

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE CONTROL DE CALIDAD
DE PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEINAS EN *TRYPANOSOMA CRUZI***

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

Ianina Laura Conte

Director: Dr. Armando J. Parodi

Director Asistente: Dr. Julio J. Caramelo

Consejera de Estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2007

a Pablo

Agradecimientos

Al Director de esta tesis, Dr. Armando Parodi por su comprensión, su paciencia, su generosidad y su ejemplo.

Al Director Asistente, Dr. Julio Caramelo por haberme hecho partícipe de sus proyectos y por brindarme su ayuda siempre que la necesité.

A mi Consejera de Estudios, Dra. Ángeles Zorreguieta por estar siempre abierta al diálogo y por su apoyo.

Al Dr. Carlos Labriola por todo lo que me enseñó.

A mis compañeros de laboratorio por hacer distinto lo cotidiano.

Al personal de apoyo del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de San Martín (IIB- UNSAM) y de la Fundación Instituto Leloir (FIL) por hacer más sencillo mi trabajo de todos los días.

Al IIB- UNSAM, la FIL y la Universidad de Buenos Aires por haberme permitido realizar este trabajo.

Al Ministerio de Salud de la Nación y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el sustento económico.

A mis padres por todo lo que me brindaron, por haberme dado la extraordinaria oportunidad de educarme y por todo su esfuerzo para que eso fuera posible.

A mis amigos por su apoyo y aliento.

A Pablo. Por ser como sos, maravilloso.

Índice

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE.....	4
RESUMEN	7
SUMMARY	10
ABREVIATURAS	13
PARTE I.....	16
ESTUDIO DEL ROL DE LAS CHAPERONA-LECTINAS EN LA PATOGENICIDAD DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
LOS TRIPANOSOMÁTIDOS Y <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	18
<i>Perspectiva general de la enfermedad de Chagas</i>	20
<i>Ciclo de vida de T. cruzi</i>	23
<i>Aspectos peculiares de la biología celular de T. cruzi</i>	27
CONTROL DE CALIDAD Y PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS EN EL CAMINO SECRETORIO	29
<i>La maquinaria de plegamiento de proteínas del RE</i>	32
<i>La N-glicosilación de proteínas</i>	33
<i>Formación del glicano precursor</i>	35
<i>Reacciones de procesamiento del glicano en el retículo endoplásmico</i>	38
<i>La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa</i>	39
<i>Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas</i>	44
<i>Reacciones de procesamiento del glicano en el aparato de Golgi</i>	47
EL CAMINO SECRETORIO EN <i>T. CRUZI</i>	49
<i>La N-glicosilación en tripanosomátidos</i>	51
<i>Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas</i>	54
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	61
CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	62
TRANSFECCIÓN DE PARÁSITOS Y SELECCIÓN	62
ENSAYOS DE CAPACIDAD INFECTIVA	63
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	63
CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA GT DE <i>T. CRUZI</i>	64
CONSTRUCCIONES PARA LA INTERRUPCIÓN DE GENES.....	64
PREPARACIÓN DE DNA GENÓMICO	66
SOUTHERN BLOT.....	67

SONDAS	68
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	68
MARCACIÓN POR PULSO Y CAZA DE CÉLULAS DE T. CRUZI	68
PURIFICACIÓN DE CRUZIPAÍNA LISOSOMAL	69
INMUNOPRECIPITACIONES	70
ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A NITROCELULOSA	70
OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS	70
REVELADO DE FILTROS DE NITROCELULOSA CON SUEROS	71
CINÉTICAS CON CICLOHEXIMIDA DE CÉLULAS DE T. CRUZI	71
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	72
ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	72
<i>Medida de actividad de glucosiltransferasa in vitro</i>	72
<i>Medida de actividad de glucosiltransferasa in vivo</i>	72
<i>Medida de actividad de oligosacariltransferasa</i>	73
<i>Medida de actividad de glucosidasa II</i>	73
<i>Medida de actividad de cruzipaína</i>	74
<i>Medida de actividad de manosidasa</i>	74
<i>Medida de actividad de piruvato quinasa (PK)</i>	74
RESULTADOS	75
CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA GT DE T. CRUZI Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ENZIMA.....	76
GENERACIÓN DE MUTANTES DE T. CRUZI NULOS EN GT.....	81
CARACTERIZACIÓN DE LOS T. CRUZI MUTANTES NULOS EN GT.....	84
EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD, EL CRECIMIENTO Y LA CAPACIDAD INFECTIVA DE LOS T. CRUZI GT ⁻	86
EFFECTO DE LA AUSENCIA DE GT EN EL CONTENIDO DE GLICOPROTEÍNAS.....	88
EFFECTO DE LA AUSENCIA DE GT EN LA INTERACCIÓN CRT:GLICOPROTEÍNA	89
CRT NO INTERACCIONA CON CZ NO GLUCOSILADA	90
LA AUSENCIA DE GT PROLONGA LA INTERACCIÓN GRP78/BiP- CZ	92
DISCUSIÓN.....	94
PARTE II	103
INTRODUCCIÓN	104
FUNCIONES DE CRT EN EL RE.....	106
ESTRUCTURA DE CNX Y CRT Y SITIOS DE UNIÓN	107
FUNCIONES DE CRT FUERA DEL RE	112
LA CRT DE TRYPANOSOMA CRUZI	115
OBJETIVOS	117

MATERIALES Y MÉTODOS	119
MATERIALES	120
OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CRT RECOMBINANTE	120
CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE CRT Y CRT- Δ C	121
MARCACIÓN DE GLICOPÉPTIDOS CON FITC.....	121
EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y GLICOSILACIÓN DEL CI2	121
ESTABILIDAD PROTEICA	123
MEDIDAS DE UNIÓN	124
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CHAPERONA IN VITRO.....	125
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE CHAPERONA IN VIVO	126
MEDIDA DE ACTIVIDAD DE GT	126
EFFECTO DEL CALCIO EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE CRT	127
RESULTADOS	128
LA UNIÓN DEL CALCIO Y LA DEL GLICANO ESTABILIZAN A CRT DE FORMA INDEPENDIENTE.....	129
LA ACTIVIDAD LECTINA DE CRT NO DEPENDE DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO.....	132
LA UNIÓN IN VITRO DE GLICOPROTEÍNAS A CRT NO DEPENDE DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO.....	137
LAS ACTIVIDADES IN VITRO COMO CHAPERONA DE CRT SON INDEPENDIENTES DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO .	139
LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN EL RE NO AFECTA LA ASOCIACIÓN IN VIVO ENTRE CRT Y GLICOPROTEÍNAS EN PROCESO DE PLEGAMIENTO	140
¿PARTICIPA CRT EN ALIVIA LA INHIBICIÓN POR PRODUCTO DE GT?	142
EL MOVIMIENTO DE CALCIO AFECTA LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE CRT.....	143
DISCUSIÓN	146
REFERENCIAS.....	154

Resumen

ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE CONTROL DE CALIDAD DE PLEGAMIENTO DE GLICOPROTEINAS EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

El retículo endoplásmico (RE) es el compartimiento celular donde las proteínas que son secretadas o las que residen a lo largo de las vías endo y exocíticas o en la membrana plasmática se pliegan y sufren diversas modificaciones postraduccionales. Para evitar que las proteínas viajen por el camino secretorio sin haber adquirido su conformación nativa, el RE cuenta con sistemas de control de calidad de plegamiento (QC) capaces de distinguir los polipéptidos mal plegados y retenerlos en el RE para que eventualmente se plieguen o terminen siendo degradados. Uno de los principales sistemas de QC depende de la presencia de un *N*-glicano unido a la proteína que se está plegando. El glicano que se transfiere cotraduccionalmente al polipéptido naciente en la mayoría de las células eucariotas tiene la estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Los dos primeros residuos de glucosa son escindidos por acción de las glucosidasas I y II (GI y GII). El glicano monoglucosilado resultante (G1M9N2) es reconocido por dos lectinas residentes del RE, la calnexina (CNX) y la calreticulina (CRT). Esta interacción se interrumpe cuando la GII remueve la glucosa restante pero puede restituirse gracias a la acción de otra enzima residente del RE, la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT). La GT vuelve a glucosilar sólo a aquellas glicoproteínas que no adquirieron su conformación nativa permitiendo su unión con las lectinas y así aumentando sus posibilidades de plegarse correctamente.

En *Trypanosoma cruzi* se han identificado los tres componentes que forman el sistema de QC de glicoproteínas, GT, GII y CRT (este organismo no posee CNX). En este parásito, a diferencia de lo que ocurre en células de mamíferos, G1M9N2 sólo se forma por acción de la GT, puesto que el glicano transferido a las proteínas nascentes no contiene residuos de glucosa. Dada la gran importancia que diversas glicoproteínas poseen para el ciclo de vida de este parásito, se decidió estudiar si el facilitamiento del plegamiento mediado por CRT de la cruzipaina (CZ), uno de los factores de virulencia de *T. cruzi*, era esencial para la viabilidad, diferenciación y

capacidad infectiva del parásito. Para ello, se identificó y secuenció el gen que codifica para la GT y se obtuvieron *T. cruzi* mutantes nulos para este gen. Así, se comprobó que la eliminación del sistema de QC de glicoproteínas no afectó el crecimiento de la forma epimastigote del parásito, aunque redujo la capacidad infectiva de la forma trypomastigote. El contenido celular de CZ sólo disminuyó parcialmente (5-20%) a pesar de que en células salvajes más del 90% de estas moléculas interaccionan con CRT. En los *T. cruzi* carentes de GT no pudo detectarse interacción entre CRT y CZ aún en condiciones muy suaves de inmunoprecipitación sin embargo se verificó un retraso en la llegada de la proteinasa a los lisosomas. Este retraso se debió a la inducción del sistema alternativo de QC basado en BiP/Grp78, cuya interacción con CZ se prolongó. Estos resultados ponen de manifiesto la gran plasticidad de la maquinaria de plegamiento del RE, la cual le permite al parásito sobreponerse a la falta del sistema de QC específico para glicoproteínas.

Por otra parte, además de su función como chaperona, CRT es la principal proteína de unión de calcio en el RE. Dado que el nivel de calcio del RE fluctúa de forma considerable se estudió la relación entre ambas funciones de la CRT. La afinidad de CRT por G1M9N2 determinada por equilibrio de diálisis y por anisotropía de fluorescencia no se afectó con modificación de la concentración de calcio presente en el medio. La unión de CRT a neoglicoproteínas que presentan una conformación nativa o de tipo glóbulo fundido también fue independiente de la concentración del ión. En este mismo sentido, se comprobó que el calcio y G1M9N2 estabilizan a CRT frente a la desnaturalización térmica o inducida por urea de manera independiente y aditiva. Además, la capacidad de CRT de inhibir la agregación de IgY desnaturalizada tampoco se modificó al variar los niveles de calcio. En una aproximación *in vivo*, se observó que al disminuir los niveles de calcio del RE de *T. cruzi* no se altera la unión entre CRT y CZ. Estas observaciones demuestran que las funciones de chaperona y de unión de calcio de CRT son mutuamente independientes.

Por último, se observó que la variación de los niveles de calcio del RE afectaba la localización subcelular de CRT, provocando un aumento de la concentración de esta en el citosol.

Palabras claves: retículo endoplásmico, *N*-glicosilación, control de calidad de plegamiento, chaperona, UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa, calreticulina, calcio, cruzipaina, *Trypanosoma cruzi*.

Summary

ON THE COMPONENTS OF THE GLYCOPROTEIN FOLDING QUALITY CONTROL SYSTEM IN *TRYPANOSOMA CRUZI*

The endoplasmic reticulum (ER) is the site of folding for proteins destined for compartments of the secretory and endocytic pathways, the plasma membrane and secretion. Only native proteins are released from the ER. Folding intermediates, orphan subunits of oligomeric complexes, and misfolded polypeptides are retained in the ER and eventually forwarded to degradation in a complex series of events denominated Quality Control (QC). *N*-glycans are directly involved in QC. *N*-glycosylation occurs in most eukaryotic cells by addition of a preassembled core glycan (Glc₃Man₉GlcNAc₂) to nascent polypeptides emerging into the ER lumen. Rapid trimming of the two outermost glucose residues by ER-resident enzymes glucosidases I (GI) and glucosidase II (GII) generates a monoglucosylated protein bound *N*-glycan (G1M9N2) which is recognized by the ER lectins calnexin (CNX) and calreticulin (CRT). Release from CNX/CRT is followed by GII cleavage of the innermost glucose residue. The folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glycosyltransferase (GT) adds back a terminal glucose to promote re-association of non-native polypeptides with the lectins, thus prolonging their retention in the ER folding environment.

The three components involved in QC of glycoprotein folding, *i.e.* GT, GII and CRT, have been described in *Trypanosoma cruzi* (this parasite lacks CNX). However, contrary to what happens in most eukaryotic cells, in trypanosomatid protozoa G1M9N2 is exclusively formed by GT action because unglucosylated *N*-glycans are transferred to nascent polypeptides. The gene coding for GT was identified and sequenced. Even though several of this parasite glycoproteins have been identified as essential components of differentiation and mammalian cell invasion processes, disruption of both GT-encoding alleles did not affect cell growth rate of epimastigote form parasites and partially affected differentiation and mammalian cell invasion of the trypomastigote form. The cellular content of one of the already identified *T. cruzi* glycoprotein virulence factors (cruzipain, CZ, a

lysosomal proteinase) only showed a partial (5-20%) decrease in GT null mutants in spite of the fact that >90% of all CZ molecules interacted with CRT during their folding process in wild-type cells. Although extremely mild cell lysis and immunoprecipitation procedures were used, no CRT-CZ interaction was detected in GT-null mutants, but secretion of the proteinase was nevertheless delayed because of a lengthened interaction with BiP/Grp78 probably caused by the detected induction of this chaperone in GT null mutants. This result provides a rationale for the absence of a more drastic consequence of GT absence. It was concluded that *T. cruzi* ER folding machinery presents an exquisite plasticity that allows the parasite to surmount the absence of the glycoprotein-specific folding facilitation mechanism.

Besides being a chaperone, CRT is one of the main calcium buffers in the cell. Here, we study the interplay between these roles of CRT. The affinity of CRT for G1M9N2 measured in solution by equilibrium dialysis or fluorescence anisotropy was not affected by the absence of calcium. Binding of CRT to monoglucosylated neoglycoproteins displaying either native or molten globule-like conformations was also independent of calcium concentrations. Moreover, calcium and G1M9N2 stabilized CRT structure in an apparent additive, independent manner when the protein was subjected to thermal or urea-induced denaturation. In addition, the ability of CRT to decrease the level of aggregation of a chemically denatured monoglycosylated and nonglycosylated IgY was also independent of calcium level. From an *in vivo* point of view, a decrease in ER calcium concentration in *T. cruzi* cells did not alter CRT-CZ binding. Thus, chaperone and calcium binding activities of CRT are independent.

On the other hand, changes in ER calcium levels influenced CRT location, leading to an increase in CRT in the cytosol of *T. cruzi* cells.

Key words: Endoplasmic reticulum, *N*-glycosylation, folding quality control, chaperones, UDP-Glc-glycoprotein glucosyltransferase, calreticulin, calcium, cruzipain, *Trypanosoma cruzi*.

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

The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum.

Ianina Conte, Carlos Labriola, Juan J. Cazzulo, Roberto Docampo and Armando J. Parodi.

Molecular Biology of the Cell, 2003, 14, 3529-3540

The interplay between calcium and the *in vitro* lectin and chaperone activities of calreticulin.

Ianina L. Conte, Natasha Keith, Clara Gutiérrez-González, Armando J. Parodi and Julio J. Caramelo.

Biochemistry, 2007, aceptado para su publicación.

Abreviaturas

α - man	α - manosidasa lisosomal
ANS	ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico
BHT	Infusión cerebro corazón
BiP	chaperona de la familia Hsp70 residente del retículo endoplásmico
CD	dicroísmo circular
CI2	inhibidor de quimotripsina 2
CNX	calnexina
ConA	concanavalina A
CRT	calreticulina
CZ	cruzipaína
DNJ	1-deoxinojirimicina
CST	castanospermina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dol	dolicol
DTT	ditiotreitól
E-64	<i>trans</i> -epoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	ácido etilenglicol tetraacético
Endo H	endo- β -N-acetilglucosamidasa H
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERGIC	Endoplasmic Reticulum-Golgi intermediate compartment
ERp57	proteína de 57 kDa residente en el retículo endoplásmico
EST	Expressed Sequence Tag
FITC	isotiocianato de fluoresceína
G1M9N2	Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂
G1M8N2	Glc ₁ Man ₈ GlcNAc ₂
G1M7N2	Glc ₁ Man ₇ GlcNAc ₂
G3M9N2	Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂

G418	geneticina
GAP	secuencia del 5'UTR del gen de la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa de <i>T. cruzi</i>
GI	glucosidasa I
GII	glucosidasa II
GT	UDP-Glc:glucoproteína glucosiltransferasa
Higromicina	higromicina fosfotransferasa
HPLC	Cromatografía de alta resolución
HRP	peroxidasa de rábano picante
IgY	Inmunoglobulina Y de yema de huevo
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Benturi
M9N2	Man ₉ GlcNAc ₂
MHC I	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
Neo	Neomicina fosfotransferasa
NP-40	Nonidet P-40
OT	dolicoldifosfatoglicano:proteína oligosacariltransferasa
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	solución reguladora fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDI	proteína disulfuro isomerasa
PF-IgY	Ig Y deglicosilada
PK	piruvato kinasa
PM	peso molecular
QC	control de calidad
RE	retículo endoplásmico
SBA	aglutinina de soja
SDS	dodecilsulfato de sodio
SRP	partícula de reconocimiento de la señal
Sulfo-SMCC	sulfosuccinimidil 4-(<i>N</i> -maleimidometil)ciclohexano

carboxilato

TAE	solución reguladora tris-acetato-EDTA
TBS	solución salina regulada con tris pH 7,6
TBS-T	TBS conteniendo 0,05% de Tween 20
TCA	ácido tricloroacético
TE	solución reguladora tris-EDTA
TGF β	factor transformante del crecimiento celular β
UPR	Unfold Protein Response, respuesta al estrés del RE
UV	ultravioleta

Parte I

Estudio del rol de las chaperona-lectinas en la patogenicidad de *Trypanosoma cruzi*

Introducción

Los tripanosomátidos y Trypanosoma cruzi

El orden Kinetoplastida está compuesto por un grupo diverso de protozoarios flagelados que evolucionaron a partir de un linaje antiguo, al menos unos 500 millones de años atrás y cuyas raíces se pueden ubicar cerca de la base del árbol de los eucariotas (Figura 1.1) (Baldauf y Palmer 1993; Hannaert y col. 2003). El nombre que reciben fue acuñado dada la presencia en estos organismos de una estructura visible al microscopio óptico como gránulos basófilos ubicados cerca del cuerpo basal del flagelo, que se denominó kinetoplasto (Vickerman 1976). El kinetoplasto constituye la masa de DNA mitocondrial. Dentro de este amplio orden se incluyen organismos de vida libre y también muchos parásitos de plantas, invertebrados y mamíferos.

La familia Trypanosomatidae puede dividirse en dos grandes grupos: el que incluye varios géneros monogénéticos (parásitos de invertebrados, principalmente insectos) como *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* y el de géneros digénéticos (parásitos con alternancia evolutiva en hospedadores invertebrados y vertebrados) como *Leishmania* y *Trypanosoma*.

Los tripanosomátidos tienen relevancia médica y económica por ser agentes causales de diversas patologías en animales, incluyendo al hombre. Por ejemplo, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma vivax* son los causantes del nagana en África, una enfermedad que afecta al ganado vacuno, mientras que el *Trypanosoma evansi* causa el sura, que afecta a camellos y caballos. Por otra parte, en humanos, la enfermedad del sueño es causada por dos subespecies morfológicamente indistinguibles, el *Trypanosoma brucei gambiense* y el *Trypanosoma brucei rhodesiense* que se distribuyen en África occidental y oriental, respectivamente. Diversas formas de leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral) son producidas por alrededor de 21 de las 30 especies que constituyen el género *Leishmania*. Estas diferentes especies no pueden ser distinguidas morfológicamente pero se pueden diferenciar mediante análisis de isoenzimas, métodos moleculares o anticuerpos monoclonales.

El organismo que se empleó en este trabajo de tesis es el *Trypanosoma cruzi* que es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

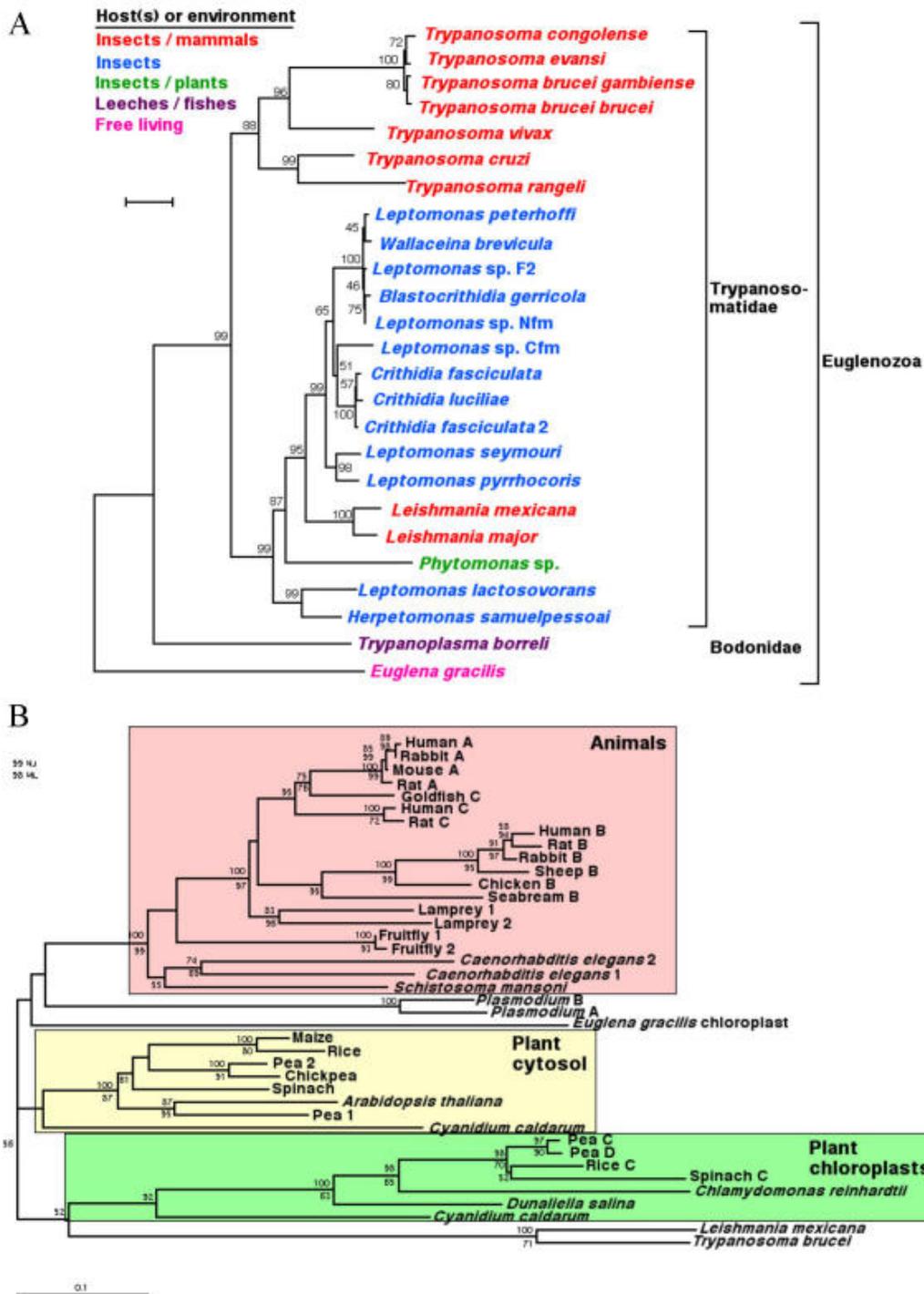


Figura 1.1: Los tripanosomátidos. A, Árbol de máxima aproximación basado en la secuencia de nucleótidos de las gliceraldehído fosfato deshidrogenasas. En colores se destacan el/los hospedadores o el ambiente donde se desarrolla cada microorganismo. B, Árbol filogenético de las aldolasas de eucariotes (Hannaert y col. 2003)

Perspectiva general de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana constituye un importante problema sanitario en América. Aunque descrita inicialmente en 1909 por Carlos Chagas, ya se la puede detectar en momias andinas datadas en 4000 años a.C. (Guhl y col. 1999). La expansión geográfica de la enfermedad comenzó a finales del siglo XIX y alcanzó un pico en la primera mitad del siglo XX. El área de dispersión del *T. cruzi* abarca gran parte del continente americano, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos de América hasta la provincia de Río Negro en Argentina. Sin embargo, debido al reciente aumento de la migración desde los países en donde la enfermedad es endémica hacia los países desarrollados, la amenaza de la patología se ha expandido hasta alcanzar regiones foráneas a sus límites geográficos tradicionales (Prata 2001).

La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 360 millones de personas viven en áreas endémicas y que al menos 90 millones (25%) tienen riesgo de presentar una infección aguda, principalmente en poblaciones rurales como consecuencia de la vinculación que existe entre la proliferación de los vectores y la precariedad de las viviendas, en las cuales los insectos pueden alimentarse, guarecerse y proliferar. Aproximadamente 20 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi*, elevándose a 60 mil la tasa anual de mortalidad causada por esta enfermedad (WHO 2002). Se estima que en nuestro país existen aproximadamente unos 3 millones de individuos con infección chagásica, de los cuales alrededor de un 10% presenta manifestaciones clínicas.

El principal mecanismo de transmisión del *T. cruzi* al hombre y otros mamíferos es el vectorial y los insectos triatomíneos del género *Triatoma* y *Rhodnius* son los vectores más importantes. La mayoría de las personas adquiere la enfermedad cuando el excremento y la orina de estos insectos hematófagos infectados entran en contacto con la piel o la mucosa. *T. cruzi* penetra fácilmente por la mucosa oral o la del ojo pero no por la piel sana, sin embargo, puede utilizar la perforación producida por la picadura del insecto o incluso la piel rascada, pues generalmente la picadura del insecto causa comezón.

La enfermedad también puede transmitirse a través de transfusiones con sangre infectada o de manera congénita a través de la placenta y si bien la incidencia de estas vías es menor, son de gran importancia.

La infección aguda muchas veces puede pasar desapercibida pues cursa con síntomas generales tales como fiebre, linfadenopatías y sarpullido, aunque puede llegar a ser letal por meningoencefalitis o miocarditis aguda, en particular en niños muy pequeños. Sin embargo, otras veces las manifestaciones clínicas facilitan el diagnóstico pues se presenta una inflamación edematosa característica en el sitio de la infección (chagoma) y cuando la entrada se produce a través de la conjuntiva ocular ocurre el signo de Romana que se presenta como un edema palpebral unilateral frecuentemente acompañado de conjuntivitis y agrandamiento del nódulo linfático local. Comúnmente, la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica, que puede tener un gran espectro de manifestaciones clínicas que van desde pacientes asintomáticos hasta otros, un 25 a 30% de los casos, con graves complicaciones cardíacas o agrandamiento del esófago y del colon que provocan un severo debilitamiento y finalmente la muerte del individuo. Más detalles respecto a la caracterización clínica de la enfermedad pueden encontrarse en (Dutra y col. 2005) y las referencias allí citadas.

Durante muchos años estuvo ampliamente difundida la idea que un fenómeno autoinmune era el principal factor determinante de la patología en la fase crónica, sin embargo, recientemente se ha enfatizado la importancia de la persistencia del parásito y las sostenidas reacciones inflamatorias que provoca en los tejidos infectados junto con un desbalance en la respuesta inmune como responsables de la patología en el largo plazo (Kalil y Cunha-Neto 1996; Tarleton 2001; Engman y Leon 2002). Por ello, la eliminación del *T. cruzi* de los pacientes podría ser un prerrequisito para detener la evolución de la enfermedad. Lamentablemente, las únicas drogas disponibles contra este organismo son las que ya se habían registrado hace 22 años: el nifurtimox y el benznidazol, que fueron desarrolladas empíricamente en los años 1960s y 1970s. El nifurtimox es un nitrofurano de acción tripanosida, activo fundamentalmente contra los trypomastigotes circulantes. El

mecanismo de acción involucra un metabolismo reductivo que lleva a la formación de radicales libres del oxígeno altamente tóxicos (Packchanian 1953). El benzimidazol, por su parte, es un 5'-nitroimidazol que funcionaría a través de la unión a macromoléculas produciendo daño a nivel de DNA. Estos compuestos tienen hasta un 80% de eficacia en la fase aguda pero muestran una limitada actividad durante la fase crónica y su uso no es recomendado porque tienen serios efectos colaterales y son potenciales mutágenos y carcinógenos (Sosa Estani y col. 1998). Es por ello que el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos se ha convertido en una problemática de carácter urgente (Barrett y col. 2003).

La mejor comprensión de la biología del parásito ha permitido en los últimos años aproximaciones más racionales al tratamiento de la enfermedad (Croft y col. 2005). Dado que *T. cruzi* posee numerosas características estructurales y metabólicas que lo diferencian de sus hospedadores mamíferos, la explotación de dichas divergencias para el desarrollo de nuevas drogas destinadas al tratamiento de la enfermedad es actualmente tema de investigación de numerosos grupos científicos. Esto ha permitido que, próximamente, ciertos derivados del triazol, los cuales funcionan como inhibidores de la biosíntesis del ergosterol actuando a nivel de la C14- α -esterol demetilasa, entren en ensayos clínicos (Urbina y Docampo 2003). Entre los agentes cuyo desarrollo preclínico está más avanzado están las vinil-sulfonas que son inhibidores de la cruzipaina (CZ), una proteasa de *T. cruzi* (Cazzulo 2002) y los N-alkil-bifosfonatos, inhibidores de la farnesilpirofosfato sintasa que se acumula en los acidocalcisomas (Urbina y Docampo 2003; Garzoni y col. 2004). Existen otros compuestos prometedores como inhibidores de la síntesis y el metabolismo de la trypanotina (Schmidt y Krauth-Siegel 2002), de la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, de la escualeno sintasa o de la óxidoescualeno ciclasa (Urbina y Docampo 2003).

