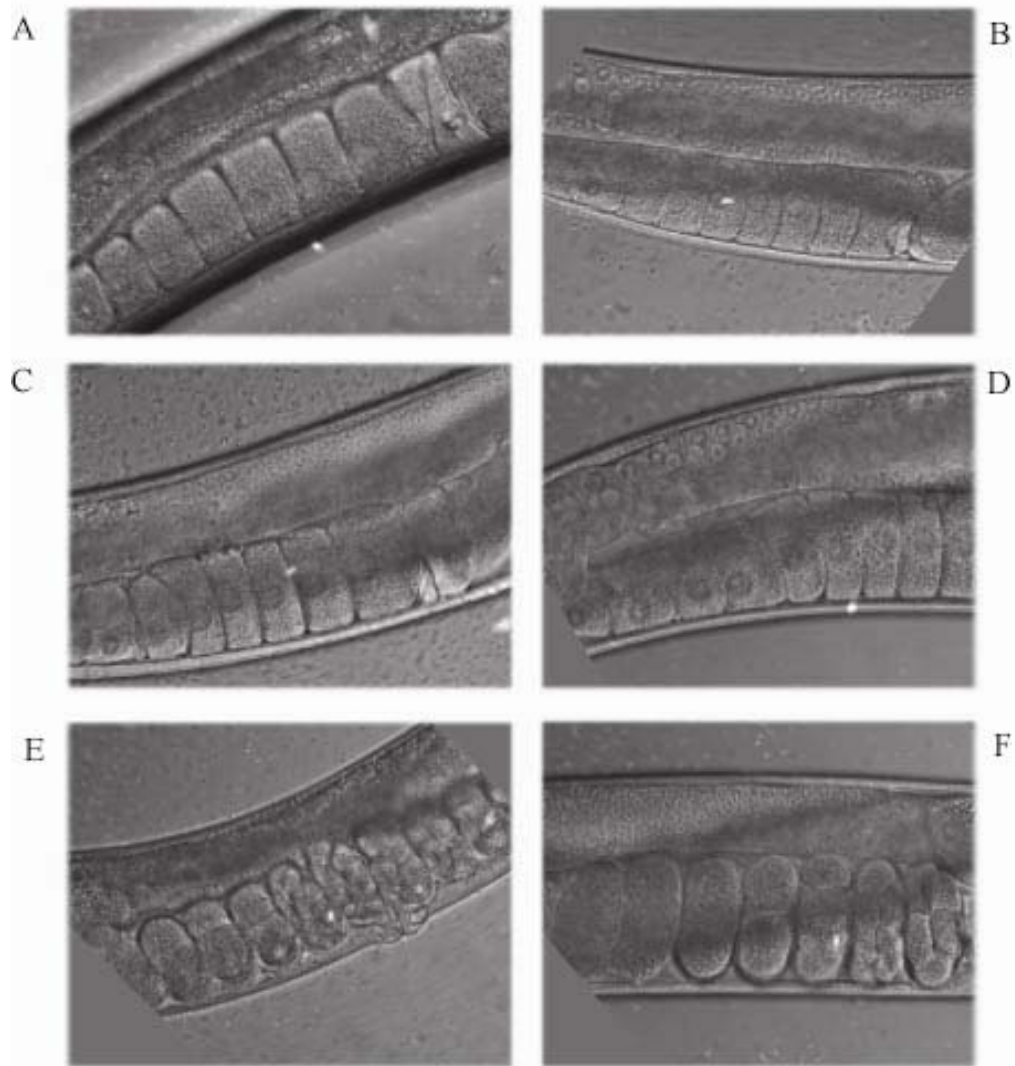


Figura 57. Imágenes Nomarski del ensayo de RNAi en animales salvajes N2. Figuras A, C y E corresponden al control de RNAi con bacterias transformadas con el vector vacío, mientras que las figuras B, D y F muestran el resultado de la inactivación de C03H5.2, que como puede observarse no ocasiona ningún fenotipo morfológico evidente.

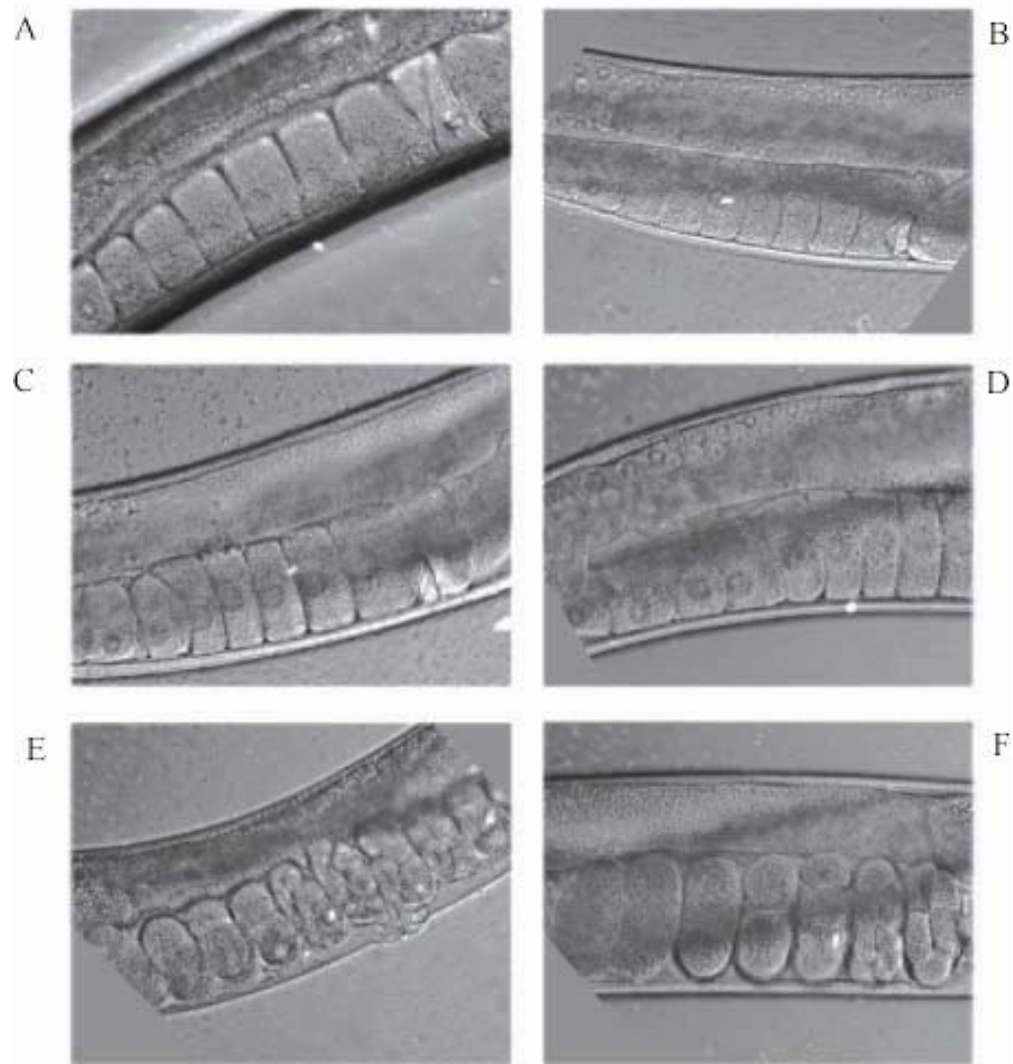


Figura 58. Fotos de imágenes Nomarski de animales *rrf-3* sometidos a inactivación mediada por RNAi usando bacterias transformadas con vector vacío (A y B, control negativo), usando bacterias transformadas con vector que expresa dsRNA correspondiente a C03H5.2 (C y D), y finalmente (E y F) usando bacterias transformadas con el vector que expresa dsRNA correspondiente a SRF-3. Todos los animales observados presentan un fenotipo salvaje. Arriba es dorsal, derecha es anterior.

Sin embargo, la inactivación de C03H5.2 en animales *srf-3* causó el desarrollo anormal de las gónadas y acumulación de oocitos en los brazos proximales de las gónadas (Figuras 59, 60 y 61). No se observaron problemas de esterilidad ni diferencias en el número de la progenie.

Para descartar la posibilidad que los defectos observados en animales *srf-3* sean el resultado de mutaciones no identificadas en la cepa particular *srf-3* empleada, se realizaron los experimentos de RNAi en tres alelos diferentes de animales *srf-3* en paralelo (Figuras 59, 60 y 61): yj10, e2689 y e2797.

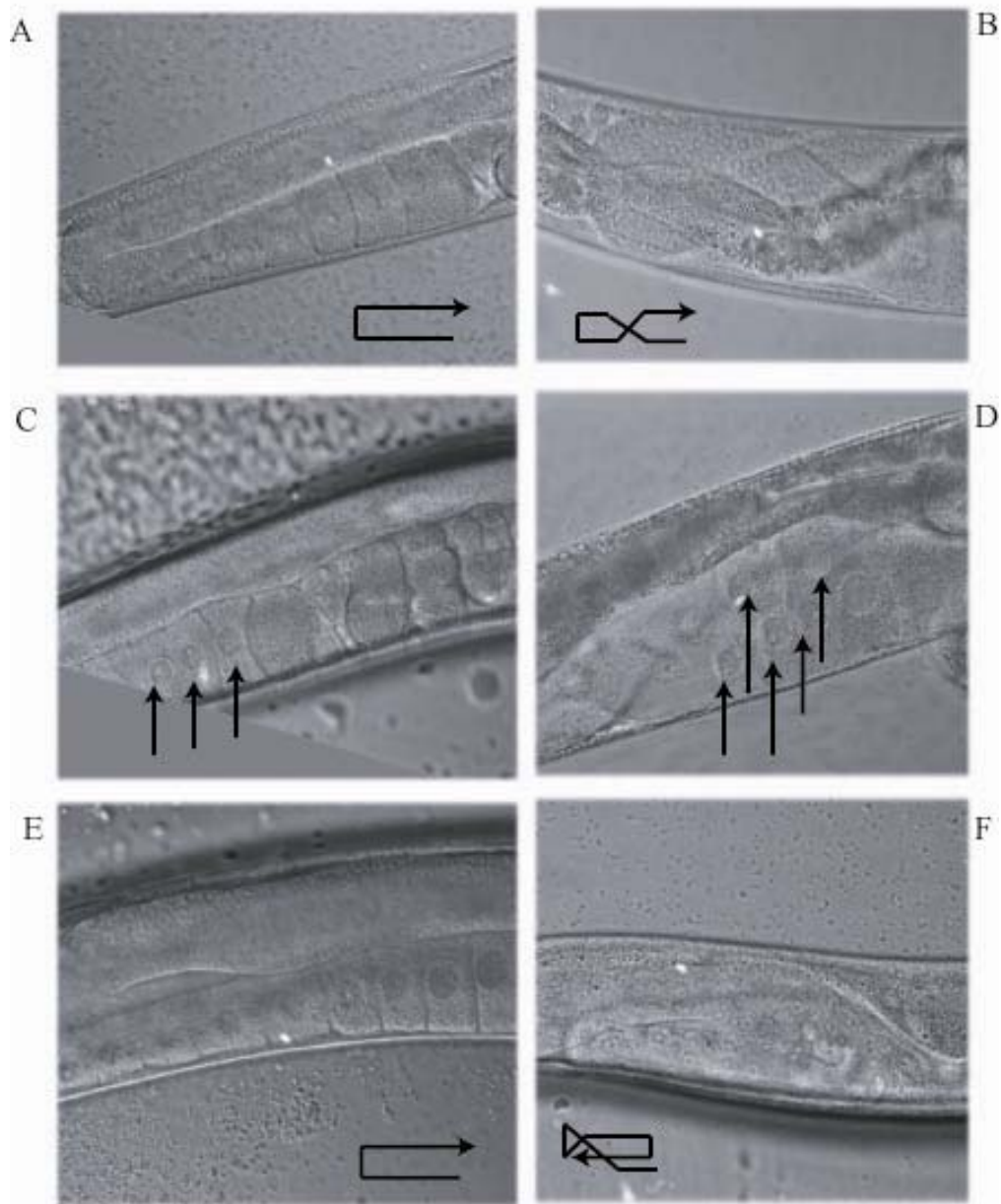


Figura 59. Imágenes Nomarski de animales *srf-3* AT10 sometidos a ensayos de RNAi. A, C y E muestran animales control alimentados con bacterias transformadas con el vector vacío. Las figuras B, D y F muestran los defectos en la migración de gónadas (B y F) y la acumulación de oocitos en el brazo proximal de la gónada (D) causados por la

inactivación de C03H5.2 en animales *srf-3* AT10. Las flechas señalan el patrón de migración gonadal normal (A,B,E y F) y los núcleos de los oocitos (C y D).

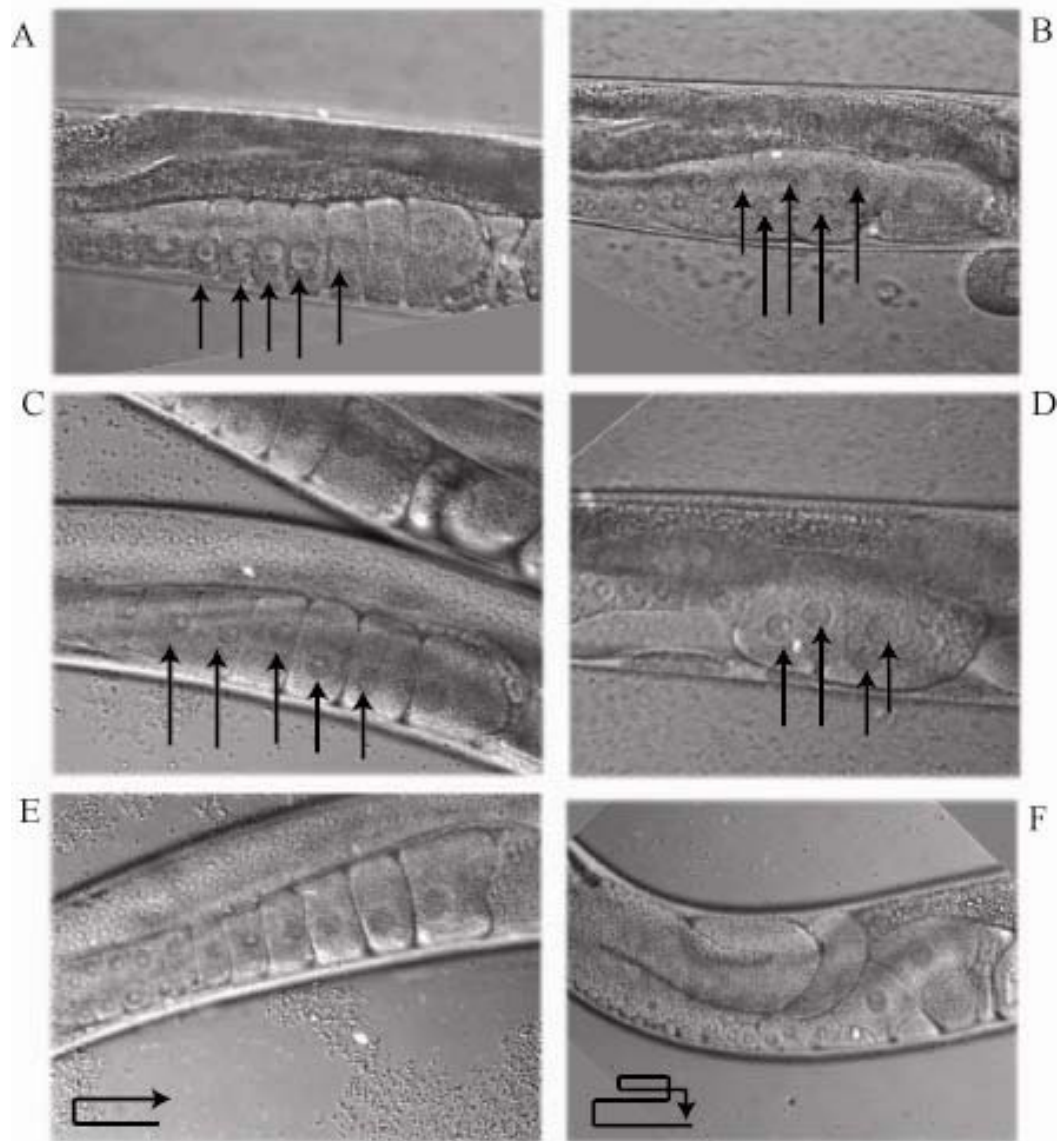


Figura 60. Imágenes Nomarski de animales *srf-3* CB5439 sometidos a ensayos de RNAi. A, C y E muestran animales control alimentados con bacterias transformadas con el vector vacío. Las figuras B, D y F muestran la acumulación de oocitos en el brazo proximal de la gónada (B y D) y los defectos en la migración de gónadas (F) causados por la inactivación de C03H5.2 en animales *srf-3* AT10. Las flechas señalan el patrón de migración gonadal normal (E y F) y los núcleos de los oocitos (A, B, C y D).

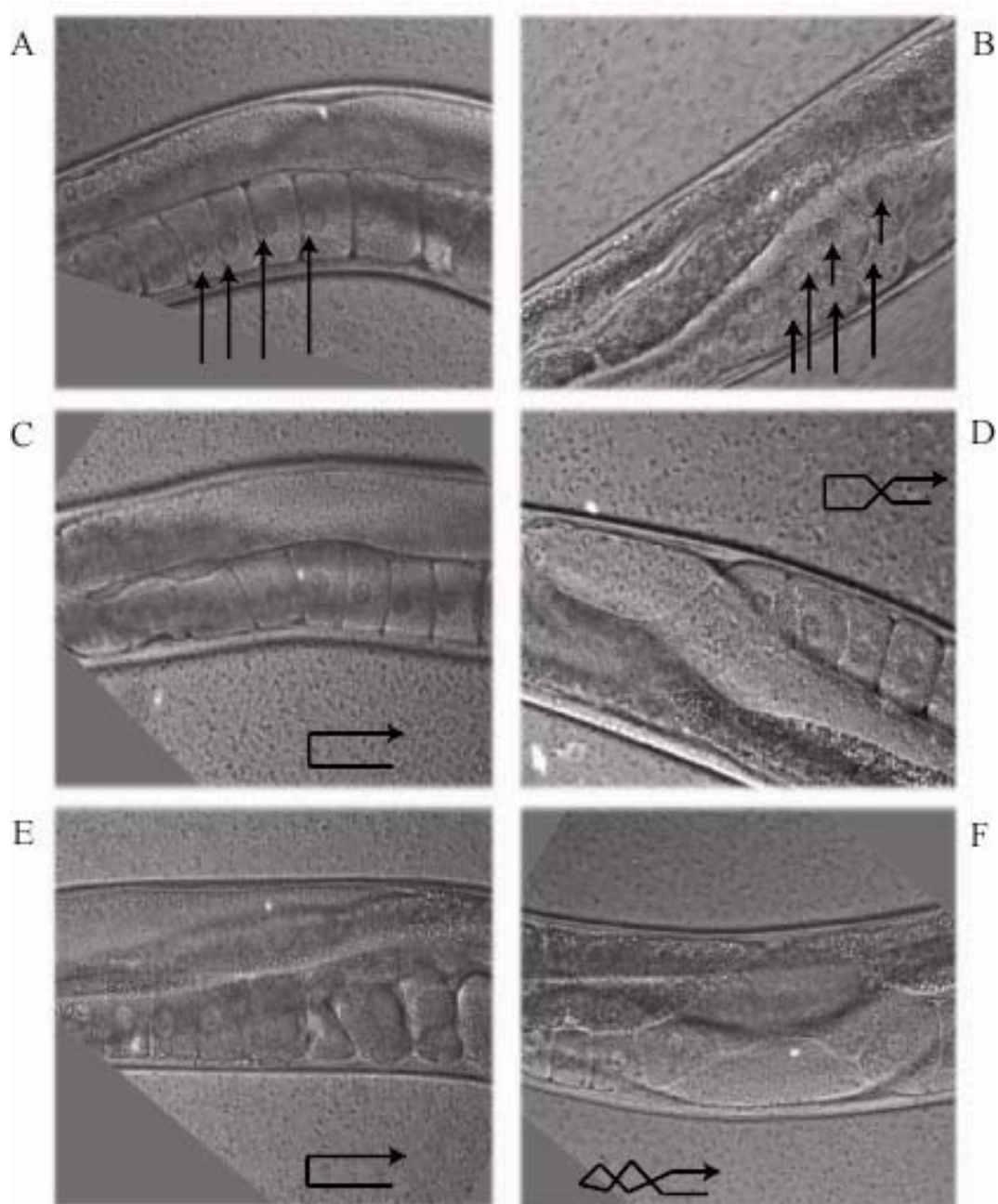


Figura 61. Imágenes Nomarski de animales *srf-3* CB5670 sometidos a ensayos de RNAi. A, C y E muestran animales control alimentados con bacterias transformadas con el vector vacío. Las figuras B, D y F muestran la acumulación de oocitos en el brazo proximal de la gónada (B) y los defectos en la migración de gónadas (D y F) causados por la inactivación de C03H5.2 en animales *srf-3* CB5670. Las flechas señalan el patrón de migración gonadal normal (C, D, E y F) y los núcleos de los oocitos (A y B).

Teniendo en cuenta que el fenotipo visual más evidente en mutantes *srf-3* es la tinción de superficie con WGA, se decidió evaluar si la inactivación del transportador C03H5.2 también causa dicho fenotipo. Para esto, se trabajó con animales mutantes *srf-3*, animales *rrf-3* alimentados con bacterias que contienen el vector vacío y animales *rrf-3* alimentados con bacteria que expresa el dsRNA correspondiente a C03H5.2. Los tres grupos fueron incubados con la lectina WGA conjugada con FITC. La figura 62 muestra la tinción de animales *srf-3* como control positivo (A y B) mientras que los animales *rrf-3*, en ninguna de las dos condiciones son susceptibles a la tinción con la lectina (C,D,E y F). En consecuencia, la inactivación de C03H5.2 no generaría los mismos cambios a nivel de superficie que la inactivación de SRF-3.

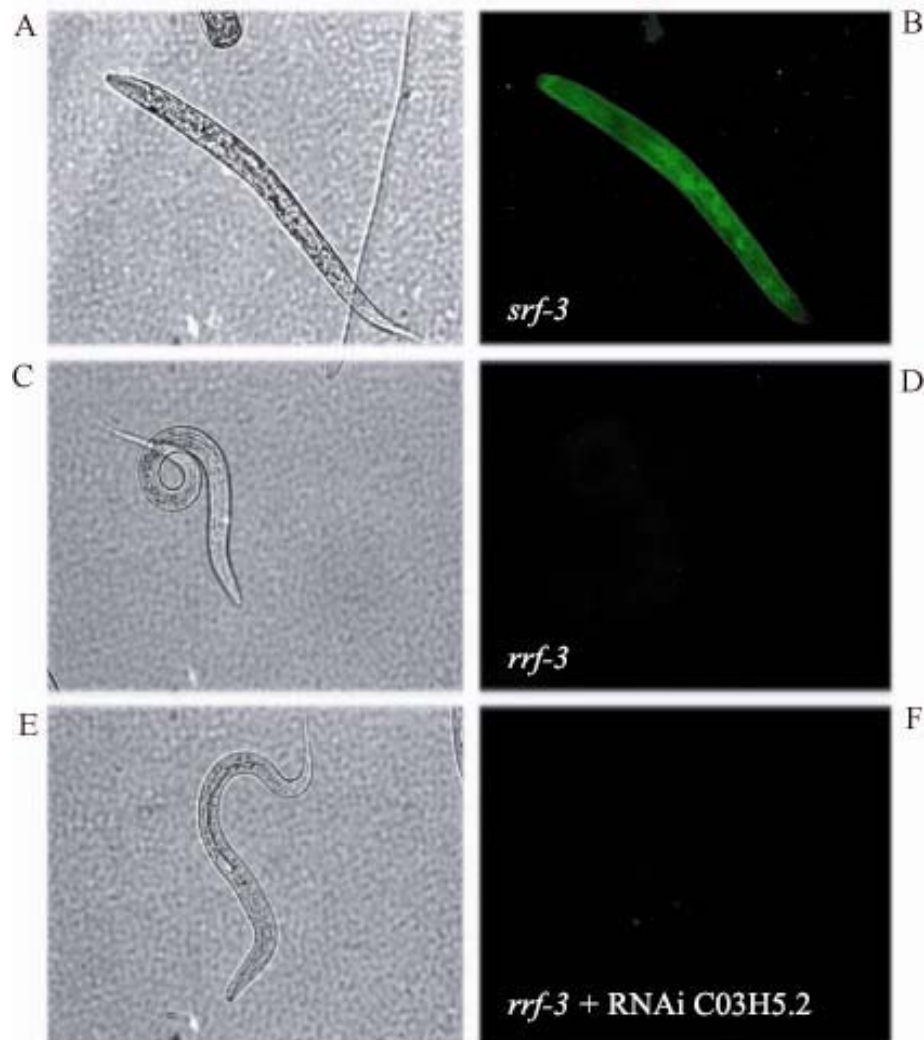


Figura 62. Imágenes Nomarski (A, C y E) y de fluorescencia (B, D y F) correspondientes a la tinción de superficie con WGA conjugada a FITC. A y B) Animales mutantes *srf-3*. C y D) animales *rrf-3* alimentados con bacterias transformadas con vector vacío. E y F) animales *rrf-3* en los que se inactivó C03H5.2 mediante RNAi.

La figura 63 muestra los porcentajes de animales afectados con cada fenotipo estudiado. Un 23% de animales yj10 (n=65), un 25% de animales e2689 (n=52) y un 19.6% de e2797 (n=56) muestran formas anormales en el patrón de migración de las gónadas como giros extras de la parte distal o entrecruzamiento de los brazos proximal y distal. Menos de un 4% de los animales *srf-3* alimentados con bacterias transformadas con el vector vacío muestran este fenotipo. Además, un 10.8% de animales yj10, un 17.3% de animales e2689 y un 3.6% de los e2796 presentan acumulación de oocitos mientras que este defecto no se observó en ningún animal cuando la inactivación de

C03H5.2 se realizó en animales salvajes ($n=50$) o cuando se emplearon bacterias con vector vacío en animales *srf-3* ($n_{yj10}=53$, $n_{e2689}=51$, $n_{e2797}=53$).

En resumen, los experimentos mencionados anteriormente sugieren fuertemente que la inactivación simultánea de C03H5.2 y SRF-3 causa un fenotipo anormal sintético que no se debe a la cepa particular usada sino que es dependiente de la falta de actividad de C03H5.2 y SRF-3, sugiriendo entonces la existencia de redundancia funcional entre estos dos transportadores de nucleótidos de azúcar en *C.elegans*.

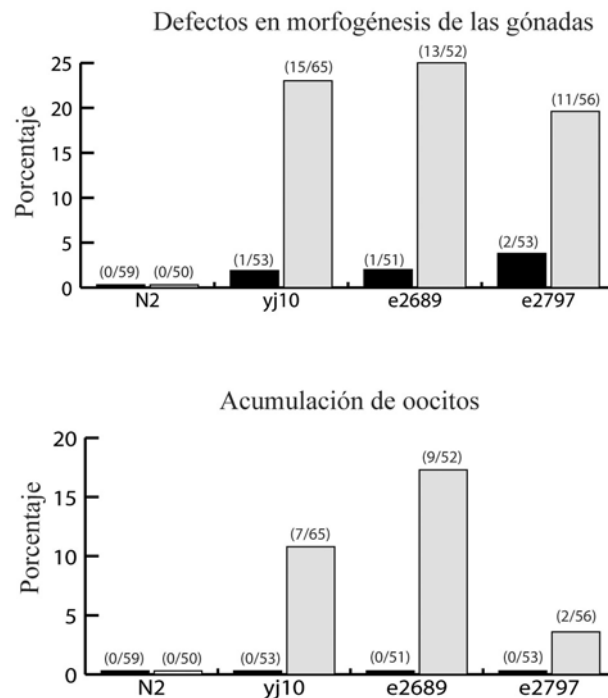


Figura 63. Inactivación de C03H5.2 mediante RNAi en animales salvajes (N2) y mutantes *srf-3*. Se indica el porcentaje de animales que presenta defectos en la migración de gónadas (panel superior), y acumulación de oocitos en el brazo proximal de la gónada (panel inferior). Las barras oscuras muestran el porcentaje de animales con el fenotipo estudiado cuando se alimentan los animales con bacterias transformadas con el vector vacío (control negativo). Las barras claras corresponden al porcentaje de animales con fenotipo resultante de la inactivación de C03H5.2.

Parte IV. Deficiencia de Adhesión Leucocitaria II (LAD II)

a) Estudios de incorporación de fucosa en células de pacientes

El objetivo de estos estudios es determinar si la actividad de transporte de GDP-Fuc residual observada en vesículas del AG de fibroblastos de pacientes con LAD II corresponde al transportador de GDP-Fuc en sí mismo o si el transportador es inactivo y otra proteína está asumiendo el rol de transporte (parcial de GDP-Fuc). En una primera etapa se trabajó con fibroblastos de individuos sanos (control 1 y control 2), fibroblastos de un paciente previamente caracterizado que presenta la mutación T308R (Sturla et al., 2001) y fibroblastos de un paciente con la mutación W323Stop y se determinó la capacidad de los mismos de incorporar [^3H]fucosa del medio y utilizarla para la síntesis de glicoproteínas. Luego de incubar las células en cultivo con medio con [^3H]fucosa, se lavan las células y se precipitan las proteínas en medio ácido.

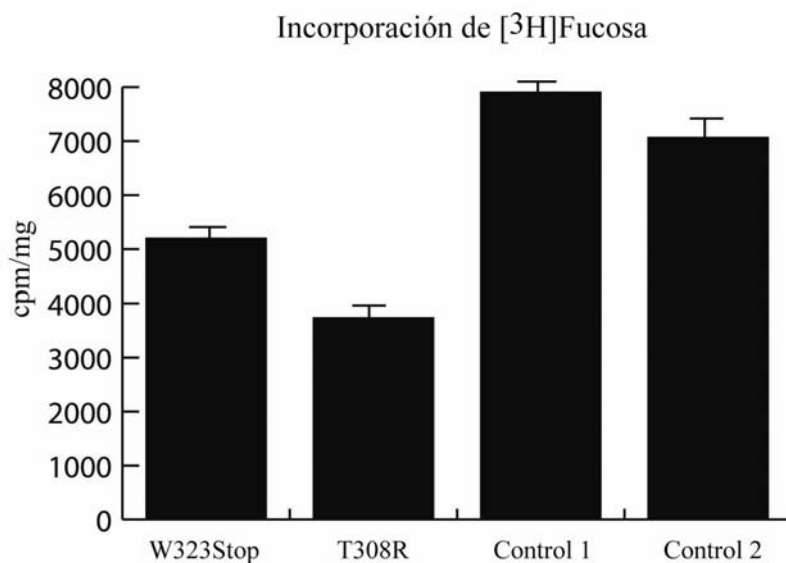


Figura 64. Incorporación de [^3H]Fucosa en fibroblastos. Se indica la cantidad de cpm/mg de proteína. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar.

Como se puede ver en la figura 64, los fibroblastos de los pacientes con las mutaciones W323Stop y T308R presentan una disminuida incorporación de fucosa a

proteína total en comparación con fibroblastos control de individuos sanos. Para confirmar que la disminución observada es específica para fucosa, se repitió el experimento empleando [^3H]N-acetilmanosamina (ManNAc) como precursor radioactivo. Como se muestra en la figura 65, las células de pacientes incorporan [^3H]ManNAc a niveles comparables o mayores que los fibroblastos control, reforzando entonces el concepto que la disminución de la utilización de fucosa es azúcar específico.

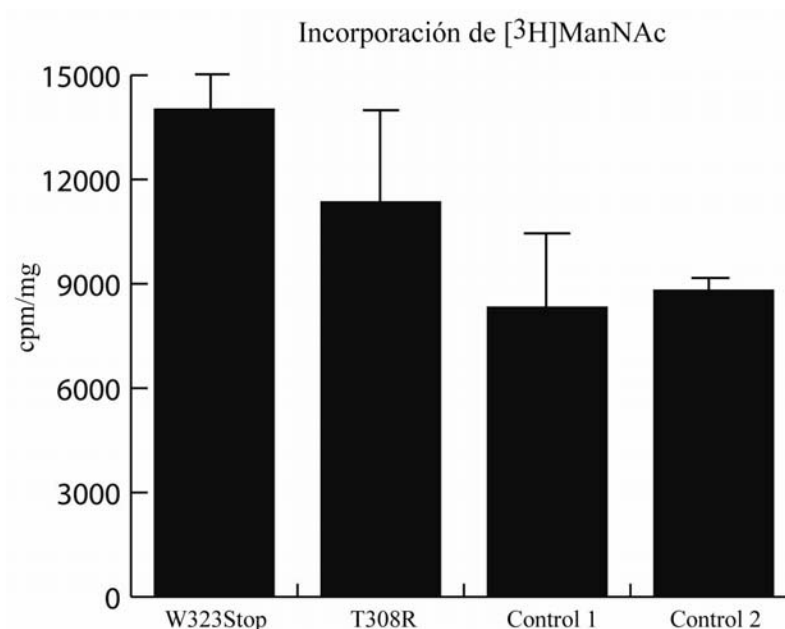


Figura 65. Incorporación de [^3H]ManNAc en fibroblastos. Se indica la cantidad de cpm/mg de proteína. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar.

b) Reconstitución en proteoliposomas

Para determinar si la actividad residual observada en fibroblastos de pacientes se debe realmente a la actividad del transportador de GDP-Fuc y no de otra proteína, se requiere encontrar un sistema en el cual se pueda medir la actividad del transportador en cuestión en ausencia de posibles proteínas interferentes. En este sentido, la expresión en bacterias constituye una estrategia atractiva ya que carece de otros transportadores que pudiesen asumir la función específica del transportador de GDP-Fuc mutado. Se diseñaron entonces, las construcciones correspondientes a los vectores que codifican para

el transportador de GDP-Fuc salvaje pT7-5-His-GDPFT(salvaje) y mutantes pT7-5-His-GDFT(W323Stop) y pT7-5-His-GDFT(T308R), colocando la secuencia correspondiente al tag de Histidina para evaluar la expresión en membrana de bacterias. Se transformaron bacterias y se confirmó la expresión de las mismas mediante inmunodetección con anticuerpos anti-His (figura 66).