Cabe aclarar que el punto más directo para el manejo de la transmisión de la enfermedad es el *control del vector*. La enfermedad de Chagas, tal como se mencionó anteriormente es una patología peridomiciliaria, dado que la mayor parte de las personas infectadas fueron picadas por el insecto vector dentro de su propia

vivienda. Los triatominos residen en lugares oscuros, grietas en los muros y techos de paja de viviendas precarias. Por lo tanto, la reparación de dichas grietas, o el reemplazo de los muros y techos por planchas de chapa corrugada, madera o cemento, convierte a estas viviendas en medios hostiles para el insecto vector. La adición de insecticidas (piretroides sintéticos) de liberación lenta en pinturas, la aplicación directa de los mismos por aspersion y la utilización de formulaciones que generan humo, son también extensamente usados para el control del vector. A esto también debe sumársele la implementación de *planes de educación para la salud* para las personas residentes en lugares endémicos. Los países latinoamericanos afectados por esta patología han implementado numerosas campañas con las características antes mencionadas para el control vectorial. Esto ha llevado hoy en día, a que la transmisión vectorial haya sido eliminada en Uruguay y Chile, y en numerosas partes de Brasil y Argentina. Informes del año 1999 en los cuales se estima el número de personas infectadas, sugieren que hay una disminución en la prevalencia de la enfermedad (Dias y col. 2002).

Ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi sufre marcados cambios morfológicos a medida que atraviesa los diversos estadios de desarrollo de su ciclo de vida. Las formas que adopta están íntimamente relacionadas con el hábitat en los que se desarrolla. Cada forma se mantiene gracias a una red de microtúbulos subpeliculares que subyace a la membrana plasmática. Es la presencia o ausencia del flagelo libre y su posición respecto al núcleo lo que determina su característica morfológica (Figura 1.2).



Figura 1.2: Representación de los principales estadios de *T. cruzi*. Se distinguen por la forma de la célula, y la presencia y posición del flagelo respecto del núcleo. El trypomastigote puede encontrarse en la sangre del hospedador mamífero, el epimastigote en el insecto vector y el amastigote es la forma intracelular (Docampo y col. 2005).

El **trypomastigote metacíclico** es la forma que se desarrolla en el intestino posterior del insecto vector (Figura 1.3). Es alargado, de unos 20 μm de longitud, presentando el kinetoplasto detrás del núcleo y un flagelo que emerge por el extremo anterior dando la impresión óptica de poseer una membrana ondulante. Cuando el triatomino se alimenta de la sangre del hospedador mamífero, el parásito en este estadio es depositado en las heces y penetra a través de la piel lesionada para pasar al torrente sanguíneo. El trypomastigote metacíclico es una forma no replicativa pero capaz de invadir una amplia variedad de tipos celulares (Brenner 1973). El trypomastigote emplea diversas moléculas de su superficie para unirse a la célula de mamífero. Estas moléculas pertenecen a la familia de las sialidasas, las cuales están glicosiladas y permanecen unidas a la membrana plasmática del parásito a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Teixeira y Yoshida 1986; Schenkman y col. 1988; Yoshida y col. 1990). No se ha logrado identificar aún a qué receptor de la célula de mamífero se unen las sialidasas aunque se ha propuesto que la β_1 -integrina y el receptor del factor transformante del crecimiento celular $-\beta$ (TGF β) podrían estar involucrados (Fernandez y col. 1993; Ming y col. 1995). Por otro lado, los carbohidratos también podrían participar en la unión entre el trypomastigote y la célula de mamífero. En este proceso intervendrían residuos de manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico (Henriquez y col. 1981; Villalta y Kierszenbaum 1984; de Titto y Araujo 1987; Villalta y col. 1993). El parásito es capaz de manipular

la concentración de calcio intracelular de la célula a invadir por medio, principalmente, de un péptido soluble que requiere de la actividad serina hidrolasa de la oligopeptidasa B para generarse (Dorta y col. 1995; Burleigh y col. 1997; Caler y col. 1998). El aumento del calcio intracelular provoca un reclutamiento de lisosomas que se fusionan con la membrana plasmática, permitiéndole la entrada al parásito dentro del compartimiento vacuolar que se forma (Tardieux y col. 1992; Rodriguez y col. 1995; Rodriguez y col. 1996; Rodriguez y col. 1997). Cuando esta vacuola se acidifica, resultado de una posterior fusión con lisosomas, el parásito libera una hemolisina que le permite escapar hacia el citoplasma (Figura 1.4) (Andrews y col. 1990; Ley y col. 1990; Hall y col. 1992).

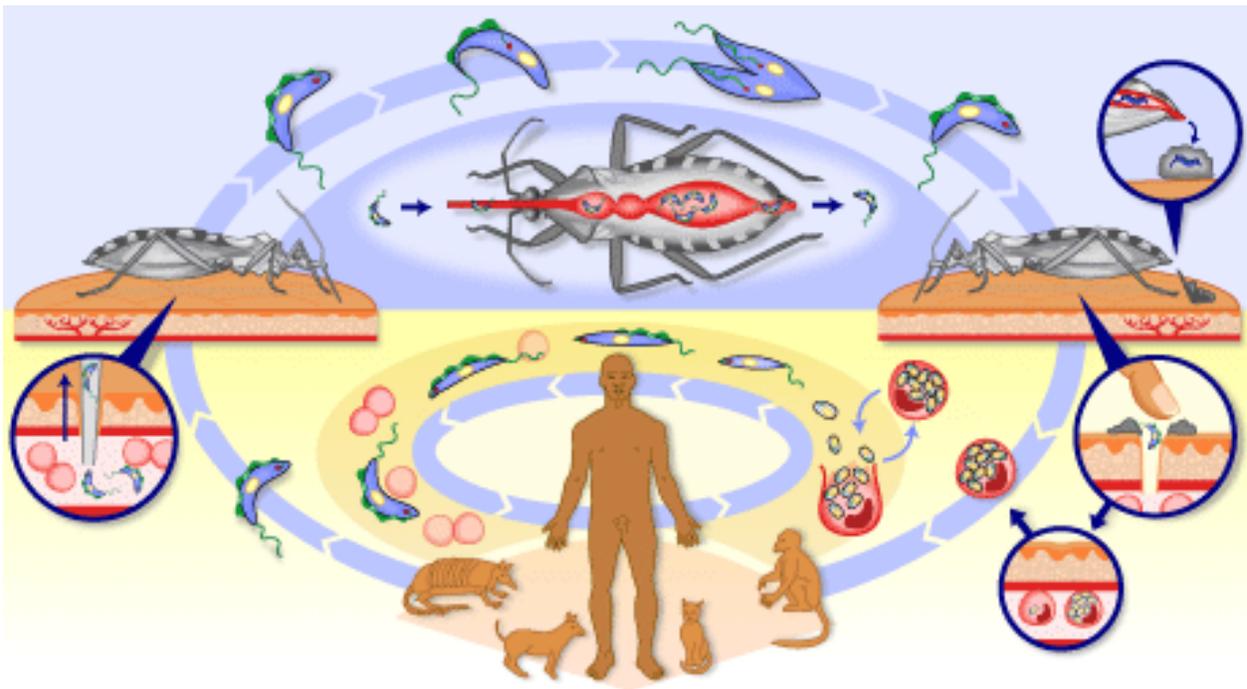


Figura 1.3: Ciclo de vida de *T. cruzi*. En el intestino del insecto vector el *T. cruzi* adopta la forma epimastigote que le permite replicarse y luego diferenciarse a la forma trypomastigote que es la que se deposita en la heces cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero. El trypomastigote es capaz de invadir diversos tipos de células y cuando alcanza el citoplasma de estas se diferencia a amastigote y se divide. Luego se diferencia a trypomastigote sanguíneo que puede invadir nuevas células y también ser ingerido por el insecto junto con la sangre. En el aparato digestivo de este se diferencia a epimastigote y se reinicia el ciclo.

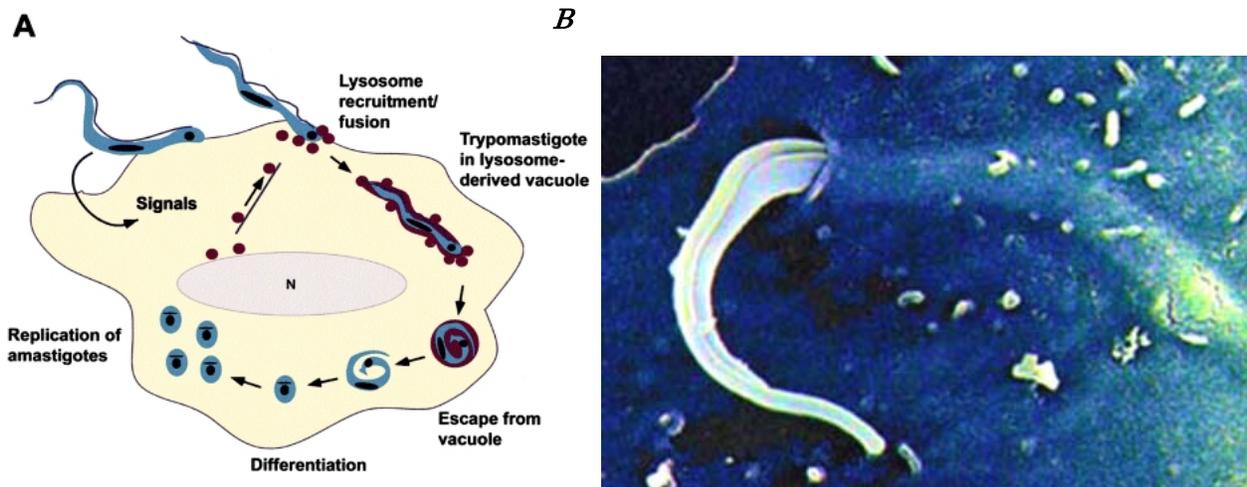


Figura 1.4: Invasión de *T. cruzi* a una célula de mamífero. *A*, Representación esquemática del ciclo intracelular de infección. Los trypomastigotes se asocian con la superficie de la célula y disparan caminos de señalización que provocan el reclutamiento localizado de lisosomas que se fusionan con la membrana plasmática y llevan a la formación de una vacuola que contiene al parásito. Este rompe la vacuola y se libera al citoplasma donde se diferencia a amastigote y comienza a dividirse 24 h después de la invasión (Burleigh y Woolsey 2002). *B*, Microscopía electrónica de un trypomastigote invadiendo una célula.

Una vez que alcanza el citoplasma el trypomastigote se diferencia a **amastigote** (Figura 1.3). En este estadio el parásito es esférico con un diámetro de 2 a 4 μm y su flagelo no alcanza a emerger del bolsillo flagelar. Esta forma se divide por fisión binaria y puede originar 512 células hijas al cabo de 9 divisiones sucesivas (Dvorak 1975). Cuando alcanzan esta alta multiplicidad, los amastigotes se diferencian a **trypomastigotes sanguíneos** que son morfológicamente semejantes a los metacíclicos, y como estos, también pueden invadir diversos tipos celulares, diseminando de esta forma la infección por todo el organismo (Figura 1.2). Si bien existe semejanza morfológica entre los trypomastigotes metacíclicos y los sanguíneos, las moléculas de superficie de ambos estadios difieren entre sí y son reconocidas por distintos anticuerpos. El uso de anticuerpos monoclonales también ha permitido demostrar que los marcadores de superficie del estadio sanguíneo, aunque no se han podido caracterizar completamente, sufren cambios a lo largo del tiempo lo que sugiere un proceso de maduración de las moléculas de la cubierta (Piras y col. 1985; Andrews y col. 1987; Schenkman y col. 1991). Se ha demostrado que los polipéptidos de la superficie de los trypomastigotes son esenciales en la unión e invasión de la célula de mamífero, pues la capacidad invasiva de *T. cruzi* se

reduce cuando se los remueve por tratamiento con tripsina o cuando se los bloquea con anticuerpos (Andrews y col. 1984; Alves y col. 1986; Ramirez y col. 1993). Incluso, la capacidad invasiva es sensible a inhibidores de la síntesis proteica o de la *N*-glicosilación (Lima y Kierszenbaum 1982; Andrews y col. 1984; Zingales y col. 1985). Los trypomastigotes libres en la sangre de los mamíferos hospedadores pueden ser ingeridos por el triatomíneo y cuando alcanzan el tubo digestivo de estos se diferencian a **epimastigotes**, de forma fusiforme, de unos 20 a 40µm de longitud, con el kinetoplasto situado delante del núcleo y con flagelo con una corta membrana ondulante (Figura 1.3). Este estadio le permite replicarse dentro del insecto y diferenciarse nuevamente a trypomastigote para ser depositados en las heces y reiniciar el ciclo.

Recientemente se ha establecido por medio de análisis de isoenzimas, de la secuencia de los genes del miniexón (véase más adelante) y marcadores de microsatélites que *T. cruzi* no es una especie única sino que constituyen dos subgrupos genéticamente divergentes que se denominaron linaje 1 y linaje 2. El linaje 1 predomina en el ciclo de vida doméstico mientras que el linaje 2 está principalmente representado en un ciclo selvático (Briones y col. 1999).

Aspectos peculiares de la biología celular de *T. cruzi*

El estudio de los tripanosomátidos siempre ha resultado atractivo dado que son organismos que poseen características únicas. Además y debido a diversas razones, algunas de las características que comparten con otras células eucariotas fueron descritas por primera vez en ellos. Solamente con el objeto de resaltar cuán peculiares son estos protozoarios, pueden citarse los siguientes ejemplos:

- Los cromosomas no se condensan en ninguna etapa del ciclo celular (De Souza 2002)
- La membrana nuclear no se desintegra durante la mitosis (Elias y col. 2006)
- La transcripción mediada por la RNA polimerasa II es multicistronica y no está regulada (Clayton 2002)

- Los transcriptos sufren un proceso denominado *trans splicing* que consiste en la transferencia al 5' del pre-mRNA de una secuencia de 39 nt (miniexón) a partir de un *splice leader RNA* de 140 nt que se transcribe separadamente (Ullu y col. 1993; Matthews y col. 1994)
- La RNA polimerasa I no sólo transcribe rRNA sino también mRNA (Ullu y col. 1993; Matthews y col. 1994)
- Cada célula tiene una única mitocondria grande
- El DNA mitocondrial (kinetoplasto) está organizado en muchos maxi- y minicírculos concatenados (Liu y col. 2005)
- El RNA de muchos transcriptos mitocondriales es editado, proceso por el cual la secuencia del pre-mRNA cambia debido a la inserción o eliminación de nucleótidos uridina. La especificidad de estos cambios está determinada por RNA guías (Stuart y col. 2005)
- Los tRNA utilizados en la mitocondria están codificados en el núcleo (Schneider y Marechal-Drouard 2000)
- La división de la mitocondria está ligada a la división celular (Gull 2003)
- Algunas reacciones de la glicólisis están compartimentalizadas en un organela inusual denominada glicosoma (Opperdoes 1987). En esta organela, que carece de catalasa, tienen lugar varias vías metabólicas que en otras células eucariotas ocurren normalmente en el citosol (Parsons 2004)
- El metabolismo energético funciona principalmente a través de una fermentación aeróbica de la glucosa (van Hellemond y col. 2005)
- Poseen unas organelas denominadas acidocalcisomas que están asociadas con diversas funciones tales como el almacenamiento de cationes y fósforo, el metabolismo del calcio y los polifosfatos y la regulación del pH y la osmolaridad (Docampo y col. 2005)
- Otra característica única es el uso de trypanotona en lugar de glutatión en reacciones que participan en la protección contra el estrés oxidativo (Fairlamb y col. 1985; Muller y col. 2003)

- Las principales moléculas de superficie están unidas a la membrana plasmática a través de anclas de glicosilfosfoinositol (GPI) (Ferguson 1999)
- La variación antigénica en *T. brucei* entre un repertorio prácticamente ilimitado de antígenos glicoproteicos es esencial para evadir la respuesta inmune del hospedador (Taylor y Rudenko 2006)

Entonces, no sólo por el impacto que provocan las enfermedades a nivel mundial, sino también por todas las razones antes mencionadas, los tripanosomátidos son organismos muy empleados como sistemas modelo en biología celular. Es por eso que no es sorprendente que también la *N*-glicosilación de proteínas presente varias peculiaridades, pero a su vez similitudes, con otras células eucariotas y es por ese motivo que su estudio despertó interés, siendo éste el campo sobre el que se desarrolla este trabajo de tesis.

Control de calidad y plegamiento de proteínas en el camino secretorio

El paso final de la expresión génica involucra la biosíntesis de proteínas funcionales. Todas aquellas proteínas de la célula eucariota que residen a lo largo del camino secretorio o que son secretadas o cuyo destino final es la membrana plasmática o los lisosomas, adquieren su conformación nativa y sufren diversas modificaciones postraduccionales en el retículo endoplásmico (RE). Por ello, este compartimiento puede ser contemplado como una expansión del programa de expresión génica en donde, en lugar de supervisarse la secuencia de nucleótidos del DNA o RNA, el objetivo último es asegurar la fidelidad estructural del producto traducido.

Para ser incorporadas en el camino secretorio (Figura 1.5) las proteínas deben primero atravesar la membrana del RE. Los polipéptidos nacientes que poseen una secuencia señal son reconocidos por la partícula de reconocimiento de señal (SRP) (Halic y Beckmann 2005; Shan y Walter 2005). La SRP dirige la cadena polipeptídica naciente hacia la maquinaria del translocón donde es translocada al lumen del RE a través del complejo Sec61p en un estado desplegado (Nikonov y Kreibich 2003; Chavan y col. 2005).

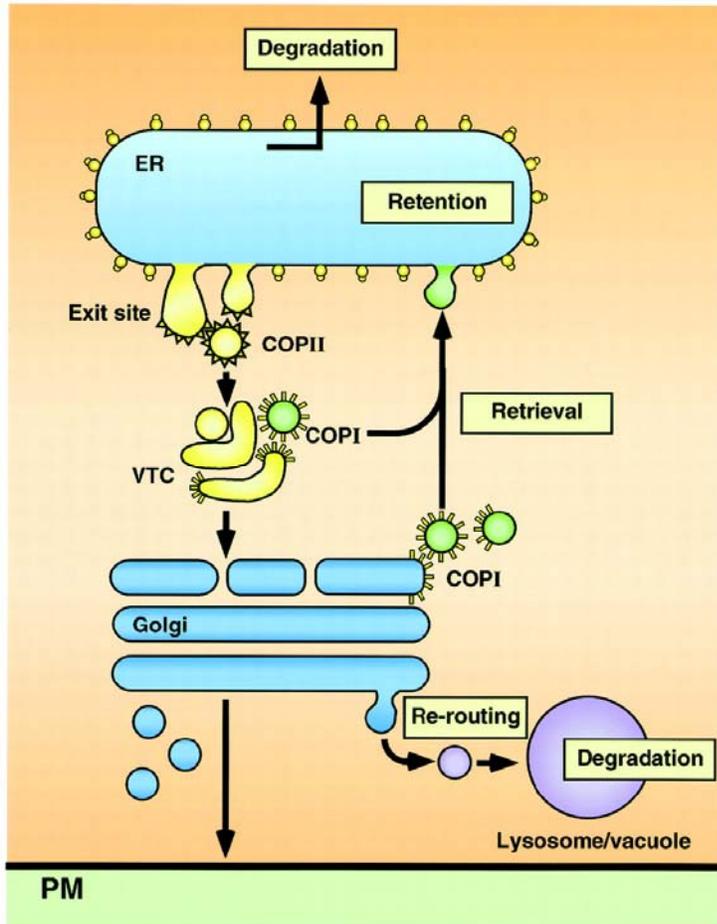


Figura 1.5: Esquema de las organelas que componen el camino secretorio y de su rol en el QC. Las proteínas son sintetizadas en el RE donde los ribosomas asociados a la membrana se muestran en amarillo. En el RE las proteínas son retenidas hasta que se pliegan correctamente y se ensamblan. Las que no lo logran son retrotraslocadas nuevamente al citosol y degradadas en el proteasoma. Cuando están bien plegadas las proteínas dejan el RE a través de los “sitios de salida”. Allí los componentes de cubierta de tipo COPII, mostrados como triángulos amarillos, se asocian con la cara citosólica de la membrana y son responsables de la gemación de las vesículas y de los elementos tubulares que se exportan al aparato de Golgi. La inclusión de las proteínas es selectiva y puede contribuir al QC. Cuando alcanzan el *trans*-Golgi las proteínas son distribuidas hacia la membrana plasmática o lisosomas (Ellgaard y col. 1999).

La estructura tridimensional de una proteína se encuentra codificada en su secuencia primaria y la exposición de esta al lumen del RE incrementa enormemente la eficiencia de su plegamiento (Anfinsen 1973). El RE es un ambiente optimizado para que el plegamiento y la oligomerización ocurran y presenta un potencial de óxido-reducción que permite la formación de puentes disulfuro (Tu y Weissman 2004).

Para poder cumplir estas tareas, el RE cuenta con una dotación completa de chaperonas moleculares y enzimas catalizadoras de plegamiento que forman una matriz de tipo gel que a su vez les permite funcionar en conjunto (Marquardt y col. 1993; Baumann y Walz 2001; Gavin y col. 2002).

Para evitar que los polipéptidos viajen a través del camino secretorio antes de haber adquirido su conformación correcta, las células poseen mecanismos que colectivamente se denominan “control de calidad de plegamiento” (QC por quality

control) y que implican el control continuo de la maduración conformacional de las proteínas (Hurtley y Helenius 1989; Ellgaard y col. 1999). Aquellas proteínas que son incapaces de adquirir su estructura nativa, son retenidas por el QC y eventualmente degradadas. Sin embargo, dado que todas las proteínas que ingresan a la vía secretoria lo hacen de forma desplegada, el sistema de QC tiene la difícil tarea de distinguir las proteínas que están en camino de un plegamiento exitoso de aquellas que se presentan conformaciones alteradas de forma irreparable.

Para el reconocimiento el QC depende de propiedades biofísicas generales compartidas por las proteínas incompletamente plegadas. Estas incluyen la presencia de zonas hidrofóbicas en la superficie, de bucles móviles y la falta de compactación. Durante la biogénesis normal de una proteína esas características están expuestas transitoriamente, resultando en la asociación también transitoria con los componentes del QC. Estos componentes son las mismas chaperonas que le permiten reconocer a las proteínas mal plegadas o los oligómeros sin ensamblar siendo, por lo tanto, no solamente responsables de promover el plegamiento correcto sino que también sirven como anclas para retener a las proteínas inmaduras dentro de RE. La unión a cualquiera de estas proteínas residentes del RE, aunque más no sea a intervalos, parece ser suficiente para impedir el tránsito hacia otros compartimientos.

Los mecanismos del QC son redundantes de manera que los miembros individuales reconocen a sus sustratos de manera diferente. Así, si una chaperona falla en interaccionar con una proteína, muy probablemente otra lo logrará (Molinari y Helenius 2000).

No obstante el amplio rango de estrategias que el RE pone en juego para favorecerlo, el plegamiento muchas veces falla y la incapacidad de las proteínas de pasar el QC deriva en la puesta en marcha de un programa concertado para prevenir los efectos tóxicos que devienen de la acumulación de proteínas aberrantes en el camino secretorio. Este programa se conoce como respuesta al estrés del RE o UPR (por Unfolded Protein Response) y tiene por objeto incrementar la capacidad de plegado correcto en el RE (Chapman y col. 1998; Kaufman y col. 2002). Esto se logra

mediante: 1) atenuación de la traducción, que disminuye la carga de proteínas recién sintetizadas a plegarse en el RE, 2) inducción transcripcional de ciertos genes, como los que codifican chaperonas y 3) remoción de las proteínas mal plegadas por un mecanismo llamado ERAD (por Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). En última instancia y como resultado de un estrés prolongado se produce la muerte celular por apoptosis.

El ERAD consiste, en la mayoría de los casos, en la retrotraslocación selectiva de la proteína mal plegada hacia el citosol y su degradación por el proteasoma 26S (Bonifacino y Weissman 1998; Brodsky y McCracken 1999; Plemper y Wolf 1999; Cabral y col. 2001). Para el caso de las glicoproteínas, este proceso involucra la participación de una *N*-glicanasa citosólica que deglicosila las glicoproteínas y de una ubiquitin ligasa específica para estas (Suzuki y col. 2002; Yoshida y col. 2002).

La maquinaria de plegamiento de proteínas del RE

La batería de factores que facilita el plegamiento correcto en el RE incluye tres clases de proteínas: las “foldasas”, las chaperonas moleculares y las lectinas.

Las *foldasas* son enzimas que catalizan diversos pasos en el plegado de las proteínas. Los ejemplos más prominentes son las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas que, como su nombre lo indica, catalizan la isomerización de las uniones peptídicas de los residuos de prolina, y las proteína disulfuro isomerasas (PDI) (Schmid 2001; Sevier y Kaiser 2002). Las tiol oxidoreductasas de la familia de PDI catalizan el proceso de oxidación e isomerización de puentes disulfuro a través de la formación transitoria de puentes mixtos entre la enzima y la proteína sustrato. Además, PDI y sus homólogos, ERp57, ERp72, pueden presentar actividad de tipo chaperona (Mazzarella y col. 1990).

Las chaperonas, en lugar de promover de forma activa la adquisición de estructuras correctas, asisten el plegamiento principalmente escondiendo las regiones mal plegadas del entorno. Las chaperonas del RE se clasifican según su contraparte citosólica dentro de la familia de las Hsp70, como BiP que es la más abundante (Haas y Wabl 1983), o dentro de la familia de las Hsp90, como GRP94 (Sorger y Pelham 1987; Melnick y col. 1992).

El sistema de Hsp70 ha sido muy estudiado. Esta chaperona actúa en conjunto con otros dos componentes, una Hsp40 o DnaJ y GrpE. La Hsp40 se une primero a la cadena nascente cuando emerge del traslocón y el dominio J le permite interaccionar con la Hsp70 que va a unir un heptapéptido hidrofóbico de la proteína. La unión de las dos chaperonas estimula la actividad ATPasa de la Hsp70 que permanece uniendo ADP hasta que GrpE lo desplaza, lo que provoca la disociación de todo el complejo. El plegamiento se logra a través de múltiples ciclos de unión y liberación mediante, en principio, un mecanismo indirecto, pues el resultado primario de la actividad de la chaperona es evitar que la proteína entre en vías muertas del camino del plegamiento tales como la agregación.

Las lectinas calnexina (CNX) y calreticulina (CRT) forman parte del segundo de los sistemas más importantes del QC con los que cuenta el RE (Fliegel y col. 1989; Wada y col. 1991; Michalak y col. 1992; Bergeron y col. 1994). Este sistema depende para su funcionamiento no sólo de una región mal plegada en la proteína, sino también de la presencia de un glicano monoglucosilado. Lo significativo de este sistema deriva del hecho que aproximadamente el 80 % de las proteínas que ingresan al camino secretorio están glicosiladas, lo que las convierte en candidatos a ser supervisadas por este segundo sistema de QC.

El ciclo de CNX/CRT se describirá con más detalle más adelante dado que su estudio es el motivo del desarrollo de esta tesis. Primeramente se describirán los pasos que conducen a que una proteína contenga el glicano que le permita interaccionar con CNX y CRT.

La *N*-glicosilación de proteínas

La *N*-glicosilación de proteínas es un proceso esencial para la viabilidad celular y en la última década se han descrito numerosas enfermedades hereditarias que están asociadas con alteraciones en la estructura de los *N*-glicanos (Aebi y Hennet 2001; Freeze y Aebi 2005).

La *N* y la *O* glicosilación representan los dos tipos más ampliamente distribuidos de carbohidratos unidos a proteínas (Spiro 2002). En células eucariotas los glicanos unidos al grupo amino de la cadena lateral de un residuo asparagina (de

allí el nombre de *N*-glicosilación) muestran dos importantes contrastes con respecto a los unidos al grupo hidroxilo de los residuos de serina o treonina (*O*-glicosilación). El primero es el glicano en sí mismo, que en la *N*-glicosilación se transfiere preensamblado en el RE, mientras que en la *O*-glicosilación se construye sobre la proteína por el agregado secuencial de un número variable de monosacáridos en el aparato de Golgi o el citosol. El segundo es que la *N*-glicosilación es un evento cotraduccional al contrario de la *O*-glicosilación que ocurre sólo postraduccionalmente.

El camino biosintético de los *N*-glicanos maduros comprende dos compartimiento celulares distintos: el RE y el aparato de Golgi. Como se describirá más adelante, en el RE el glicano es ensamblado y transferido a los polipéptidos nascentes y los recortes que sufre son limitados y compartidos por todas las glicoproteínas. En esta localización los carbohidratos juegan un papel estructural e influyen en la conformación, solubilidad y estabilidad de las proteínas que los contienen (Chu y col. 1985; Schulke y Schmid 1988; Paulson 1989; Kern y col. 1992; Edge y col. 1993; Kern y col. 1993; Wang y col. 1996).

Aunque los glicanos son cruciales para el plegamiento de la mayoría de las glicoproteínas (Ronnett y col. 1984; Sliker y col. 1986; Konig y col. 1988), también existen ejemplos de algunas que pueden alcanzar su conformación nativa en ausencia de aquellos, lo que se observó ya sea usando drogas como la tunicamicina que inhibe la *N*-glicosilación o por eliminación de los sitios consensos donde la *N*-glicosilación ocurre (Breitfeld y col. 1984; George y col. 1986; Pitta y col. 1989). Incluso, en una misma proteína que contenga más de un sitio de glicosilación, la remoción de cada uno individualmente tiene efectos diferentes sobre el plegamiento de la glicoproteína, sugiriendo que los glicanos ejercen además efectos locales (Dube y col. 1988; Semenkovich y col. 1990). Y si bien la glicosilación no induce la formación de una estructura secundaria permanente en la proteína muchas veces promueve la aparición de giros β , pocas veces de láminas β y menos aún de hélices α (O'Conner y Imperiali 1998).