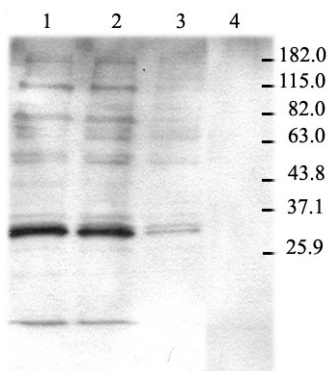


Figura 66. Expresión de pT7-5-His-GDPFT en *E.coli*. Se sembraron 50ug de proteína correspondiente a la fracción de membrana, se separaron por SDS-PAGE y se visualizó mediante inmunodetección con anticuerpos anti-His. 1) pT7-5-His-GDPFT (G969A, W323Stop), 2) pT7-5-His-GDPFT (C923G, T308R), 3) pT7-5-His-GDPFT (salvaje), 4) pT7-5 vacío.

A continuación, se disolvieron las proteínas de la fracción membrana de bacterias y se reconstituyeron en liposomas preparados según se explica en la Parte Experimental. Los proteoliposomas así obtenidos fueron evaluados en su capacidad de transportar GDP-Fuc. La figura 67 muestra los resultados del ensayo de transporte.

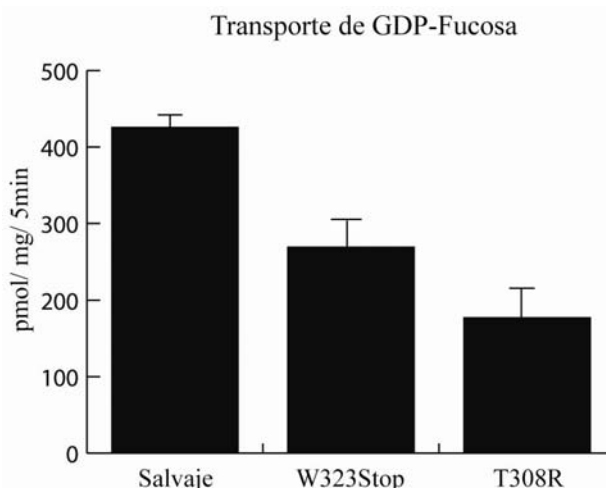


Figura 67. Transporte de GDP-fucosa en proteoliposomas preparados a partir de proteínas de membrana de bacterias que expresan el transportador de GDP-fucosa salvaje o mutantes. La actividad de transporte se muestra como la cantidad de nucleótidos de azúcar dentro de los proteoliposomas a 30 °C menos el valor correspondiente a 0 °C. Los resultados son el promedio de dos determinaciones independientes y el error estándar. La concentración de GDP-Fucosa en la mezcla de reacción es de 1 μ M.

Los resultados obtenidos sugieren que las mutaciones descritas en pacientes generan una pérdida parcial de la actividad de transporte de GDP-Fuc. Esto significa que no hay necesidad de invocar otras proteínas para justificar la actividad residual observada *in vivo* (determinada por la presencia de ciertas proteínas fucosiladas) (Sturla et al., 2003) e *in vitro* (correspondiente al transporte de GDP-fucosa en vesículas enriquecidas en la fracción Golgi de fibroblastos de pacientes) (Sturla et al., 2001). También es interesante destacar la correlación observada entre la actividad residual determinada y la severidad de la enfermedad. El paciente con la mutación W323Stop presenta una sintomatología clínica más leve que la correspondiente al paciente con la mutación T308R. Esta diferencia se ve reflejada también en los mayores niveles de transporte residual obtenidos para el paciente con el síndrome clínico menos severo.

DISCUSSION

Parte I. Caracterización bioquímica del transportador C03H5.2.

En este trabajo de tesis, se caracterizó un nuevo transportador de nucleótidos de azúcar de *C.elegans* codificado por el gen C03H5.2. Toda la evidencia presentada a continuación sugiere que este transportador parece translocar sus sustratos a través de un mecanismo novedoso que es simultáneo, independiente y no simporte.

La expresión de la proteína C03H5.2 en *S.cerevisiae* y su aislamiento en vesículas enriquecidas en la fracción correspondiente al AG muestran que C03H5.2 transporta UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc en forma saturable con valores de Km en el rango 0-30µM similares a los publicados para otros transportadores de nucleótidos de azúcar. Aunque los dos sustratos son epímeros, ya se había descrito que los transportadores de nucleótidos de azúcar pueden comportarse en forma epímero específicos. Ejemplos de este comportamiento son los transportadores SQV-7 y SRF-3 descritos en la introducción. SQV-7, el primer transportador de nucleótidos de azúcar multisustrato caracterizado, presenta especificidad por UDP-Gal y UDP-GalNAc, además de UDP-GlcA, pero no por UDP-Glc o UDP-GlcNAc. Por otro lado, SRF-3 transporta UDP-GlcNAc y UDP-Gal, sin embargo, no es capaz de transportar UDP-GalNAc ni UDP-Glc, siendo glucosa y galactosa epímeros en C4. C03H5.2 también corrige el fenotipo de superficie de una mutante de la levadura *K.lactis* la cual es deficiente en el transporte de UDP-GlcNAc en el AG. Este resultado sugiere dos importantes conclusiones. En primer lugar, que la actividad de la proteína C03H5.2 expresada heterológamente compensa la falta de actividad endógena de esta mutante observado por la recuperación de GlcNAc en la superficie celular a niveles comparables a la levadura salvaje con el transportador de UDP-GlcNAc endógeno activo. En segundo lugar, y no menos importante, de este experimento se deduce que C03H5.2 alcanza su destino final en el AG translocando UDP-GlcNAc hacia el lumen de la organela quedando disponible para la correspondiente glicosiltransferasa.

Mediante 4 líneas de evidencia independiente, hemos demostrado que C03H5.2 transloca sus dos sustratos de forma simultánea e independiente.

La primer línea de evidencia proviene de los resultados obtenidos al comparar la curva de saturación obtenida para UDP-[³H]GlcNAc y la obtenida para ese mismo sustrato en presencia de UDP-GalNAc no radioactivo. Como se mostró en los resultados, el transporte de UDP-[³H]GlcNAc no se ve inhibido, como se esperaría para un sustrato competitivo, sino que es ligeramente estimulado por el agregado del otro sustrato al medio de reacción. La misma falta de inhibición se observó al realizar el experimento opuesto, es decir, la curva de saturación para UDP-[³H]GalNAc en presencia de UDP-GlcNAc no radioactivo.

La segunda línea de evidencia demuestra directamente que ambos nucleótidos de azúcar son translocados vía C03H5.2 de forma simultánea y no competitiva al lumen de vesículas enriquecidas en la fracción correspondiente al AG. Se incubaron vesículas de levaduras que expresan el transportador C03H5.2 con UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc, marcados con diferentes radionucleídos en el azúcar. De este modo, es posible determinar simultáneamente la cantidad de cada nucleótido de azúcar que es transportada al interior de las vesículas en un único ensayo. Los resultados obtenidos muestran que ambos sustratos entran al lumen de las vesículas en igual magnitud tanto si se incuban por separado o en presencia de un exceso de 10 veces el otro sustrato. Cuando el mismo diseño experimental fue hecho con vesículas de levaduras que expresan el transportador SQV-7, el agregado de 10 veces más UDP-[¹⁴C]GlcA a la mezcla de reacción, disminuye aproximadamente un 80% la entrada de UDP-[³H]GalNAc. Si bien este experimento no fue realizado en el trabajo original en el que se caracterizó el transporte a través de SQV-7 como competitivo no cooperativo, confirma estos resultados mediante un enfoque experimental totalmente diferente.

La tercer línea de evidencia que apoya la hipótesis de que C03H5.2 transloca sus sustratos de forma simultánea e independiente proviene de la pérdida asimétrica de la actividad de transporte como consecuencia de la delección de 16 aminoácidos en el segmento ubicado entre el segundo y tercer dominios transmembrana de acuerdo al modelo topológico obtenido mediante el software TMHMM (<http://seqtool.sdsc.edu>). Según este modelo, el fragmento eliminado se encuentra en el segundo loop citosólico, considerando que en los casos donde se realizaron estudios topológicos de transportadores de nucleótidos de azúcar, los extremos amino y carboxilo terminal están

siempre orientados hacia el citosol. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que los aminoácidos eliminados estén orientados hacia el lumen de la organela, ya que los métodos empleados no tienen en cuenta el espesor de la membrana del AG siendo esta aproximadamente un 20% más delgada que la membrana plasmática para la cual se hacen las predicciones.

Este resultado muestra que el transporte a través de C03H5.2 está mediado por diferentes porciones de la proteína según el sustrato en cuestión. En el caso de SQV-7 las dos mutaciones puntuales muestran una reducción paralela de la actividad de transporte de los tres sustratos consistente con un mecanismo competitivo, no cooperativo.

Los resultados anteriores llevan a especular que quizás C03H5.2 tiene dos sitios diferentes de translocación aunque no puede descartarse otro posible mecanismo hasta que se lleven a cabo estudios estructurales adecuados, propuestos más adelante.

La cuarta línea de evidencia proviene de la determinación del parámetro Relación Específica de Transporte (Transport Specificity Ratio, TSR). En este ensayo se incubaron vesículas de levaduras que expresan el transportador C03H5.2 salvaje y en forma paralela vesículas que expresan la forma mutante del transportador (DeIA) con ambos sustratos marcados con diferentes radionucleídos. De esta forma, se detecta en un mismo ensayo la cantidad de cada uno de los sustratos que es efectivamente translocado al interior de las vesículas. Estos valores, expresados de forma relativa, pueden compararse para ambas formas del transportador, reflejando cambios en la afinidad hacia los sustratos independientemente de los niveles de expresión de las proteínas y de la cantidad de sustrato usada en el ensayo. Esto último es de gran importancia ya que si sólo se comparan los valores absolutos de transporte a través de la proteína salvaje o la mutante, se observaría que estos van cambiando según la concentración de sustrato utilizada en cada determinación. Mas aún, la menor expresión obtenida generalmente para la mutante DeIA podría enmascarar niveles normales de actividad. Sin embargo, los valores de TSR obtenidos ratifican una pérdida selectiva de la actividad de transporte de UDP-GalNAc en relación a UDP-GlcNAc para la mutante, y sugiere que diferentes aminoácidos participan en el reconocimiento/transporte específico de cada sustrato.

En este momento, resulta oportuno discutir los determinantes de especificidad de transporte en términos estructurales. La primera y más simple de las aproximaciones al

concepto de determinantes de especificidad comprende aquellos aminoácidos que en algún momento en la trayectoria de la translocación, están en contacto directo con el sustrato. Una posible alternativa es la necesidad de realineamientos hélice-hélice para cambios en la afinidad de unión durante el transporte que permite exponer al sustrato a las fases acuosas en ambos lados de la membrana. Estos determinantes de la especificidad pueden ser considerados “deslocalizados” en oposición a los “localizados” en contacto directo con el sustrato. El parámetro TSR depende estrictamente de la energía en el estado de transición que incluye la energía correspondiente a las contribuciones de contactos moleculares directos en la interfase sustrato-proteína y la energía proveniente de los contactos moleculares en todas las otras interfases proteína-proteína. Esta interpretación más amplia de los determinantes de especificidad del transporte aporta una nueva interpretación a los resultados experimentales obtenidos en este trabajo según la cual, los aminoácidos eliminados no necesariamente corresponden al sitio activo para el transporte de UDP-GalNAc sino que pueden formar parte de los determinantes deslocalizados que actúan a distancia.

Todo el conocimiento estructural actual se basa en predicciones de bioinformática, resultados experimentales que involucran mutagénesis, marcación de extremos amino y carboxilo terminal, quimeras e inmunoprecipitación. Como se mencionó en la introducción, la mayor parte de los estudios estructura-función provienen de la construcción de quimeras de los transportadores humanos de UDP-Gal y CMP-Sia que muestran que diferentes dominios transmembrana son responsables del reconocimiento de sustrato. La falta de estructuras cristalinas también ha retrasado el establecimiento de un mecanismo preciso de transporte. Los trabajos de Chiaramonte *et al* muestran que todo el proceso de transporte depende tanto de interacciones transportador-base como transportador-azúcar (Chiaramonte et al., 2001). El hallazgo de transportadores con especificidad para varios nucleótidos de azúcar generó un nuevo interrogante: ¿la existencia de transportadores multisustratos refleja una mayor promiscuidad en cuanto a especificidad? Esta pregunta puede replantearse en los siguientes términos: ¿los transportadores multisustrato presentan un único dominio para el reconocimiento y la translocación de todos sus sustratos generando competencia entre los mismos, o por el contrario, presentan sitios específicos para el transporte de cada uno

de los sustratos? La primer respuesta a este interrogante fue dada por el trabajo de Berninsone *et al.*, en el que se demuestra un mecanismo competitivo no cooperativo para el transporte de UDP-Gal, UDP-GalNAc y UDP-GlcA a través del transportador de *C.elegans*, SQV-7. Desde entonces, se había asumido que todos los transportadores multisustrato eran competitivos pero no se llevaron a cabo los experimentos correspondientes hasta la presente tesis.

Como se describió en la introducción, los transportadores de GDP-Fuc humano, UDP-GalNAc y GDP-Fuc de rata y GDP-Man de levaduras forman homodímeros activos en la membrana del AG. Para otro tipo de proteínas con actividad proteolítica, como las proteasas de aspártico retrovirales, se ha descrito que forman dímeros con un único sitio activo en la interfase de dimerización. Otros ejemplos, como las caspasas, requieren la formación de homodímeros para la actividad biológica pero cada monómero tiene su propio sitio activo. Recientemente, Lorenz *et al* describieron la estructura del dominio catalítico de la proteasa NS2-3 del virus de Hepatitis C, caracterizada por la formación de homodímeros con dos sitios activos compuestos (Lorenz et al., 2006). Esto significa que, para cada sitio activo, los residuos catalíticos (en este caso histidina y glutamato) son aportados por un monómero, mientras que el residuo nucleofílico (una cisteína) es aportado por el otro.

A la luz de estos hallazgos, no puede descartarse que los sitios para el reconocimiento y/o translocación de UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc involucren aminoácidos de ambas subunidades o que cada subunidad tenga su propio sitio. La determinación del mecanismo de transporte en términos de sitios activos e interacciones específicas transportador-sustrato, requiere necesariamente un mejor y más preciso conocimiento de la estructura tridimensional de estas proteínas. La cristalografía y difracción por rayos X son las técnicas de elección para elucidar estos aspectos. Sin embargo, la dificultad de obtener cristales adecuados para difracción a partir de proteínas altamente hidrofóbicas como los transportadores de nucleótidos de azúcar ha retrasado la concreción de tal proyecto. En el caso, por ejemplo, del transportador lactosa permeasa de *E.coli*, la difracción por rayos X se llevó a cabo en cristales obtenidos a partir de una mutante que une al sustrato con gran afinidad pero que tiene baja actividad de transporte. Las ventajas de esta mutante son su mayor termoestabilidad y baja tendencia a formar

agregados (Abramson et al., 2003). Esto muestra que, si bien es posible la obtención de cristales, se requieren estrategias moleculares que modifiquen ligeramente las propiedades físico-químicas de la proteína de forma que se facilite la cristalización de la misma. Ménétret *et al* (Menetret et al., 2005), caracterizaron el complejo Sec61 de mamíferos mediante la técnica denominada EMAN (Electrón Micrograph Análisis) que consiste en un software semiautomático que realiza una reconstrucción tridimensional a partir de micrografías de transmisión electrónica. Por otro lado, ensayos más sencillos, de protección del sitio activo, podrían aportar significativa información estructural del transportador sin necesidad de obtener cristales. Estos ensayos se basan en el uso de derivados azido de nucleótidos de azúcar que al incubarse con el transportador y exponerse a luz UV, se entrecruzan en forma específica al sitio activo en el transportador (Puglielli and Hirschberg, 1999). Esto, seguido de digestión enzimática en péptidos y análisis de los mismos mediante espectrometría de masas, permitiría identificar dominios de la proteína transportadora responsables del reconocimiento y/o translocación del sustrato.

Interpretación filogenética de la existencia de transportadores competitivos y no competitivos

Como se muestra, tanto en la introducción como en los resultados, el árbol filogenético de los putativos transportadores de nucleótidos de azúcar de *C.elegans* muestra que SRF-3 y C03H5.2 están relacionados más cercanamente que SQV-7. Efectivamente, los experimentos de transporte con sustratos marcados con diferentes radionucleídos sugieren que SRF-3 presenta un mecanismo no competitivo similar al descrito para C03H5.2, en el que ambos sustratos son transportados simultánea e independientemente, diferente a lo observado para SQV-7. Esto sugiere que diferentes mecanismos de transporte pudieron haberse originado evolutivamente de forma paralela a la divergencia evolutiva de las proteínas transportadoras. Podría proponerse también que la existencia de transportadores multisustrato competitivos obedece a una mayor promiscuidad del sitio activo mientras que los transportadores multisustrato no

competitivos que transportan sus sustratos de forma independiente y simultánea podrían ser el resultado de la fusión de genes que codificaban para transportadores de nucleótidos de azúcar específicos para un único sustrato.

Parte II

Redundancia funcional de transportadores de nucleótidos de azúcar. Significado biológico

Los resultados de esta tesis muestran la existencia de redundancia funcional entre transportadores de nucleótidos de azúcar en organismos multicelulares. Esto sugiere un mecanismo que asegura la adecuada formación de glicoconjugados que a su vez parece ser necesaria para el adecuado desarrollo de tejidos.