Formación del glicano precursor

A pesar de la gran heterogeneidad encontrada en los glicanos maduros, los primeros pasos en la síntesis de los *N*-glicanos están notoriamente conservados a lo largo de la evolución de los eucariotas. Todos ellos se forman a partir de un precursor que se procesa para dar origen a las distintas estructuras. En la mayoría de los eucariotas el glicano precursor tiene la estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3M9N2) y se construye unido por un enlace pirofosfato a un lípido en la membrana del RE (Figura 1.6) (Parodi y Leloir 1979; Hubbard y Ivatt 1981; Kornfeld y Kornfeld 1985). Dicho glicano es transferido luego en bloque a los residuos asparagina de una cadena polipeptídica naciente por la acción de una oligosacariltransferasa (OT) (Kiely y col. 1976; Bergman y Kuehl 1977; Rothman y Lodish 1977; Sefton 1977).

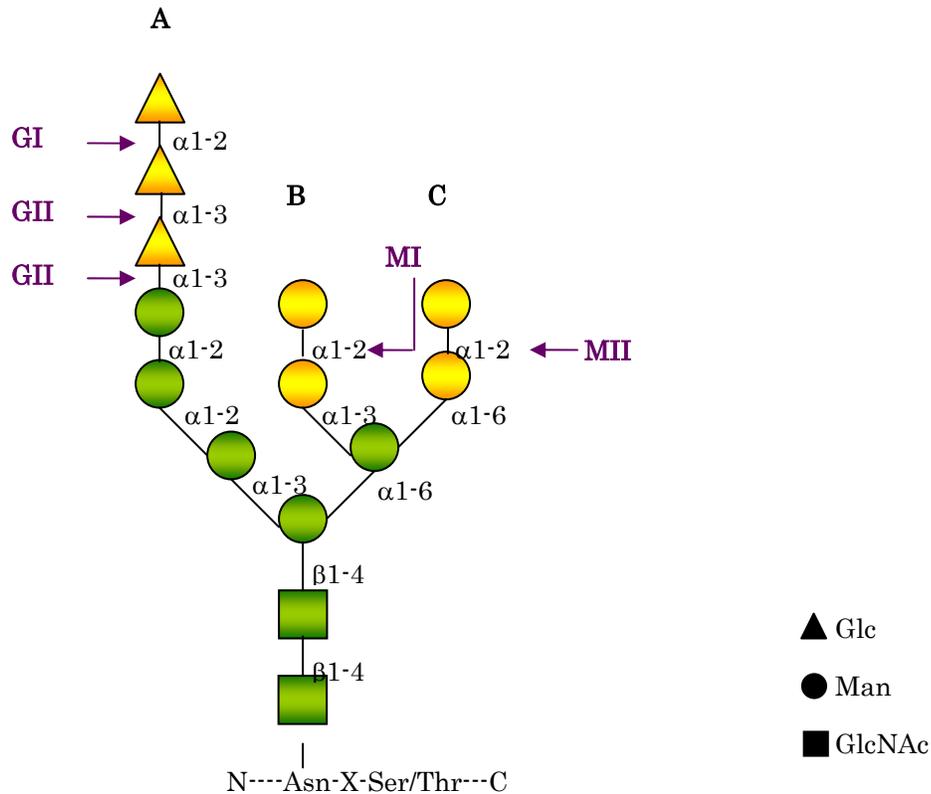


Figura 1.6: Estructura del glicano que inicia la *N*. glicosilación. El glicano se ensambla en la membrana del RE unido a un dolicol-P-P y luego se transfiere en bloque a un residuo Asn de un polipéptido naciente. Los residuos verdes se incorporan al lípido precursor en la cara citosólica del RE a partir de dadores de azúcares solubles (UDP-GlcNAc y GDP-Man). Los residuos amarillos se incorporan en la cara luminal del RE a partir del Dol-P-Man y Dol-P-Glc. Se indica el sitio de acción de las glicosidasas que actúan en el RE.

La secuencia y la topología de las reacciones que conducen a la formación del precursor se detallan en la figura 1.7. El lípido sobre el que se realiza la síntesis es el dolicol-fosfato, un poliprenol que contiene entre 11 y 21 unidades isopreno según la especie que se trate (Schenk y col. 2001). De las 14 unidades de azúcares que componen el precursor, las primeras siete son ensambladas en la cara citosólica de la membrana del RE por glicosiltransferasas que están unidas a ella. El primer paso consiste en la transferencia de GlcNAc-1-P a Dol-P de manera que se forma el enlace pirofosfato en una reacción que es inhibida por la tunicamicina. Los seis monosacáridos restantes se agregan de forma escalonada utilizando como sustrato UDP-GlcNAc y GDP-Man. El Man₅GlcNAc₂-P-P-dolicol es traslocado entonces hacia

el lumen por una "flipasa" del RE donde se le suman los cuatro restantes residuos de manosa y los tres de glucosa. Las glicosiltransferasas responsables de estas reacciones utilizan dolicol-P-Man y dolicol-P-Glc respectivamente que a su vez se formaron en la cara citosólica a partir de dolicol-P y GDP-Man y UDP-Glc, respectivamente. Estos compuestos también sufren una translocación desde la cara citosólica hacia la luminal del RE de manera de localizar los azúcares en este último compartimiento (Kellenberger y col. 1997; Burda y Aebi 1999; Kelleher y Gilmore 2006; Weerapana y Imperiali 2006).

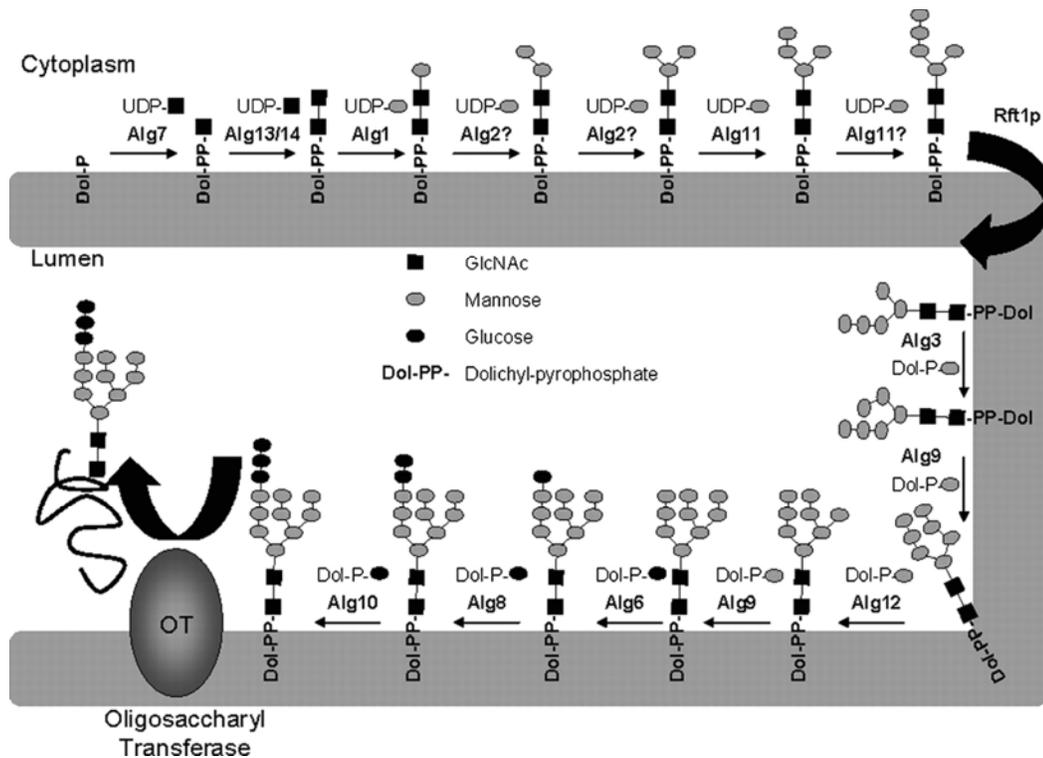


Figura 1.7: Formación del glicano precursor en *S. cerevisiae*. (Weerapana y Imperiali 2006).

La OT encargada de transferir el glicano precursor a las proteínas es un complejo de ocho subunidades que está asociado al traslocón Sec61. El sitio activo se encuentra sobre la cara interna de la membrana del RE (Imperiali y Hendrickson 1995; Yan y Lennarz 1999; Dempski y Imperiali 2002; Kelleher y Gilmore 2006). Este complejo es capaz de reconocer la asparagina de las secuencias Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, que debe encontrarse a unos 10 ó 12 aminoácidos de la membrana. La eficiencia de dicho proceso depende del entorno local de la secuencia consenso y típicamente disminuye en regiones

donde la cadena polipeptídica adopta rápidamente una estructura secundaria (Nilsson y von Heijne 1993; Holst y col. 1996). Además, en ensayos libres de células se mostró que OTs de variadas fuentes transfieren el G3M9N2 de 10 a 20 veces más rápido que el Man₉GlcNAc₂ (M9N2), asegurando de esta forma que todos los glicanos transferidos hayan completado su síntesis (Turco y col. 1977; Ballou y col. 1986).

Reacciones de procesamiento del glicano en el retículo endoplásmico

El procesamiento del glicano en el lumen del RE comienza inmediatamente después de su transferencia a la proteína. La glucosa más externa es removida por la glucosidasa I (GI), una $\alpha(1,2)$ -glucosidasa unida a la membrana del RE (Shailubhai y col. 1991; Kalz-Fuller y col. 1995). Mientras que las dos glucosas restantes que están unidas por uniones $\alpha(1,3)$ son removidas por la glucosidasa II (GII), una enzima heterodimérica soluble formada por una subunidad catalítica y otra no catalítica que contiene en su extremo carboxi-terminal una señal de retención en el RE (Figura 1.6) (Trombetta y col. 1996; D'Alessio y col. 1999; Trombetta y col. 2001).

Según la especie involucrada, pueden encontrarse manosidasas específicas del lumen del RE que remueven uno o dos residuos de manosa de la rama $\alpha(1,6)$ del glicano (Figura 1.6) (Weng y Spiro 1993). Las estructuras resultantes fueron involucradas en los procesos de degradación de glicoproteínas mal plegadas. Se propuso que el isómero B de Man₈GlcNAc₂ representaría una señal de degradación *per se* (Helenius y Aebi 2004) o que, dado que el recorte de manosas es un proceso lento, su presencia podría ser un síntoma de la persistencia de una dada glicoproteína en el RE y facilitase su eliminación (Su y col. 1993; Jakob y col. 1998). Estudios más recientes resaltaron diferencias entre las levaduras y las células de mamíferos respecto a la extensión de la remoción de manosas requerida para que un polipéptido con un plegamiento defectuoso sea sustrato de ERAD. En células de mamíferos los *N*-glicanos son procesados por $\alpha(1,2)$ -manosidasas hasta alcanzar composiciones con 5 ó 6 Man antes de ser degradados (Frenkel y col. 2003; Hosokawa y col. 2003; Foulquier y col. 2004). Aún se debate acerca de cuál/es serían las proteínas responsables de este exhaustivo recorte de manosas. Se han propuesto

tres posibilidades: 1) el secuestro de los candidatos de ERAD en subcompartimientos del RE donde la concentración de la α -manosidasa I es elevada 2) la participación de las endomanosidasas del aparato de Golgi y 3) la participación de una nueva clase de proteínas homólogas a la α -manosidasa I del RE, EDEM1, EDEM2 y EDEM3 (Ruddock y Molinari 2006). Aunque las EDEM fueron originalmente descritas como putativas lectinas sin actividad enzimática debido a que carecían de un puente disulfuro presente en otras manosidasas, también se han encontrado α -manosidasas activas sin dicha unión disulfuro (Cabral y col. 2001; Hosokawa y col. 2001; Mast y col. 2005). Si bien el mecanismo no se ha esclarecido, tanto el uso de inhibidores de las manosidasas como la supresión de la expresión de EDEM provoca un retraso del ERAD (Liu y col. 1999; Jakob y col. 2001; Molinari y col. 2002; Molinari y col. 2003).

También en el lumen del RE ocurre la reglucosilación de los glicanos de alta manosa que han sido completamente deglucosilados por la acción de las GI y GII, generándose las estructuras $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1M9N2), $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (G1M8N2) y $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (G1M7N2) a partir de las respectivas glicoproteínas sin Glc. El residuo es añadido a la misma manosa y en la misma conformación que el del glicano precursor por lo que es susceptible de ser removido por la actividad de la GII (Parodi y col. 1983; Trombetta y col. 1989). La enzima responsable de catalizar esta reglucosilación transitoria de las glicoproteínas es la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT) y la cual se encuentra en células de mamíferos, plantas, hongos y tripanosomátidos (Trombetta y col. 1989; Trombetta y col. 1991; Trombetta y Parodi 1992). *Saccharomyces cerevisiae* es el único organismo descrito hasta la actualidad que no posee GT (Fernandez y col. 1994).

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa

La GT se purificó a homogeneidad de diversas fuentes y resultó ser una enzima relativamente grande, de alrededor de 160 kDa, comparada con la mayoría de las glicosiltransferasas de la vía secretoria (Trombetta y Parodi 1992; Fernandez y col. 1994; Parker y col. 1995). Además, a diferencia de la mayoría de las glicosidasas y glicosiltransferasas que actúan en esta vía, que son proteínas de membrana, la GT resultó ser una proteína soluble en el lumen del RE, de forma

similar a la enzima que contrarresta su acción, la GII (Parodi y col. 1984; Herscovics 1999). La enzima aislada tiene un pH óptimo neutro y necesita una concentración relativamente alta de iones Ca^{2+} (5–10 mM) para su actividad. Ambos requisitos son compatibles con su localización subcelular en el RE. Otra particularidad de esta enzima es que utiliza UDP-Glc como dador de glucosa en lugar de los derivados del dolicol. La membrana del RE posee un transportador que permite el ingreso de UDP-Glc desde el citosol, el lugar donde se sintetiza, acoplado a la salida de UMP (Perez y Hirschberg 1987). Se ha identificado una UDPasa soluble en el lumen del RE que puede hidrolizar el UDP generado por la GT, impidiendo la inhibición por producto de la enzima y facilitando el ingreso de su sustrato por el conocido mecanismo de *antiport* (Trombetta y Helenius 1999; Failer y col. 2002).

La glicoproteína aceptora de la Glc es preferentemente la que presenta el glicano de estructura M9N2, sobre M8N2 y M7N2 a los que la GT glucosila con una eficiencia del 50% y 15% respectivamente (Sousa y col. 1992). Vale la pena mencionar aquí que la GII presenta un comportamiento similar respecto a su actividad según disminuye el contenido de Man en el glicano (Grinna y Robbins 1980).

Por otro lado, un requisito llamativo para poder observar la actividad de GT en ensayos libres de células fue que la glicoproteína sustrato tenía que estar desnaturalizada (Trombetta y col. 1989; Sousa y col. 1992; Parker y col. 1995). Se pudo determinar que la GT reconoce el residuo GlcNAc más interno del glicano, es decir, el que está unido a la proteína y esa unión covalente debe existir para una glucosilación efectiva por parte de la GT (Sousa y Parodi 1995). Esta es una restricción importante, pues evitaría que en un medio densamente poblado de proteínas parcialmente plegadas o no plegadas como es el lumen del RE, el estado conformacional de una tenga influencia sobre la glucosilación de otra.

Dado que en glicoproteínas en su conformación nativa la GlcNAc más interna no está expuesta sino estrechamente asociada a aminoácidos de la proteína, la exposición de la unión GlcNAc-Asn es un elemento clave en el reconocimiento de una proteína mal plegada, sin embargo, este factor no es suficiente para que la

glucosilación ocurra, puesto que glicopéptidos de alta manosa, en donde el motivo GlcNAc-Asn se encuentra totalmente expuesto al solvente, son sustratos muy pobres de la enzima (Sousa y Parodi 1995; Trombetta y Helenius 2000). Existe a su vez un requerimiento por dominios proteicos que están ocultos en la conformación nativa y el reconocimiento no es a través de una secuencia consenso sino que, al contrario, la GT puede unirse a péptidos hidrofóbicos que pueden encontrarse en cualquier proteína que esté plegándose en el RE (Sousa y col. 1992). Esta propiedad es compartida con las chaperonas moleculares, pero la GT tiene el rasgo único que es capaz de modificar covalentemente a su blanco. En este sentido, la GT es un caso prácticamente único de una proteína que reúne la actividad de una glicosiltransferasa con la especificidad de una chaperona.

Aunque el estudio de los determinantes moleculares reconocidos por esta enzima ha sido un tópico controvertido, algunos trabajos realizados *in vitro* con neoglicoproteínas demostraron que la GT es un *sensor* muy delicado de sutiles diferencias en la conformación (Sousa y Parodi 1995; Rodan y col. 1996). Ambos trabajos probaron que la GT prefiere glicoproteínas no nativas en etapas avanzadas de plegamiento. En el primero de ellos, se utilizó la nucleasa de *Staphylococcus*, una pequeña proteína bacteriana muy bien caracterizada, a la que se le acopló un glicopéptido. La proteína nativa resultó ser un pobre sustrato de la GT pero versiones truncadas que no diferían ampliamente respecto a su estructura terciaria y que conservaban de un tercio a un cuarto de la actividad de la nativa fueron eficientemente glucosiladas por la GT. Más aún, el agregado de un inhibidor de la actividad nucleasa que se sabe que estabiliza la conformación nativa, convertía a las versiones truncadas en peores aceptores de Glc. En la segunda aproximación se utilizaron diferentes conformeros de RNasa B. La proteína nativa, así como una con una ruptura de la unión peptídica entre los residuos 20 y 21 que mantiene su estructura nativa, aunque perturbada, y conserva su actividad, no fueron reconocidas por la GT. La separación del péptido de 20 aminoácidos de la versión truncada suprimió la actividad RNasa pero convirtió al resto de la molécula en sustrato de GT. Recientemente, utilizando como sustrato modelo el inhibidor de la

quimotripsina-2 glicosilado químicamente, se reveló que la GT reconoce en realidad superficies hidrofóbicas expuestas, predominantemente en conformaciones de tipo glóbulo fundido que tienen una estructura semejante a la nativa pero a las que les falta la compactación de las cadenas laterales (Caramelo y col. 2003). Además, se encontró que la GT puede reconocer los parches hidrofóbicos que se exponen en las superficies de contacto de subunidades de complejos sin ensamblar, participando así también en el reconocimiento de estructura cuaternaria, glucosilando complejos multiméricos que no contienen el total de sus subunidades (Caramelo y col. 2004). El reconocimiento de estas estructuras se realizaría, en principio, en un contexto local de forma que en una glicoproteína grande con dominios que se pliegan de manera independiente el glicano se glucosila siempre y cuando esté unido al dominio mal plegado (Ritter y Helenius 2000).

Estos resultados *in vitro* parecen ajustarse a observaciones hechas en experimentos con células vivas. La primera demostración concluyente de la reglucosilación selectiva de una glicoproteína *in vivo* se realizó con una mutante termosensible en la que la proteína G de la línea mutante ts045 del virus de stomatitis vesicular no se plegaba correctamente a 41°C y era retenida en el RE. Dicha proteína presentaba el 50% de sus glicanos alternando entre las formas glucosiladas y sin glucosilar (Suh y col. 1989). Luego se observó que la proteína a la temperatura no permisiva tenía la mayoría de sus puentes disulfuro formados, lo que indicaba que estaba en un estado avanzado de plegamiento (de Silva y col. 1990). Esto también pudo establecerse usando al *Trypanosoma cruzi* como se describirá más adelante (Labriola y col. 1999).

Cuando se conocieron las secuencias de genes que codifican para GTs de distintas especies se comprobó que todas codificaban para proteínas de tamaño semejante al determinado experimentalmente y que poseían un péptido señal en el extremo amino-terminal y una señal de retención en el extremo carboxi-terminal (Parker y col. 1995; Fernandez y col. 1996; Arnold y col. 2000; Tessier y col. 2000). Sin embargo, la conservación de la secuencia a lo largo de toda la proteína era moderada, de un 30% a 40% de identidad y un 40% a 60% de similitud. Pero si se

consideran únicamente las porciones C-terminales, los últimos 270 aa aproximadamente, la conservación aumenta notablemente, alcanzándose valores de 65 a 85% de identidad. Este dominio comparte homología con glucosil y galactosil transferasas de origen bacteriano que utilizan UDP-Glc o UDP-Gal como dadores de azúcares y forman uniones α con retención de la configuración anomérica, al igual que lo que hace la GT. Tanto unas como otras poseen cuatro residuos aspártico que forman parte de dos motivos DXD que al ser mutados conllevan a la pérdida de actividad enzimática. Por este motivo se atribuyó a este dominio la capacidad de glucosilar de forma autónoma del resto de la proteína (Tessier y col. 2000). Unos 200 aminoácidos también conservados unen el dominio C-terminal con el N-terminal, el cual se compone de unos 800 residuos y constituye la región menos conservada de la molécula. Esta organización recuerda a la de la familia de chaperonas Hsp70 que poseen un dominio N-terminal con un alto nivel de homología que tiene actividad ATPasa, y un dominio C-terminal mucho menos conservado y que contiene el sitio de unión de péptidos hidrofóbicos (Hendrick y Hartl 1993). Se ha propuesto que el dominio N-terminal de las GTs estaría involucrado en el reconocimiento de los determinantes expuestos en proteínas mal plegadas y que el dominio C-terminal sería el responsable de la actividad catalítica. El dominio N-terminal de la GT de *Schizosaccharomyces pombe* unido al dominio C-terminal de la GT de *Drosophila melanogaster* o la construcción inversa, forman enzimas activas *in vivo*, sugiriendo que a pesar de la baja similitud de la secuencia primaria de las porciones N-terminales (16%) estos dominios deben compartir rasgos a nivel tridimensional (Guerin y Parodi 2003). Por otro lado, el dominio N-terminal es necesario para el correcto plegamiento de la porción catalítica y ambas porciones permanecen fuertemente unidas después de un tratamiento suave con proteasas y no pueden ser separados sin que se pierda la actividad. Además, se describió que existen dos homólogos humanos de la GT, HUGT1 y HUGT2 que aunque son indistinguibles en cuanto a tamaño y son 83% idénticos entre sí en sus regiones C-terminales, sólo comparten un 49% de identidad en las regiones N-terminales (Arnold y col. 2000). Sorpresivamente, HUGT1 es una GT funcional, mientras que HUGT2 no muestra

actividad glucosiltransferasa. Utilizando quimeras entre los dos dominios de HUGT1 y HUGT2 se demostró que el dominio N-terminal de HUGT1 es requerido para la activación de los dominios C-terminales tanto de HUGT1 como HUGT2 (Arnold y Kaufman 2003).

Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas

Los glicanos monoglucosilados que se forman tanto por deglucosilación parcial del precursor transferido a la proteína o por acción de la GT son específicamente reconocidos en el RE por CNX, una lectina integral de membrana y por CRT, su homólogo soluble (Ware y col. 1995; Spiro y col. 1996; Vassilakos y col. 1998). Esta unión no sólo evita la salida del RE de los conformeros mal plegados sino que también disminuye el ritmo e incrementa la eficiencia de plegamiento de las glicoproteínas, impidiendo una oligomerización prematura o la degradación y facilitando la formación de puentes disulfuro nativos, constituyéndose así en el segundo de los sistemas de QC del RE (Hammond y col. 1994; Helenius 1994; Hebert y col. 1996). Sin embargo, el principio por el cual operan difiere del de las chaperonas clásicas. En lugar de basarse en cambios conformacionales producidos por la hidrólisis de ATP, los ciclos de unión y liberación entre los intermediarios de plegamiento y CNX/CRT dependen de la acción concertada de dos enzimas con actividades opuestas, la GT y la GII. De esta manera, el ciclo de CNX/CRT se centra en el *N*-glicano.

Tanto CNX como CRT poseen una alta especificidad pero baja afinidad por glicanos monoglucosilados (Patil y col. 2000) lo que podría facilitar una disociación espontánea del sustrato. Es más, en la estructura cristalográfica del dominio lectina de CNX la porción del glicano unido que contiene el enlace Glc-Man parece estar inaccesible a la GII (Schrag y col. 2001). Entonces la asociación dinámica entre la glicoproteína y CNX o CRT expondría el residuo terminal de glucosa a la hidrólisis por la acción de la GII. Si la proteína deglucosilada no está correctamente plegada se convierte en sustrato de la GT y vuelve a unirse a las lectinas. Este ciclo se repite hasta que o bien la proteína adquiere su conformación nativa, lo que la hace sustrato de la GII pero no de la GT por lo que puede liberarse del ancla y seguir su camino

hacia el aparato de Golgi o alternativamente si no logra plegarse es degradada (Figura 1.8).

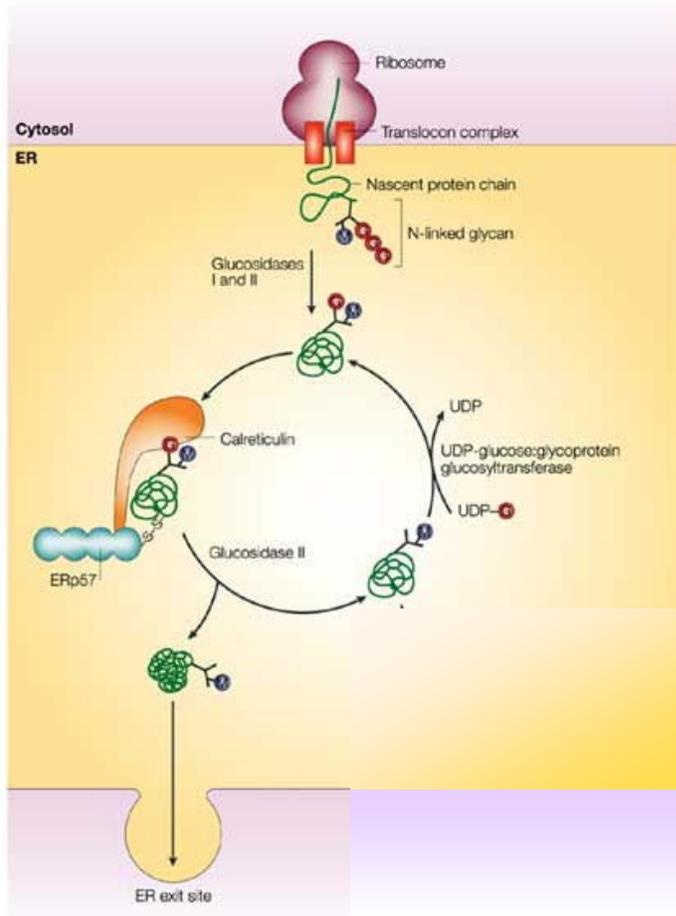


Figura 1.8: El ciclo de CNX/CRT. CNX y CRT asisten en el plegamiento de las glicoproteínas en el RE (para simplificar sólo se muestra a CRT). Luego de la transferencia del glicano precursor (G3M9N2, donde las glucosas se muestran como círculos rojos y una de las manosa como un círculo azul) a una proteína nascente, dos de las glucosas son removidas por las GI y la GII. Esto genera una glicoproteína monoglucosilada que puede interactuar con CNX y CRT. Ambas lectinas se asocian con la tiorredoxina oxidoreductasa ERp57. Durante la catálisis de la formación de la unión disulfuro ERp57 forma puentes mixtos con las glicoproteínas unidas a CNX/CRT. La acción de la GII sobre la última glucosa libera a la glicoproteína de las lectinas. Una vez liberadas, si las proteínas están correctamente plegadas dejan el RE hacia el aparato de Golgi. Si, en cambio, las proteínas no adquirieron su conformación nativa se convierten en sustrato de la GT que agrega una glucosa y que permite que la glicoproteína vuelva a unirse a CNX/CRT (Ellgaard 2003).

Aunque la alta conservación de los dominios de lectina concede a CNX y CRT una especificidad similar por el glicano, el espectro de glicoproteínas que se unen a ellas *in vivo* no se superpone completamente (Peterson y col. 1995; Otteken y Moss 1996; Pipe y col. 1998; Danilczyk y Williams 2001). CNX une de forma transitoria la mayoría de las glicoproteínas, mientras que CRT une un grupo más restringido (Peterson y col. 1995; Van Leeuwen y Kearse 1996) Pueden encontrarse proteínas que interactúan con sólo una de las chaperonas mientras que otras pueden unirse a ambas, tanto de manera simultánea como secuencial, según el estado del proceso de maduración de la glicoproteína (van Leeuwen y Kearse 1996; Pamer y Cresswell 1998) o a través de distintos glicanos (Hebert y col. 1997). Para algunos sustratos,

estas diferencias parecen ser causadas en parte por el status soluble de CRT y el anclado a la membrana de la CNX y pueden invertirse parcialmente si se intercambian la porciones luminales de las dos proteínas (Wada y col. 1995; Danilczyk y Williams 2001). Sin embargo, también hay ejemplos en los que el dominio luminal de CNX no puede reemplazar a CRT (Gao y col. 2002), por lo que deben existir determinantes que aún no han podido identificarse que influyen en la selectividad de sustratos de estas lectinas (Molinari y col. 2004; Pieren y col. 2005).

Vale la pena mencionar aquí la controversia que se ha suscitado respecto al mecanismo de acción de CNX y CRT. Como se ha venido desarrollando, el modelo de lectina propone que la interacción entre CNX/CRT y la glicoproteína está controlada únicamente por la disponibilidad del residuo terminal de Glc en el glicano unido a la Asn. En este modelo, el facilitamiento del plegado se lograría secuestrando a la glicoproteína en la cavidad que se forma entre el dominio globular y el brazo P (ver Parte 2). En este caso no habría un enmascaramiento directo de sitios hidrofóbicos, expuestos en las conformaciones no nativas, para evitar la agregación de forma similar al mecanismo de otras chaperonas moleculares (Helenius y Aebi 2004). Existe mucho apoyo experimental detrás de este modelo que proviene fundamentalmente de ensayos en los que se observa que la interacción entre CNX/CRT y una glicoproteína puede abolirse utilizando inhibidores de glucosidasas o células carentes de ellas (ejemplos de ello citados en (Parodi 2000).

Por otro lado, se ha planteado un modelo alternativo denominado de “unión dual”, en el que CNX y CRT interaccionan con la proteína en proceso de plegamiento no sólo a través del sitio lectina sino también a través de un sitio de unión a polipéptidos (Williams 2006). Así, la función promotora del plegado de CNX y CRT sería similar a la de otras chaperonas moleculares, es decir, evitando la agregación por unión a segmentos hidrofóbicos de las glicoproteínas no nativas. La disociación del complejo requeriría de la liberación del glicano y de un cambio conformacional en el sitio de unión al polipéptido que estaría regulado por el ATP o algún otro factor. En este caso, tanto CNX/CRT como GT evaluarían el estado conformacional de la proteína. También hay evidencia que apoya este modelo, como que los complejos una

vez formados pueden ser deglicosilados enzimáticamente sin que se disocien. También se ha visto que *in vitro* CRT puede unirse a proteínas no glicosiladas y suprimir la agregación (véanse los ejemplos citados en (Williams 2006). El principal inconveniente que presenta este modelo es que no se ha podido ubicar un sitio de unión a péptidos en la estructura cristalográfica de CNX. También son objetables los resultados obtenidos en los ensayos de agregación pues la temperatura a la que se realizaron son cercanas a la temperatura de desnaturalización de CRT.