Si bien el fenómeno de redundancia genética y funcional fue descrito previamente para genes de *C.elegans* no relacionados a glicosilación, hasta el momento no se habían descrito ejemplos en proteínas involucradas en la formación de glicoconjugados en organismos multicelulares. Los transportadores de nucleótidos de azúcar C03H5.2 y SRF-3 comparten parcialmente especificidad de sustrato y localización tisular. Ambos transportadores presentan especificidad de sustrato por UDP-GlcNAc y son expresados en faringe, células seam y espermateca. Este solapamiento es sólo parcial ya que SRF-3 es capaz de transportar UDP-Gal mientras que C03H5.2 también tiene como sustrato UDP-GalNAc y es expresado, además, en músculos de la vulva, músculos de pared corporal y músculo stomatointestinal. Las mutantes *srf-3* no presentan fenotipo morfológico cuando crecen en césped de *E.coli* y la inactivación mediante RNAi de C03H5.2 tampoco causa defectos morfológicos evidentes en animales salvajes. Sin embargo, este mismo ensayo de RNAi llevado a cabo en animales *srf-3* ocasiona migración anormal de gónadas y acumulación de oocitos en el brazo proximal de la gónada. Estos resultados sugieren que SRF-3 y C03H5.2 son redundantes. En otras palabras, SRF-3 y C03H5.2 tienen actividades complementarias en determinados tejidos de forma que la falta de actividad de uno de ellos no ocasiona ningún fenotipo anormal sino que se requiere inactivar ambos transportadores para observar consecuencias morfológicas evidentes. Resulta importante destacar que estos ensayos fueron realizados en tres alelos diferentes de mutantes *srf-3* lo cual asegura que los efectos observados corresponden a la inactivación de ambos transportadores y se descarta la posibilidad que sean consecuencia de mutaciones no identificadas en otros genes de dichos animales. Además, la cepa *srf-3(e2797)*, para la cual se obtuvieron bajos porcentajes de animales

defectuosos en el ensayo de inactivación de C03H5.2, corresponde a un alelo *srf-3* caracterizado como temperatura sensible para el fenotipo Dar (deformed anal region). Como se explicó en la introducción, los animales *srf-3* presentan resistencia a la deformación de la zona anal causada por la infección con *M.nematophilum* mientras que los animales *srf-3* con el alelo *e2797* presentan fenotipo Dar (deformed anal region) a 15 y 20 °C y adquieren la resistencia a *M.nematophilum* a 25 °C. En consecuencia, el hecho que los experimentos de RNAi fueron realizados a 16 °C podría explicar la menor penetrancia observada para este alelo.

Como se desarrolló en la introducción, la existencia evolutiva de redundancia genética puede ser interpretada en al menos, cuatro sentidos: a) Los genes redundantes contribuyen a la cantidad de un producto génico en particular. Un ejemplo de esto son los genes que codifican para RNA ribosomal en eucariontes para los cuales existen múltiples copias idénticas asegurando que haya suficiente cantidad de RNA ribosomal para sostener el crecimiento óptimo. b) Estos genes aseguran la alta fidelidad de un proceso en particular. Los genes *CIN8* y *KIP1* de levaduras codifican para proteínas motoras asociadas a microtúbulos. La inactivación de cualquiera de estos dos genes no causa ningún efecto evidente mientras que la inactivación de ambos simultáneamente provoca defectos en la formación del huso mitótico. Se considera que *CIN8* y *KIP1* cumplirían funciones relacionadas que juntas otorgan fidelidad a la segregación cromosómica. c) Las proteínas redundantes se conservan evolutivamente para preservar las actividades no redundantes de las mismas. Los receptores de superficie codificados por *lin-12* y *glp-1* en *C.elegans* participan en el control de interacciones celulares durante el desarrollo. Mutaciones en cada uno de estos genes individuales ocasiona defectos en diferentes grupos de interacciones celulares; sin embargo, la inactivación de ambos genes causa además fallas en interacciones celulares adicionales. d) Existe una propiedad emergente que depende de la existencia de ambos genes. El ejemplo característico de este tipo de redundancia es la visión binocular en primates, donde cada ojo lleva a cabo actividades redundantes en cuanto a la percepción de color, forma, movimiento; pero se requieren ambos ojos para percibir profundidad (Thomas, 1993). La redundancia genética entre C03H5.2 y SRF-3 podría ser explicada en términos de uno o varios de los mecanismos de selección anteriormente mencionados. Podría considerarse la necesidad de genes

redundantes que codifiquen para transportadores de nucleótidos de azúcar que aseguren que suficientes cantidades de nucleótidos de azúcar estarán disponibles en el AG para la síntesis de glicoconjugados. A su vez, esta redundancia sería responsable de mantener altos niveles de fidelidad en los procesos de glicosilación. En otro sentido, la existencia de redundancia genética entre *srf-3* y C03H5.2 podría deberse a la necesidad de mantener las funciones no redundantes en cuanto a especificidad de sustrato y localización tisular. Finalmente, puede hipotetizarse también que los defectos observados durante la inactivación de C03H5.2 en animales *srf-3* son el resultado de una propiedad emergente que depende de la actividad de ambos productos génicos.

Desde el punto de vista biológico, los defectos observados por la inactivación de C03H5.2 en mutantes *srf-3* constituyen un nuevo enfoque a nivel global de la importancia de las reacciones de glicosilación durante el desarrollo. Los dos defectos observados, migración anormal de gónadas y acumulación de oocitos en la porción proximal de la gónada, fueron descritos en otras mutantes lo cual podría sugerir también la participación de estos transportadores de nucleótidos de azúcar en la misma vía. A continuación, se discuten ambos procesos, destacando la potencial relación funcional con la glicosilación de proteínas dependiente de la disponibilidad de nucleótidos de azúcar mediada por C03H5.2 y SRF-3.

Los patrones de migración celular involucran la regulación temporal y espacial de las células que migran y dependen de señales regulatorias y direccionales en el ambiente extracelular. En *C.elegans*, las gónadas adquieren la forma en U mediante la migración dirigida de las células distales (DTC) localizadas en el extremo de los brazos gonadales. La iniciación de la migración de las DTCs y la transición entre fases son precisamente coordinadas con otros eventos durante el desarrollo larval y las fallas en la migración son fácilmente detectables por la forma anormal de las gónadas en estadios Larva 4 (L4) y adulto. Como se muestra en la figura 68, la migración gonadal puede dividirse en 3 fases:

- 1- migración desde punto medio ventral hacia la cabeza o cola (una rama en cada dirección) a lo largo de bandas musculares de la pared ventral.
- 2- migración ventral-dorsal guiado por la pared interna de la hipodermis.
- 3- migración hacia el punto medio dorsal, a lo largo de bandas musculares de la pared dorsal.

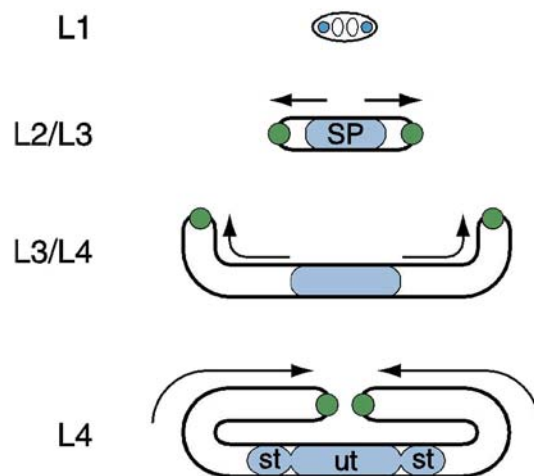


Figura 68. Gonadogénesis en *C.elegans* (animales hermafroditas). En el estadio Larva 1, el primordio gonadal tiene dos células somáticas (celestes) y dos células germinales (blanco). La extensión de las gónadas requiere las células líder (células de la punta, DTC) (verde) que dirigen la migración. La formación del primordio gonadal (SP) requiere la coalescencia de células somáticas. El SP se divide luego y se diferencia en las estructuras somáticas del adulto: útero (ut), espermateca (st) y células de la envoltura o sheath (no se muestran). Adaptado de (Blelloch et al., 1999).

Entre las proteínas identificadas en estas etapas de migración, debe destacarse a GON-1, una metaloproteinasa de matriz extracelular. Mutantes *gon-1* fallan en la fase 1 de migración gonadal generando gónadas de forma redonda acumuladas en la porción ventral del animal. La proteína MIG-17, miembro de la familia de metaloproteinasas ADAM, se sintetiza mayoritariamente en células musculares de pared y difunde hacia la gónada donde es requerida para la migración de DTCs. Otra proteína de gran interés a la luz de este trabajo es MIG-23. Mutaciones en *mig-23* causan también defectos en la migración de DTCs. MIG-23 es una nucleósido difosfato fosfatasa que tendría un rol crítico en el sistema antiporte de nucleótidos de azúcar. Los autores proponen que los defectos gonadales causados por mutaciones en MIG-23 son el resultado de una reducida glicosilación de MIG-17 (Nishiwaki et al., 2004). Según el modelo sugerido, MIG-17 requiere estar glicosilada para alcanzar su localización en la superficie de las gónadas

donde degradaría ciertos sustratos y participaría así en la migración dorsal de las células distales (DTCs). Esta glicosilación sería dependiente de MIG-23 que hidroliza nucleótidos difosfato proporcionando nucleótidos monofosfato necesarios para el intercambio con el nucleótido de azúcar a través del correspondiente transportador (Carolina E. Caffaro, in press). Así, el nucleótido de azúcar quedaría disponible para ser utilizado en la glicosilación de MIG-17, entre otras proteínas, en el lumen del AG. Del mismo modo, podría hipotetizarse que los defectos en la migración gonadal observados al inactivar C03H5.2 en animales *srf-3*, se deben a fallas en la glicosilación de proteínas críticas de este proceso y que la redundancia funcional demostrada constituye una forma de protección que asegure la disponibilidad de nucleótidos de azúcar para la correcta síntesis de glicoconjugados.

La fertilización en *C.elegans*, al igual que en vertebrados, esta precedida por las etapas de maduración y ovulación. La maduración consiste en la progresión a través de la división celular meiótica. El evento más destacado de esta etapa es la ruptura de la envoltura nuclear y rearrreglo de corteza celular. Por otro lado, la ovulación es la expulsión del oocito del ovario y depende de la contracción de células mioepiteliales de envoltura (sheath) de la gónada y relajación de la porción distal de la espermateca. En muchas especies, como ocurre en humanos, los oocitos entran en un estadio de arresto prolongado en la profase meiótica. Sin embargo, en animales *C.elegans* adultos hermafroditas no ocurre un arresto en la maduración ya que la señal para este evento es constitutiva (esperma) y en consecuencia, un oocito madura y ovula cada 23 minutos aproximadamente. En animales hembras generados por mutaciones en los genes determinantes del sexo, en ausencia de esperma, se observa un arresto de oocitos en diaquinesis, la última fase dentro de la profase meiótica. Sin embargo, el oocito más proximal en la gónada femenina madura estocásticamente y se libera pero a muy baja velocidad, ocasionando la acumulación de oocitos en la porción proximal de la gónada (Blelloch et al., 1999).

Se han propuesto cuatro diferentes interacciones célula-célula que regularían la maduración y ovulación del oocito:

- 1- una señal asociada a esperma que promueve la maduración meiótica del oocito y es independiente de la fertilización y presencia de espermatozoides.

2- una señal asociada a esperma que estimula la actividad basal contráctil de células de la envoltura (sheath) proximales.

3- señales provenientes del oocito que aumentan la velocidad e intensidad de las contracciones de las células de la envoltura (sheath) durante la ovulación.

4- señales del oocito en maduración que inducen la dilatación de la espermateca.

Hasta el momento se han identificado algunas de las proteínas que participan en las señales mencionadas. Entre ellas, se destaca la interacción de la proteína principal de esperma (Major Sperm Protein, MSP) con receptores VAB-1/Ephrin en las células de envoltura (sheath) induciendo su contracción y dilatación. También se identificó una señal mediada por LIN-3/EGF producida por oocitos en maduración que actuaría a nivel de receptores LET-23/EGFR en las células de envoltura (sheath) adyacentes. Se cree que a este nivel, LET-23 promueve la producción de inositol trifosfato (IP₃) al estimular, vía fosfolipasa C (PLC), receptores ITR-1 que hidrolizan fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). El evento final sería la liberación de Ca⁺² del RE promoviendo la contracción de las células sheath. Xu *et al* propusieron que en forma similar, interacciones entre células de matriz extracelular e integrinas de membrana de células de la envoltura (sheath) activarían PLC-3/PLC γ estimulando la función de ITR-1 y desencadenando la contracción celular (Xu et al., 2005). Mutantes β integrinas presentan acumulación de oocitos similar a la observada en mutantes *itr-1*, en la inactivación de PLC-3/PLC γ por RNAi y en nuestro caso también.

Wang *et al* han realizado un screening mediante RNAi del efecto de la inactivación de glicosiltransferasas en la citokinesis en *C.elegans* (Wang et al., 2005). Si bien existe poca información referida a la maquinaria de N-glicosilación en *C.elegans*, mediante análisis de secuencias, se identificaron siete proteínas que podrían formar parte del complejo OST o participar en la formación del mismo. De estas proteínas, se llevaron a cabo ensayos de RNAi inactivando T22D1.4, similar a OST1/riboforina-1 y M01A10.3, la cual posee topología de membrana y homología de secuencia con SWP/riboforina-II de levaduras y mamíferos. La inactivación de las mismas ocasiona acumulación de oocitos en la gónada proximal con endomitosis (divisiones nucleares sin división celular). El mismo fenotipo se observó al inactivar una xilosiltransferasa que podría ser importante en la síntesis de proteoglicanos. También se estudió la importancia de glicosiltransferasas

que participan en síntesis de *O*-glicoproteínas tipo mucinas, mediante la inactivación de diferentes GalNAc transferasas. En este caso, no se observó acumulación de oocitos ni endomitosis. Sin embargo, no puede descartarse la existencia de redundancia funcional entre las 11 GalNAc transferasas presentes en *C.elegans* acompañado de la baja eficiencia de inactivación mediante RNAi de múltiples genes simultáneamente.

El hecho de que un 40% de las proteínas celulares sean glicosiladas dificulta la determinación de los glicoconjugados afectados por la inactivación de ambos transportadores de nucleótidos de azúcar, SRF-3 y C03H5.2, causando los defectos observados. La baja penetrancia de los ensayos de RNAi dificulta el estudio químico tendiente a identificar los glicoconjugados afectados por la doble inactivación *srf-3*/RNAi C03H5.2, siendo necesario a tal fin, obtener dobles mutantes estables. Sin embargo, a corto plazo, experimentos similares a los realizados en esta tesis, podrían brindar información adicional sobre la regulación de estos transportadores en organismos multicelulares.

Parte III

Actividad residual de mutantes humanos del transportador de GDP-fucosa, significado biológico

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo sugieren que el transportador de GDP-Fuc en pacientes con LAD II presenta una actividad de transporte residual que se correlaciona con el grado de severidad del síndrome clínico. De esta forma el paciente con la mutación W323Stop presenta una sintomatología más suave que el paciente con la mutación T308R que muestra una menor actividad de transporte residual al ser reconstituída en proteoliposomas. Esto, sin embargo, no asegura que esta sea la única actividad de transporte de GDP-Fuc aunque hasta el momento no se ha podido identificar otra proteína con la misma actividad.

Helmus *et al* (Helmus *et al.*, 2006) llevaron a cabo experimentos de localización subcelular del transportador salvaje y de diversas mutantes, encontrando que las proteínas con las mutaciones W323Stop y $\Delta 588$ no logran llegar al AG quedando retenidas en el RE al ser transfectadas en células COS-7, mientras que las mutantes R147C y T308R colocalizan con marcadores del AG cuando se las expresa en fibroblastos de paciente con mutación W323Stop. Además, mediante ensayos de complementación de estas células con las diferentes mutantes, intentaron demostrar la falta de actividad residual de las proteínas mutadas y postulan la existencia de una actividad de transporte de GDP-Fuc alternativa en el AG aún no identificada.

Si bien estos resultados parecen contradecir los obtenidos en la presente tesis, es necesario hacer una interpretación cautelosa de los mismos. En primer lugar, los experimentos realizados por Helmus *et al* no permiten descartar, reconocido por ellos también, que un porcentaje de la proteína expresada heterológamente en células COS-7 esté alcanzando su localización en el AG ya que no se muestra la posición del AG en esas células mediante un marcador adecuado y la tinción del RE es considerablemente amplia. Por otro lado, cuando la proteína con la mutación W323Stop es expresada en fibroblastos de pacientes portadores de la misma mutación, se obtiene una tinción significativa de todo el citoplasma de la célula que nuevamente no permite descartar una colocalización con el marcador del AG utilizado. Finalmente, si bien la respuesta positiva al tratamiento

oral con fucosa se explicaría por la actividad de otra proteína alternativa en el AG, no se explica por qué el paciente con la mutación T308R no responde favorablemente a dicho tratamiento. Esta situación puede ser mejor explicada si las diferentes mutaciones afectan la K_m y/o V_{max} pero manteniendo una actividad residual según se explico en la introducción.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la importancia de glicoconjugados y en particular de los transportadores de nucleótidos de azúcar imprescindibles para el desarrollo tisular. Además, el rol vital de los transportadores de nucleótidos de azúcar en el desarrollo fisiológico de organismos, a diferencia de mutantes hechos en el laboratorio, es indiscutible desde el descubrimiento de dos síndromes en mamíferos causados por mutaciones en estos transportadores: el Síndrome de Adhesión Leucocitaria II (LAD II) en humanos y la Malformación Vertebral Compleja (CVM) en bovinos.