Fue necesario reevaluar las funciones de CNX y CRT cuando se descubrió que podía unirse a ERp57 y que esta enzima redox de la familia de PDI interacciona exclusivamente con glicoproteínas parcialmente deglicosiladas. Al parecer, CNX y CRT, reclutando a las glicoproteínas monoglucosiladas, funcionan como presentadoras de sustrato para ERp57 (Elliott y col. 1997; Oliver y col. 1997; Farmery y col. 2000; Kang y Cresswell 2002). De esta manera, las glicoproteínas que contienen cisteínas pueden formar puentes disulfuro mixtos con la ERp57, facilitándose la formación de las uniones correctas (Lindquist y col. 2001; Antoniou y col. 2002; Molinari y col. 2002). En la Parte 2 de este trabajo de tesis se analizarán con más detalle las propiedades y funciones de CRT.

La relevancia de este sistema de QC de glicoproteínas se manifiesta al comprobarse que de no funcionar se activa la UPR y a su vez sus componentes son inducidos por esta ante cualquier circunstancia que provoque la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, tales como elevadas temperaturas, ionóforos de calcio y drogas que afectan la formación de puentes disulfuro o la *N*-glicosilación (Parlati y col. 1995a; Fernandez y col. 1996; D'Alessio y col. 1999; Doerrler y Lehrman 1999; Arnold y col. 2000; Casagrande y col. 2000; Travers y col. 2000; Hosokawa y col. 2001; Helenius y col. 2002; Shang y col. 2002).

Reacciones de procesamiento del glicano en el aparato de Golgi

Una vez que las glicoproteínas adquieren su conformación nativa los glicanos participan en eventos de distribución y transporte hacia el aparato de Golgi. Se identificó la lectina ERGIC-53 que asiste el transporte de glicoproteínas desde el RE a los compartimientos intermedios entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC, del

inglés Endoplasmic Reticulum-Golgi intermediate compartment) (Schweizer y col. 1988; Appenzeller y col. 1999). ERGIC-53 es una proteína de membrana de tipo I que une glicanos de alta manosa y que tiene homología con CNX. ERGIC-53 une sustratos en el ambiente neutral y rico en calcio del RE y los libera en el ERGIC a causa del ambiente más ácido y con menor contenido de calcio (Itin y col. 1996; Appenzeller-Herzog y col. 2004). En su dominio citosólico ERGIC-53 tiene la secuencia KKFF. El motivo dilisina es reconocido por la cubierta COPI que media la formación de vesículas y le permite que se recicle hacia el ER y el motivo difenilalanina es el responsable de su reclutamiento en los sitios de salida del RE y su unión al complejo de cubierta COPII (Andersson y col. 1999; Nufer y col. 2002). También se descubrieron dos proteínas relacionadas con ERGIC-53 no muy bien caracterizadas aún que recibieron los nombres VIP36 (por vesicular membrane protein) y ERGL (por ERGIC-53-like) que sugieren que el uso de los glicanos como señales de transporte no es un hecho limitado a ERGIC-53 (Hara-Kuge y col. 1999).

Cuando alcanzan las cisternas intermedias del aparato de Golgi las glicoproteínas sufren un recorte ordenado de monosacáridos y la adición de otros que dará por resultado el gran espectro de glicofomas que se encuentra en los *N*-glicanos maduros. El orden en el que estas modificaciones ocurren está establecido pero no es dirigido por la glicoproteína templado, como es el caso de la biosíntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Moremen y col. 1994; Roth 2002; Wildt y Gerngross 2005). Más bien, las estructuras resultantes dependen de la especificidad de las glicosidasas y glicosiltransferasas, de su localización dentro del aparato secretorio, de la velocidad de migración de las glicoproteínas por el aparato de Golgi y de la exposición de los glicanos a las enzimas procesadoras. Algunas enzimas pueden competir por un mismo sustrato y dependiendo de su abundancia, afinidad y localización, la glicosiltransferasa dominante puede favorecer o impedir la formación de una estructura en particular, así, incluso en un mismo polipéptido se pueden encontrar distintas estructuras de glicanos y las variaciones se forman de manera específica según el tipo celular o la especie.

Aunque la *N*-glicosilación representa sólo un tipo de los carbohidratos unidos covalentemente a proteínas, presenta una gran variedad de estructuras. Estas estructuras se han clasificado en tres grandes grupos: el que conforman los glicanos de alta manosa, formados por GlcNAc y Man; el de los glicanos complejos, constituidos por GlcNAc, Man, Gal, ácido siálico y Fuc; y por último los híbridos que poseen características de los dos anteriores.

El cambio de la uniformidad a la diversidad estructural del *N*-glicano coincide con un marcado cambio de su función. Al comienzo del camino secretorio tienen el rol común de promover el plegado de las proteínas, participar en el QC y en algunos eventos de distribución pero en el aparato de Golgi las enzimas los preparan para todo el espectro de nuevas funciones que deben cumplir, siendo utilizados principalmente como señales de reconocimiento que permiten interacciones entre células (Varki 1993).

Gran parte de los trabajos que permitieron delinear el funcionamiento del sistema de QC de glicoproteínas del RE fue realizado en *T. cruzi* puesto que este organismo posee algunas características particulares que se describirán a continuación.

El camino secretorio en T. cruzi

La supervivencia de *T. cruzi* en los diversos ambientes en los que habita a lo largo de su ciclo vital requiere la presentación controlada en su superficie celular de una abundante cubierta de glicoproteínas y glicolípidos (McConville y col. 2002). Estas moléculas alcanzan la membrana plasmática luego de atravesar un camino secretorio cuya organización no difiere considerablemente de la de otras células eucariotas (Figura 1.9).

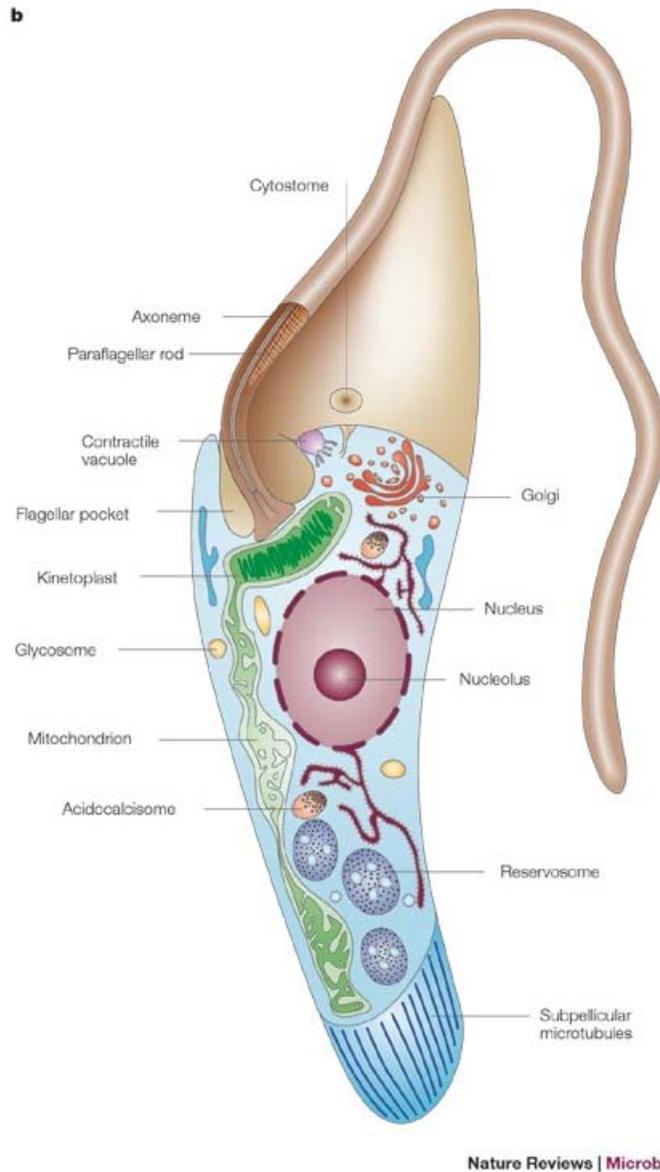


Figura 1.9: Representación esquemática de un corte longitudinal de un epimastigote de *T. cruzi* (Docampo y col. 2005).

El RE es el lugar donde se pliegan y ensamblan las proteínas que ingresan a la vía secretoria. A nivel ultraestructural el RE comprende la envoltura nuclear y un sistema de cisternas o membranas tubulares conectadas que frecuentemente se hallan estrechamente asociadas con la membrana plasmática (Souto-Padron y col. 1984). También se pueden distinguir los clásicos subdominios de RE rugoso y liso y una región especializada de donde brotan vesículas directamente opuesta al único aparato de Golgi. En contraste con lo que sucede en células de mamíferos, el aparato

de Golgi de los tripanosomátidos no colapsa durante la mitosis sino que sufre una fisión medial junto con el cuerpo basal, el flagelo y el kinetoplasto (Field y col. 2000). El aparato de Golgi se ubica junto al bolsillo flagelar, una invaginación de la membrana plasmática por donde emerge el flagelo. El bolsillo flagelar aísla un compartimiento extracelular especializado, rodeado por una membrana que difiere de la que recubre al cuerpo celular y al flagelo y que no está sustentada por los microtúbulos subpeliculares (Landfear y Ignatushchenko 2001). Esta última característica convierte al bolsillo flagelar en el único sitio por medio del cual ocurre la exo y endocitosis (Figura 1.9).

La morfología de los lisosomas varía según el estadio de vida del parásito. En los trypomastigotes los lisosomas maduros comprenden una serie de vacuolas esféricas con distribución perinuclear (Soares y col. 1992) mientras que en los epimastigotes se localizan en la región posterior (Porto- Carreiro 2000). Las proteínas pueden transportarse a los lisosomas desde el aparato de Golgi vía el bolsillo flagelar o por una ruta directa intracelular. Esta última, se sabe que no está mediada por el receptor de Man-6-fosfato sino por determinantes proteicos no muy bien caracterizados.

La N-glicosilación en tripanosomátidos

Los tripanosomátidos construyen el glicano precursor sobre dolicoles-fosfato de menor tamaño que los encontrados en eucariotas superiores, puesto que estos poliprenoles poseen sólo entre 10 y 13 unidades de isopreno (Parodi y Quesada-Allue 1982; Quesada-Allue y Parodi 1983; Low y col. 1991). Puesto que ninguno de los tripanosomátidos estudiados posee la enzima que sintetiza Dol-P-Glc a partir del UDP-Glc ni las glucosiltransferasas encargadas de adicionar este residuo al glicano precursor, estos organismos son las únicas células salvajes eucariotas conocidas hasta el momento que transfieren *in vivo* glicanos no glucosilados (de la Canal y Parodi 1987; Jones y col. 2004; Samuelson y col. 2005). Además, algunas especies carecen también de la manosiltransferasa dependiente de Dol-P-Man responsable de la transferencia del séptimo y noveno residuo de manosa (Frank y Aebi 2005), y otras carecen de la manosiltransferasa encargada de agregar el octavo residuo, por

lo que el glicano que se transfiere a las proteínas tiene la estructura M9N2 en *T. cruzi*, M7N2 en *Crithidia fasciculata* y M6N2 en *Leishmania mexicana* (Parodi y col. 1981; Parodi y Quesada-Allue 1982; Mendelzon y Parodi 1986). Las reacciones de formación del glicano precursor se esquematizan en la figura 1.10.

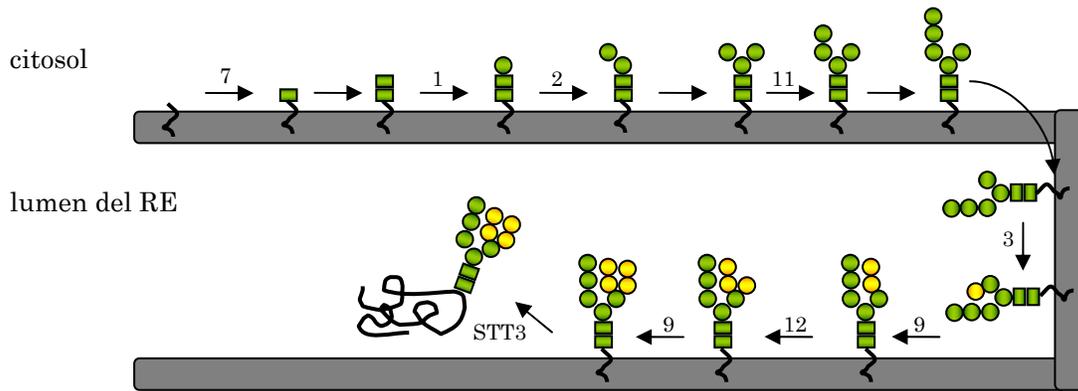


Figura 1.10: Reacciones de formación del glicano precursor en *T. cruzi*. Los once monosacáridos son agregados por glicosiltransferasas que se denominaron Alg1 a Alg12 según sus contrapartes en *S. cerevisiae* que a su vez fueron numeradas por en orden en que fueron descubiertas en lugar de por el orden de las reacciones que catalizan (Samuelson y col. 2005).

Como ya se mencionó anteriormente, la OT de mamíferos, plantas u hongos necesita que los tres residuos de glucosa estén presentes en el glicano precursor para una catálisis eficiente, por lo que la incapacidad de los tripanosomátidos para generar esta estructura provocaría, a su vez, una transferencia ineficaz que tendría como consecuencia una hipoglicosilación en las proteínas. Sin embargo, en ensayos libres de células se determinó que la OT de *T. cruzi* transfiere con igual eficiencia el precursor glucosilado que aquel sin glucosilar (Bosch y col. 1988). Recientemente, el análisis del genoma de este organismo permitió identificar a la única subunidad de esta enzima, la STT3, la cual posee la actividad catalítica (Yan y Lennarz 2002; Nilsson y col. 2003; Samuelson y col. 2005). Sin embargo, contrariamente a lo que se esperaba, recientemente se estableció que la selectividad de esta enzima por G3M9N2 en casi todos los eucariotas no es una característica que esté determinada por la subunidad catalítica sino por todo el complejo OT (Castro y col. 2006).

Dado que el glicano transferido a las proteínas no contiene residuos de glucosa es lógico entender que no se encuentre actividad de GI (Bosch y col. 1988). Sin

embargo, sí se detecta actividad de GII, porque esta enzima remueve la glucosa que adiciona la GT, otra enzima cuya actividad puede detectarse en el RE de estos parásitos (Parodi y col. 1983; Bosch y col. 1988; Trombetta y col. 1989; Ganan y col. 1991). Es más, la estructura G1M9N2 sólo puede formarse por la actividad glucosilante de la GT, que justamente fue descrita por primera vez en estos protozoarios, puesto que dicho *N*-glicano no podía confundirse con el que se obtiene por deglucosilación parcial del precursor en células de mamíferos (Parodi y Cazzulo 1982). Las reacciones de procesamiento del glicano que tienen lugar en el RE de *T. cruzi* se muestran en la figura 1.11 comparadas con las que ocurren en células de mamíferos.

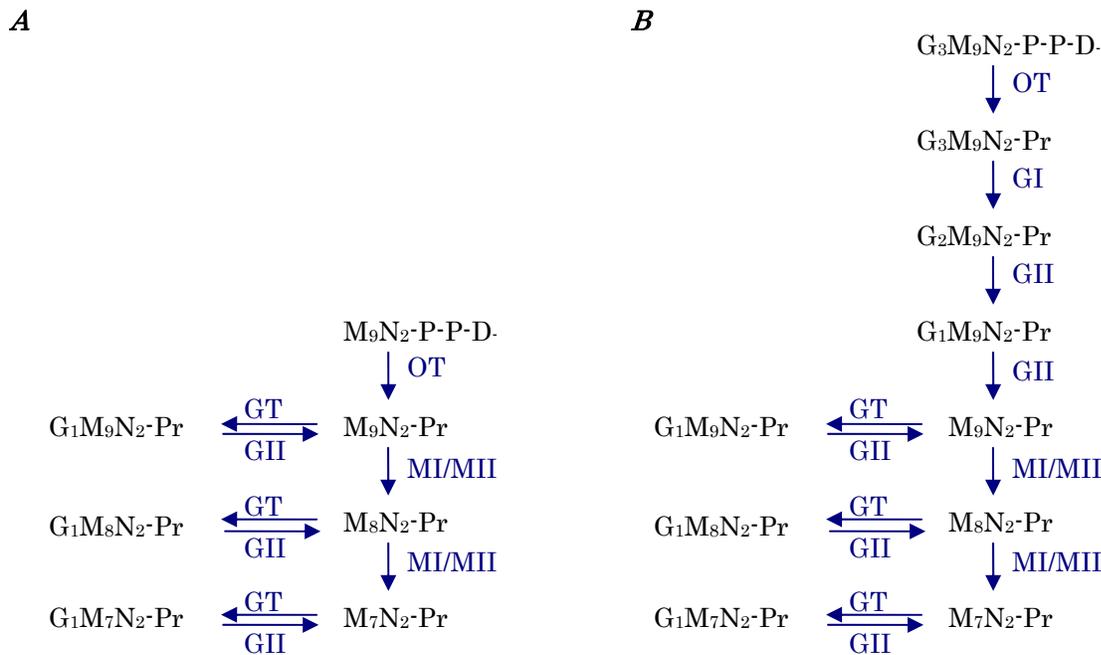


Figura 1.11: Reacciones de procesamiento de los glicanos en el RE. Se muestran las reacciones de procesamiento de los glicanos que ocurren en *T. cruzi* (A) y células de mamíferos (B). G, Glc; M, Man; N, GlcNAc; D, dolicol; Pr, proteína; OT, oligosacariltransferasa; GI, glucosidasa I; GII glucosidasa II; GT, glucosiltransferasa; MI/MII, manosidasas I y II, respectivamente.

El uso de estos parásitos permitió determinar que alrededor del 50% de los *N*-glicanos de *T. cruzi* y *C. fasciculata* cultivados en presencia de inhibidores de GII tienen residuos de glucosa y como generalmente las glicoproteínas tienen más de un glicano por molécula, se puede afirmar que más del 50% de todas las glicoproteínas son alguna vez sustrato de la GT (Ganan y col. 1991). Este experimento no puede

realizarse en células de mamíferos porque los inhibidores de GII también inhiben a la GI, lo que lleva a la acumulación de compuestos triglucosilados. Además, otro impedimento para realizar esta estimación en eucariotas superiores es que poseen en el aparato de Golgi una endomanosidasa, que no existe en tripanosomátidos, que libera GlcMan de los glicanos G1M9-7N2 para que estos puedan seguir procesándose (Dairaku y Spiro 1997; Dong y col. 2000; Zuber y col. 2000).

El procesamiento de los glicanos en el aparato de Golgi de los tripanosomátidos no ha sido completamente estudiado pero se sabe que la estructura de los compuestos de alta manosa que se encuentran en proteínas maduras no difiere sustancialmente de la de los mamíferos excepto por la presencia en algunas especies de galactosas en configuración furanosa unidas directamente a residuos de manosa (Mendelzon y Parodi 1986; Mendelzon y col. 1986; Moraes y col. 1988; Gonzalez Clemente y col. 1990; Barboza y col. 2005). Por su parte, los glicanos complejos tampoco difieren en forma significativa respecto a los de los mamíferos, aunque se ha demostrado que en *T. cruzi* el agregado de ácido siálico a glicoproteínas y glicolípidos no ocurre intracelularmente y utilizando CMP-ácido siálico como dador sino en la superficie externa del parásito a través de un transialidasa que utiliza $\alpha(2,3)$ -sialoconjugados del hospedador como dador y sólo galactosas externas en uniones β como aceptor (Previato y col. 1985; Couto y col. 1987; Piras y col. 1987; Bangs y col. 1988; Couto y col. 1990; Schenkman y col. 1991; Zamze y col. 1991; Ferrero-Garcia y col. 1993).

Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas

T. cruzi resultó también un modelo útil para evaluar la ocurrencia del sistema de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas no sólo porque posee actividad de GII y GT sino que además sintetiza una glicoproteína que cumple dos requisitos esenciales, a saber, existe en suficiente cantidad como para permitir comprobar si es glucosilada *in vivo* y es una proteína soluble de los lisosomas, lo que permite estudiar el efecto de las unidades de glucosa en el tiempo que necesita para alcanzar su destino final. Esta glicoproteína es la cruzipaína (CZ).

La CZ (nombre dado para enfatizar su homología con la papaína, a cuya superfamilia pertenece) es la principal cisteín-proteasa de *T. cruzi*, de localización fundamentalmente lisosomal, aunque también puede detectarse una fracción minoritaria en membrana plasmática, y, en los trypomastigotes, en el bolsillo flagelar. Además, la concentración de esta enzima en los epimastigotes es apreciablemente mayor que en los otros estadios del parásito, constituyendo entre un 5 y 8% del total de proteínas solubles de la célula (Cazzulo y col. 1989).

La CZ es una endoproteasa capaz de degradar proteínas como caseína, albúmina bovina y hemoglobina desnaturalizada (pH óptimo 3,0-5,0) así como sustratos cromogénicos y fluorogénicos sintéticos (pH óptimo 7,0-9,0). La enzima es inhibida por reactivos organomercuriales, E-64, TLCK, leupeptina, varios derivados de peptidil clorometano y peptidil fluorometano (Meirelles y col. 1992; Franke de Cazzulo y col. 1994) e inhibidores proteicos de cisteína proteinasas como las cistatinas, las stefinas y los kininógenos (Stoka y col. 1995).

En la cepa Tul 2 del parásito se encuentran alrededor de 130 genes no idénticos que codifican para CZ, colocados en serie y separados por espacios intergénicos de algo más de 400 pb. Estas series ("tándems") se encuentran ubicados, según la cepa o clon del parásito, en dos o cuatro cromosomas diferentes (Campetella y col. 1992). La enzima se sintetiza como una proteína formada por cuatro dominios: un pre-dominio (péptido señal) de 18 aminoácidos, que se pierde al entrar al RE; un pro-dominio de 104 aminoácidos, que se pierde probablemente ni bien se activa en el lisosoma; un dominio catalítico de 214 aminoácidos, altamente homólogo a la catepsina L de mamífero y, en menor grado, a la papaína; y un dominio C-terminal de 130 aminoácidos que parece caracterizar a la mayoría de las cisteína proteinasas de tripanosomátidos y contra el que están dirigidos la mayoría de los anticuerpos en infecciones naturales o experimentales (Martinez y col. 1993). Este último dominio presenta características estructurales notables, que incluyen la presencia de siete residuos de treonina modificados, acompañados por siete residuos de prolina, entre los primeros 21 aminoácidos; ocho residuos de cisteína, que parecen estar formando cuatro puentes disulfuro, en la zona central; y un extremo C-

terminal que sobre 27 aminoácidos presenta 18 residuos hidrofílicos, 11 de ellos cargados. La función de este dominio es desconocida pero no es necesario para la actividad enzimática. Al pro-dominio, en cambio, se le han asignado varias funciones: 1) colaborar en el correcto plegamiento (Conner 1992), 2) mantener al zimógeno inactivo hasta que llegue a su lugar de acción (Eakin y col. 1992), 3) dirigir al precursor hasta el lisosoma (McIntyre y col. 1994).

La CZ se purificó a partir de epimastigotes como una mezcla compleja de isoformas (Cazzulo y col. 1995). Esta microheterogeneidad es probable que se deba a la presencia de modificaciones postraduccionales (Cazzulo y col. 1992), incluyendo heterogeneidad en los glicanos (Parodi y col. 1995), así como también mutaciones puntuales que llevan al reemplazo de aminoácidos, la mayoría de ellos en el dominio C-terminal (Campetella y col. 1992; Cazzulo y col. 1992).

La enzima tiene tres sitios potenciales de *N*-glicosilación, dos en el dominio catalítico y uno en el dominio C-terminal. Se sabe que el primer sitio (Asn 33), al igual que el sitio del dominio C-terminal (Asn 255) están glicosilados, mientras que no hay evidencias sobre el estado de glicosilación del segundo sitio (Metzner y col. 1996). El primer sitio lleva solamente glicanos del tipo de alta manosa. La mayoría de los *N*-glicanos que se encontraron en el dominio C-terminal son de alta manosa, algunos de ellos sulfatados pero también se identificaron glicanos complejos sializados, fucosilados y con lactosamina (Barboza y col. 2005).

Las funciones de la CZ no son del todo conocidas, pero podrían referirse a: 1) la digestión intralisosomal de proteínas, exógenas o del propio parásito; 2) la protección contra la respuesta inmune del hospedador, ya sea por digestión intralisosomal de inmunoglobulinas endocitadas, o por destrucción en superficie del fragmento Fc de las inmunoglobulinas ligadas a los respectivos antígenos, dejando el fragmento F(ab')₂, que es incapaz de activar el complemento, actuando así, como protector; 3) un papel en la penetración del trypomastigote en la célula del mamífero, pues se sabe que inhibidores de proteinasas inhiben parcialmente este proceso. Estudios de varios laboratorios indican claramente una participación importante de cisteína proteasas, presumiblemente la CZ, en diferentes puntos del

ciclo de vida del parásito (Meirelles y col. 1992; Harth y col. 1993; Franke de Cazzulo y col. 1994). En efecto, se ha encontrado que la inhibición específica de la CZ previene la diferenciación de los epimastigotes en trypomastigotes y reduce marcadamente la infección de células de mamíferos y la multiplicación intracelular de los amastigotes. Más aún, la administración de inhibidores rescata a ratones de infecciones letales y cura animales con infecciones crónicas (Engel y col. 1998).

En células cultivadas en presencia de 1-deoxynojirimycin (DNJ), un inhibidor de GII, se encontró que la CZ contenía tanto glicanos glucosilados como sin glucosilar y que alrededor del 52% de los presentes en el único sitio de *N*-glucosilación del dominio C-terminal contenían glucosa, demostrando que la glucosilación no estaba restringida a un glicano en particular sino que el mismo glicano podía estar glucosilado en unas moléculas y no en otras. Este hecho es consistente con el concepto que la GT sólo glucosila los glicanos de los dominios que no están correctamente plegados y como el tiempo que una proteína necesita para adquirir su estructura terciaria puede diferir de una molécula a otra puede asumirse que las CZs que se pliegan rápidamente no son sustrato de la GT mientras que las que lo hacen más lentamente, sí.

También se observó que el agregado de DNJ provocaba un retraso en el tiempo medio de llegada de la CZ a los lisosomas y esto refleja un aumento de la permanencia de la CZ en el RE, según predice el modelo de control de calidad de plegamiento de proteínas. A su vez, este resultado estaba sugiriendo la presencia en el RE de *T. cruzi* de las chaperonas-lectinas CNX y/o CRT que permitiesen la retención de los intermediarios monoglucosilados. Efectivamente, pudo determinarse que *T. cruzi* posee un gen que codifica para CRT, que se halla en copia única por genoma haploide. No se encontró ningún gen que codifique para CNX.

La traducción del marco abierto de lectura hallado muestra un 40% de identidad y un 64% de similitud con la CRT de origen humano. También posee los característicos dominios ácidos y los sitios de unión a calcio presentes en otras CRTs. Además, en el extremo C-terminal posee una señal de retención en el RE. La

proteína efectivamente se localiza en el lumen del RE y una específicamente glicanos con estructuras G1M9N2 (Labriola y col. 1999).

Como se había supuesto, realizando ensayos de inmunoprecipitación se pudo comprobar que CZ es reconocida transitoriamente por CRT en el RE y retenida por un tiempo más prolongado cuando se agrega DNJ al cultivo. Esta interacción depende únicamente de la presencia del glicano reafirmando la idea que CRT reconoce solamente el hidrato de carbono y no determinantes proteicos.

Puesto que en *T. cruzi* la formación de los glicanos monoglucosilados depende exclusivamente de la actividad de GT (Figura 1.11) se pudo establecer que la CZ, que tiene siete puentes disulfuros, sólo se glucosila cuando todos o casi todos los puentes se han formado, indicando el requerimiento de una molécula casi completamente estructurada para que ocurra la reglucosilación *in vivo* (Labriola y col. 1999).

Siendo el *T. cruzi* un sistema modelo que permite investigar el funcionamiento del control de calidad de plegamiento mediado por lectinas y dada la importancia sanitaria de este parásito y de la dependencia de las glicoproteínas para su ciclo de vida, en la primera parte de esta trabajo de tesis se estudió si el facilitamiento del plegamiento de la CZ, uno de los factores de virulencia del *T. cruzi*, mediado por su interacción con CRT es esencial para la viabilidad, diferenciación y capacidad infectiva del parásito.

Objetivos

Estudiar si el facilitamiento del plegamiento mediado por CRT de la CZ, uno de los factores de virulencia del *T. cruzi* es esencial para la viabilidad, diferenciación y capacidad infectiva del parásito.

Materiales y Métodos

Cepas y condiciones de cultivo

La forma epimastigote de *T. cruzi* del clon CL Brener se cultivó a 28 °C en medio “Brain-Heart-Tryptose” (BHT, por litro: infusión 33 g cerebro corazón (Difco), 3 g Tryptose (Difco), 3,2 g Na₂HPO₄, 0,4 g KCl, 0,3 g Glc, 20 mg hemina (Sigma), pH 7,2-7,4), suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 10% v/v de suero fetal bovino inactivado previamente a 56 °C durante 45 min (Cazzulo y col. 1985). El crecimiento celular se evaluó contando los parásitos en una cámara de Neubauer.

Escherichia coli DH5α fue empleada para los experimentos de clonación. La cepa BL21(DE3) fue empleada para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor de la RNA polimerasa de T7. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB: 0,5% p/v NaCl, 1% p/v Tryptone (Difco), 0,5 % p/v extracto de levadura (Difco)). El medio se suplementó con 1,5 % agar de acuerdo a los requerimientos experimentales. Asimismo, para las cepas conteniendo plásmidos, la selección se realizó por el agregado de 100 µg/ml de ampicilina ó 50 µg/ml de kanamicina al medio.

Transfección de parásitos y selección

Cien millones de epimastigotes del clon CL Brener en fase logarítmica de crecimiento se centrifugaron a 1200 x *g* durante 10 min, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 350 µl de PBS suplementado con 0,5 mM MgCl₂ y 0,1 mM CaCl₂. Los parásitos se mezclaron con aproximadamente 100 µg de la construcción GT-Neo (véase más adelante) linealizado con *KpnI/NotI* y se incubaron en hielo durante 1 h. La mezcla se trasvasó a una celda de electroporación (0,4 cm electrode Gene-Pulser® cuvette (BioRad) a la cual se le aplicó mediante un aparato de electroporación (Electro Cell Manipulator 600, BTX Electroporation System) una descarga eléctrica de corriente continua a un voltaje de 0,4 kV y una capacitancia de 500 µFd.

A continuación, los parásitos se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, luego se diluyeron en 8 ml de medio BHT suplementado con suero y se incubaron por 48 h previo al agregado de 500 µg/ml de geneticina (G418, Sigma). Los

parásitos que resultaron resistentes a G418 se clonaron en placas de BHT-agar Noble antes de su caracterización. Como resultado de este procedimiento se obtuvo un clon positivo que contenía la construcción correctamente integrada, hecho evidenciado por análisis del tamaño de los fragmentos de restricción de DNA genómico (ver más adelante). Este clon se utilizó en un paso posterior para introducir la construcción GT-Hygro mediante una electroporación realizada en las mismas condiciones que la anterior, y la selección se llevó a cabo por el agregado de 500 µg/ml de Higromicina B (Sigma) y 500 µg/ml G418.

Ensayos de capacidad infectiva

Las monocapas de células de mioblasto de rata (L₆E₆) fueron cultivadas a 37 °C en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino, 100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Se infectaron 5 x 10⁴ células con epimastigotes (salvajes, heterocigotos y homocigotos) cultivados hasta fase estacionaria en una relación parásito:célula de 5:1 y 10:1. Las células fueron lavadas cada 48 h con medio Hank con el propósito de remover los parásitos no adheridos, agregándose medio DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino luego de cada lavado. Dieciséis días después de la infección, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con Giemsa. A continuación se contaron las células infectadas por observación microscópica. Cada experimento se realizó por triplicado. El mismo experimento se realizó con células Vero pero usando epimastigotes sin pretratar y con dos ruedas de infección. El pretratamiento de los epimastigotes fue el siguiente: se lavaron los parásitos dos veces con PBS y se incubaron durante 30 min a 37 °C con una dilución 1:20 de suero de cobayo (Sigma). Luego, los parásitos se lavaron otras dos veces con PBS y se resuspendieron en la misma solución.

Técnicas de biología molecular

Todas las técnicas de biología molecular se realizaron de acuerdo a lo descrito en (Sambrook y Russell 2001) y según las indicaciones de los fabricantes.

Clonado y secuenciación del gen que codifica para la GT de T. cruzi

Para realizar el clonado y secuenciación del gen que codifica para la GT se realizó una búsqueda en el banco de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* ingresando la secuencia de la región carboxi-terminal de la GT de *S. pombe* pues esta es la región que presenta un mayor grado de homología entre los genes ya secuenciados de otras especies. Se encontró un *Expressed Sequence Tag* (EST) (TENS2248) que poseía una homología significativa y sobre él se diseñaron oligonucleótidos exactos, 5'-CTC CTC AGT TTA AGA CGC-3' y 5'-TCG CAC CAG AGC CAC TCC-3', que amplificaron sobre DNA genómico un fragmento de aproximadamente 800 pb. Dicho fragmento se utilizó como sonda para realizar una búsqueda por hibridación de una biblioteca ordenada de cósmidos de DNA genómico de *T. cruzi* (Hanke y col. 1996) de acuerdo al procedimiento descrito en (Sambrook y Russell 2001). Como resultado de esta búsqueda se aislaron tres cósmidos a los cuales se les determinó el patrón de restricción con la enzima *EcoRI*, dos de los cuales resultaron idénticos. La digestión de uno de los cósmidos positivos con *EcoRI* produjo un fragmento de 4000 pb que contenía a las 800 pb del fragmento amplificado inicialmente por PCR. El mismo se clonó en pBluescript II KS+ (Stratagene, La Jolla, CA) y se secuenció totalmente utilizando el método de Sanger (Sanger y col. 1977) y el *kit* T7 Sequenace 2.0 (Amersham Life Science). Para completar la secuencia del gen se digirió el cósmido positivo con *SacI*, obteniéndose un fragmento de 5000 pb que fue clonado en pBluescript II KS+ y secuenciado. Como resultado de la secuenciación de ambos clones se obtuvo la secuencia completa del gen de GT.

Construcciones para la interrupción de genes

Para realizar la interrupción del gen de GT se construyeron dos cassettes con diferentes marcadores de resistencia: Neomicina fosfotransferasa (Neo) e Higromicina fosfotransferasa (Hygro) (Figura 1.12). Se clonó el gen Neo en pBluescript en los sitios *HincII* y *EcoRI*. Luego, se insertó en el sitio *HincII* un fragmento de 470 pb que corresponden a la región 5'UTR (la región 5' no codificante)

del gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de *T. cruzi* (GAP). Este fragmento contiene el *splice acceptor site* que permite la inserción del miniexón para la maduración del mRNA.

Para realizar la recombinación homóloga se utilizaron dos fragmentos de la región codificante del gen de GT, los cuales fueron generados mediante PCR usando como templado el fragmento de 4000 pb clonado en el sitio *EcoRI* del vector pBluescript. Los oligonucleótidos utilizados para estas amplificaciones fueron 5'-TAC GGT ACC GTG TTG AGG CGC GAT GC-3' y 5'-CCA GCT CGA GCT TGC ACT GCC GGT GAG G-3' (fragmento correspondiente a las bases 3178 a 3698 en el gen de GT, fragmento A) y 5'-CTC CTC AGT TTA AGA CGC-3' y 5'-ACG GGA TCC CTC CAA TTC GGT GTC GG-3' (fragmento correspondiente a las bases 4277 a 4959 en el gen de GT, fragmento B) (el subrayado indica sitios de corte de enzimas de restricción). El fragmento A se clonó usando los sitios *KpnI/XhoI* en dirección 5' de GAP y el fragmento B se clonó en los sitios *SmaI/BamHI* en dirección 3' de Neo, generándose de esta forma la construcción GT-Neo (Figura 1.12). El segundo cassette que contiene el gen de resistencia a Higromicina B se realizó simplemente liberando Neo con *EcoRI* del primer cassette y clonando en su lugar el gen Hygro con extremos romos, generando el cassette GT-Hygro (Figura 1.12).

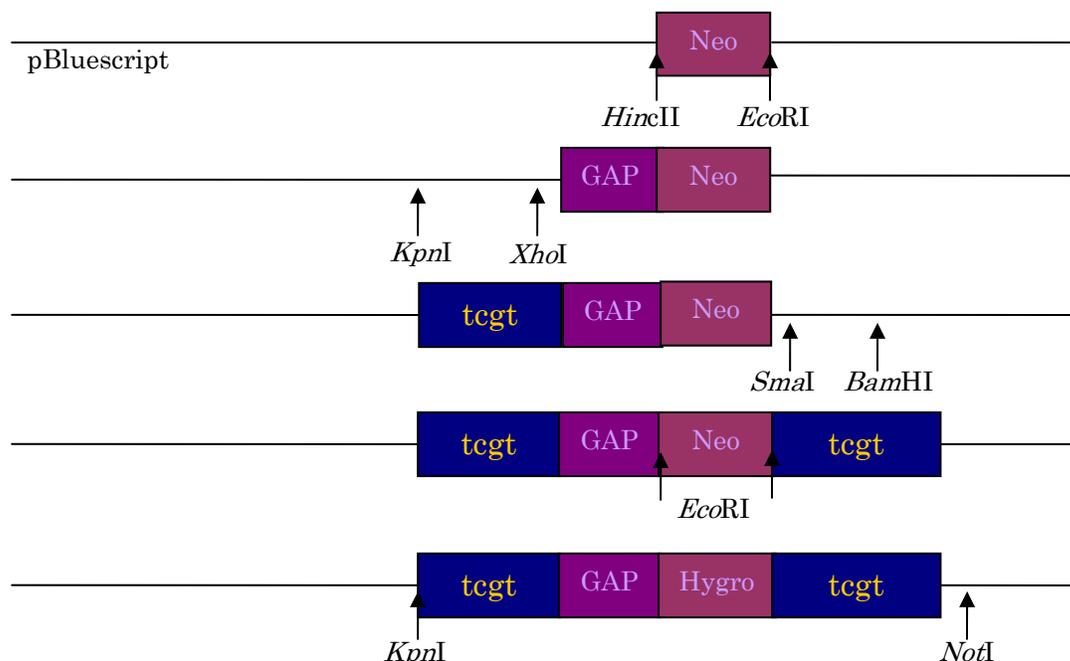


Figura 1.12: Representación esquemática de las construcciones realizadas para obtener los mutantes nulos en GT. El gen que confiere resistencia a G418 (Neo) se clonó en los sitios *HincII* y *EcoRI* de pBluescript KS. En dirección 5' de Neo, en el sitio *HincII*, se clonó un fragmento (GAP), que contiene la región 5' no codificante del gen que codifica la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de *T. cruzi*. Luego en dirección 5' de GAP se agregó el fragmento correspondiente a las bases 3178 a 3698 del gen de GT, utilizando los sitios de restricción *KpnI* y *XhoI*. En dirección 3' de Neo se clonó el fragmento correspondiente a las bases 4277 a 4959 del gen de GT, utilizando los sitios de restricción *SmaI* y *BamHI*. Esta construcción recibió el nombre GT-Neo. La construcción GT-Hygro se realizó liberando Neo de GT-Neo con la enzima *EcoRI* y reemplazándolo por el gen que confiere resistencia a Higromicina B (Hygro). Ambas construcciones se linearizaron utilizando los sitios *KpnI* y *NotI*.

Preparación de DNA genómico

El DNA genómico de *T. cruzi* se preparó como ya fue descrito (Borst y col. 1980). Se resuspendió 1 g de parásitos en 10 ml de 10 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,6. La suspensión se llevó a 1% (p/v) de SDS y se mezcló suavemente por inversión. A continuación, se adicionó proteinasa K (Gibco) hasta 100 µg/ml y se incubó a 50 °C durante toda la noche. Al finalizar la incubación, se agregó un volumen de fenol (equilibrado en 50 mM Tris-HCl pH 8,0) y se agitó el tubo por inversión. Se centrifugó durante 5 min a 11953 x *g* y se tomó el sobrenadante evitando la interfase. La extracción se repitió una vez. Luego se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25/24/1, v/v), recuperando el sobrenadante. Finalmente se realizó una tercera extracción con

cloroformo:alcohol isoamílico (24/1, v/v). Al sobrenadante se le agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se tomó el DNA con una varilla de vidrio que posteriormente fue sumergida en etanol 70%. El DNA se secó y se resuspendió en 5 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, (Sambrook y Russell 2001)). A la solución resultante se le agregó RNasa A (20 µg/ml final) y se incubó durante 1,5 h a 37 °C. Después se llevó a 0,5% p/v en SDS, se agregó proteinasa K (50 µg/ml final) y se incubó a 50 °C durante 2 h. Se hizo luego una extracción con un volumen de fenol:cloroformo (1/1, v/v). Se centrifugó a 17212 x *g* durante 5 min y la fase superior se llevó a una concentración de 300 mM de acetato de sodio pH 5,0 y se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNA. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min y el precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de agua. Se realizaron diluciones y se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa junto con un marcador de peso molecular de concentración conocida para estimar la concentración de DNA.

Southern blot

El DNA purificado se digirió en forma completa con las enzimas de restricción que se indican en cada caso y los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) a 80 V durante 3 h. El DNA se desnaturalizó con NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M y se transfirió a una membrana de nylon de acuerdo a las técnicas convencionales de transferencia por capilaridad, se unió covalentemente a la membrana utilizando radiación ultravioleta (UV Crosslinker, Stratagene) y se prehibridó por 3 h a 42 °C con 100 mM citrato de sodio, 750 mM NaCl, 0,1% Ficoll 400, 0,1% polivinilpirrolidona, 0,1% albúmina bovina (Sigma, Fracción V), 1% SDS, 50% formamida y 100 µg/ml DNA de esperma de salmón, previamente desnaturalizado a 100 °C durante 15 min. Las hibridaciones se realizaron durante 18 h a 42 °C con las sondas indicadas en cada caso. Los lavados se realizaron a 65 °C durante 2 h con 0,15% SDS, 15 mM NaCl, 2 mM citrato de sodio, pH 7. Una vez seca la membrana se expuso sobre películas radiográficas con pantalla intensificadora a -70 °C.

Sondas

Las sondas utilizadas se prepararon por PCR, se purificaron las bandas de DNA correspondientes del gel de agarosa y se marcaron con [$\gamma^{32}\text{P}$]dCTP por el método de “random priming” usando el *kit* Prime-a-gene[®] Labeling System (Promega). La sonda correspondiente a la región 5' del gen de GT (Sonda A) se extiende desde la base 34 a la 580 y la correspondiente a la región 3' (Sonda B) desde la base 4277 a la 4805.

Fraccionamiento subcelular

Se siguió el protocolo descrito por (Bontempi y col. 1989). Epimastigotes de *T. cruzi* (1 g de peso húmedo) se lavaron con buffer 25 mM Tris-HCl, 320 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 4 mM KCl, pH 7,6 (buffer A) conteniendo inhibidores de proteasas (100 μM *trans*-epoxisuccinil-1-leucilamido(4-guanidino)butano (E-64 de Sigma; este compuesto inhibe irreversiblemente la actividad proteínica de la CZ) y 1 mM PMSF) y se centrifugaron a 5857 x *g* por 10 min. El precipitado se mezcló con carburo de silicio (1,5 g de carburo de silicio/1 g de epimastigotes) y se homogeneizó suavemente con mortero en frío durante 3 min. Se resuspendió en buffer A en un volumen final de 10 ml y se centrifugó a 500 *g* por 3 min, conservando el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces con buffer A y se centrifugó de la misma manera. Se reunieron todos los sobrenadantes y se sometieron a centrifugación diferencial a 1100 *g* por 10 min, 5000 *g* por 10 min, 14500 *g* por 10 min y 105000 *g* por 1 h, obteniéndose las correspondientes fracciones: nuclear (N), gránulos grandes (LG), gránulos pequeños (SG), microsomal (M) y fracción soluble (S), respectivamente. M y S se conservaron para su posterior análisis.

Marcación por pulso y caza de células de *T. cruzi*

Se siguió el protocolo descrito en (Labriola y col. 1995; Labriola y col. 1999). Se cosecharon 2 g de células en fase exponencial de crecimiento (4×10^7 células/ml) y se lavaron dos veces con medio DME/F-12 Base (14,2 mg/ml, medio libre de Met, Gln, Leu, Lys, Sigma) suplementado con 365 mg/l de Gln, 59,05 mg/l de Leu, 91,25

mg/l de Lys, 61,2 mg/l MgCl₂, 154,5 mg/l CaCl₂ y 1,2 g/l de NaHCO₃. Los parásitos se resuspendieron en 8 ml del medio antes mencionado y se dividieron en mitades. DNJ (Sigma) se agregó a una de ellas a una concentración final de 6 mM. Ambas mitades se incubaron por 20 min a 28 °C.

Para los experimentos de inmunoprecipitación se agregó [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys (1 mCi; >1000 Ci/mmol; EasyTag protein labeling mix, New England Nuclear) a ambas mitades y se incubaron por 2 min a 28 °C. Las suspensiones se centrifugaron a baja velocidad y los precipitados se resuspendieron en 4 ml del medio de cultivo habitual de *T. cruzi* suplementado con 3 mM Met y 3 mM Cys. DNJ (6 mM) se agregó al medio de los parásitos previamente tratados con esta droga. Alícuotas de 400 µl se retiraron después de los tiempos de incubación a 28 °C indicados en cada figura. Las suspensiones se centrifugaron y los precipitados se lisaron con 350 µl de buffer 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,5, con el agregado de Nonidet P-40 (NP-40) (a la concentración indicada en cada caso), 300 mM iodoacetamida, 1 mM PMSF y 100 µM E-64. Después de 1 h a 0 °C, los lisados celulares se preaclaron por centrifugación. Estos sobrenadantes se sometieron a inmunoprecipitación.

Para estudiar la llegada de la CZ a los lisosomas se agregó [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys (1 mCi; >1000 Ci/mmol; EasyTag protein labeling mix, New England Nuclear) a ambas mitades y se incubaron a 28 °C durante 15 min. Las suspensiones se sometieron de centrifugaciones a baja velocidad y los precipitados se resuspendieron en 4 ml del medio de cultivo habitual de *T. cruzi* suplementado con 3 mM Met y 3 mM Cys. DNJ (6 mM) se agregó al medio de los parásitos previamente tratados con esta droga. Alícuotas de 400 µl se retiraron después de los tiempos de incubación a 28 °C indicados en cada figura. Las suspensiones se centrifugaron y los precipitados se congelaron por 48 h para que ocurra la ruptura de los parásitos.

Purificación de cruzipaina lisosomal

La CZ se purificó de acuerdo al procedimiento descrito por (Labriola y col. 1993). Brevemente, los parásitos rotos por congelado y descongelado se resuspendieron en 0,5 ml de buffer 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, pH 7,6 y se centrifugaron a 15000 *g* durante 10 min. El

material soluble se sembró en columnas de concanavalina A-Sepharosa (Sigma) y estas se eluyeron con 800 mM α -metilmanósido (Sigma). Los eluatos se desalaron usando columnas NAP-10 pre-empacadas, se concentraron en SpeedVac y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes (Laemmli 1970). Posteriormente se reveló por autorradiografía.

Inmunoprecipitaciones

Los sobrenadantes de la lisis (200 μ l) se incubaron con suero antiCRT diluido 1:20 durante 2 h a 4°C bajo agitación. Se agregó Proteína A-Sepharosa (40 μ l, Sigma) y se siguió incubando durante toda la noche. La resina se lavó una vez con 1 ml del correspondiente buffer de lisis, se resuspendieron en buffer de ruptura (50 mM Tris-HCl, 10 % glicerol, 10 mM DTT, azul de bromofenol, pH 6,8) y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se reveló por autorradiografía.

Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa

Una vez finalizada la corrida electroforética los minigeles de poliacrilamida con SDS se equilibraron durante 10 min en buffer Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8,3 y el mismo buffer se utilizó para la electrotransferencia de las proteínas a los filtros de nitrocelulosa. Luego de la electrotransferencia (1 h a 90 mA) los filtros se retiraron y se dejaron secar al aire (Burnette 1981).

Obtención de anticuerpos

Los anticuerpos específicos contra CRT de *T. cruzi* se obtuvieron mediante la inmunización de conejos con la proteína recombinante purificada que se produjo como se describió en (Labriola y col. 1999). Los animales se inmunizaron por vía subcutánea mediante la aplicación cada 15 días de un total de cuatro dosis de aproximadamente 100 μ g de la proteína disuelta en 1 ml de PBS (buffer 100 mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl pH 7,2). La proteína se administró emulsionada 1:1 v/v con adyuvante de Freund completo (Gibco) para la primera inoculación e incompleto para las restantes. Posteriormente, se realizó una sangría exploratoria y cuando el

suero obtenido poseía un buen título de anticuerpos se sangró los conejos a blanco. El suero fue separado del paquete globular por centrifugación a 358 x *g* durante 10 min.

El suero de conejo antiBiP de *T. brucei* fue gentilmente cedido por el Dr. J. Bangs (University of Wisconsin-Madison Medical School)

Revelado de filtros de nitrocelulosa con sueros

Los filtros de nitrocelulosa conteniendo las proteínas electrotransferidas se bloquearon durante 1 h con solución A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6, suplementada con 3% leche descremada en polvo). Posteriormente se incubaron 1 h con el suero en solución A en la dilución apropiada (1:1000, v/v). Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6) o TBST (TBS + 0,05% Tween20). Luego se incubó 1 h con anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra (diluido 1:30000 en solución A, de acuerdo a las instrucciones del fabricante), que tiene acoplada la enzima peroxidasa de rábano (Sigma). Se realizaron otros tres lavados y los filtros se revelaron con un sustrato quimioluminiscente del ECL (Pierce).

Cinéticas con cicloheximida de células de T. cruzi

Para estudiar la interacción entre BIP y CZ se agregó a 2 g (peso húmedo) de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento cicloheximida a una concentración final de 1 mM. Se incubó a 28 °C y se retiraron alícuotas después de los tiempos indicados. Las células se separaron por centrifugación a baja velocidad y se lisaron con 350 µl de buffer 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,5% NP-40, 300 mM iodoacetamida, 1 mM PMSF, 100 µM E-64, pH 7,5. Después de 1 h a 0 °C, los lisados celulares se pre-aclararon por centrifugación. Estos sobrenadantes se sometieron a inmunoprecipitación con una dilución 1:50 de suero policlonal antiCZ a 4 °C durante toda la noche. Los inmunocomplejos se aislaron con proteína A-Sepharosa, se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se revelaron con un suero antiBiP de *T. brucei*.

Detección y cuantificación de proteínas

Las concentraciones de proteínas en solución se determinaron por el método de Bradford (Bradford 1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Ensayos enzimáticos

Medida de actividad de glucosiltransferasa *in vitro*

La medida de actividad de GT *in vitro* se describió en (Trombetta y col. 1989). En un volumen de reacción de 50 μ l se incubaron 10 mM buffer imidazol, 20 mM CaCl₂, pH 7,0, 2 μ M UDP-[¹⁴C]Glc (285 Ci/mol), 200 μ g tiroglobulina bovina desnaturalizada, 5mM DNJ y la fracción a ensayar. Cuando se usaron membranas no permeabilizadas como fuente de enzima, se incluyó 0,5 % Lubrol en la mezcla de reacción. Se incubó a 37 °C durante 30 min y se detuvo la reacción con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Luego de centrifugar la mezcla resultante a 3000 *g* durante 5 min, el precipitado proteico se lavó 2 veces con 1 ml de TCA 10%. El precipitado del último lavado se disolvió en 0,5 ml de una mezcla solubilizadora comercial (Hyamine®) compatible con la solución centelleadora (tolueno/PPO/POPOP). Luego se agregó 3 ml de solución centelleadora y se midió la radioactividad por centelleo líquido.

La GT de hígado de rata utilizada como control positivo de la reacción se obtuvo como se indica en (Trombetta y Parodi 1992).

Medida de actividad de glucosiltransferasa *in vivo*

La medida de GT *in vivo* se realizó según (Labriola y col. 1995). Brevemente, se cosecharon epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento y se lavaron tres veces con el medio de marcación que contenía 40 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 85 mM NaCl, 5 mM piruvato de sodio, 2 mM glutamina, vitaminas y aminoácidos. Las células se resuspendieron en 2 a 4 veces su volumen en el mismo medio y se agregó 5 mM DNJ. Luego, se incubaron durante 30 min a 28 °C y se agregó 500 mM [¹⁴C]Glc (300 mCi/mol, New England Nuclear). Al cabo de otros 30 min se adicionó 100 mM Glc y las células se incubaron 30 min más.

Posteriormente se extrajeron las proteínas con cloroformo:metanol:H₂O (3/2/1, v/v) y una vez lavadas se digirieron durante 4 días con 10 mg de proteasa de *S. griseus* (Sigma) en 100 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl₂ en atmósfera de tolueno a 37 °C. Los glicanos se liberaron de los glicopéptidos por tratamiento con endo-β-N-acetilglucosamidasa H (EndoH) y se separaron por cromatografía en papel Whatman 1 con 1-propanol:nitrometano:agua (5/2/4, v/v, solvente A). Luego, se extrajeron y se sometieron a una hidrólisis ácida y los monosacáridos resultantes se separaron por cromatografía en papel con 1-butanol:piridina:agua (10/3/3, v/v, solvente B).

Los estándares radioactivos [¹⁴C]G3M9N, [¹⁴C]G2M9N, [¹⁴C]G1M9N y [¹⁴C]M9N se obtuvieron por incubación de crestas de oviducto de gallina ponedora con [¹⁴C]Glc como se describió previamente (Parodi y col. 1981).

Medida de actividad de oligosacariltransferasa

El ensayo se realizó según (Bosch y col. 1988), usando como aceptor el péptido sintético Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val y como dador dolicol pirofosfato glicano, este último marcado con [¹⁴C]Glu como fue descrito en (Parodi y col. 1973). Se incubaron durante 30 min a 20 °C en un volumen final de 50 µl de buffer 50 mM Tris-maleato, pH 7,6, 10 mM MnCl₂, 0,6 % (v/v) Triton X-100, 2 mM hexapéptido, 15000 cpm de dador y la muestra a ensayar. Luego se agregó 1 ml de la mezcla cloroformo:metanol (3/2, v/v), 0,1 ml de agua y 100 µg de albúmina, que se usa de proteína portadora, se separó la fase superior y se lavó la inferior con 0,3 ml de cloroformo:metanol:agua (1/16/16, v/v). La fase superior se juntó con la anterior y se concentró para poder sembrarse en papel y realizar una electroforesis en 5% de ácido fórmico, desarrollada durante 2 h a 25 V/cm. Una vez finalizada, se secó el papel, se cortaron fragmentos de 1 cm de ancho y se contó la radiactividad asociada a cada uno. En el caso de que el glicano se hubiere transferido al péptido, se observa que migra unos 10 cm desde el punto de siembra.

Medida de actividad de glucosidasa II

Este ensayo se describió (Trombetta y col. 1996) y utiliza como sustrato sintético el p-nitro-fenil-α-D-glucopiranosido que al hidrolizarse genera un producto

que presenta una elevada absorbancia de luz a 405 nm en medio básico. La mezcla de reacción contiene buffer 20 mM HEPES, pH 7,5, 0,1% Triton X-100, 20 mg sustrato y la muestra a ensayar en un volumen total de 50 μ l y se incubó a 37 °C por 30 min. La reacción se detiene con el agregado de 65 μ l de 1,5 M Tris y SDS 2% (p/v).

Medida de actividad de cruzipaina

La determinación de la actividad de CZ está descripta en (Cazzulo y col. 1990) y consiste en medir la velocidad a la que se libera p-nitroanilida a partir del sustrato sintético Benzoil-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilida (BzProPheArg-pNA). La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 1 ml de una solución conteniendo 100 mM Tris-acetato, pH 8,0, 10 μ M β -mercaptoetanol, 150 μ M sustrato y mezcla a ensayar. La actividad se siguió por aumento de absorbancia a 410 nm a lo largo del tiempo a temperatura ambiente.

Medida de actividad de manosidasa

Este ensayo se realizó según (Li y Lee 1972) usando el sustrato sintético p-nitro-fenil- α -D-manopiranosido. La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 0,5 ml de una solución conteniendo 2 mM sustrato, 250 mM buffer acetato de sodio, pH 4,0 y mezcla a ensayar. Se incubó 1 h a 37 °C. Se agregaron 4 volúmenes de buffer glicina-NaOH 400 mM pH 10,8. Se centrifugó a 1500 x *g* durante 20 min y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 430 nm.

Medida de actividad de piruvato quinasa (PK)

La actividad de piruvato quinasa se determinó en un volumen final de reacción de 1 ml conteniendo 100 mM de buffer Tris-acetato pH 6,8, 30 μ M MgCl₂, 90 μ M KCl, 1 μ M ADP, 0,3 μ M NADH, 1 μ M fosfoenolpiruvato, 100 U lactato deshidrogenasa y la muestra a ensayar y se siguió el aumento de la absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo (Cazzulo y col. 1989).

Resultados

Clonado y secuenciación del gen que codifica para la GT de T. cruzi y localización subcelular de la enzima

En trabajos previos se pudo comprobar que el sistema de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas es funcional en *T. cruzi*. Este parásito posee los tres componentes que constituyen este sistema, a saber, la lectina CRT y las enzimas GT y GII. El motivo que convierte a este protozoario en un modelo ideal para estudiar el sistema de QC es que el glicano que se transfiere a las glicoproteínas nacientes no posee ningún residuo de glucosa, por lo cual la aparición de *N*-glicanos monoglucosilados se debe exclusivamente a la acción de la GT.

Dado que en el laboratorio se había secuenciado el gen que codifica para CRT y que este parásito no posee CNX, se intentó mediante diversas estrategias suprimir la expresión de este componente, de forma de tornar inoperante a todo el sistema de control de calidad y poder así evaluar su relevancia. Sin embargo, los diversos intentos llevados a cabo para obtener parásitos que no expresasen CRT fueron infructuosos. El empleo de RNA antisentido no fue efectivo porque, según se reportó posteriormente, el silenciamiento de la expresión de un gen por medio de RNA interferencia, a diferencia de lo que ocurre en *T. brucei*, no es funcional en *T. cruzi*. Se intentó, entonces, eliminar el gen de CRT pero solamente se obtuvieron parásitos con uno de los alelos y todos los ensayos por eliminarlo resultaron en la muerte de la población, indicando que CRT podría tratarse de un gen esencial para la viabilidad de estas células. Vale la pena mencionar que tampoco pudieron obtenerse mutantes nulos en CNX en *S. pombe*, levadura que sólo posee esta lectina específica para *N*-glicanos monoglucosilados (Jannatipour y Rokeach 1995), lo que llevó a pensar que ambas proteínas podrían tener roles adicionales además del facilitamiento del plegamiento (como se discutirá en más detalle en la segunda parte de este trabajo de tesis). Se decidió entonces abolir el sistema de QC de plegamiento de glicoproteínas eliminando la GT, una aproximación que desde el punto de vista del QC debería dar un resultado equivalente al de anular la CRT pues, como fue ya mencionado, GT es la única vía en *T. cruzi* que permite que las glicoproteínas interaccionen con la lectina.

Puesto que al momento de comenzar este proyecto el genoma completo de *T. cruzi* aún no se conocía, el primer paso para eliminar el gen de la GT fue la secuenciación completa de dicho gen.