Por un lado, la severidad de estos síndromes deja abierta la posibilidad de que no se hayan identificado mutaciones en otros transportadores de azúcar de mamíferos debido a efectos fatales de las mismas. Por otro lado, teniendo en cuenta la redundancia funcional observada para C03H5.2 y SRF-3, no puede descartarse que mutaciones en algunos de estos transportadores estén enmascaradas por la actividad redundante de otra proteína y por tanto no hayan sido identificadas hasta el momento. Futuros estudios de estas proteínas transportadoras deben revelar otros ejemplos del rol de los glicoconjugados en el desarrollo tisular de organismos multicelulares.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Medios y soluciones

1.1 Medios de cultivo

LB: Medio para cultivo de bacterias. 1% p/v bacto-triptona, 0.5% p/v extracto de levaduras, 1% p/v NaCl

LB-agar: LB + 2% p/v bactoagar.

YPD (Yeast extract + Peptone + Dextrose): Medio para cultivo de cepas de levaduras. 1% extracto de levadura, 2% peptona, 1% dextrosa.

YPD-agar: YDP + 2% agar

SD-u (Synthetic Uracil Drop-out media): 0.67% base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 2% glucosa, y 2% SCM-URA (mezcla sintética commercial de aminoácidos e inositol).

NGM-agar: Medio para crecimiento de *C.elegans*. Se autoclavan 3g de cloruro de sodio, 2.5g de Bacto-peptona y 17g agar en 1 litro de agua. Se enfría a 55 °C, y a continuación se agregan 1mL de colesterol (5mg/mL en etanol), 1mL de cloruro de calcio 1M, 1mL de sulfato de magnesio 1M y 25mL de fosfato de potasio monobásico 1M pH 6.0. Las placas de Petri se llenan hasta la mitad para facilitar el mantenimiento prolongado de nematodos y se flamea la superficie de agar para remover burbujas de aire y así evitar que los animales se desplacen bajo la superficie del agar.

Medio mínimo para cultivo de bacteria OP50: A 10mL de buffer M9 (ver en siguiente sección) se agregan 0.1mL de cloruro de amonio 2M, 0.1mL de glucosa 20% w/v y 0.02mL de uracilo 2mg/mL.

Medio de cultivo de fibroblastos: medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB) 10% y antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Concentración de ampicilina utilizada: 50ug/mL (Stock 50mg/mL, disolver en agua).

Concentración de carbenicilina utilizada (ensayo de RNAi): 50ug/mL (Stock 50mg/mL, disolver en agua).

Concentración de tetraciclina utilizada (ensayo de RNAi): 12.5ug/mL (Stock 1.5mg/mL, disolver en etanol).

Concentración de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG): 1mM (Stock 1M).

1.2 Soluciones

PBS: Para 1 litro: 8g cloruro de sodio, 0.2g cloruro de potasio, 1.15g fosfato dibásico de sodio, 0.2g fosfato monobásico de sodio.

TE: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0.

TAE 50X: Para 1 litro: 242g Tris base, 57.1mL ácido acético glacial, 100mL 0.5M EDTA pH 8.0 (National Diagnostics).

TBS 10X: 0.25M Tris-HCl pH 8.0, 9% p/v cloruro de sodio.

Buffer de siembra para muestras de DNA, 6X: 0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v cianol de xileno, 30% v/v glicerol.

Buffer MOPS 20X: 0.4M MOPS, 1M acetate de sodio pH 7.0, 0.02M EDTA. (Invitrogen).

Buffer transferencia: Para 1 litro: 200mL etanol, 14.4g glicina, 3.03g Tris.

Buffer de siembra para muestras de proteínas (4X): 40% v/v glicerol, 6.2% p/v DTT, 8% p/v SDS, 0.32M Tris-HCl pH 6.8, 0.002% p/v azul de bromofenol. (Invitrogen).

Buffer lisis de bacterias: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 50mM cloruro de sodio, inhibidores de proteasas.

Buffer A: 10mM Tris-HCl pH 7.0, 0.3M sacarosa, 1mM cloruro de magnesio, 1mM DTT, 20% v/v glicerol.

Buffer B: 10mM Tris-HCl pH 7.0, 0.3M sacarosa, 1mM cloruro de magnesio, 1mM DTT, 1% v/v glicerol.

Reactivo de Bradford: Para 1 litro: disolver 100mg de Coomassie G250 en 50mL de etanol 95%, agregar 100mL de ácido fosfórico 85%, completar a volumen con agua, filtrar y guardar en frasco oscuro.

Inhibidores de proteasas: tabletas cocktail de inhibidores de proteasas (Roche).

Buffer esferoplastos (2X): 2.8M sorbitol, 0.1M fosfato de potasio pH 7.5, 10mM azida de sodio.

Buffer membrana: usado en la preparación de vesículas de levaduras. 0.8M sorbitol, 1mM EDTA, 10mM trietanolamina/ácido acético pH 7.2.

Medio para ensayo de transporte en vesículas de levaduras: 0.5M, MgCl 5mM, MnCl 5mM y trietanolamina 30mM pH=7.2

Solución acetato de litio/TE para transformación de levaduras: 100mM acetato de litio, 10mM Tris, 1mM EDTA.

Solución acetato de litio/TE/PEG para transformación de levaduras: 100mM acetato de litio, 10mM Tris, 1mM EDTA, 40% v/v PEG.

2. Sustratos Radioactivos

Los sustratos radioactivos usados fueron comprados a American Radiolabeled Chemicals (St.Louis, MO) excepto cuando se indica diferente: UDP-[³H]Glc (60 Ci/mmol), UDP-[³H]Gal (20 Ci/mmol), UDP-[³H]GlcNAc (60 Ci/mmol), UDP-[³H]GalNAc (60 Ci/mmol), UDP-[¹⁴C]GlcNAc (300mCi/mmol). GDP-[³H]Fuc fue adquirida de Perkin Elmer Sciences.

3. Mantenimiento de cepas

Ensayos de incorporación de fucosa *in vivo*

Se emplearon fibroblastos de pacientes con las siguientes mutaciones en la secuencia del transportador de GDP-Fucosa: Y337C (A1010G), T308R (C923G) y fibroblastos de un individuo sano como control. Cultivo en estufa a 37 °C con atmósfera de CO₂ 5%.

Ensayos de expresión heteróloga en bacterias

Se uso la cepa BL21, las cuales son lisógenas para el λ profago que contiene el gen que codifica para la RNA polimerasa T7 inducible por IPTG.

Ensayos de expresión heteróloga en levaduras

Se usaron la cepas PRY225 de *S.cerevisiae* (*ura3-52*, *lys2-801am*, *ade2-1020c*, *his3*, *leu2*, *trp1-1* Δ) y KL3 (Mat a, *uraA*, *mnn2-2*, *arg⁻* K⁺, pKD1⁺) (Abeijon et al., 1996a)

and MW103-1C (Mat a, uraA lysA, K⁺, pKD1⁺) (Chen et al., 1991) de *K.lactis*. Todas estas cepas fueron crecidas a 30°C.

Cepas de *C.elegans*

Se usaron las cepas Bristol N2, rrf-3, srf-3 (yj10), srf-3 (e2797), srf-3 (e2680), BC14237 (C03H5.2 promoter::GFP fusion construct)(*C.elegans* bioinformatics, <http://elegans.bcgsc.ca/perl/eprofile/index>), BR3021 (mutante ZK896.9; laboratorio Dr Baumeinster) , BR2847 (srf-3::GFP fusion construct; laboratorio Dr.Baumeinster). Todas las cepas de *C.elegans* fueron crecidas en medio sólido NGM agar (Brenner, 1974; Wood, 1988) Todas las cepas fueron crecidas a 16 °C tnato para mantenimiento como para ensayos de RNAi.

4. Técnicas electroforéticas

4.1 Geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon con buffer TAE 1X al 1% con 0.5 ug/mL de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizan a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspenden con el correspondiente volumen de buffer de siembra 10X. Los geles son visualizados y fotografiados mediante el uso de transiluminadores de luz UV.

4.2 Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se utilizan minigeles NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Las muestras a analizar se preparan agregando los volúmenes correspondientes de buffer de siembra y calentando 20min a 80 °C. Como buffer de corrida se usa el buffer MOPS 1X. Los marcadores de peso molecular usado son de Invitrogen (Prestained BenchMark protein ladder).

5. Biología Molecular

5.1 Técnicas generales para la manipulación de DNA

Reacciones de PCR

Se utilizan las mezclas BIO-X-Act Long o Short mix según la longitud del fragmento a amplificar (BIOLINE).

Cuantificación de DNA y oligonucleótidos

Medición de la absorbancia a $\lambda = 260$ nm. Las concentraciones correspondientes se calculan sabiendo que OD_{260nm} de DNA = 50 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras de DNA también pueden cuantificarse mediante comparación de la intensidad observada al UV con marcadores de masa conocida.

Purificación a partir de geles de agarosa

QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN).

Preparación de DNA plasmídico (miniprep)

Se inocula 1 colonia proveniente de una placa fresca en 3 mL de cultivo con antibióticos según corresponda. Se crece a 37 °C 16h y se purifica el plásmido según instrucciones del kit usado. Plasmid Mini kit (QIAGEN).

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA se realizan en los buffers indicados por el fabricante (New England BioLabs). Se emplean de 3 a 5 unidades de enzima por μg de DNA y se incuban 4h a la temperatura recomendada por la compañía.

Preparación del vector con extremos adhesivos

La digestión con enzimas que generan extremos adhesivos y permiten llevar a cabo una ligación orientada no requiere la defosforilación que es necesaria en caso de preparar

extremos romos. Los fragmentos digeridos se limpian mediante electroforésis y purificación en geles de agarosa.

Ligación de extremos adhesivos

La reacción de ligación debe llevarse a cabo con fragmentos de inserto y vector purificados (sin sales, agarosa u otros contaminantes). Se utiliza la enzima T4 ligasa con buffer y solución de ATP provistos por el fabricante (BIOLINE). La relación molar inserto: vector utilizada es 6:2 a 8:2 y se incuba 30 min a 16 °C.

Transformación de bacterias competentes

Se utilizan bacterias químicamente competentes (BL21 de Novagen o DH5 α de BIOLINE). Se transforma mediante golpe de calor 30seg a 42 °C.

Transformación de levaduras

Se inicia un cultivo de levaduras PRY225 a partir de una colonia de placa fresca en medio YPD. Se cultiva a 30 °C 16h-24h. Se cosechan las células y se resuspenden en solución de acetato de litio/TE 1X en un volumen igual al utilizado para el cultivo. Se centrifugan nuevamente y se resuspenden en 1mL de la misma solución, se resuspende con ayuda de un vortex y se transfiere a un tubo eppendorf. Se centrifuga y resuspende en la misma solución pero en un volumen igual al volumen del pellet obtenido luego de la centrifugación. Se incuban 20uL de dsDNA carrier, 5uL de plásmido (obtenido mediante miniprep), 25uL de suspensión de levaduras y 150uL de solución acetato de litio/TE/PEG. Se incuba 1h a temperatura ambiente y se calienta a 42 °C 10min. Se incuba 2min en hielo, se centrifuga y el pellet resultante se resuspende en 200uL de agua estéril. Se plaquea en placas SCM-ura para selección.

Identificación de plásmidos recombinantes

Se emplearon alternativamente dos técnicas. En una de ellas, se prepara DNA plasmídico a partir de colonias aisladas y digestión con enzimas de restricción para verificar la presencia del inserto de interés. La otra estrategia consiste en chequear la presencia del

inserto mediante PCR de colonia. En ambos casos, se verifica la secuencia mediante secuenciación de DNA a partir de plásmido purificado o producto de PCR.

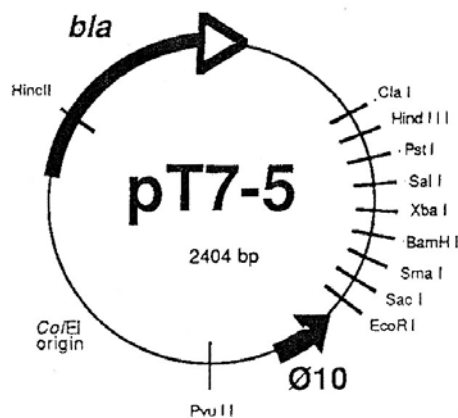
Secuenciación de DNA

Las secuencias de las construcciones realizadas se confirmaron mediante secuenciación en el Core Genetics del Departamento de Genética, Boston University Medical Center.

5.2 Expresión heteróloga

5.2.1 Expresión heteróloga en bacterias

Para la expresión del transportador de GDP-Fuc en bacterias se empleó como vector de expresión el plásmido pT7-5 y el cDNA correspondiente a dicho transportador se obtuvo de ATCC clonado en el vector pOTB7.



Se empleó la siguiente estrategia: la secuencia del gen del transportador de GDP-Fuc se levantó mediante PCR del plásmido pOTB7 usando los siguientes primers que contienen los sitios de restricción para las enzimas BamHI (5') y HindIII (3') y agregan también la secuencia correspondiente al tag de histidina en el extremo amino terminal de la proteína:

GDPFT-FLAGfor(forward):

GGCCCA**GGATCC**AT**GGACTACAAGGATGACGATGACAAG**GCGCTGACCGG
GGCC

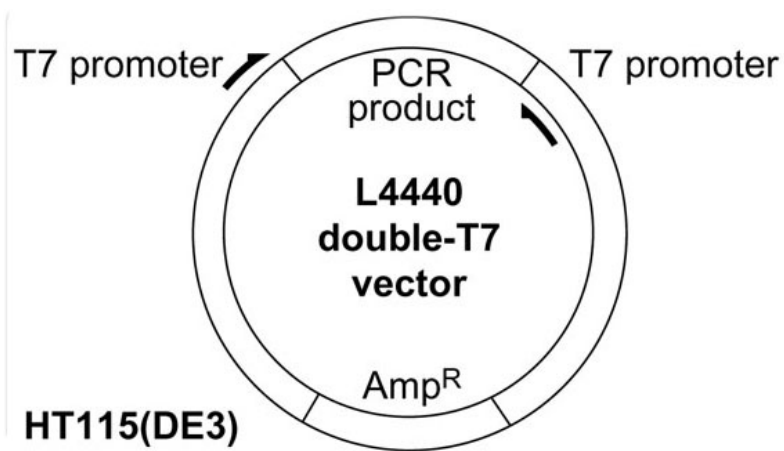
GDPFTrev (reverse):

CCGCGC**AAGCTT**CA**TGGCGCTCTTCTCGCTGT**

Tanto el vector pT7-5 como los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas BamHI y HindIII. Luego de limpiar los fragmentos correspondientes al inserto y vector lineal mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, se ligaron empleando T4 DNA ligasa (BIOLINE). Se transformaron bacterias competentes α -Select gold efficiency (BIOLINE) análogas a las DH5 α para propagación del vector y BL21 (Novagen) para expresión de la proteína.

Preparación de construcciones y transformación de bacterias para ensayos de RNAi

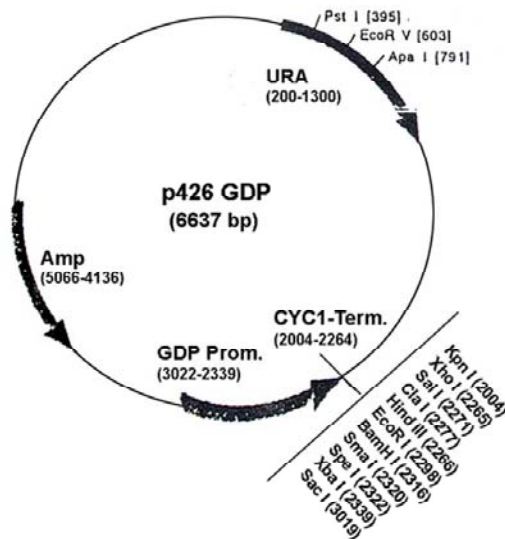
Para los ensayos de RNAi en *C.elegans* se empleó el correspondiente CeRNAiFeeder de Open Biosystems. Este fue construido por clonado del marco de lectura de cDNA de C03H5.2 en el vector L4440. Como se muestra en la figura, el vector L4440 contiene dos promotores T7 invertidos flanqueando el sitio de clonado. De este modo, cuando se transforman bacterias con dicho plásmido, se transcribe a RNA doble cadena (dsRNA). Se empleó la cepa E.coli HT115(DE3) que carece de RNase III específica para dsRNA, mejorando de este modo la eficiencia del método (Timmons and Fire, 1998).



5.2.2 Expresión heteróloga en levaduras

Expresión en *S.cerevisiae*

Para la expresión en *S.cerevisiae* se eligió el vector pG426 y los correspondientes cDNA fueron clonados río abajo del promotor GDP (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), incorporando el tag FLAG en el extremo amino terminal para facilitar la detección de las proteínas expresadas mediante Western Blot.