Una búsqueda en la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* que estaba recién en sus inicios produjo como resultado un EST cuya secuencia de cDNA presentaba homología con el extremo C-terminal de las GTs ya secuenciadas de otras especies. Dada la alta conservación de secuencia que presentan las GTs de diversas especies en esta región del gen y la relativamente pobre conservación que presentan en el resto, era esperable que la detección por homología de algún posible gen de GT en *T. cruzi* hubiera sido justamente a partir de esta zona. El número de acceso de este EST es TENS 2248. A partir de la secuencia del EST, se diseñaron oligonucleótidos exactos, los cuales se emplearon en reacciones de PCR para amplificar desde DNA genómico del clon CL Brener de *T. cruzi* un fragmento de aproximadamente 800 pb. Con el objetivo de aislar la secuencia completa del gen, este fragmento se utilizó como sonda en una búsqueda por hibridación de un banco de cósmidos con insertos de aproximadamente 50 kb de DNA genómico de *T. cruzi*. Este procedimiento condujo a la identificación y aislamiento de tres clones positivos, dos de los cuales resultaron iguales por análisis con enzimas de restricción (Figura 1.13). La digestión con *EcoRI* de uno de estos cósmidos y análisis por Southern blot mostró una banda de aproximadamente 4000 pb que contenía el fragmento de 800 pb amplificado inicialmente por PCR. El fragmento más grande se subclonó en pBluescript II KS+ y se secuenció completamente. Como el extremo 5' de este fragmento carecía de codón inicial, se clonó otro fragmento de aproximadamente 5000 pb, que se obtuvo por digestión del cósmido con *SacI* y se identificó con una sonda generada a partir de la secuencia obtenida con anterioridad. Finalmente se obtuvo un marco abierto de lectura de 5007 pb. Del otro cósmido se secuenciaron aproximadamente 2000 pb y resultaron idénticas a las correspondientes 2000 pb del primer cósmido. Este gen se denominó *tcgt* y recibió el número de acceso AJ555866 del EMBL.

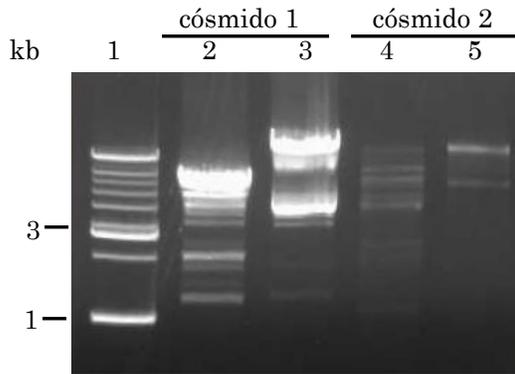


Figura 1.13: Diferencias entre los còsmidos obtenidos a partir de la búsqueda en la biblioteca. Patrón de restricción con las enzimas *EcoRI* (calles 2 y 4) y *SacI* (calles 3 y 5) de los dos còsmidos diferentes que se seleccionaron por unir la sonda de 800 pb.

Como en la mayoría de los genes de tripanosomátidos, *tcgt* no posee intrones. Su traducción teórica genera una proteína de 1657 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos mayor que su homólogo de levadura, mosca, gusanos o mamíferos. La enzima del parásito de 188 kDa posee todos los aminoácidos que se conoce son necesarios para la actividad de GTs de otras fuentes: C1518, C1607, C1611, C1625, D1488, D1490, D1584, D1586, Q1585, N1589 y L1587 (Figura 1.14).

```

MELGPRDCSKSMNQPHHRPRNIAYCTDWGRGRGRFAATLTLLLLWSVSLILLEAPTVEGKGVHVTLLA
PWTETPLLQEGCEMVAARGAHFVGFYQCMQDVWKRQAMNSSGGAAKLTQKSQYDILLDMMEQ
ANWPPTQVKLAKMKFAARLYSPVIEAHWQLARKAKQLIDGCSTEGGPFVLTAGKVICSEDLLEETLS
APAPVNETQDSHEDEAFSLFAELDQMHPNAKGSRVVILYGVVGGEEQTMQLLQVVERHLHAVRLAFR
HLPISGRMWEHPLHVQGYAVTVDLKNVEYKVIDEKDKNDAAGTDANDANTVEETESIGSVGGFNL TLL
TQRYPQLKPQLNTFA SHLVD MIDRDEVKVD FQMWETQYMGIAAAQYVMDAENEKRLNVL MNLLT
KFPLHASKLSKMGA TVRAKMNKKMHEELMEFASVVRSGTSPVFLNGRNLAVEKLNLF SLLQKLDEEE
QLLEGVQRVFTSYRLPSVNDDGFLSAKTDALHQAMESFRRSVHRYIASNGLEDGESVPRIWLPQRSV
LWLNNIQRD VNYIYMPAAEA I LHVNINGVVPVPRKNLIHAVCVVDPTTVAGLQNI FTILKLEESKQP
VRFGIVFADNKWSPELSVFTRGNDFITD TSLSGVTVIIAATVWELLKGEHPQDVLEFLSEVVQARS
TRGNLEEDEIKIISTNIL TLAGKTTL DNILTDASFVEYYQDTQM KIREMKL DASPFTLLNGKMFQGN
MLHALRQNFMEELHYVRGLVQSDAL TERDDGDFYESILRLSGARERYNEAFYSEKFYADWTSKPVLD
FLLHRPFLLPKIRSKKTPLVSSVL TIQSPMGEAALNALVK TIRNLLQCEDETQKCVNVRFTYVVCDAK
ESKRRTMAGDLERLIVRRKGGDDGKQHVQWVYDFLQKIAAQNNTRQLMDPDLYEELVAEVNFSPEV
KKLLDASDEGLDAQLQLQRGIVNGFCAQLEVDLSLSTSSLSANAAAAGREK GKEEGAVYYYYVNGRRFV
YDESFLEDDFRTAEEMEMLLAGAVSEALSKVEFTTMSSELEPSDLESHFYASKVAALSEVLRDAARG
SPMQEENHLPSTSGLT SFVVKPANGD TVPRHTLTVVIDPVAQQSQFLISLCDYVTRSPLGVSCTVHM
GATEHASKLMRNFYQFVSEMELRFD AVGGVPPAAVFHRLPSKHLL TLGIEEPESWTVFSLDAKYDLD
NILLDKLPSSSQYLHAVYRINSILL TGSARDAEQPNPSRGLPLLIRSTKTNPEAGVTRDTLVMAIMGYF
QLQSSPGVWYLVTVQPGDI AKIFYISQVDGIPVNDGANKNHGFRFNYTAGQNI PVVVSSTGKFLML
GVSKTPGHEEVSIEDVNEASALHVDWPPKGP I KSKPDRPTLNIFSVASGHLYERFLRMMIHSVMRTSF
DVHGANTTRIKFWLIENFLSPQFKTLVPLLAKHYGFDVGFV TYRWPWWLHKQTEKQRTIWAYKVL F
LDVLFPLDVDRVIFV DADQTVLADLHEL YNMDIGNAPTAYTPFCRKHPNPATKNFRFWDHGYWLEHL
HGKPYHISAIYLVDLRRLRAIAGGDKYRLVYSRLSSDPNSLANL DQDLNFIQDQVPIYSLPEEWLWC
ETWCGAESKARAKTIDL CNNPLTKMPKLDNARLIIPGWEETDTELEALSEKLLQQQKQMS*
    
```

Figura 1.14: Secuencia de aminoácidos de la GT de *T. cruzi*. Se destacan en rojo los aminoácidos necesarios para la actividad de las GTs de otras fuentes que están conservados en la de *T. cruzi*, subrayado el potencial péptido señal y en verde los aminoácidos del extremo C-terminal que no conforman una señal de retención en el RE conocida.

Todas las GTs están formadas por al menos dos dominios: el dominio amino-terminal, que abarca el 80% de la molécula y no tiene homología con otras proteínas conocidas, se necesita para el correcto plegado de la porción carboxi-terminal y se ha propuesto que está involucrado en el reconocimiento de las conformaciones no nativas de los sustratos; y el dominio carboxi-terminal o dominio catalítico que une $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{5N}_3\text{UDP-Glc}$ y muestra un tamaño similar y una homología significativa con miembros de la familia 8 de glicosiltransferasas (Tessier y col. 2000; Guerin y Parodi 2003). Todos los dominios C-terminales de las GTs de distintas especies son muy similares (50-80%), siendo mucho menor la similitud entre los dominios N-

terminales (Tabla 1.1). Llamativamente, el dominio N-terminal de la GT de *T. cruzi* resultó ser más semejante al de mamíferos (32,5% de similitud) que el de *S. pombe* (21,8%), a pesar que este último es mucho más cercano en términos evolutivos a los organismos multicelulares que el protozooario parásito.

Tabla 1.1: Porcentaje de similitud entre los dominios C- y N-terminales de GT^{a, b}

Especie	<i>T. cruzi</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>
<i>T. cruzi</i>	–	<u>55,5</u> – 26,5	<u>53,8</u> – 32,1	<u>56,6</u> – 32,5	<u>56,4</u> – 25,3
<i>S. pombe</i>			<u>62,0</u> – 18,3	<u>65,2</u> – 21,8	<u>64,0</u> – 19,0
<i>D.melanogaster</i>				<u>74,1</u> – 35,1	<u>75,5</u> – 31,6
<i>R. norvegicus</i>					<u>82,5</u> – 47,6

^aLos valores subrayados corresponden a la similitud entre los dominios C-terminales.

^bLos índices de similitud se obtuvieron por alineamiento apareado usando el método de Lippman-Pearson (programas Aling y DNASTar)

A diferencia de otras GTs, la enzima de *T. cruzi* no presenta en su extremo C-terminal una señal de retención en el RE característica como es PDEL en *S. pombe* o (K/H)DEL en mamíferos. Como la proteína contiene una región transmembrana que se corresponde con un péptido señal interno (aminoácidos 35 a 52) existía la posibilidad de que se tratase de una proteína de membrana de tipo II. Entonces para determinar su status soluble o unido a membrana del RE, se prepararon fracciones microsomales en medio isotónico que se trataron con concentraciones crecientes de Tritón X-100. La actividad de GT se detectó en los sobrenadantes de centrifugaciones a 100000 x *g* de las muestras tratadas con 0,05 % de Tritón X-100 (Figura 1.15). En contraste, la actividad de la OT, una enzima de la membrana del RE, no se pudo detectar en dichos sobrenadantes pero sí en los precipitados. Por otra parte, el perfil de liberación de GT de los microsomas acompaña al de GII, una enzima soluble del RE. Estas observaciones demuestran que la GT se encuentra soluble en el RE, pero el mecanismo mediante el cual es retenida en el lumen del RE es desconocido.

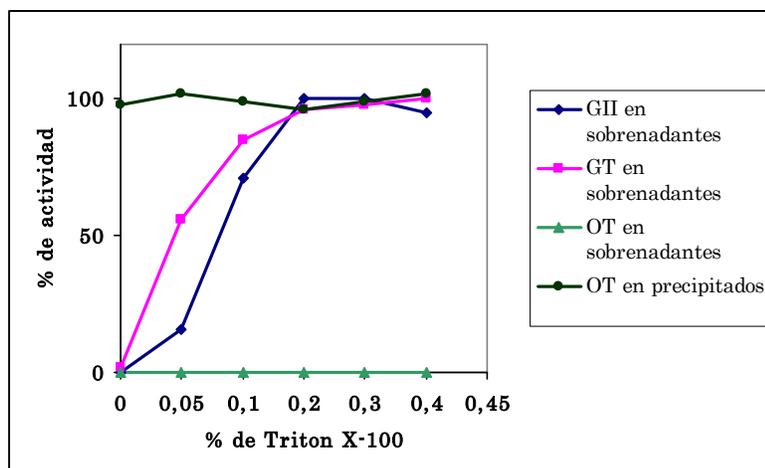


Figura 1.15: La GT de *T. cruzi* es una enzima soluble del lumen del RE. Medida de las actividades enzimáticas de UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT), Glucosidasa II (GII) y oligosacariltransferasa (OT). Se prepararon microsomas de epimastigotes salvajes de *T. cruzi* y se trataron con las concentraciones indicadas de Triton X-100. Las actividades enzimáticas se determinaron en el extracto total y en los sobrenadantes y precipitados de centrifugaciones a 100 000 x *g* durante 60 min. Las actividades de los extractos totales se consideraron 100%.

Generación de mutantes de *T. cruzi* nulos en GT

Como un paso previo a la disrupción del gen de GT fue necesario determinar el número de copias presente en el genoma completo de *T. cruzi*, pues este organismo se caracteriza por tener numerosas copias de varios genes, las cuales pueden llegar al orden de los cientos, un escenario que de ocurrir para el caso de la GT tornaría prácticamente imposible la generación de mutantes nulos. Con este objetivo, se digirió DNA genómico de *T. cruzi* con tres enzimas de restricción: *Xho*I, que no corta la secuencia del gen, y *Mlu*I y *Bam*HI que sí la cortan. Los fragmentos que se generaron se analizaron por Southern blot usando dos sondas que se unen a las bases 34 a 580 (sonda A) y 4277 a 4805 (sonda B) y como se muestra en la figura 1.16 se obtuvo un patrón de bandas consistente con el hecho que el gen de GT es de copia única. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de haber detectado sólo 3 cósmidos positivos en una biblioteca que contiene el genoma de *T. cruzi* representado 25 veces, lo que ya sugería que este gen no se encontraba en múltiples copias. Además, un segundo Southern blot, ahora de una digestión parcial con *Bam*HI de DNA genómico, no evidenció una distribución regular de bandas de tamaño creciente típica de los genes organizados en tandems en el genoma de *T. cruzi* (Figura 1.17).

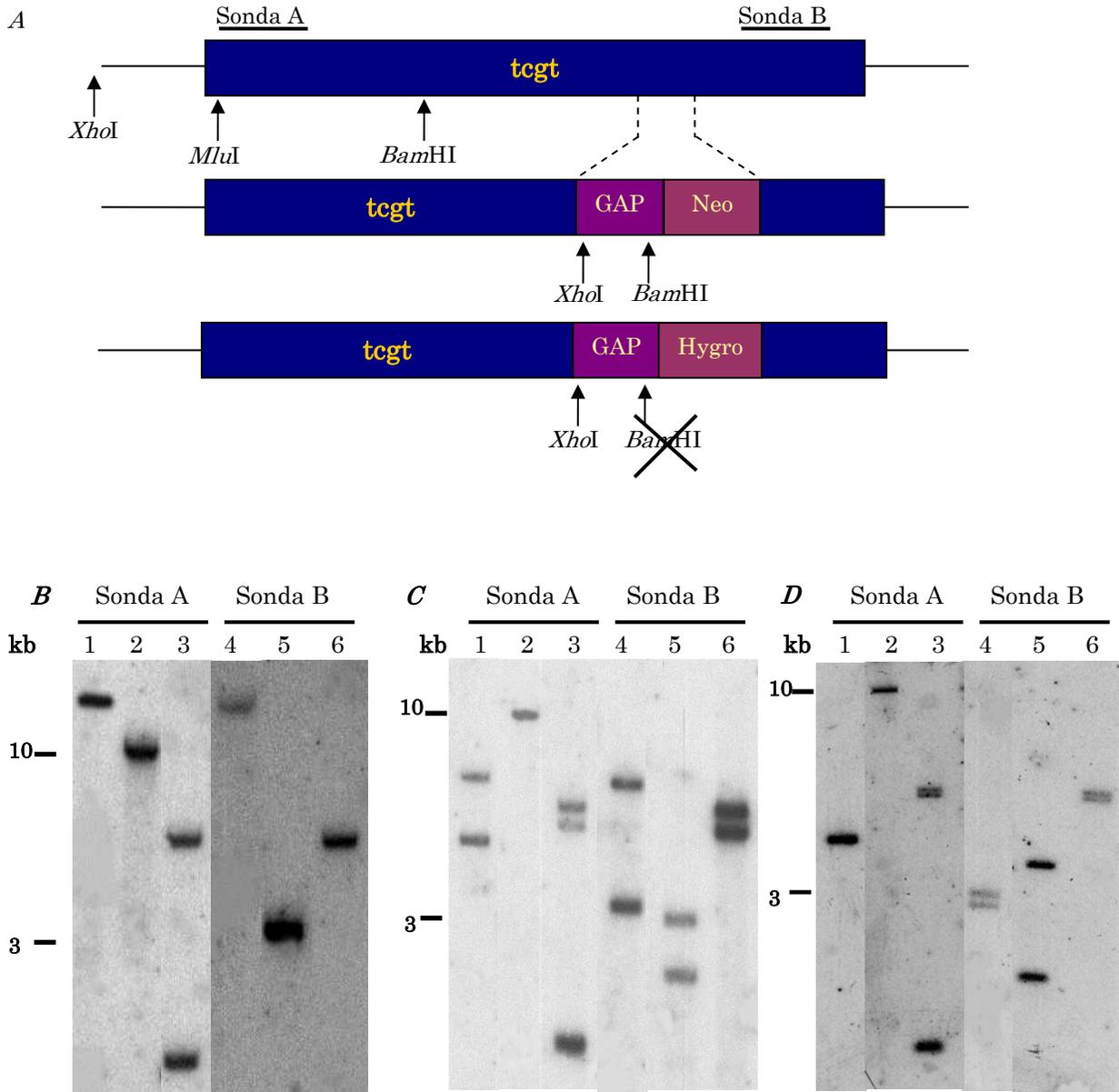


Figura 1.16: Caracterización del número de copias de *tcgt* y de los parásitos *gt/gt*. *A*, Diagrama del *tcgt* salvaje y de los alelos generados luego de su interrupción con los genes que confieren resistencia a G418 (Neo) e Higromicina (Hygro), donde se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el análisis y las regiones codificantes empleadas como sondas. El DNA genómico de las células salvajes (*B*), *gt⁺/gt⁺* (*C*) y de las *gt/gt* (*D*) se digirió con *Xho*I (calles 1 y 4), *Bam*HI (calles 2 y 5) y *Mlu*I (calles 3 y 6) y se sometió a análisis por Southern blot con las sondas indicadas más arriba. Para más detalles, véase Materiales y Métodos.

Tiempo de
digestión 10'' 30'' 1' 5' 10' 20' 30' 1h 2h

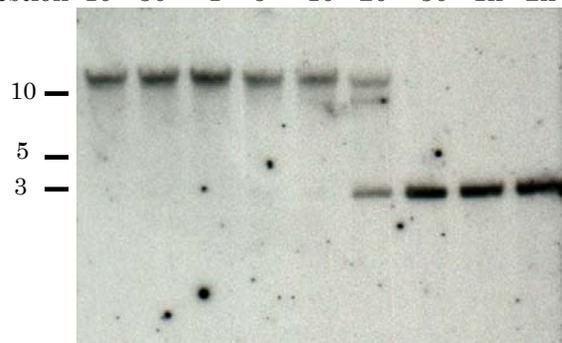


Figura 1.17: Los genes que codifican GT no están organizados en serie. Digestión parcial de DNA genómico de *T. cruzi*. 20µg de DNA genómico de *T. cruzi* se digirieron con *Bam*HI y alícuotas de 2 µg se tomaron a los tiempos indicados en la figura y se analizaron por Southern blot con la sonda B.

Una vez establecido que sólo existía una copia del gen *tcgt* por genoma haploide, se realizó la disrupción de un primer alelo por la introducción de la construcción GT-Neo mediante electroporación de la forma epimastigote de *T. cruzi* (ver Materiales y Métodos), eligiéndose como blancos para la recombinación homóloga a dos fragmentos que se extienden entre las bases 3178 a 3698 y 4277 a 4959 de la región codificante de *tcgt*. La expresión del gen que codifica la neomicina fosfotransferasa (Neo) permitió generar parásitos heterocigotas resistentes a la droga G418. Estos parásitos se clonaron y se comprobó la disrupción del gen analizando por Southern blot el patrón de los fragmentos de restricción generados con mismas las enzimas mencionadas anteriormente (Figura 1.16). Un clon conteniendo GT-Neo integrado en el *locus* de *tcgt* se seleccionó para realizar la interrupción del segundo alelo a través de la introducción de la construcción GT-Hygro, obteniéndose como resultado parásitos con ambos alelos anulados, resistentes a Higromicina B y G418. El análisis de Southern blot del DNA genómico de estos parásitos reveló un patrón de bandas consistente con la correcta integración de las construcciones en el *locus* de *tcgt* (Figura 1.16). Asimismo, el análisis por PCR con oligonucleótidos que se aparean con las bases 3555 a 3571 y 4804 a 4821 del gen de GT mostró que la recombinación había ocurrido en el lugar correcto (Figura 1.18).

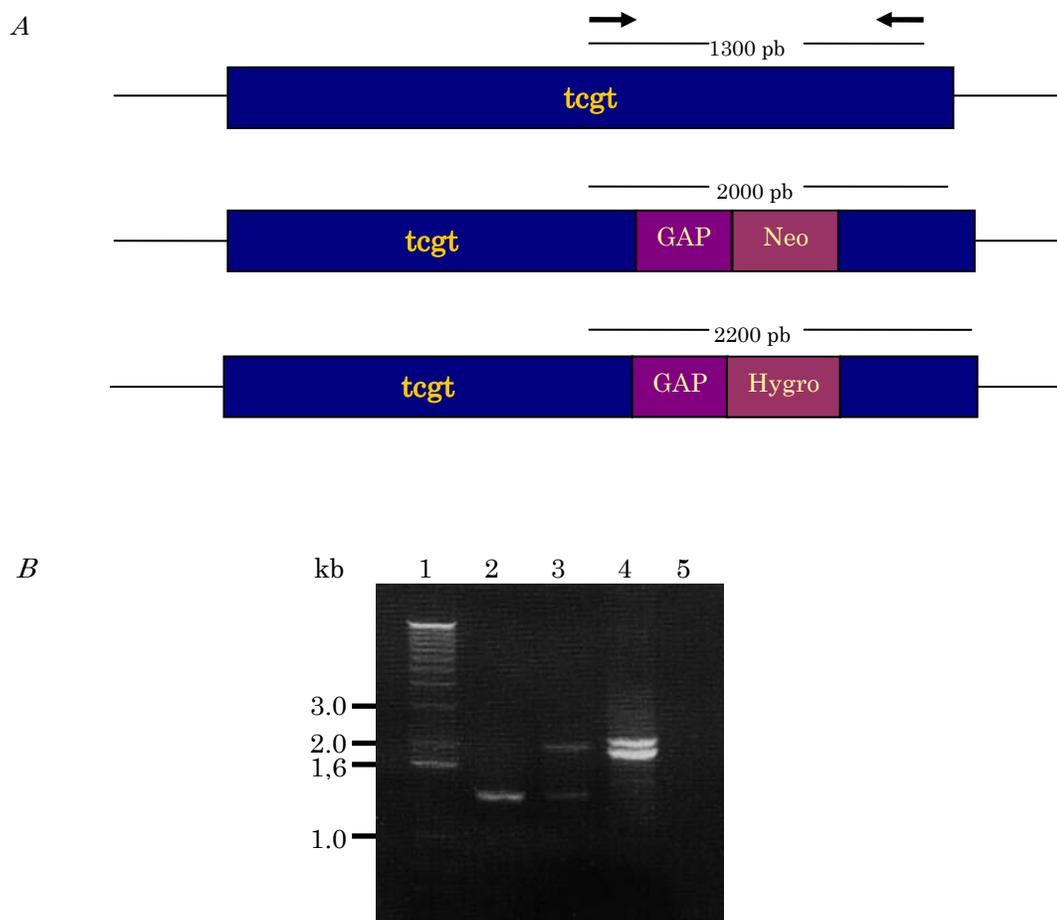


Figura 1.18: Caracterización de los *T. cruzi* mutantes nulos en GT. *A*, Diagrama del *tcgt* salvaje y de los alelos generados luego de su interrupción con los genes que confieren resistencia a G418 (Neo) e Higromicina (Hygro), donde se indican los sitios donde se aparean los oligonucleótidos utilizados en la PCR y la longitud de los fragmentos que se obtienen. *B*, Separación en un gel de agarosa 1% de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos indicados en *A* y DNA genómico de *T. cruzi* salvajes (calle 2), heterocigotos (calle 3) y nulos en GT (calle 4) y control negativo (calle 5).

Caracterización de los *T. cruzi* mutantes nulos en GT

La interrupción del gen de GT se demostró además midiendo los niveles de actividad enzimática. En un ensayo *in vitro*, los extractos de células mutantes fueron incapaces de transferir [¹⁴C]Glc a partir del UDP-[¹⁴C]Glc a tiroglobulina desnaturalizada, mientras que en los extractos de células salvajes así como también de la cepa con un solo alelo interrumpido, sí se detectó actividad glucosilante (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Actividad *in vitro* de GT de *T.cruzi* salvaje y nulos en GT^a

Enzima	Tiroglobulina	Cpm
Hígado de rata	–	45
Hígado de rata	+	2424
<i>T. cruzi</i> salvaje	–	146
<i>T. cruzi</i> salvaje	+	798
<i>T. cruzi</i> nulos en GT	–	44
<i>T. cruzi</i> nulos en GT	+	42

^aGT purificada de hígado de rata o microsomas de *T. cruzi* se utilizaron como fuente de enzima.

Por otro lado, se realizó un ensayo *in vivo* en presencia de un inhibidor de GII, DNJ, para estabilizar de esta forma los productos generados por la GT, y se determinó la composición de los glicanos unidos a las proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* luego de ser marcados con [¹⁴C]Glc. En el caso de las células salvajes este procedimiento condujo a la formación de *N*-glicanos glucosilados (G1M9-7N) y no glucosilados (M9-7N) mientras que de las células mutantes sólo se obtuvieron las variantes no glucosiladas (Figura 1.19 *A y B*). En este sentido, una hidrólisis ácida de todos los glicanos obtenidos confirmó la presencia de glucosa únicamente en aquellos provenientes de las células salvajes (Figura 1.19 *C y D*).

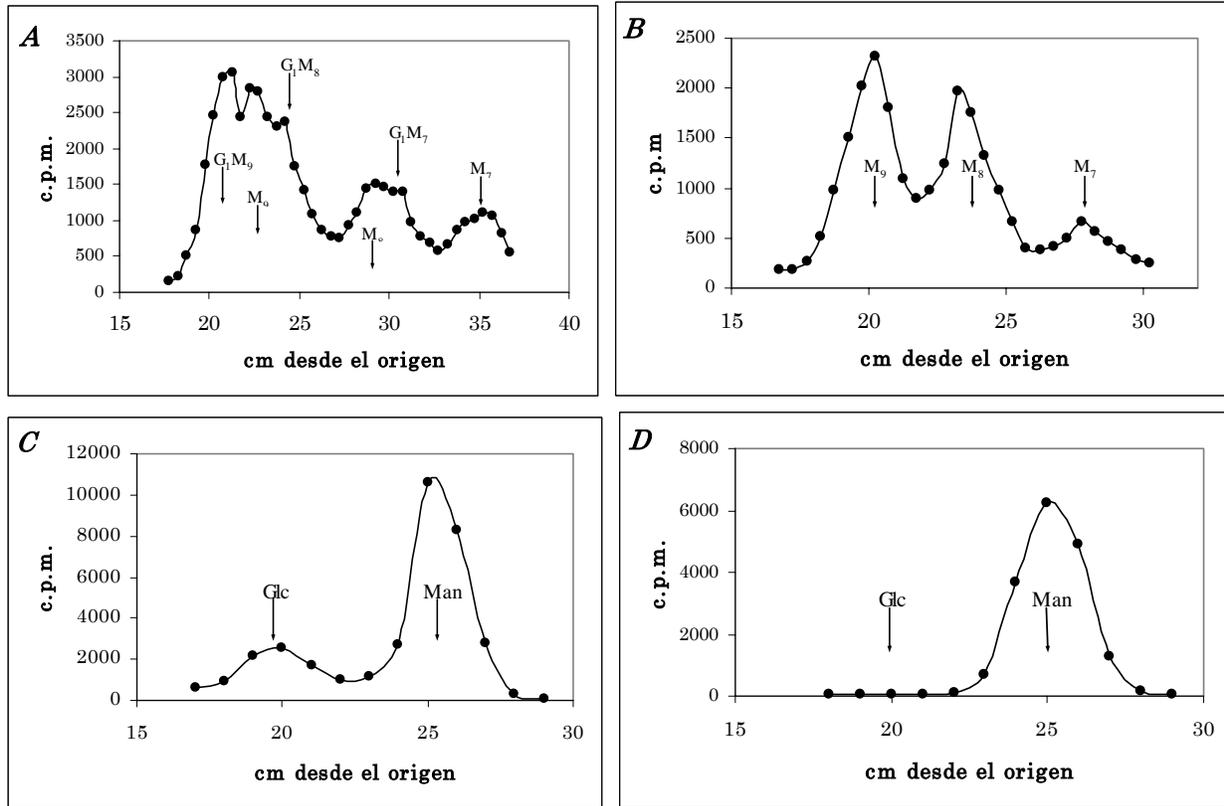


Figura 1.19: Caracterización *in vivo* de los mutantes nulos en GT. Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes (A y C) y mutantes nulos en GT (B y D) sometieron a un pulso y caza con [¹⁴C]Glc en presencia de 5 mM DNJ. El total de los glicanos endo-β-N-acetilglucosaminidasa H sensibles se separaron por cromatografía en papel con el solvente A (A y B). Los N-glicanos se sometieron a una hidrólisis ácida y se separaron por cromatografía en papel con el solvente B (C y D). Los números indican la posición donde corren los estándares: G₁M₉, G₁M₉N; M₉, M₉N; G₁M₈, G₁M₈N; M₈, M₈N; G₁M₇, G₁M₇N; M₇, M₇N; Glc; Man.

Estos resultados confirman que el gen interrumpido efectivamente codificaba para la GT y que no existe actividad glucosilante residual en los parásitos mutantes.

Evaluación de la viabilidad, el crecimiento y la capacidad infectiva de los T. cruzi GT⁻

Dado que no es factible realizar manipulaciones genéticas en la forma trypomastigote del parásito, infectiva y no replicativa, la disrupción del gen de GT se llevó a cabo en la forma epimastigote, la cual crece en medio líquido. La generación exitosa de los parásitos mutantes nulos indica que la GT no es esencial para la viabilidad de los epimastigotes. No se observaron diferencias entre las curvas de crecimiento en BHT de los epimastigotes salvajes (*tcgt^{+/+}*), heterocigotas (*tcgt^{+/-}*) y

homocigotas (*tcgt*^{-/-}). Tampoco se notaron diferencias morfológicas ni defectos en la motilidad entre los distintos grupos de parásitos a juzgar por la observación con microscopio óptico.

Sin embargo, la falta de GT y por consiguiente del sistema de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas podría estar alterando la capacidad de las células de diferenciarse a trypomastigote y posteriormente de invadir las células de mamíferos, proceso que, como se mencionó anteriormente, es mediado por diversas proteínas que contienen *N*-glicanos.

La diferenciación y capacidad infectiva de los *T. cruzi* mutantes nulos en GT se exploró mediante dos estrategias experimentales. En la primera de ellas, se infectaron monocapas de células de mioblasto de rata (L₆E₆) con epimastigotes salvajes, heterocigotos y homocigotos para GT en fase estacionaria de crecimiento previamente tratados con suero de cobayo para enriquecerlos en las formas infectivas. Se utilizaron dos relaciones parásito:célula, 5/1 y 10/1. Luego, las células se tiñeron con Giemsa y se contaron las que estaban infectadas. En la tabla 1.3 se muestran los promedios de cuatro experimentos, donde se observa que mientras los heterocigotos mantienen una capacidad infectiva semejante a la de los salvajes, los homocigotos nulos tienen su capacidad infectiva reducida aproximadamente a la mitad. En el segundo de los procedimientos se infectaron células Vero con epimastigotes en fase estacionaria de crecimiento que no habían sufrido ningún tratamiento particular. En una primera ronda de infección se encontraron células infectadas con parásitos salvajes y heterocigotos pero no con homocigotos nulos, a juzgar por la observación directa de células no teñidas. Sin embargo, cuando se recogieron los sobrenadantes de las células infectadas con las tres líneas de parásitos y se los utilizó para una segunda ronda de infección se obtuvieron resultados similares a los que se muestran en la tabla 1.3 Se puede concluir que la diferenciación y la capacidad infectiva están parcialmente afectadas por la falta de actividad de GT y por ende de la facilitación del plegamiento mediada por CRT.

Tabla 1.3: Efecto de la carencia de GT en la capacidad infectiva de *T. cruzi*^a

Relación parásito:célula	salvaje	heterocigoto	nulos en GT
5:1	45 ± 6	50 ± 5	27 ± 4
10:1	93 ± 8	106 ± 11	60 ± 2

^aLos valores corresponden al promedio del número de células infectadas de cuatro experimentos independientes, cada uno realizado con tres placas que contenían 50 000 células cada una.

Efecto de la ausencia de GT en el contenido de glicoproteínas

Con el objeto de comprender cómo la privación del sistema de QC afecta la capacidad del RE para plegar y exportar proteínas, se estudió la maduración de uno de los factores de virulencia mejor conocidos del parásito. La CZ es una proteína lisosomal que, como ya se mencionó, constituye aproximadamente el 5% del total de las proteínas solubles de la célula. Anteriormente se demostró que más del 90% de todas las moléculas de CZ interaccionan con CRT durante el proceso de plegamiento en una célula salvaje. Sin embargo, el nivel de CZ lisosomal en los mutantes nulos en GT sólo se vio levemente afectado, produciéndose una disminución del 5 al 20% según el momento de la curva de crecimiento en la que se realizó la medición (Figura 1.20). Por otro lado, se observa una disminución mucho más pronunciada en los niveles de actividad de otra glicoproteína lisosomal, la α -manosidasa, mientras que los niveles de una enzima citosólica, la piruvato quinasa, no se alteran (Figura 1.20). Estos resultados indican que la interacción lectina-glicoproteína monoglucosilada podría no ser absolutamente necesaria para el plegado correcto y que la ausencia de esta interacción puede tener efectos diferenciales en la eficiencia de plegado de diversas glicoproteínas, como se pone de manifiesto al comparar la CZ con la α -manosidasa, la cual probablemente como consecuencia de su condición de proteína multimérica (Vandersall-Nairn 1998) vio más afectada su maduración conformacional o el ensamblaje de los monómeros.

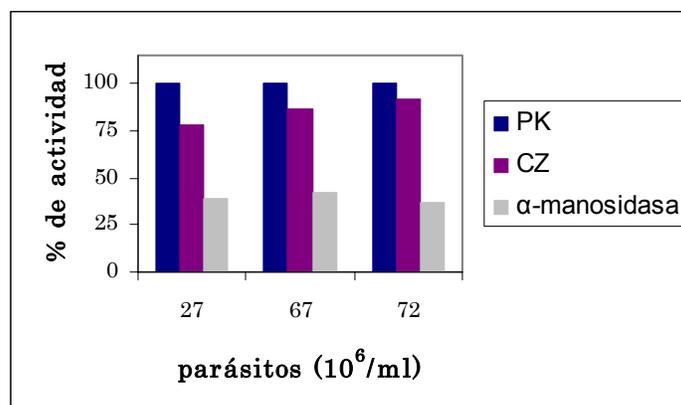


Figura 1.20: Contenido de glicoproteínas en los *T. cruzi* mutantes nulos en GT. Las células se cosecharon a las tres densidades que se indican en la figura, se congelaron y descongelaron. Se resuspendieron en 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6 y se centrifugaron durante 20 min a 13150 x g. En los sobrenadantes que corresponden a las fracciones citosólicas y lisosomales se ensayó la actividad piruvato quinasa (PK), cruzipaina (CZ) y α -manosidasa (α -man). Se consideró 100% el valor obtenido con las células salvajes.

Efecto de la ausencia de GT en la interacción CRT:glicoproteína

El plegamiento y la oligomerización que ocurren en el RE son los pasos limitantes en el proceso de secreción proteica en células eucariotas. En este sentido, previamente se demostró que el agregado de DNJ prolonga la interacción CRT-CZ y de esa manera retrasa la llegada de la proteasa a los lisosomas (Labriola y col. 1995; Labriola y col. 1999). Al contrario de lo que sucede en otras células eucariotas en las que el agregado de inhibidores de GI y GII provoca la acumulación de especies tri- y diglucosiladas que evaden la interacción con la lectina, en tripanosomátidos los inhibidores favorecen la persistencia de *N*-glicanos monoglucosilados.

El retraso en la llegada de CZ a los lisosomas observado previamente en la cepa Tulahuen 2 salvaje debido al agregado de DNJ se reprodujo en el clon CL Brener (Figura 1.21 A y B). Como se esperaba, en las células *gt*^{-/-} el agregado de DNJ no produjo ningún cambio, confirmando que el efecto producido en las células salvajes se debía a la formación de los *N*-glicanos monoglicosilados (Figura 1.21 C y D). La cinética de la llegada de CZ a los lisosomas en los parásitos nulos en GT fue similar a la de las células salvajes tratadas con DNJ. Esta observación constituyó una firme indicación que en los mutantes las moléculas de CZ estaban siendo retenidas en el RE por un mecanismo alternativo que no involucraba una interacción entre la lectina y el glicano. Para determinar cuál pudiese ser el

mecanismo de retención se estudiaron dos tipos de interacciones proteína-proteína, uno que involucra a CRT y otro a Grp78/BiP.

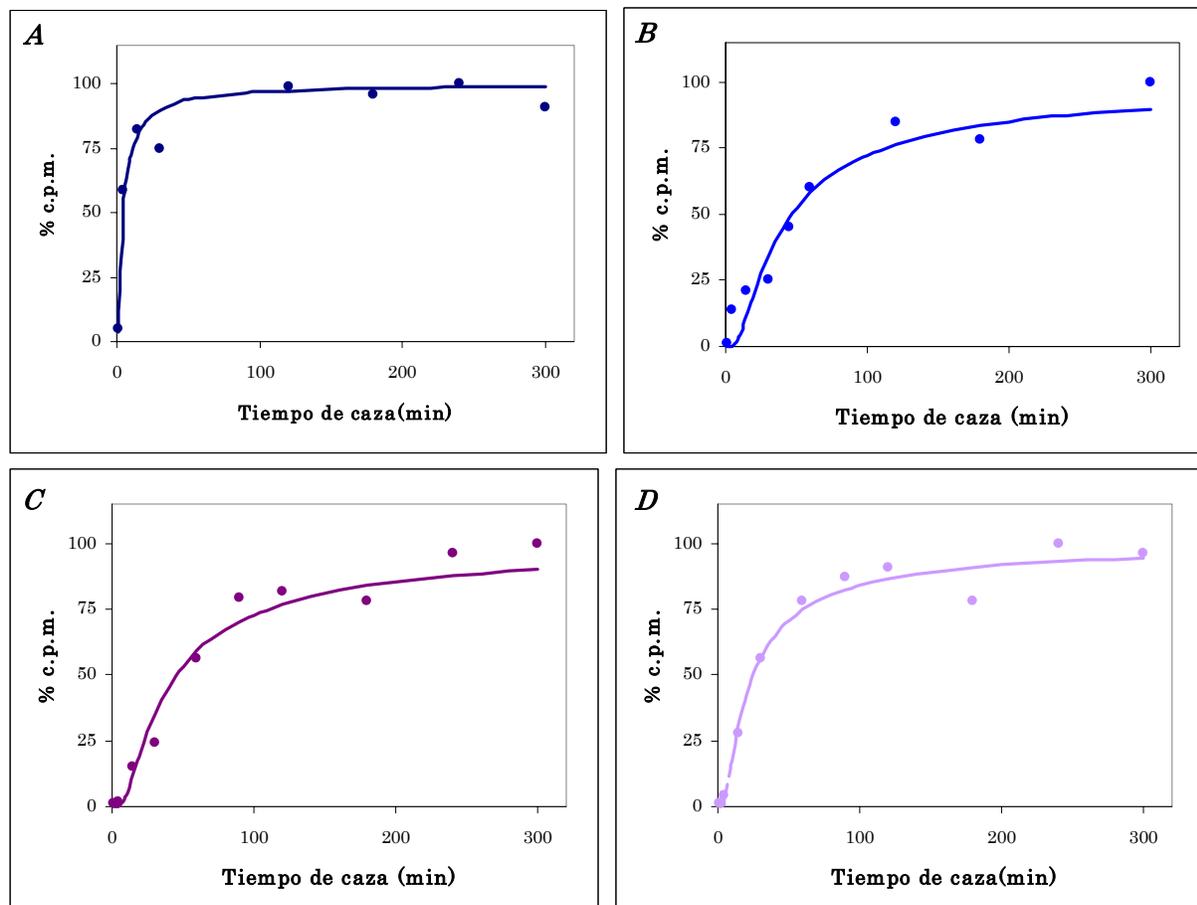


Figura 1.21: Cinética de la llegada de CZ a los lisosomas. Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes (*A* y *B*) y mutantes nulos en GT (*C* y *D*) se sometieron a un pulso y caza con [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys y se aisló la CZ de los lisosomas. Luego, la proteína se analizó por SDS-PAGE y se reveló por autorradiografía. La intensidad de las bandas se graficó en función del tiempo y se consideró una intensidad de 100% la obtenida al cabo de 300 min. El experimento con las células en (*B* y *D*) se realizó en presencia de 6 mM DNJ.

CRT no interacciona con CZ no glucosilada

Durante mucho tiempo se ha discutido sobre la capacidad de CNX y CRT de unir glicoproteínas no glucosiladas o incluso proteínas no glucosiladas y se ha sugerido que una interacción débil basada en contactos proteína-proteína podría no ser detectada dada la relativamente alta concentración de detergente habitualmente utilizada en la ruptura de las células previa a los ensayos de inmunoprecipitación. Para conocer si la CZ se une a CRT sólo por la presencia de la glucosa agregada por

la GT o si existen interacciones adicionales entre ellas se realizaron marcaciones de parásitos salvajes y *gt*^{-/-} por tiempos cortos, seguidas de inmunoprecipitaciones con suero anticalreticulina en distintas condiciones de lisis, utilizando distintas concentraciones de detergentes, tratando de minimizar la agregación proteica pero de preservar las potenciales interacciones proteína-proteína. Como ya se había descrito, el agregado de DNJ a células salvajes marcadas con [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys aumenta la cantidad de CZ que coimmunoprecipita con CRT cuando se agrega suero anti-CRT a células lisadas con 1% de NP-40. Sin embargo, no se observa que precipite CZ cuando se usan células nulas en GT, tanto en presencia como en ausencia de DNJ (Figura 1.22 A). Tampoco pudo observarse CZ unida a CRT en condiciones más suaves de lisis, incluso a concentraciones tan bajas de NP-40 como 0,1% (Figura 1.22 B). Estos resultados también se reprodujeron cuando el ensayo se realizó empleando distintas concentraciones del detergente digitonina (Figura 1.23). De esta manera, al menos para el caso particular de la CZ, quedan excluidas las interacciones de tipo proteína-proteína entre la CRT y su sustrato, por lo que a su vez se descarta que el mecanismo que pudiese retener a CZ en el RE y provocar el retraso en su llegada a los lisosomas esté mediado por CRT.

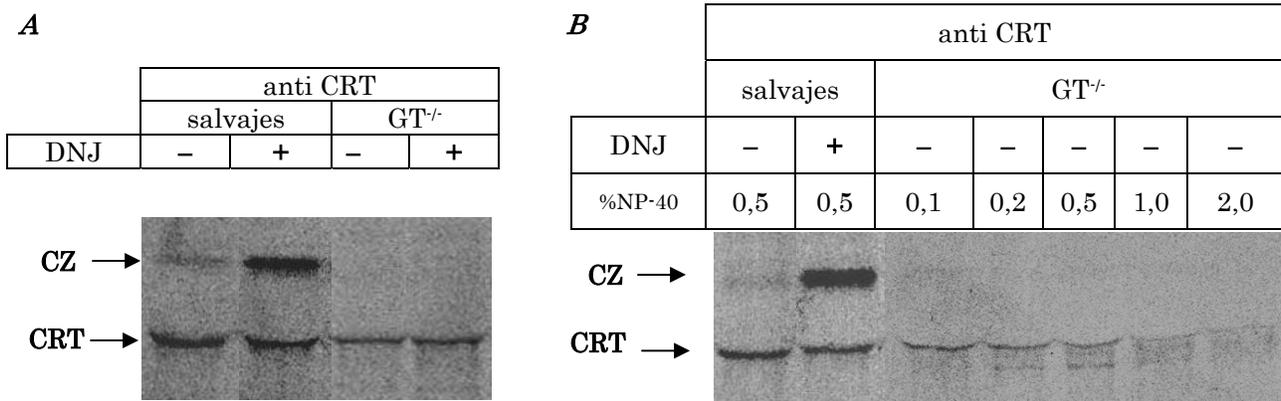


Figura 1.22: Interacción entre CRT y CZ. Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes y mutantes nulos en GT se marcaron durante 2 min con [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys y se lisaron con 1% Nonidet P-40 (A) o las concentraciones indicadas del mismo detergente (B). Los lisados se sometieron a inmunoprecipitaciones con antiCRT que luego se separaron en un SDS-PAGE y se revelaron por autorradiografía. Donde se indica, se agregó 6 mM DNJ 30 min antes del pulso radioactivo.

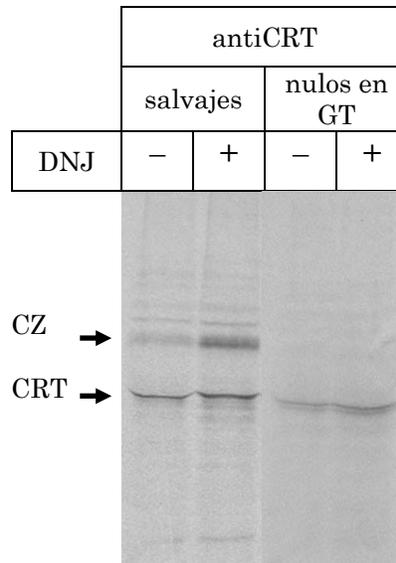


Figura 1.23: Interacción entre CRT y CZ. Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes y mutantes nulos en GT se marcaron durante 2 min con [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys y se lisaron con 1% digitonina. Los lisados se sometieron a inmunoprecipitaciones con antiCRT que luego se separaron en un SDS-PAGE y se revelaron por autorradiografía. Donde se indica, se agregó 6 mM DNJ 30 min antes del pulso radioactivo.

La ausencia de GT prolonga la interacción Grp78/BiP- CZ

Para estudiar la influencia de la creación de los *N*-glicanos monoglucosilados mediada por GT en la interacción entre CZ y Grp78/BiP se agregó cicloheximida a células de *T. cruzi* salvajes y *gt^{-/-}* para detener la síntesis proteica. Se retiraron alícuotas de células a distintos tiempos que se lisaron e inmunoprecipitaron con suero contra CZ. Los inmunoprecipitados se analizaron por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo generado contra BiP de *T. brucei* que también reconoce a la proteína de *T. cruzi*. Los resultados que se muestran en la figura 1.24 *A* y *B* indican que la interacción entre CZ y Grp78/BiP persistió por tiempos más prolongados en los mutantes nulos en GT, mostrando así que el retraso observado en la llegada de la CZ a los lisosomas se debía a la retención en el RE mediada por Grp78/BiP. Por otro lado, el análisis densitométrico de los Western blot reveló que los niveles de la proteína Grp78/BiP en los parásitos mutantes estaban aumentados respecto a los de las células salvajes (Figura 1.24 *C*). Se puede concluir que en ausencia de la interacción entre CRT y las glicoproteínas la eficiencia de plegamiento disminuye sensiblemente lo que produce la acumulación de CZ en el RE. Esto, a su vez, provoca

un aumento de mecanismos alternativos facilitadores del plegamiento que unen más CZ que en condiciones salvajes y permiten retener a CZ en el RE. Así, la inducción de estos mecanismos es necesaria para mantener el repertorio adecuado de glicoproteínas de la vía secretoria.

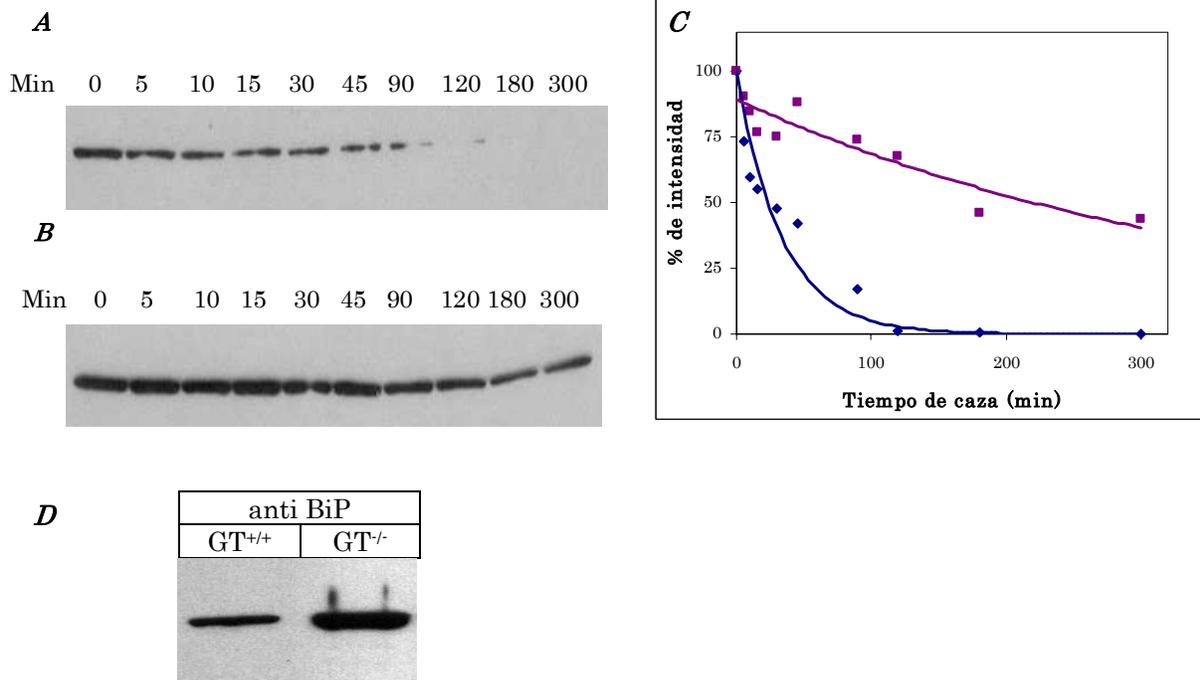


Figura 1.24: Interacción entre Grp78/BiP y CZ. En epimastigotes salvajes (A) o mutantes nulos en GT (B) se detuvo la síntesis de proteínas con el agregado de 1 mM cicloheximida y se tomaron muestras luego de los tiempos de caza indicados en la figura. Las células se lisaron y se inmunoprecipitaron con suero antiCZ. Los inmunoprecipitados se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida 10% con SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con suero antiBiP de *T. brucei*. En (C) se graficó la cuantificación de las intensidades de las bandas de (A) en azul y (B) en violeta donde se consideró 100% la intensidad de la primer alícuota. En (D) se cosecharon 10⁷ epimastigotes salvajes y mutantes nulos en GT en fase exponencial de crecimiento y se calentaron en buffer de ruptura, luego se separaron en un SDS-PAGE y se analizaron con un suero antiBiP como se indicó más arriba.

Discusión

El RE de las células eucariotas es el compartimiento donde las proteínas de la vía secretoria se pliegan, oligomerizan y sufren diversas modificaciones postraduccionales. Para que estos procesos tengan lugar de manera eficiente el RE dispone de una batería de chaperonas moleculares y enzimas catalizadoras del plegamiento. Estas moléculas no sólo asisten a las proteínas en la adquisición de su conformación nativa sino que también verifican el estado conformacional de las mismas en un proceso conocido como control de calidad de plegamiento (QC, por quality control). La consecuencia inmediata de este sistema es la retención de aquellas especies que no han alcanzado un arreglo tridimensional correcto, las cuales son eventualmente degradadas, si no lo alcanzan. El sistema de QC basado en *N*-glicanos requiere de la formación de un glicano monoglucosilado que es reconocido por dos lectinas residentes en el RE, CNX y CRT. Este glicano monoglucosilado necesario para el acceso a este sistema de QC puede formarse en células de mamíferos por dos vías. Una vía es la deglucosilación parcial del *N*-glicano transferido a la proteína y la otra es a través de la reglucosilación del glicano de alta manosa completamente deglucosilado. Esta última reacción es catalizada por la GT, una enzima capaz de reconocer y glucosilar únicamente a las glicoproteínas que no adquirieron su conformación nativa. Así, las proteínas que están en proceso de plegamiento oscilan entre la forma glucosilada y la no glucosilada como consecuencia de la acción de las actividades opuestas de GT y GII, uniéndose y liberándose, a su vez, del ancla de CNX/CRT. Cuando la proteína logra plegarse correctamente deja de ser sustrato de la GT pero lo sigue siendo de GII por lo que eventualmente es completamente deglucosilada, se libera del ciclo de QC y puede continuar hacia su destino final en la vía secretoria.

Para evaluar la relevancia de este sistema de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en este trabajo de tesis se utilizó como organismo modelo a *T. cruzi*. En este parásito unicelular los glicanos monoglucosilados sólo pueden formarse por acción de la GT dado que el *N*-glicano que se transfiere a los polipéptidos nacientes carece en absoluto de glucosas. Si se imposibilita la formación del glicano monoglucosilado se está impidiendo que las glicoproteínas ingresen al

ciclo de QC mediado por CRT (este parásito no posee CNX). Con el objetivo de eliminar la actividad de la GT por medio de la interrupción de los genes que la codifican fue necesario primeramente obtener la secuencia de dicho gen.

El primer hallazgo llamativo al analizar la secuencia obtenida resultó ser la ausencia de señal de retención en el RE en la estructura primaria de la GT. La ausencia de señal de retención no ocurre en todas las glicoproteínas residentes del RE de *T. cruzi* puesto que ya se han descrito otras proteínas con dicha localización que poseen en su extremo C-terminal las secuencias MDDL y KEDL, para Grp78/BiP y CRT respectivamente (Tibbetts y col. 1994; Labriola y col. 1999). Por otro lado, también se conocen proteínas solubles del RE que carecen de señal de retención en el RE en células de mamíferos y levadura e incluso en otro protozoo de la familia Trypanosomatidae como es el caso de la PDI de *Leishmania donovani* (Trombetta y col. 1996; D'Alessio y col. 1999; Padilla y col. 2003). El mecanismo que permite que la GT de *T. cruzi* sea retenida en el RE es desconocido.

Una vez obtenida la secuencia del gen de GT y comprobado que se trata de un gen de copia única se realizó la interrupción de los genes mediante recombinación homóloga. La disponibilidad de mutantes GT nulos permitió estudiar si las interacciones proteína-proteína, además de las proteína-glicano, participaban en el reconocimiento de las glicoproteínas por la CRT de *T. cruzi*. En la literatura se pueden encontrar reportes sugiriendo que la CRT y una forma soluble de CNX previenen la agregación *in vitro*, no sólo de glicoproteínas desnaturalizadas que poseen un glicano monoglucosilado, sino también de proteínas desnaturalizadas desprovistas de *N*-glicanos. CRT y CNX también son capaces de reprimir *in vitro* la desnaturalización térmica de las proteínas no glicosiladas y de mejorar su replegado manteniendo a los intermediarios de plegamiento en un estado competente. Asimismo, ambas lectinas pueden formar complejos estables con confórmers no plegados pero no con moléculas en su estado nativo. A partir de estas observaciones se concluyó que estas lectinas podrían comportarse *in vitro* como chaperonas clásicas (Ihara y col. 1999; Saito y col. 1999; Stronge y col. 2001). Sin embargo, la validez de dichas conclusiones es cuestionable porque CRT presenta una transición de

desnaturalización cooperativa con una temperatura media similar (44 °C) a la empleada en los ensayos de chaperona y el efecto observado bien podría deberse a un fenómeno inespecífico (Bouvier y Stafford 2000; Li y col. 2001). En relación a los ensayos *in vivo*, se reportó que en células de mamífero desprovistas de actividad de GI o GII o en presencia de un inhibidor de ambas enzimas (castanospermina; *i.e.* condiciones que evitan la formación de glicanos monoglucosilados) ciertas glicoproteínas inmunoprecipitan junto con CNX si se toman suficientes recaudos durante la lisis celular y la inmunoprecipitación (Danilczyk y Williams 2001). Esos resultados llevaron a plantear un modelo en el que CRT y CNX interaccionan con la proteína a través de un sitio de unión a polipéptidos de forma similar al de las chaperonas convencionales (Williams 2006). Este modelo se puede poner a prueba en los *T. cruzi* nulos en GT generados en este trabajo de tesis. Si la unión a la lectina no dependiese de la presencia del residuo de glucosa en el glicano, en los mutantes nulos en GT podrían inmunoprecipitar con CRT las proteínas unidas a ella a través del sitio de unión a polipéptidos. Sin embargo, los resultados aquí presentados muestran que incluso bajo condiciones muy suaves de lisis e inmunoprecipitación no pudo detectarse interacción entre CRT y CZ en las células mutantes nulas en GT, confirmando así la naturaleza exclusiva de lectina de la CRT de *T. cruzi*.

Las glicoproteínas son componentes esenciales del complejo ciclo de vida de *T. cruzi*. En particular, la CZ fue identificada como uno de los factores de virulencia del *T. cruzi* (Franke de Cazzulo y col. 1994). De hecho, inhibidores específicos de esta enzima fueron capaces de curar la infección por *T. cruzi* en un modelo de ratón (Engel y col. 1998). Pseudopéptidos derivados de las vinilsulfonas superaron las pruebas de toxicidad y los análisis farmacocinéticos en roedores y perros (SRI Internatinal project # 1382-377) y al menos un miembro de esta familia de compuestos está siendo evaluado como candidato quimioterapéutico para entrar en ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Jacobsen y col. 2000).

A pesar de esta gran dependencia de las glicoproteínas para su ciclo de vida, la obtención de mutantes nulos en GT en *T. cruzi*, con la consiguiente eliminación del

sistema de QC dependiente de *N*-glicanos, no afectó la viabilidad de las células y solamente tuvo efectos cuantitativos pero no cualitativos en los procesos de diferenciación e infección. Teniendo en cuenta los resultados aquí descritos puede afirmarse que la existencia del sistema de QC en el que participa CRT no sería esencial para el desarrollo de las células bajo condiciones normales de crecimiento. Una conclusión similar se había alcanzado empleando células de mamíferos y fúngicas (Reitman y col. 1982; Ray y col. 1991; Fernandez y col. 1996; D'Alessio y col. 1999). También se han descrito líneas celulares derivadas de ratones deficientes en CRT capaces de sobrevivir, aunque los correspondientes ratones de los cuales se obtuvieron dichas líneas celulares mueren en estado embrionario (Mesaeli y col. 1999; Rauch y col. 2000; Denzel y col. 2002). Los embriones de ratones deficientes en CNX llegan a término pero mueren a poco de nacer. (Denzel y col. 2002) Se puede argumentar que la letalidad viene dada por el plegamiento defectuoso de numerosas glicoproteínas pero si se toman todos los resultados en conjunto, estos pueden reflejar que no es el sistema de QC lo esencial sino que CNX y CRT cumplen funciones esenciales distintas a la de la unión a glicanos monoglucosilados. En este sentido, CRT es la principal proteína de unión a calcio del RE y su eliminación conduce a un marcado descenso de los niveles de calcio intracelulares (Nakamura y col. 2001). Los ratones a los cuales se les eliminó el gen de CRT mueren durante el desarrollo embrionario debido a fallas cardíacas y pueden ser rescatados mediante la sobreexpresión de calcineurina, un factor de transcripción que funciona río abajo de las señales que movilizan calcio del RE (Guo y col. 2002). Estas observaciones demuestran que la letalidad en ratones se debería a la capacidad de CRT para regular los niveles de calcio intracelulares. Otra interpretación posible es que en organismos multicelulares CNX/CRT son absolutamente necesarias para el plegamiento de unas pocas glicoproteínas requeridas para la supervivencia de dicho organismo pero no de células aisladas.