El cDNA correspondiente al marco abierto de lectura C03H5.2 se obtuvo de Open biosystems y se amplificó mediante PCR usando Bio-X-Act Short DNA polimerasa (BIOLINE). Se usaron los siguientes primers:

C03H5.2FLAGfor(forward):

CGGGCC**ACTAGTAT**GGATTACAAGGATGACGACGATAAGAATCGAGCTAACGACA

5-C03H5.2rev(reverse):

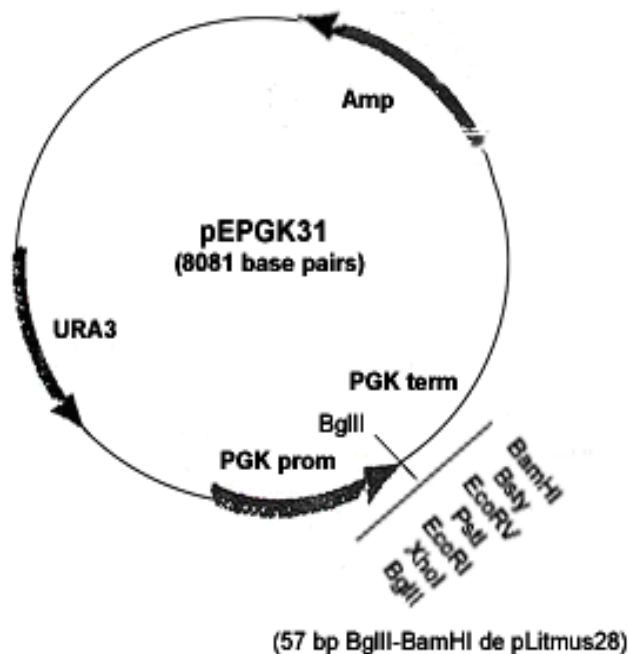
CGCCG**CTCGAGTTAT**CAGGCATTATGAGCTTCG

En rojo están indicados los sitios de restricción, en azul, los sitios de iniciación (ATG) o terminación (TTA, TCA) y en verde, la secuencia del tag.

El producto de amplificación obtenido mediante PCR y el plásmido vacío pG426 fueron digeridos con las enzimas SpeI y XhoI 4h a 37C. Luego de separar en gel de agarosa 1%, los fragmentos de interés (insertos y vector) se limpiaron usando QIAquick gel extraction kit (QIAGEN). La ligación se llevo a cabo siguiendo el protocolo recomendado para la T4 DNA Ligasa (BIOLINE).

Expresión en *K.lactis*

Para la expresión en *K.lactis* se usó el plásmido pE4 obtenido mediante la ligación del fragmento the 57bp BglII-BamHI correspondiente al plásmido pLitmus28 (New England) en el sitio BglII del plásmido pEPGK31. (Abeijon et al., 1996b).



De la misma forma que se clonó el cDNA de C03H5.2 en el plásmido pG426, se usaron los siguientes primers para el clonado en el vector pE4, entre los sitios XhoI y EcoRI:

pE4forC03H5.2:

CGGGCCCTCGAGATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAAT

pE4revC03H5.2:

CGCCGCCTTAAGTTATCAGGCATTATGAGCTTCG

Para la transformación de *S.cerevisiae* o *K.lactis* con las correspondientes construcciones o vectores vacíos, se utilizó el método acetato de Lítio/polietylenglicol (Elble, 1992) descrito anteriormente.

6. Detección de proteínas mediante Western Blot

6.1 Preparación de extractos de bacteria

Se inoculan 3mL de LB/ampicilina con una colonia aislada proveniente de placa fresca. Se incuba a 37 °C durante 10h. Se toma 1mL de ese cultivo y se inoculan 100mL de medio LB/ampicilina fresco. Se incuba a 20 °C durante 18h. Se cosechan las células y se resuspenden en buffer lisis. Se rompen las células por sonicación y se centrifuga a 14000 rpm 5min. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 65000 rpm 30 min (rotor 90 Ti, Beckman) y el pellet correspondiente a la fracción membrana se resuspende en buffer A con al agregado de Triton X-100 0.5%. Se toma una alícuota y se agrega buffer siembra. Se separan las proteínas mediante minigel NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Luego de la electroforesis de proteínas, se electrotransfiere a una membrana Millipore Immobilon P. Se bloquea el binding no específico con leche descremada 5% en buffer fosfato salino (PBS), 1h a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las membranas se incuban con el anticuerpo anti-His (QIAGEN) en PBS durante 1h a temperatura ambiente. La detección de proteínas se realizo usando un Segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Promega) seguido de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences).

6.2 Preparación de extractos de levaduras

Se prepararon extractos totales de levaduras a partir de 3mL de cultivo ($A_{600}=3.0$) según el siguiente protocolo. El pellet correspondiente a 3mL se lava con agua y se resuspende en 100uL de Tris-HCl 20mM pH=7.9, acetato de amonio 50mM, EDTA 2mM e inhibidores de proteasas (Roche). Se agrega 100uL de TCA 20% y 200mg de perlas de vidrio. Se rompen las células en un Bead Beater 3 pulsos de 1min cada uno, dejando 1min en hielo entre pulsos. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo, se lavan las perlititas con la misma solución anterior y se juntan los sobrenadantes. Se deja en hielo durante +10min y se centrifuga 20-30min a máxima velocidad. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100mM Tris BASE pH=11.0, SDS 3%, DTT 3mM (se agrega fresco justo antes de usar). Se incuba 20min a 80 °C y se siembran 20-40uL por calle en un minigel NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Luego de la electroforesis de proteínas, se electrotransfiere a una membrana Millipore Immobilon P. Se bloquea el binding no específico con leche descremada 5% en buffer fosfato salino (PBS), 1h a temperature ambiente. Luego del bloqueo, las membranas se incuban con el anticuerpo anti-FLAG (Sigma, dilución 1;1000) en PBS durante 1h a temperature ambiente. La detección de proteínas se realizó usando un Segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Promega, dilución 1:5000) seguido de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences).

7. Fraccionamiento subcelular de levaduras

Levaduras *S.cerevisiae* transformadas con pG426 o pG426-FLAG-C03H5.2 fueron crecidas en medio liquido SCM-URA (Sherman, 1991) hasta alcanzar una $A_{600}=3.0$. Los cultivos fueron centrifugados y convertidos a esferoplastos según (Abeijon et al., 1993) usando un total de 1mg de zymolyasa 100T (Seikagaku Amrica, Rockville, MD) por g de células. La suspensión de esferoplastos fue centrifugada a 2000xg durante 10min. Las células se rompieron mediante la resuspensión del pellet con pipeta en 1.5X volúmenes de buffer M (sorbitol 0.8M, EDTA 1mM y trietanolamina/acido acético 10mM, pH=7.2)

y luego usando un homogeneizador (Dounce). La suspensión se centrifuga sucesivamente durante 10min a 2000xg, 8min a 5000xg y finalmente 45min a 125000xg para obtener un pellet enriquecido en vesículas derivadas del RE y Golgi.

8. Reconstitución de proteínas expresadas en membrana bacteriana en liposomas

8.1 Preparación de liposomas

Se empleó fosfatidilcolina de yema de huevo como fuente de lípidos porque está libre de contaminantes que podrían afectar la actividad de las proteínas reconstituídas. Para una preparación típica, se emplean 30mg de fosfatidilcolina en cloroformo (100mg/mL stock, Sigma), se secan con corriente de nitrógeno en la pared de una ampolla de vidrio de 10mL. La muestra seca se liofiliza durante 18h. A continuación, los lípidos secos se emulsionan en 1mL de buffer B con ayuda del vortex. Esta suspensión, de aspecto lechoso, se sonica hasta que se vuelve translúcida (aproximadamente 1h, Heat Systems Ultrasonics sonicator, modelo W-225, con baño de agua en circulación a 30 °C). En este momento, la suspensión consiste en una población homogénea de pequeñas vesículas unilaminares. Estos liposomas así preparados son estables a 4 °C por una semana, pero normalmente fueron utilizados para experimentos de reconstitución dentro de las 5h de preparados.

8.2 Preparación de proteoliposomas

A 1mL de liposomas, preparados con la técnica anteriormente descrita, se agregan 1mg de extracto de proteínas de membrana de bacteria en buffer A con Triton X-100 0.5% . Esta etapa se realiza haciendo pasar la solución de proteínas a través de una columna con ExtractiGel (Calbiochem) para remover el detergente y dejándola eluir por goteo directamente sobre la suspensión de liposomas que se agita en forma suave

simultáneamente. La mezcla se congela rápidamente en un baño de hielo seco/acetona y se deja descongelar lentamente a temperatura ambiente. Este ciclo se realiza cinco veces.

9. Ensayo de Transporte de Nucleótidos de Azúcar

9.1 Ensayo de transporte en proteoliposomas

La actividad de transporte en proteoliposomas se determina mediante la incubación de 200uL de proteoliposomas reconstituídos según se explicó anteriormente con 50uL de buffer B conteniendo el sustrato radioactivo. Luego de incubar 5min a 30 °C, se detiene la reacción en hielo y se siembra la mezcla en una columna Dowex 1x2-100 intercambiador aniónico (2.5cm de altura x 1cm diámetro) previamente lavada cinco veces con 1mL de agua. Se eluye directamente en los viales para contador de centelleo con alícuotas de 300uL de agua. Se determina la radioactividad de cada fracción eluída y se combinan las fracciones en las que eluyen los proteoliposomas (en general fracciones 3 a 7). Se realiza en paralelo un control con proteoliposomas preparados con extracto de proteínas de membrana de bacterias transformadas con plásmido vacío.

9.2 Ensayo de transporte en vesículas de levaduras

Las bases teóricas del ensayo de transporte de nucleótidos de azúcar con vesículas enriquecidas en el RE y el AG han sido descritas previamente (Perez and Hirschberg, 1987).

Todos los ensayos se hicieron en tubos de rotor Ti-50 (Beckman) en un volumen total de 1mL. El medio de incubación estuvo compuesto por sacarosa 0.5M, MgCl 5mM, MnCl 5mM y trietanolamina 30mM pH=7.2. Los sustratos radioactivos fueron secados bajo corriente de aire y solubilizados en el medio de incubación. Cada ensayo fue iniciado por

la adición de 100uL de una preparación de vesículas (1mg proteína) y se incubaron durante 4min a 25 °C o en hielo y la reacción se detuvo por agregado de 3mL de solución STOP (sacarosa 1M, EDTA 1mM) e inmediata centrifugación a 125000xg durante 30min. Se descartó el sobrenadante y los pellets y paredes del tubo fueron lavados 4 veces con 3mL de solución STOP. A continuación, los pellets se resuspendieron en 500uL de agua con la ayuda de un sonicador (Heat System Ultrasonic) y se transfirieron con pipeta Pasteur a tubos eppendorf 1.5mL. Se precipitaron las macromoléculas con 0.5mL de ácido perclórico 8% y centrifugación a máxima velocidad durante 10min. Los sobrenadantes se transfirieron directamente a los viales del contador de centelleo para la detección de la radioactividad asociada a vesículas (dentro y entre ellas).

10. Técnicas empleadas en los experimentos con *C.elegans*

10.1 Montaje de animales (*C.elegans*) para observación con óptica DIC (microscopía) (Shai Shaham, 2006).

Se emplean dos portaobjetos a los cuales se les ha colocado cinta de rotulado en ambos laterales mayores que sirven de espaciadores. Otro portaobjetos limpio se coloca entre ellos a modo de sandwich en una superficie plana. Usando una pipeta Pasteur se coloca una gota de una solución de agar 5% en agua previamente disuelta y calentada a 65 °C sobre el centro del portaobjetos limpio. Se cubre el agar con otro portaobjetos limpio en forma perpendicular y se presiona suavemente hasta obtener una superficie circular de alrededor 0.4mm de espesor. Una vez solidificado, se colocan 5uL de azida de sodio 10mM en buffer M9 en el centro del agar. La azida de sodio anestecia a los animales de modo que no se muevan durante la observación al microscopio. Con la ayuda de un anza se transfieren los animales a la gota y se cubre suavemente con un cubreobjetos.

10.2 Ensayo de RNAi

Una colonia de HT115 E.coli conteniendo el plásmido L4440-C03H5.2, L4440-ZK896.9 o L4440 vacío se creció en medio LB suplementado con 50ug/mL de ampicilina y 12.5ug/mL tetraciclina durante 16h. Los cultivos se diluyeron 1:50 en el mismo medio y se incubaron a 37C hasta Abs=0.5. En ese momento, se agrego IPTG concentración final

1mM durante 4h a 37°C. Una vez finalizado el tiempo de inducción, las bacterias fueron cosechadas y resuspendidas en medio LB fresco suplementado con antibióticos. Se empleó un volumen de medio igual al 25% del volumen de inducción. Estos cultivos fueron empleados para sembrar placas NGM suplementadas con 50ug/mL carbenicilina, 12.5ug/mL tetraciclina e IPTG 1mM. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante un día.

Animales hermafroditas en estadio L4 (N2, *rrf-3*, *srf-3*. BR3021) se colocaron en placas NGM sembradas con las bacterias que expresan el dsRNA para cada gen de interés y se incubaron a 16 °C durante 24h. Una vez que alcanzan el estadio adulto, se transfieren a placas frescas sembradas con las mismas bacterias y se les permite poner huevos durante 6 horas a 16 °C. De esta forma se obtiene una progenie sincronizada para la observación al microscopio.

RESUMEN

Aproximadamente un 50% de las proteínas celulares en eucariontes son secretadas al medio extracelular o se encuentran unidas a membranas. Ambos tipos de proteínas son sintetizadas en ribosomas unidos a membrana y translocados al lumen del Retículo Endoplasmático. Desde allí, migran vía vesículas al aparato de Golgi y luego al destino final ya sea dentro o fuera de la célula. En el lumen del Retículo Endoplasmático o del aparato de Golgi, un 80% de estas proteínas son glicosiladas, sulfatadas o fosforiladas en reacciones que emplean nucleótidos de azúcar, nucleótidos sulfato y adenosina trifosfato como sustrato. La síntesis de estos derivados nucleotídicos no ocurre en el lumen de dichas organelas sino en el citosol a excepción del ATP cuya mayoría se sintetiza en la mitocondria. Esto hace necesaria la existencia de un mecanismo de transporte desde el lugar de síntesis al lumen del Retículo Endoplasmático y del aparato de Golgi. Este transporte es mediado por proteínas específicas, que hasta el momento, han sido encontradas en todos los sistemas eucariontes estudiados. Los transportadores de nucleótidos de azúcar del nematodo *C.elegans* han sido el objeto de estudio de esta tesis incluyendo áreas relacionadas tanto al mecanismo de transporte como a la regulación y relevancia fisiológica de los mismos en organismos multicelulares

Los transportadores de nucleótidos de azúcar actúan en intercambio con los correspondientes nucleósidos monofosfato a través de la membrana del Retículo Endoplasmático o del aparato de Golgi. Esto permite que los nucleótidos de azúcar sean concentrados en el lumen de estas organelas en relación a su concentración en el citosol, un transporte activo. La energía para este transporte no proviene de la hidrólisis de ATP sino que está aportada, al menos en parte, por la salida de solutos desde el lumen de la organela hacia el citosol siguiendo un gradiente de concentración. El clonado molecular de transportadores de nucleótidos de azúcar ha revelado importantes características de los mismos: a) hasta el momento, todos los transportadores descritos son proteínas hidrofóbicas que atraviesan la membrana varias veces. b) La similitud a nivel de secuencia primaria no es en general un indicador de especificidad de sustrato. c) La misma especificidad de sustrato puede estar mediada por proteínas con una muy baja identidad de secuencia.

Los primeros transportadores de nucleótidos de azúcar caracterizados presentaban especificidad por un único sustrato. Sin embargo, más recientemente se han clonado y

descrito transportadores multisustrato. Solamente para uno de ellos, SQV-7 de *C.elegans*, se había establecido un mecanismo de transporte competitivo que sugiere que los mismos comparten el sitio activo en la estructura tridimensional de la proteína. Para los demás transportadores multisustrato descritos se asumió competencia entre sustratos aunque no se demostró experimentalmente.

El nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) es un organismo multicelular ampliamente utilizado como modelo de estudio en las áreas de biología de desarrollo, neurobiología y biología de comportamiento. *C.elegans* constituye el organismo multicelular en el cual se han realizado la mayor cantidad de estudios recientes relacionados a transportadores de nucleótidos de azúcar y en el cual se ha identificado, hace cinco años, el primer transportador multisustrato, SQV-7, que es también para el único que se había obtenido evidencia directa de un mecanismo competitivo.

Desde entonces, sólo un segundo transportador de nucleótidos de azúcar había sido caracterizado en *C.elegans*, denominado SRF-3. Se trata también de un transportador multisustrato y se presumía un mecanismo competitivo aunque no se realizaron los ensayos correspondientes. Tanto para SQV-7 como para SRF-3, se conoce la localización tisular respectiva, mostrando en ambos casos, que la expresión es tejido específica. El genoma de *C.elegans* ha sido totalmente secuenciado y mediante homología de secuencia se predicen 18 putativos transportadores de nucleótidos de azúcar. Sin embargo, de acuerdo al análisis del contenido de azúcar de los glicoconjugados de estos animales, sólo se requieren siete diferentes donores de azúcar (nucleótidos de azúcar). Esta situación sumada a la expresión tejido específica y la especificidad por múltiples sustratos, sugiere la posibilidad de que más de un transportador lleve a cabo la misma función en forma redundante o por el contrario que tengan la misma función pero en diferentes tejidos y/o estadíos.

En esta tesis, se estudió un putativo transportador de nucleótidos de azúcar de *C.elegans*, llamado C03H5.2. Con un enfoque bioquímico, se verificó su actividad como transportador de nucleótidos de azúcar, y se lo caracterizó en términos de especificidad de sustrato y parámetros cinéticos para cada uno de ellos. Debido a que este organismo no se presta al fraccionamiento subcelular, se llevó a cabo la expresión heteróloga del mismo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que tiene transporte de UDP-glucosa y

GDP-manosa endógenos y se evaluó la actividad de transporte *in vitro* en vesículas de esta levadura. Los resultados de estos ensayos demuestran que C03H5.2 es un transportador de nucleótidos de azúcar con especificidad por UDP-*N*-acetilglucosamina y UDP-*N*-acetilgalactosamina. Dicha actividad de transporte es temperatura dependiente y saturable con valores de K_m de 25.2 μ M y 24.9 μ M respectivamente. Mediante la complementación de células mutantes *Kluyveromyces lactis* deficientes en el transporte de UDP-*N*-acetilglucosamina, se demostró que la especificidad por dicho sustrato también ocurre *in vivo* e indirectamente, que C03H5.2 alcanza su localización subcelular en el aparato de Golgi. En base estudios previos que demostraban un mecanismo competitivo para SQV-7, se investigó un posible mecanismo de competencia entre sustratos mediante diferentes estrategias que incluyen el desplazamiento de curvas de saturación por agregado de cantidades constantes de competidor, ensayos de transporte con sustratos marcados con diferente radionucleídos y el efecto de la cantidad de competidor agregado sobre el transporte de una determinada cantidad de sustrato. A su vez, combinando técnicas de biología molecular y bioquímica se diseñaron mutantes para evaluar el efecto de determinados aminoácidos en la actividad de transporte. Todos los resultados obtenidos en estos experimentos son coherentes con un mecanismo de transporte novedoso no competitivo en el que los dos sustratos son transportados en forma independiente y simultánea. Una delección de 16 aminoácidos en el segundo loop citosólico da lugar a una proteína mutante que prácticamente carece de actividad de transporte de UDP-*N*-acetilgalactosamina mientras que el transporte de UDP-*N*-acetilglucosamina no se afecta significativamente.

Desde el punto de vista biológico y de acuerdo las observaciones previas relacionadas a la especificidad de sustrato y localización tisular de los transportadores de nucleótidos de azúcar descritos en *C.elegans*, se evaluó una posible redundancia funcional entre C03H5.2 y SRF-3. En este sentido, se determinó la especificidad de sustrato, patrón de expresión de las proteínas de interés y efecto de inactivación de las mismas en el fenotipo de los animales. El primer requisito quedó contestado mediante el análisis bioquímico anteriormente descrito. Estudios previos a esta tesis habían demostrado que SRF-3 transporta UDP-*N*-acetilglucosamina y UDP-galactosa, por lo que es evidente que tanto C03H5.2 como SRF-3 tienen a UDP- *N*-acetilglucosamina como

sustrato común. Para la determinación de la expresión tisular, se empleó una construcción donde el cDNA que codifica para una proteína verde fluorescente (GFP) se encuentra bajo la regulación del promotor de C03H5.2. En esta construcción, la GFP reemplaza al transportador y de esta forma, la visualización de la fluorescencia indica los tejidos a los cuales dicho promotor dirigiría la expresión del transportador en estudio. De esta forma, la expresión tisular de C03H5.2 se comparó con la descrita previamente para SRF-3, observándose una superposición parcial en la expresión de los mismos en células de faringe, células seam y la espermateca. A continuación, mediante ensayos de inactivación de RNA (RNAi) se evaluaron los efectos de la inactivación individual y los resultantes de la inactivación simultánea de ambos transportadores. Mientras que la inactivación individual de cualquiera de ellos no tiene consecuencias morfológicas evidentes, la doble inactivación ocasiona defectos en la migración de gónadas durante el desarrollo y la acumulación anormal de oocitos en la porción proximal de la gónada. El hallazgo de este fenotipo sintético como resultado de la doble inactivación es una prueba, junto a los resultados de superposición parcial de especificidades y expresión tisular, que C03H5.2 y SRF-3 son redundantes.

Otro aspecto importante de esta tesis fue el estudio de mutaciones naturales de transportadores de nucleótidos de azúcar en humanos. El Síndrome de Adhesión Leucocitaria II (LAD II) que afecta crecimiento y desarrollo neurológico es causado por mutaciones en el transportador de GDP-fucosa humano. Vesículas del aparato de Golgi preparadas a partir de fibroblastos de pacientes con LADII presentan una menor actividad de transporte que controles de vesículas preparadas a partir de individuos sanos. Sin embargo, si bien la actividad de transporte de GDP-fucosa se encuentra disminuida, en diferente grado según la mutación, existe en todos ellos cierta actividad residual que permite la fucosilación diferencial de algunas glicoproteínas. A partir de esta situación se planteó un importante interrogante respecto a la identidad de la proteína responsable de la actividad residual observada. Teniendo en cuenta que, al igual que se describió para *C.elegans*, el genoma humano contiene un mayor número de putativos transportadores de nucleótidos de azúcar que la cantidad de sustratos requeridos para la síntesis de glicoconjugados, la actividad residual observada podría deberse a otra(s) proteína(s) que está(n) llevando a cabo esa función (redundancia funcional) o bien, que las mutaciones

descritas en los pacientes sólo ocasionen una pérdida parcial de la actividad. Para responder este interrogante, se llevó a cabo la expresión heteróloga del transportador de GDP-fucosa humano salvaje y mutantes en bacterias, que carecen de dicha actividad de transporte. La reconstitución de estas proteínas en liposomas permitió evaluar la actividad intrínseca residual de las mutantes en comparación con el transportador salvaje y así determinar la necesidad o no de invocar otras proteínas para justificar la actividad residual observada en vesículas del aparato Golgi de los pacientes. En estos ensayos, se observó cierta actividad de transporte residual que además se correlaciona con la severidad clínica del síndrome observado en los pacientes. Esto permite explicar los resultados obtenidos en vesículas del aparato Golgi de fibroblastos de pacientes sin necesidad de invocar proteínas adicionales.

En resumen, en esta tesis se provee suficiente evidencia que C03H5.2 es un transportador de nucleótidos de azúcar con especificidad por UDP-*N*-acetilglucosamina y UDP-*N*-acetilgalactosamina. Los experimentos realizados demuestran que este transporte tiene lugar mediante un mecanismo novedoso según el cual los sustratos son transportados en forma simultánea e independiente. No se conoce otro ejemplo de un transportador multisustrato con este mecanismo. Además, se estudió la existencia de redundancia funcional entre C03H5.2 y SRF-3, mecanismo que asegura una adecuada provisión de nucleótidos de azúcar para la biosíntesis de glicoconjugados. Los efectos fenotípicos observados como resultado de la inactivación simultánea de estos transportadores refleja también la gran importancia de los mismos y por ende, de los glicoconjugados en general para un correcto desarrollo tisular.

Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos que sugieren que las mutaciones en el transportador de GDP-fucosa de pacientes con Síndrome de Adhesión Leucocitaria II presentan cierta actividad residual que podría justificar los niveles bajos pero existentes de fucosilación observada en estos pacientes.

Publicaciones a las que ha dado lugar este trabajo de tesis:

1- Nucleotide Sugar Transporters of the Golgi Apparatus: from Basic Science to Diseases. Carolina E. Caffaro and Carlos B. Hirschberg. *Accounts of Chemical Research*. (*En prensa*)

2- The independent and simultaneous translocation of two substrates by a nucleotide sugar transporter. Carolina E. Caffaro, Carlos B. Hirschberg, Patricia M. Berninsone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (*En prensa*)

3- Functional redundancy of *C.elegans* nucleotide sugar transporters. Carolina E. Caffaro, Carlos B. Hirschberg, Patricia M. Berninsone. (Manuscrito en preparación)

REFERENCIAS

- Abe, M., Hashimoto, H., and Yoda, K. (1999). Molecular characterization of Vig4/Vrg4 GDP-mannose transporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 458, 309-312.
- Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1987). Subcellular site of synthesis of the N-acetylgalactosamine (alpha 1-0) serine (or threonine) linkage in rat liver. *J Biol Chem* 262, 4153-4159.
- Abeijon, C., Mandon, E. C., Robbins, P. W., and Hirschberg, C. B. (1996a). A mutant yeast deficient in Golgi transport of uridine diphosphate N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271, 8851-8854.
- Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P. W., and Hirschberg, C. B. (1989). Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDPmannose transport and luminal guanosine diphosphatase activities in Golgi-like vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6935-6939.
- Abeijon, C., Robbins, P. W., and Hirschberg, C. B. (1996b). Molecular cloning of the Golgi apparatus uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter from *Kluyveromyces lactis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5963-5968.
- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E. C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C. B., and Robbins, P. W. (1993). Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 122, 307-323.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610-615.
- Alon, R., and Etzioni, A. (2003). LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol* 24, 561-566.
- Altmann, F., Fabini, G., Ahorn, H., and Wilson, I. B. (2001). Genetic model organisms in the study of N-glycans. *Biochimie* 83, 703-712.
- Ambros, V. (2000). Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 10, 428-433.
- Anderson, D. C., and Springer, T. A. (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med* 38, 175-194.
- Ashikov, A., Routier, F., Fuhlrott, J., Helmus, Y., Wild, M., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2005). The human solute carrier gene SLC35B4 encodes a bifunctional nucleotide sugar transporter with specificity for UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 280, 27230-27235.
- Bacic, A., Kahane, I., and Zuckerman, B. M. (1990). *Panagrellus redivivus* and *Caenorhabditis elegans*: evidence for the absence of sialic acids. *Exp Parasitol* 71, 483-488.
- Baeg, G. H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S., and Perrimon, N. (2001). Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 128, 87-94.
- Becker, D. J., and Lowe, J. B. (1999). Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim Biophys Acta* 1455, 193-204.
- Berninsone, P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., and Hirschberg, C. B. (1997). Functional expression of the murine Golgi CMP-sialic acid transporter in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272, 12616-12619.
- Berninsone, P., Hwang, H. Y., Zemtseva, I., Horvitz, H. R., and Hirschberg, C. B. (2001). SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N- acetylglactosamine, and UDP-galactose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3738-3743.

- Berninsone, P., Miret, J. J., and Hirschberg, C. B. (1994). The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles. *J Biol Chem* *269*, 207-211.
- Berninsone, P. M., and Hirschberg, C. B. (2000). Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol* *10*, 542-547.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-366.
- Blelloch, R., Anna-Arriola, S. S., Gao, D., Li, Y., Hodgkin, J., and Kimble, J. (1999). The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* *216*, 382-393.
- Brandan, E., and Fleischer, B. (1982). Orientation and role of nucleosidediphosphatase and 5'-nucleotidase in Golgi vesicles from rat liver. *Biochemistry* *21*, 4640-4645.
- Bredeston, L. M., Caffaro, C. E., Samuelson, J., and Hirschberg, C. B. (2005). Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* *280*, 32168-32176.
- Briles, E. B., Li, E., and Kornfeld, S. (1977). Isolation of wheat germ agglutinin-resistant clones of Chinese hamster ovary cells deficient in membrane sialic acid and galactose. *J Biol Chem* *252*, 1107-1116.
- Brockhausen, I., Moller, G., Yang, J. M., Khan, S. H., Matta, K. L., Paulsen, H., Grey, A. A., Shah, R. N., and Schachter, H. (1992). Control of glycoprotein synthesis. Characterization of (1-->4)-N-acetyl-beta-D-glucosaminyltransferases acting on the alpha-D-(1-->3)- and alpha-D-(1-->6)-linked arms of N-linked oligosaccharides. *Carbohydr Res* *236*, 281-299.
- Bulik, D. A., Wei, G., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Waldrip, W. R., Esko, J. D., Robbins, P. W., and Selleck, S. B. (2000). sqv-3, -7, and -8, a set of genes affecting morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*, encode enzymes required for glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10838-10843.
- Burke, R. D., Myers, R. L., Sexton, T. L., and Jackson, C. (1991). Cell movements during the initial phase of gastrulation in the sea urchin embryo. *Dev Biol* *146*, 542-557.
- Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60-66.
- Capasso, J. M., and Hirschberg, C. B. (1984a). Effect of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into Golgi apparatus vesicles. *Biochim Biophys Acta* *777*, 133-139.
- Capasso, J. M., and Hirschberg, C. B. (1984b). Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 7051-7055.
- Capasso, J. M., Keenan, T. W., Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1989). Mechanism of phosphorylation in the lumen of the Golgi apparatus. Translocation of adenosine 5'-triphosphate into Golgi vesicles from rat liver and mammary gland. *J Biol Chem* *264*, 5233-5240.
- Carey, D. J., Sommers, L. W., and Hirschberg, C. B. (1980). CMP-N-acetylneuraminic acid: isolation from and penetration into mouse liver microsomes. *Cell* *19*, 597-605.
- Carolina E. Caffaro, C. B. H. (in press). Nucleotide Sugar Transporters of the Golgi Apparatus: From Basic Science to Diseases. *Accounts of Chemical Research*.

- Cassada, R. C., and Russell, R. L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* *46*, 326-342.
- Chiaromonte, M., Koviach, J. L., Moore, C., Iyer, V. V., Wagner, C. R., Halcomb, R. L., Miller, W., Melancon, P., and Kuchta, R. D. (2001). Inhibition of CMP-sialic acid transport into Golgi vesicles by nucleoside monophosphates. *Biochemistry* *40*, 14260-14267.
- Cipollo, J. F., Awad, A., Costello, C. E., Robbins, P. W., and Hirschberg, C. B. (2004). Biosynthesis in vitro of *Caenorhabditis elegans* phosphorylcholine oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3404-3408.
- Cipollo, J. F., Awad, A. M., Costello, C. E., and Hirschberg, C. B. (2005). N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J Biol Chem* *280*, 26063-26072.
- Cipollo, J. F., Costello, C. E., and Hirschberg, C. B. (2002). The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans. *J Biol Chem* *277*, 49143-49157.
- Coates, S. W., Gurney, T., Jr., Sommers, L. W., Yeh, M., and Hirschberg, C. B. (1980). Subcellular localization of sugar nucleotide synthetases. *J Biol Chem* *255*, 9225-9229.
- Cooke, J., Nowak, M. A., Boerlijst, M., and Maynard-Smith, J. (1997). Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet* *13*, 360-364.
- D'Alessio, C., Caramelo, J. J., and Parodi, A. J. (2005). Absence of nucleoside diphosphatase activities in the yeast secretory pathway does not abolish nucleotide sugar-dependent protein glycosylation. *J Biol Chem* *280*, 40417-40427.
- Dean, N., Zhang, Y. B., and Poster, J. B. (1997). The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *272*, 31908-31914.
- Deutscher, S. L., and Hirschberg, C. B. (1986). Mechanism of galactosylation in the Golgi apparatus. A Chinese hamster ovary cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose across Golgi vesicle membranes. *J Biol Chem* *261*, 96-100.
- Deutscher, S. L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Briles, E. I., and Hirschberg, C. B. (1984). Translocation across Golgi vesicle membranes: a CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell* *39*, 295-299.
- Douglas, R. H., and Ballou, C. E. (1982). Purification of an alpha-N-acetylglucosaminyltransferase from the yeast *Kluyveromyces lactis* and a study of mutants defective in this enzyme activity. *Biochemistry* *21*, 1561-1570.
- Eckhardt, M., Gotza, B., and Gerardy-Schahn, R. (1998). Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *J Biol Chem* *273*, 20189-20195.
- Eckhardt, M., Gotza, B., and Gerardy-Schahn, R. (1999). Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J Biol Chem* *274*, 8779-8787.
- Etzioni, A., and Alon, R. (2004). Leukocyte adhesion deficiency III: a group of integrin activation defects in hematopoietic lineage cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *4*, 485-490.
- Etzioni, A., Frydman, M., Pollack, S., Avidor, I., Phillips, M. L., Paulson, J. C., and Gershoni-Baruch, R. (1992). Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* *327*, 1789-1792.

- Etzioni, A., Sturla, L., Antonellis, A., Green, E. D., Gershoni-Baruch, R., Berninsone, P. M., Hirschberg, C. B., and Tonetti, M. (2002). Leukocyte adhesion deficiency (LAD) type II/carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) IIc founder effect and genotype/phenotype correlation. *Am J Med Genet* 110, 131-135.
- Etzioni, A., and Tonetti, M. (2000). Fucose supplementation in leukocyte adhesion deficiency type II. *Blood* 95, 3641-3643.
- Feinberg, E. H., and Hunter, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301, 1545-1547.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S. S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.
- Fischer, A., Lisowska-Grospierre, B., Anderson, D. C., and Springer, T. A. (1988). Leukocyte adhesion deficiency: molecular basis and functional consequences. *Immunodeficiency Rev* 1, 39-54.
- Frydman, M., Etzioni, A., Eidlitz-Markus, T., Avidor, I., Varsano, I., Shechter, Y., Orlin, J. B., and Gershoni-Baruch, R. (1992). Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype. *Am J Med Genet* 44, 297-302.
- Gao, X. D., and Dean, N. (2000). Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 17718-17727.
- Gao, X. D., Nishikawa, A., and Dean, N. (2001). Identification of a conserved motif in the yeast golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J Biol Chem* 276, 4424-4432.
- Gems, D., Sutton, A. J., Sundermeyer, M. L., Albert, P. S., King, K. V., Edgley, M. L., Larsen, P. L., and Riddle, D. L. (1998). Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150, 129-155.
- Ginsburg, V. (1960). Formation of guanosine diphosphate L-fucose from guanosine diphosphate D-mannose. *J Biol Chem* 235, 2196-2201.
- Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M., and Hayashi, S. (2001). UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat Cell Biol* 3, 816-822.
- Griffitts, J. S., Haslam, S. M., Yang, T., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell, A., Adang, M. J., and Aroian, R. V. (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* 307, 922-925.
- Griffitts, J. S., Huffman, D. L., Whitacre, J. L., Barrows, B. D., Marroquin, L. D., Muller, R., Brown, J. R., Hennet, T., Esko, J. D., and Aroian, R. V. (2003). Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J Biol Chem* 278, 45594-45602.
- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 579, 5932-5939.
- Grishok, A., and Mello, C. C. (2002). RNAi (Nematodes: *Caenorhabditis elegans*). *Adv Genet* 46, 339-360.
- Grishok, A., Sinskey, J. L., and Sharp, P. A. (2005). Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes Dev* 19, 683-696.
- Guerardel, Y., Balanzino, L., Maes, E., Leroy, Y., Coddeville, B., Oriol, R., and Strecker, G. (2001). The nematode *Caenorhabditis elegans* synthesizes unusual O-linked glycans: identification of glucose-substituted mucin-type O-glycans and short chondroitin-like oligosaccharides. *Biochem J* 357, 167-182.

- Guillen, E., Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1998). Mammalian Golgi apparatus UDP-N-acetylglucosamine transporter: molecular cloning by phenotypic correction of a yeast mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7888-7892.
- Gustafson, T., and Wolpert, L. (1963). The Cellular Basis of Morphogenesis and Sea Urchin Development. *Int Rev Cytol* 15, 139-214.
- Haltiwanger, R. S., and Lowe, J. B. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 73, 491-537.
- Hard, K., Mekking, A., Kamerling, J. P., Dacremont, G. A., and Vliegthart, J. F. (1991). Different oligosaccharides accumulate in the brain and urine of a cat with alpha-mannosidosis: structure determination of five brain-derived and seventeen urinary oligosaccharides. *Glycoconj J* 8, 17-28.
- Haslam, S. M., Gems, D., Morris, H. R., and Dell, A. (2002). The glycomes of *Caenorhabditis elegans* and other model organisms. *Biochem Soc Symp*, 117-134.
- Haslam, S. M., Houston, K. M., Harnett, W., Reason, A. J., Morris, H. R., and Dell, A. (1999). Structural studies of N-glycans of filarial parasites. Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers. *J Biol Chem* 274, 20953-20960.
- Haslam, S. M., Khoo, K. H., Houston, K. M., Harnett, W., Morris, H. R., and Dell, A. (1997). Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of *Acanthocheilonema viteae*. *Mol Biochem Parasitol* 85, 53-66.
- Helmus, Y., Denecke, J., Yakubenia, S., Robinson, P., Luhn, K., Watson, D. L., McGrogan, P. J., Vestweber, D., Marquardt, T., and Wild, M. K. (2006). Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter. *Blood* 107, 3959-3966.
- Herman, T., Hartweg, E., and Horvitz, H. R. (1999). sqv mutants of *Caenorhabditis elegans* are defective in vulval epithelial invagination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 968-973.
- Herscovics, A. (1999). Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1473, 96-107.
- Hidalgo, A., Ma, S., Peired, A. J., Weiss, L. A., Cunningham-Rundles, C., and Frenette, P. S. (2003). Insights into leukocyte adhesion deficiency type 2 from a novel mutation in the GDP-fucose transporter gene. *Blood* 101, 1705-1712.
- Hirschberg, C. B. (2001). Golgi nucleotide sugar transport and leukocyte adhesion deficiency II. *J Clin Invest* 108, 3-6.
- Hirschberg, C. B., Robbins, P. W., and Abeijon, C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* 67, 49-69.
- Hirschberg, C. B., and Snider, M. D. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* 56, 63-87.
- Hoflich, J., Berninsone, P., Gobel, C., Gravato-Nobre, M. J., Libby, B. J., Darby, C., Politz, S. M., Hodgkin, J., Hirschberg, C. B., and Baumeister, R. (2004). Loss of srf-3-encoded nucleotide sugar transporter activity in *Caenorhabditis elegans* alters surface antigenicity and prevents bacterial adherence. *J Biol Chem* 279, 30440-30448.
- Hong, K., Ma, D., Beverley, S. M., and Turco, S. J. (2000). The *Leishmania* GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry* 39, 2013-2022.

- Hwang, H. Y., and Horvitz, H. R. (2002). The SQV-1 UDP-glucuronic acid decarboxylase and the SQV-7 nucleotide-sugar transporter may act in the Golgi apparatus to affect *Caenorhabditis elegans* vulval morphogenesis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14218-14223.
- Hwang, H. Y., Olson, S. K., Brown, J. R., Esko, J. D., and Horvitz, H. R. (2003a). The *Caenorhabditis elegans* genes *sqv-2* and *sqv-6*, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase II and xylosyltransferase. *J Biol Chem* *278*, 11735-11738.
- Hwang, H. Y., Olson, S. K., Esko, J. D., and Horvitz, H. R. (2003b). *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis and vulval morphogenesis require chondroitin biosynthesis. *Nature* *423*, 439-443.
- Ichikawa, S., and Hirabayashi, Y. (1998). Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* *8*, 198-202.
- Ichikawa, S., Ozawa, K., and Hirabayashi, Y. (1998). Molecular cloning and characterization of the mouse ceramide glucosyltransferase gene. *Biochem Biophys Res Commun* *253*, 707-711.
- Ishida, N., and Kawakita, M. (2004). Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflugers Arch* *447*, 768-775.
- Ishida, N., Yoshioka, S., Chiba, Y., Takeuchi, M., and Kawakita, M. (1999). Molecular cloning and functional expression of the human Golgi UDP-N-acetylglucosamine transporter. *J Biochem (Tokyo)* *126*, 68-77.
- Ishihara, H., and Heath, E. C. (1968). The metabolism of L-fucose. IV. The biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose in porcine liver. *J Biol Chem* *243*, 1110-1115.
- Ishihara, H., Massaro, D. J., and Heath, E. C. (1968). The metabolism of L-fucose. 3. The enzymatic synthesis of beta-L-fucose 1-phosphate. *J Biol Chem* *243*, 1103-1109.
- Johnson, T. E., Mitchell, D. H., Kline, S., Kemal, R., and Foy, J. (1984). Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* *28*, 23-40.
- Kearns, A. E., Vertel, B. M., and Schwartz, N. B. (1993). Topography of glycosylation and UDP-xylose production. *J Biol Chem* *268*, 11097-11104.
- Kennedy, S., Wang, D., and Ruvkun, G. (2004). A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* *427*, 645-649.
- Khare, N., and Baumgartner, S. (2000). Dally-like protein, a new *Drosophila* glypican with expression overlapping with wingless. *Mech Dev* *99*, 199-202.
- Knight, S. W., and Bass, B. L. (2002). The role of RNA editing by ADARs in RNAi. *Mol Cell* *10*, 809-817.
- Kuhn, N. J., and White, A. (1976). Evidence for specific transport of uridine diphosphate galactose across the Golgi membrane of rat mammary gland. *Biochem J* *154*, 243-244.
- Lane, M. C., Koehl, M. A., Wilt, F., and Keller, R. (1993). A role for regulated secretion of apical extracellular matrix during epithelial invagination in the sea urchin. *Development* *117*, 1049-1060.
- Liu, K. S., and Sternberg, P. W. (1995). Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* *14*, 79-89.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G., and Rice, C. M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* *442*, 831-835.

- Lubke, T., Marquardt, T., Etzioni, A., Hartmann, E., von Figura, K., and Korner, C. (2001). Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet* 28, 73-76.
- Luhn, K., Laskowska, A., Pielage, J., Klambt, C., Ipe, U., Vestweber, D., and Wild, M. K. (2004). Identification and molecular cloning of a functional GDP-fucose transporter in *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* 301, 242-250.
- Luhn, K., Wild, M. K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., and Vestweber, D. (2001). The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat Genet* 28, 69-72.
- Ma, D., Russell, D. G., Beverley, S. M., and Turco, S. J. (1997). Golgi GDP-mannose uptake requires *Leishmania* LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J Biol Chem* 272, 3799-3805.
- Marquardt, T., Brune, T., Luhn, K., Zimmer, K. P., Korner, C., Fabritz, L., van der Werft, N., Vormoor, J., Freeze, H. H., Louwen, F., *et al.* (1999). Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* 134, 681-688.
- Menetret, J. F., Hegde, R. S., Heinrich, S. U., Chandramouli, P., Ludtke, S. J., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (2005). Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J Mol Biol* 348, 445-457.
- Milla, M. E., Clairmont, C. A., and Hirschberg, C. B. (1992). Reconstitution into proteoliposomes and partial purification of the Golgi apparatus membrane UDP-galactose, UDP-xylose, and UDP-glucuronic acid transport activities. *J Biol Chem* 267, 103-107.
- Milla, M. E., and Hirschberg, C. B. (1989). Reconstitution of Golgi vesicle CMP-sialic acid and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transport into proteoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1786-1790.
- Morelle, W., Haslam, S. M., Morris, H. R., and Dell, A. (2000). Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol* 109, 171-177.
- Nishiwaki, K., Kubota, Y., Chigira, Y., Roy, S. K., Suzuki, M., Schvarzstein, M., Jigami, Y., Hisamoto, N., and Matsumoto, K. (2004). An NDPase links ADAM protease glycosylation with organ morphogenesis in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* 6, 31-37.
- Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C. B., Silva, H., and Orellana, A. (2002). Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactos/UDP-glucose transporter. *J Biol Chem* 277, 32923-32929.
- Nordeen, M. H., Jones, S. M., Howell, K. E., and Caldwell, J. H. (2000). GOLAC: an endogenous anion channel of the Golgi complex. *Biophys J* 78, 2918-2928.
- Ohyama, C., Smith, P. L., Angata, K., Fukuda, M. N., Lowe, J. B., and Fukuda, M. (1998). Molecular cloning and expression of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, a key enzyme for fucose metabolism defective in Lec13 cells. *J Biol Chem* 273, 14582-14587.
- Perez, M., and Hirschberg, C. B. (1986). Topography of glycosylation reactions in the rough endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 261, 6822-6830.
- Perez, M., and Hirschberg, C. B. (1987). Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Methods Enzymol* 138, 709-715.

- Phillips, M. L., Schwartz, B. R., Etzioni, A., Bayer, R., Ochs, H. D., Paulson, J. C., and Harlan, J. M. (1995). Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. *J Clin Invest* 96, 2898-2906.
- Puglielli, L., and Hirschberg, C. B. (1999). Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. *J Biol Chem* 274, 35596-35600.
- Puglielli, L., Mandon, E. C., Rancour, D. M., Menon, A. K., and Hirschberg, C. B. (1999). Identification and purification of the rat liver Golgi membrane UDP-N-acetylgalactosamine transporter. *J Biol Chem* 274, 4474-4479.
- Scadden, A. D. (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol* 12, 489-496.
- Schierenberg, E., Miwa, J., and von Ehrenstein, G. (1980). Cell lineages and developmental defects of temperature-sensitive embryonic arrest mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 76, 141-159.
- Segawa, H., Kawakita, M., and Ishida, N. (2002). Human and *Drosophila* UDP-galactose transporters transport UDP-N-acetylgalactosamine in addition to UDP-galactose. *Eur J Biochem* 269, 128-138.
- Segawa, H., Soares, R. P., Kawakita, M., Beverley, S. M., and Turco, S. J. (2005). Reconstitution of GDP-mannose transport activity with purified *Leishmania* LPG2 protein in liposomes. *J Biol Chem* 280, 2028-2035.
- Selva, E. M., Hong, K., Baeg, G. H., Beverley, S. M., Turco, S. J., Perrimon, N., and Hacker, U. (2001). Dual role of the fringe connection gene in both heparan sulphate and fringe-dependent signalling events. *Nat Cell Biol* 3, 809-815.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G. J., Sdicu, A. M., Thomas, D. Y., Jakob, C. A., Aebi, M., and Bussey, H. (1998). Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149, 843-856.
- Shechter, Y., Etzioni, A., Levene, C., and Greenwell, P. (1995). A Bombay individual lacking H and Le antigens but expressing normal levels of alpha-2- and alpha-4-fucosyltransferases. *Transfusion* 35, 773-776.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S. P., Nonet, M. L., Fire, A., Ahringer, J., and Plasterk, R. H. (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* 12, 1317-1319.
- Smardon, A., Spoerke, J. M., Stacey, S. C., Klein, M. E., Mackin, N., and Maine, E. M. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 10, 169-178.
- Sommers, L. W., and Hirschberg, C. B. (1982). Transport of sugar nucleotides into rat liver Golgi. A new Golgi marker activity. *J Biol Chem* 257, 10811-10817.
- Sternberg, P. W., and Felix, M. A. (1997). Evolution of cell lineage. *Curr Opin Genet Dev* 7, 543-550.
- Sturla, L., Puglielli, L., Tonetti, M., Berninsone, P., Hirschberg, C. B., De Flora, A., and Etzioni, A. (2001). Impairment of the Golgi GDP-L-fucose transport and unresponsiveness to fucose replacement therapy in LAD II patients. *Pediatr Res* 49, 537-542.

- Sturla, L., Rampal, R., Haltiwanger, R. S., Fruscione, F., Etzioni, A., and Tonetti, M. (2003). Differential terminal fucosylation of N-linked glycans versus protein O-fucosylation in leukocyte adhesion deficiency type II (CDG IIc). *J Biol Chem* 278, 26727-26733.
- Suda, T., Kamiyama, S., Suzuki, M., Kikuchi, N., Nakayama, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Aoki, T., and Nishihara, S. (2004). Molecular cloning and characterization of a human multisubstrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to *Drosophila* fringe connection. *J Biol Chem* 279, 26469-26474.
- Sulston, J. E., and Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M., and Wieschaus, E. (1991). Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development* 112, 775-789.
- Tabara, H., Grishok, A., and Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282, 430-431.
- Thomas, J. H. (1993). Thinking about genetic redundancy. *Trends Genet* 9, 395-399.
- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A. H., Holm, L. E., Nielsen, V. H., Agerholm, J. S., Arnbjerg, J., and Bendixen, C. (2006). A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res* 16, 97-105.
- Tijsterman, M., Ketting, R. F., and Plasterk, R. H. (2002). The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36, 489-519.
- Tijsterman, M., May, R. C., Simmer, F., Okihara, K. L., and Plasterk, R. H. (2004). Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 14, 111-116.
- Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Timmons, L., Tabara, H., Mello, C. C., and Fire, A. Z. (2003). Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14, 2972-2983.
- Tiralongo, J., Ashikov, A., Routier, F., Eckhardt, M., Bakker, H., Gerardy-Schahn, R., and von Itzstein, M. (2006). Functional expression of the CMP-sialic acid transporter in *Escherichia coli* and its identification as a simple mobile carrier. *Glycobiology* 16, 73-81.
- Tonetti, M., Sturla, L., Bisso, A., Benatti, U., and De Flora, A. (1996). Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *J Biol Chem* 271, 27274-27279.
- Tops, B. B., Tabara, H., Sijen, T., Simmer, F., Mello, C. C., Plasterk, R. H., and Ketting, R. F. (2005). RDE-2 interacts with MUT-7 to mediate RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 33, 347-355.
- Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., and Selleck, S. B. (2000). Structural analysis of glycosaminoglycans in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* and demonstration that tout-velu, a *Drosophila* gene related to EXT tumor suppressors, affects heparan sulfate in vivo. *J Biol Chem* 275, 2269-2275.
- Trombetta, E. (1992) Identification, Partial Characterization and Purification of Rat Liver UDP-Glc: Glycoprotein Glucosyltransferase. A New Glycoprotein Processing Reaction., University of Buenos Aires.
- Varki, A. C., R; Esko, J; Freeze, H; Hart, G; Marth, J (1999). Essentials of glycobiology (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I., and Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.
- von Andrian, U. H., Berger, E. M., Ramezani, L., Chambers, J. D., Ochs, H. D., Harlan, J. M., Paulson, J. C., Etzioni, A., and Arfors, K. E. (1993). In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. *J Clin Invest* 91, 2893-2897.
- Waldman, B. C., and Rudnick, G. (1990). UDP-GlcNAc transport across the Golgi membrane: electroneutral exchange for dianionic UMP. *Biochemistry* 29, 44-52.
- Walthall, W. W., and Chalfie, M. (1988). Cell-cell interactions in the guidance of late-developing neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 239, 643-645.
- Wang, H., Spang, A., Sullivan, M. A., Hryhorenko, J., and Hagen, F. K. (2005). The terminal phase of cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* early embryo requires protein glycosylation. *Mol Biol Cell* 16, 4202-4213.
- Wild, M. K., Luhn, K., Marquardt, T., and Vestweber, D. (2002). Leukocyte adhesion deficiency II: therapy and genetic defect. *Cells Tissues Organs* 172, 161-173.
- Xu, X., Lee, D., Shih, H. Y., Seo, S., Ahn, J., and Lee, M. (2005). Linking integrin to IP(3) signaling is important for ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 579, 549-553.
- Yamada, S., Okada, Y., Ueno, M., Iwata, S., Deepa, S. S., Nishimura, S., Fujita, M., Van Die, I., Hirabayashi, Y., and Sugahara, K. (2002). Determination of the glycosaminoglycan-protein linkage region oligosaccharide structures of proteoglycans from *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 277, 31877-31886.
- Yamada, S., Van Die, I., Van den Eijnden, D. H., Yokota, A., Kitagawa, H., and Sugahara, K. (1999). Demonstration of glycosaminoglycans in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 459, 327-331.
- Yurchenco, P. D., and Atkinson, P. H. (1977). Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells. *Biochemistry* 16, 944-953.