Desde otro punto de vista, en la actualidad se conoce un único organismo que en su forma salvaje no posee GT, *S. cerevisiae* (Fernandez y col. 1994; Jakob y col. 1998). Aunque carece de este importante componente del QC de glicoproteínas, no

ha podido establecerse con claridad si los glicanos monoglucosilados participan en la facilitación del plegamiento. Por un lado, en oposición a lo que sucede en células de mamíferos y *S. pombe*, la eliminación del gen de GII no provoca la acumulación de glicoproteínas mal plegadas (Jakob y col. 1998; Simons y col. 1998) y además la CNX de *S. cerevisiae* presenta diferencias estructurales significativas comparada con sus contrapartes de mamíferos y *S. pombe*. (Parlati y col. 1995b) (ni *S. pombe* ni *S. cerevisiae* poseen genes que codifiquen para CRT). Sin embargo, por otro lado, se ha reportado que mutantes de *S. cerevisiae* que transfieren G1M9N2 en la *N*-glicosilación y que carecen de GII, acumulan menos glicoproteínas mal plegadas en el RE cuando se las somete a un estrés exógeno (agregado de ditiotreitol) que las mutantes que transfieren M9N2 o G2M9N2 y que también carecen de GII (Jakob y col. 1998). Esto sugiere que en *S. cerevisiae* los glicanos monoglucosilados están de alguna manera involucrados en la facilitación del plegamiento por lo que no puede descartarse que un sistema de QC que dependa de *N*-glicanos sea funcional en esta levadura.

En *T. cruzi* estudiamos particularmente el proceso de plegamiento de la CZ. Como ya se mencionó, la CZ está compuesta por dos dominios: el dominio catalítico y la extensión C-terminal (McGrath y col. 1995). El dominio catalítico posee dos secuencias consenso de *N*-glicosilación y al menos una de ellas está ocupada, mientras que el dominio C-terminal posee una de estas secuencias, la cual se ha demostrado que lleva un glicano (Cazzulo y col. 1992; Metzner y col. 1996). Con anterioridad se describió que el 65% de los glicanos de cualquiera de los dominios, son glucosilados por la GT (Labriola y col. 1995) y como la enzima modifica glicanos que están cercanos a una perturbación estructural y puesto que ambos dominios de CZ se pliegan de manera independiente (McGrath y col. 1995; Ritter y Helenius 2000) se concluyó que más del 90% de las moléculas de CZ son glucosiladas en al menos uno de sus *N*-glicanos, permitiendo la consiguiente asociación con CRT. Si el segundo sitio de glicosilación en el dominio catalítico también estuviese ocupado y glucosilado se puede calcular estadísticamente que prácticamente todas las moléculas de CZ se unirían a CRT. Dado que CZ posee siete uniones disulfuro, se

espera que su plegamiento dependa en gran medida de la interacción con CRT y ERp57 de existir esta última en el RE de *T. cruzi*. ERp57 es un miembro de la familia de las proteína disulfuro isomerasas que en células de mamífero se encuentra asociada a CNX/CRT y promueve la formación de uniones disulfuro nativas en las glicoproteínas monoglucosiladas (Oliver y col. 1999). Sin embargo, los resultados aquí presentados muestran que la ausencia de la interacción CRT-CZ sólo afecta levemente los niveles intracelulares de la proteinasa. La explicación más probable para este resultado es que la acumulación de proteínas mal plegadas como consecuencia indirecta de la falta de GT induce un aumento de la síntesis de otras chaperonas y proteínas facilitadoras del plegamiento del RE, las cuales mantienen la eficiencia del plegamiento de CZ (UPR, (Parodi 2000).

Debido a que el plegamiento es un proceso proclive a errores, las células disponen de sistemas alternativos para ayudar a las proteínas a adquirir la estructura terciaria adecuada en el RE. Si bien cada sistema facilitador de plegamiento presenta una determinada especificidad por sus sustratos, dicha especificidad no es absoluta y como regla general se puede afirmar que cuando un sistema esta ausente, uno alternativo puede suplir su tarea. Por ejemplo, en células de mamífero en las cuales se impide el acceso al sistema de CNX/CRT las glicoproteínas se unen a Grp78/BiP (Zhang y col. 1997). También se ha observado que la inhibición de la formación de *N*-glicanos monoglucosilados en células de mamíferos y *S. pombe* ya sea por el agregado de inhibidores de GII o por la disrupción de los genes que codifican para GII o GT resulta en la inducción del mRNA de Grp78/BiP (Balow y col. 1995; Pahl y Baeuerle 1995; D'Alessio y col. 1999). En concordancia con esos resultados, en este trabajo se observa en los *T. cruzi* carentes de GT un aumento de los niveles de Grp78/BiP. Efectivamente se pudo detectar interacción entre CZ y Grp78/BiP tanto en células con actividad de GT como en las carentes de ella. Sin embargo, la interacción fue más prolongada en estas últimas, sugiriendo que la Grp78/BiP podría ser la responsable del retraso en la llegada de CZ a los lisosomas en los parásitos nulos para GT. Grp78/BiP reconoce preferentemente heptapéptidos que contienen residuos hidrofóbicos voluminosos en

posiciones alternadas expuestas en conformaciones extendidas de las proteínas, mientras GT exhibe afinidad por parches de aminoácidos hidrofóbicos presentes en conformaciones de tipo glóbulo fundido (Blond-Elguindi y col. 1993; Caramelo y col. 2003; Caramelo y col. 2004). En otras palabras, el paso de las glicoproteínas de su asociación con Grp78/BiP al sistema basado en CNX/CRT podría suceder como una consecuencia natural de presentar suficiente estructura primaria en el lumen del RE como para permitir la formación de intermediarios colapsados de plegamiento. De hecho, existe una gran cantidad de ejemplos en los cuales se ha observado en células de mamíferos intactas dicha interacción secuencial, primero Grp78/BiP y luego con CNX/CRT (Hammond y col. 1994; Kim y Arvan 1995; Tomita y col. 1999; Molinari y Helenius 2000). A partir de los resultados aquí presentados se puede especular que un orden similar ocurre en células de *T. cruzi* normales pero que en el caso de los mutantes nulos en GT, los mayores niveles de Grp78/BiP podrían prolongar la conformación extendida para prevenir la agregación de glicoproteínas.

Aunque en este trabajo se ha destacado la redundancia entre los sistemas que promueven el plegamiento, también puede notarse que la ausencia de la interacción con las lectinas afecta de manera diferencial la eficiencia de plegamiento de diversas proteínas, así, por un lado los niveles de la CZ prácticamente no se alteran pero los de la α -manosidasa sufren una drástica disminución. En este mismo sentido pueden encontrarse ejemplos en la literatura que demuestran que no siempre uno de los sistemas puede suplir todas las funciones del otro. Ratones homocigotos nulos para calmegina, un homólogo de CNX específico de testículos, son prácticamente estériles, aunque muestran un comportamiento copulatorio y espermatogénesis normales (Ikawa y col. 1997). Su esperma no se adhiere a la matriz extracelular del óvulo (zona pelúcida), probablemente debido a la ausencia total o parcial de las glicoproteínas de anclaje de la membrana plasmática. Otro ejemplo muy llamativo es que puede evitarse la producción de partículas infecciosas de los virus HIV-1 y de la hepatitis B si se agregan inhibidores de GI y GII al medio de cultivo (Gruters y col. 1987; Fischer y col. 1996; Mehta y col. 1997). En el primer caso, las partículas de virus producidas en ausencia de interacción CNX/CRT-glicoproteína no son

infecciosas debido al mal plegamiento del rulo de V1-V2 en la gp120 del HIV-1. De manera semejante, el plegamiento de glicoproteína M del virus de la hepatitis B está severamente comprometido cuando la interacción lectina-glicoproteína es eliminada y por ende el ensamblaje del virus obstaculizado. También se encontró que la interacción CNX-glicoproteína es esencial para la viabilidad de *S. pombe* en condiciones severas de estrés en el RE, como por ejemplo, altas temperaturas (Fanchiotti y col. 1998). Presumiblemente, la o las glicoproteínas afectadas participarían en la formación de la pared celular, dado que la viabilidad a altas temperaturas se recupera no sólo cuando se transfecta a las células mutantes con un vector de expresión que codifique la GT, sino también cuando las células se cultivan en un medio hiperosmótico (1M sorbitol). Por lo tanto, estos resultados muestran que en algunos casos la facilitación del plegamiento mediada por CNX/CRT es fundamental para diversos procesos celulares.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la interacción lectina:glicoproteína no es necesaria de forma absoluta para el plegado correcto de las glicoproteínas de *T. cruzi*, incluso para aquellas proteínas como la CZ que en condiciones normales utilizan ampliamente este sistema de QC. De esta forma, se pone en evidencia la redundancia entre los sistemas de chaperonas que son dependientes o independientes de los carbohidratos. Esta plasticidad funcional también indica que el uso de cierta maquinaria celular, al menos para algunas glicoproteínas, no está dictado por la secuencia primaria sino que se puede adaptar a la disponibilidad de chaperonas del RE. Este principio es ilustrado por proteínas que tienen diferente destino dependiendo del ambiente celular (una lista de ejemplos puede encontrarse en (Trombetta 2003).

En conclusión, los resultados aquí presentados muestran que la maquinaria de plegamiento del RE del *T. cruzi* presenta una alta plasticidad que le permite al parásito superar la ausencia de un mecanismo específico que facilita el plegamiento de glicoproteínas.

Parte II

Estudio del rol del calcio en la actividad de lectina-chaperona de CRT y del efecto de los niveles de calcio del RE en la localización subcelular de CRT

Introducción

Muchas de las proteínas sintetizadas en el citosol son translocadas a través de, o se insertan en, la membrana del RE y recién en este compartimiento adquieren su conformación nativa. Sin embargo, en muchos aspectos el ambiente del RE es cualitativamente diferente al del citosol, por ejemplo, el lumen del RE es más oxidante y la concentración de calcio es al menos dos órdenes de magnitud mayor (Schroder y Kaufman 2005). En células no contráctiles, el RE es el principal reservorio de calcio intracelular, donde la concentración de este ión puede fluctuar desde 1-5 mM, cuando está lleno, a 10-50 μ M después de la apertura de los canales de calcio localizados en la membrana del RE (Miyawaki y col. 1997).

El gradiente de calcio entre el citosol y el RE es mantenido por una proteína que hidroliza ATP para bombear calcio desde el citosol hacia el lumen del RE denominada SERCA (del inglés sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase). La inhibición de la SERCA por tapsigargina o ácido ciclopiazónico disipa el gradiente de calcio mediante un proceso de "goteo" que tiende a equilibrar la concentración de calcio entre ambos compartimientos.

La concentración de calcio libre en el RE afecta muchas de sus funciones, incluyendo la secreción de proteínas (Sambrook 1990), la activación del influjo de calcio a través de los canales de la membrana plasmática (Berridge 1995), la sensibilidad de las células a la apoptosis (Pinton y Rizzuto 2006) y la UPR durante el estrés del RE (Kaufman y col. 2002). El efecto que tienen las fluctuaciones del calcio del RE en el plegamiento de las proteínas no está completamente aclarado: mientras que ciertas proteínas pueden necesitar calcio de forma intrínseca para alcanzar su conformación nativa, el plegamiento de la mayoría es afectado indirectamente como consecuencia de la dependencia de calcio que presenten las chaperonas y enzimas que asisten el plegamiento (Brostrom y Brostrom 2003). Sin embargo, la mayor parte del calcio presente en el RE no está libre sino unido a proteínas que actúan como reguladores, los cuales unen calcio con gran capacidad y baja afinidad y lo liberan según las necesidades fisiológicas de la célula (Brostrom y Brostrom 2003).

Funciones de CRT en el RE

La CRT cumple en el RE al menos dos funciones importantes. Por un lado, como ya se mencionó en la primera parte de esta tesis, CRT participa en el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas. La interacción de CRT con glicoproteínas en proceso de plegamiento que poseen sus glicanos monoglucosilados evita que estas abandonen el RE antes de haber adquirido su conformación nativa y también aumenta la eficiencia del proceso al evitar la agregación proteica y al permitir la intervención de otros factores promotores del plegamiento (Parodi 2000). Por otro lado, CRT es la principal proteína de unión a calcio en el RE de células no contráctiles y como tal está involucrada en varios procesos que regulan la homeostasis celular del Ca^{2+} como ser el almacenamiento de calcio en el RE (Nakamura y col. 2001), la liberación del calcio desde el RE (Mesaeli y col. 1999; Nakamura y col. 2001) el funcionamiento de la SERCA (Camacho y Lechleiter 1995) y la activación del influjo de calcio a través de la membrana plasmática mediado por canales operados por reservorios (Bastianutto y col. 1995; Mery y col. 1996; Fasolato y col. 1998; Arnaudeau y col. 2002).

CRT posee dos sitios de unión a calcio. Uno de ellos une un catión con alta afinidad ($K_d=1\mu\text{M}$), mientras que el segundo une alrededor de 25 iones calcio con baja afinidad ($K_d\sim 1\text{-}2\text{mM}$) (Baksh y Michalak 1991). Dado que es muy improbable que la concentración de calcio libre en el RE disminuya por debajo de $1\mu\text{M}$ seguramente el sitio de alta afinidad permanece ocupado y este calcio cumple un rol estructural más que regulador. En este sentido sería el sitio de alta capacidad y baja afinidad el que tendría relevancia fisiológica.

CRT está compuesta por tres dominios (Michalak y col. 1999): (i) el dominio N-terminal, (ii) el dominio P y (iii) el dominio C-terminal (Figura 2.1). El dominio N-terminal tiene una secuencia muy conservada a través de la evolución y se predice que adopta una estructura globular formada por dos láminas β antiparalelas. El dominio P recibe ese nombre porque comprende dos módulos en tándem con tres repeticiones cada uno ricas en residuos prolina. La primera de las repeticiones tiene la secuencia PXXIXDPDAXKPEDWDE, mientras que la segunda es

GXWXPPXIXNPXYX. Ambas repeticiones son importantes para la actividad de lectina-chaperona (Vassilakos y col. 1998). Además, esta región interacciona con PDI (Corbett y col. 1999) y ERp57 (Frickel y col. 2002). El dominio C-terminal es muy ácido y termina con la señal de retención al RE KEDL. Este dominio es el que une calcio con alta capacidad y baja afinidad y se demostró que la unión de calcio juega un rol regulador en el control de la interacción *in vitro* de CRT con PDI y ERp57 (Vassilakos y col. 1998). La organización estructural de CNX es similar a la de CRT siendo la principal diferencia una hélice transmembrana situada cerca del extremo C-terminal que ubica a la región cargada negativamente en el citoplasma. Asimismo, el dominio P de CNX contiene cuatro en lugar de tres repeticiones ricas en prolina.

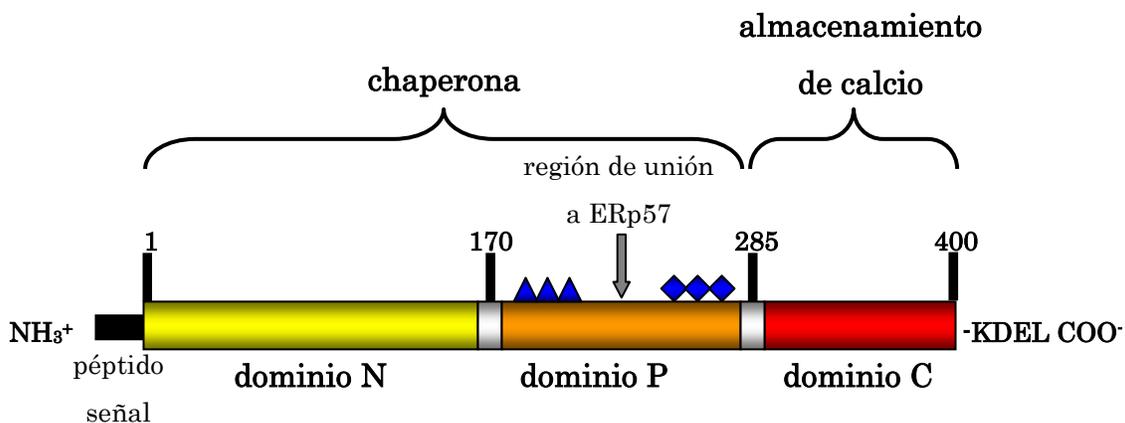


Figura 2.1: Representación esquemática de los dominios de CRT. Las predicciones estructurales anticipan la existencia de tres dominios estructurales y funcionales. Los dominios N, P y C están representados en amarillo, naranja y rojo respectivamente. La proteína contiene un péptido señal en el extremo N-terminal (rectángulo negro) y una señal de retención en el RE en el extremo C-terminal. Los triángulos y rombos azules muestran las repeticiones de secuencias ricas en prolina.

Estructura de CNX y CRT y sitios de unión

La estructura de la porción luminal de CNX resuelta por difracción de rayos X reveló una molécula sumamente asimétrica que presenta dos dominios estructurales (Figura 2.2) (Schrag y col. 2001). Uno de los dominios es globular y el otro es un brazo extendido que sobresale notablemente desde el dominio anterior.

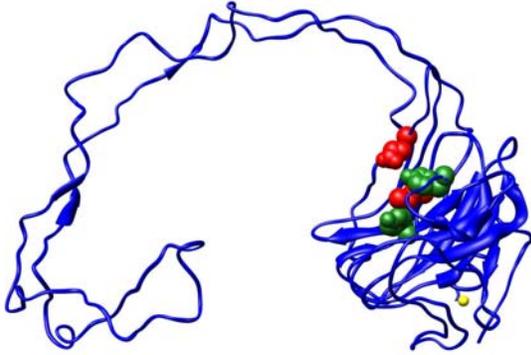


Figura 2.2: Estructura cristalográfica del dominio luminal de la CNX. El dominio globular contiene el sitio de unión al glicano con los residuos que hacen contacto con la Glc terminal mostrados en rojo y verde. El calcio unido se indica como una esfera amarilla. El brazo extendido consiste en dos cadenas, cada una conteniendo un módulo con las cuatro repeticiones de secuencias ricas en Pro, de manera que cada una en una cadena está apareada con otra de la otra cadena

El dominio globular corresponde a dos regiones de la secuencia primaria de la proteína, los residuos 61 al 262 y 415 a 458, y, como se había predicho, está organizado como un sándwich β con dos hojas β antiparalelas, una cóncava y otra convexa. La clasificación SCOP (Murzin y col. 1995; Lo Conte y col. 2002) ubica a este dominio dentro de la familia de plegamiento de lectinas tipo concanavalina-A/glucanasas. En este grupo se incluyen β -glucanasas, galectinas, pentraxinas y módulos del tipo laminina-G. Justamente, en este dominio globular se identificó el sitio de unión al residuo de Glc del glicano G1M9-7N2. El anillo de la hexosa descansa sobre la Met189 y los grupos hidroxilo forman uniones de puente de hidrógeno con las Tyr165, Lys186 y Glu217. Adyacente a este sitio se ubican residuos que pueden contactar las tres unidades de manosa pertenecientes a la rama α 1-3 del glicano (Spiro y col. 1996; Vassilakos y col. 1998). Dada la alta identidad de secuencia en esta región y la idéntica especificidad de unión al glicano entre la CNX y la CRT, se predice que el dominio N-terminal de ambas proteínas presenta una estructura muy similar (Leach y col. 2002). Asimismo, el papel fundamental de los residuos involucrados en la actividad de lectina de CRT ha sido verificado a partir de mutantes específicas (Kapoor y col. 2004; Leach y Williams 2004; Thomson y Williams 2005).

El brazo extendido corresponde al dominio P y consiste en dos cadenas en una configuración en horquilla que se extiende 140 Å en el espacio. Cada una de las cadenas contiene uno de los módulos de repeticiones, de manera que estas adoptan un arreglo antiparalelo en donde una repetición de un tipo se aparea "cabeza con cola" con una del otro tipo. La estructura del dominio P de CRT resuelta por NMR

mostró un arreglo similar al de CNX pero más corto (110 Å), una consecuencia de poseer tres repeticiones por módulo en lugar de las cuatro que presenta CNX (Ellgaard y col. 2001).

Dada la posición del sitio de unión de la Glc y la flexibilidad de las uniones glicosídicas y del propio dominio P se sugirió que este podría estar involucrado en interacciones proteína-proteína con las glicoproteínas parcialmente plegadas (Figura 2.3) (Schrag y col. 2003).

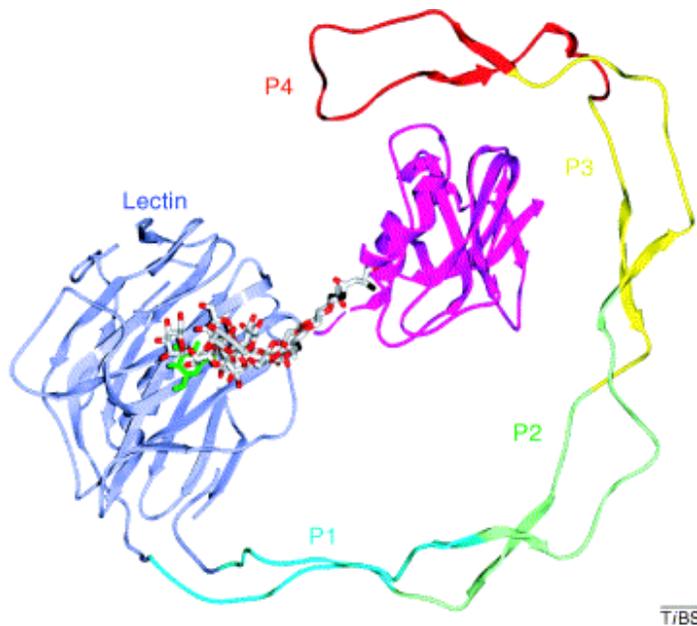


Figura 2.3: Modelo en 3D de la interacción entre CNX y una glicoproteína modelo (en este caso la RNAsa B correctamente plegada en rosa). El sitio de unión a la Glc esta representado en verde. La posición resultante del polipéptido de la glicoproteína sugiere una posible interacción con el dominio P (Schrag y col. 2003).

En los complejos lectina:glicoproteína el dominio P podría "abrazar" a la porción peptídica de la glicoproteína, previniendo de esta forma el establecimiento de contactos inespecíficos con otras proteínas en proceso de plegamiento. En este sentido, un arreglo similar se observa en la celda cristalográfica de CNX, en donde el brazo P de una proteína rodea al dominio N de otra molécula ubicada simétricamente en el centro de la celda.

Además, el extremo distal del dominio P forma una unidad de plegamiento autónoma, siendo una de las secuencias naturales más chicas que forman un plegamiento no helicoidal estable en ausencia de metales o puentes disulfuro. Este dominio le permite unir ERp57, la cual se caracteriza por la presencia de cuatro

dominios tiorredoxina organizados en el orden a, b, b', a'. Los dominios a y a' presentan los motivos CxxC que permiten la formación de puentes disulfuro mixtos con las glicoproteínas unidas a CNX y CRT. ERp57, a diferencia de PDI, posee un extremo C-terminal básico, rico en residuos lisina y que presenta una señal de retención QDEL. Se ha demostrado recientemente que esta región junto con el dominio b' le permite unirse al extremo ácido del dominio P de CRT (Russell y col. 2004; Silvennoinen y col. 2004). La unión de ERp57 al extremo distal del brazo P podría generar una cavidad protegida del solvente, en la que, como fue mencionado previamente, pueden alojarse sustratos de tamaño variado que quedarían resguardados de interacciones no deseadas con otras proteínas recién sintetizadas (Figura 2.4). Se ha observado con frecuencia que la asociación de ERp57 con sustratos glicoproteicos no ocurre en células deficientes en CNX o tratadas con castanospermina (CST, un inhibidor de la GI), lo que llevó a sugerir que ERp57 participa en el plegamiento de glicoproteínas sólo a través de su interacción con CNX y CRT (Oliver y col. 1997; Molinari y Helenius 1999; Lindquist y col. 2001).

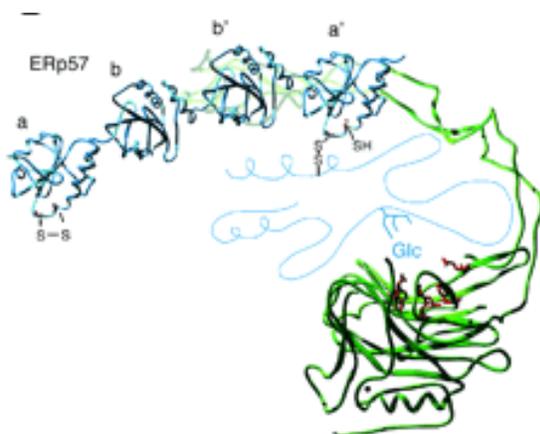


Figura 2.4: Modelo de la interacción entre CNX (verde) y ERp57 (azul) con una hipotética glicoproteína en proceso de plegarse (línea celeste). (Williams 2006)

La estructura cristalina de CNX reveló un único Ca^{2+} ubicado en el dominio N-terminal pero alejado del sitio de unión del glicano. Dicho calcio tiene un rol netamente estructural y en principio no participaría en la unión del glicano. Este ión correspondería a la actividad de unión a Ca^{2+} de alta afinidad que poseen ambas lectinas, aunque su localización distante el sitio de unión de glucosa no concuerda

con estudios *in vitro* que indican que el Ca^{2+} se necesita para que CRT funcione como chaperona.

Asimismo, si bien se le atribuye a CRT la capacidad de unir ATP, pero no de hidrolizarlo, no se ha podido detectar el sitio de unión de este nucleótido. Como ocurre con otras chaperonas, el ATP podría regular cambios conformacionales en CNX y CRT. El ATP, pero no el ADP o el AMP, hace a CRT más resistente a la digestión con proteasas y mejora la capacidad de supresión de la agregación *in vitro* (Ou y col. 1995; Ihara y col. 1999; Saito y col. 1999; Corbett y col. 2000).

Por otra parte, CRT presenta un dominio C-terminal muy ácido (residuos 290 a 400) que une aproximadamente unos 25 iones calcio con baja afinidad y que ha sido implicado con la capacidad de almacenamiento de calcio del RE *in vivo* (Figura 2.5) (Waser y col. 1997). Dada la alta polaridad y el bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos de este dominio se predijo que adoptaría una estructura intrínsecamente desplegada, hipótesis apoyada por observaciones de microscopía electrónica y por su alta sensibilidad al tratamiento con proteasas, como así también por los diversos intentos fallidos de expresar este dominio en forma aislada, posiblemente debido a la rápida degradación por la maquinaria de ERAD (Corbett y col. 1999; Nakamura y col. 2001).

```
MEPVVYFKEQFLDGDGWTERRWIESKHKSDFGKFLVSSGKFYGDQEKDKGLQTSQDARFYA
LSARFEPFSNKGQPLVVQFTVKHEQNIDCGGGYVKLFPAGLDQKDMHGDSEYNIMFGPDIC
GPGTKKVHVIFNYKGNVLINKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDNTYEVKIDNSQVESGSLEDD
WDFLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWDKPEHIPDPDAKKPEDWDEEMDGE
WEPPVIQNPEYKGEWKPRQIDNPDYKGTWIHPEIDNPEYSPDANIYAYDSFAVLGLDLWQ
VKSGTIFDNFLITNDEAYAEFNETWGVTKTAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEEKKRKEEEE
AEDEEDKDDKEDEDEDEEDKDEEEEAAGQAKDEL
```

Figura 2.5: Secuencia de aminoácidos de la CRT de conejo. En rojo se destacan los aminoácidos ácidos del dominio C-terminal.

La localización de las funciones de chaperona y de retención de calcio en dominios distintos que se aprecia en la estructura pudo comprobarse experimentalmente. En (Nakamura y col. 2001) se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratones deficientes en CRT para expresar los distintos dominios de

CRT. Así pudo observarse que la capacidad de almacenamiento de calcio que está severamente alterada en las células que carecen de CRT se restituye cuando se expresan los dominios P y C pero no se modifica cuando se expresan los dominios N y P (los intentos de expresar únicamente el dominio C habían resultado infructuosos y por ese motivo se realizó este diseño experimental). Por otra parte, los fibroblastos deficientes en CRT tienen alterada la liberación de calcio mediada por bradiquinina debido a la disminución de su receptor en la membrana de estas células. Esta disminución se atribuía al mal plegamiento del receptor debido a la ausencia de CRT. La expresión de los dominios N y P devuelve a los fibroblastos la capacidad de liberar calcio frente a un estímulo de bradiquinina mientras que la expresión de los dominios P y C no lo logra (Nakamura y col. 2001). En este sentido, (Leach y col. 2002) mostraron que una forma truncada de CRT que carece de su extremo C-terminal conserva su capacidad lectina. Sin embargo, existen otros reportes que indican que el calcio es esencial para la actividad de lectina-chaperona de CRT (Vassilakos y col. 1998) y también que la interacción de CRT con otras chaperonas del RE es calcio dependiente (Baksh y col. 1995; Corbett y col. 1999). En este último escenario, las fluctuaciones fisiológicas en la concentración de calcio que habitualmente ocurren liberarían a los intermediarios de plegamiento de su complejo con CRT representando una amenaza potencial a la viabilidad celular. Por este motivo en esta segunda parte del trabajo de tesis se estudió la relación entre las actividades de lectina y de almacenamiento de calcio de CRT.

Funciones de CRT fuera del RE

En la década de 1990 numerosos trabajos reportaron la presencia de CRT en compartimientos subcelulares diferentes al RE. Dado que CRT es una típica proteína de la vía secretoria, dotada con un péptido señal y una señal de retención en el RE, se argumentó que estas observaciones eran un artefacto de las técnicas experimentales utilizadas. Aunque sin lugar a dudas la mayoría de la CRT se encuentra en el RE, la cantidad de CRT fuera de él, si bien tan pequeña como para pasar desapercibida a las técnicas comunes, podría ser biológicamente relevante.

Sólo después de una gran cantidad de trabajos en los que se asignaban a CRT funciones compatibles con esas localizaciones fue siendo aceptada la multiplicidad de roles que tiene esta molécula y la posibilidad de que pueda acceder a compartimientos subcelulares distintos del RE.

El hallazgo de CRT en la superficie celular o en la vía secretoria puede justificarse, pues estos sitios son topológicamente equivalentes al lumen del RE y la CRT podría alcanzarlos escapando de los mecanismos de retención y reciclado basados en la secuencia KEDL. Diferentes teorías podrían explicar cómo ocurre la salida de CRT del RE a través de la vía secretoria, por ejemplo, podrían expresarse isoformas de CRT que no contengan la secuencia KEDL como lo sugiere el hecho que la CRT de la superficie de células neuronales no es reconocida por anticuerpos contra KEDL (Xiao y col. 1999), si bien esta observación también podría suceder si el epítopo estuviese bloqueado por el receptor de KEDL (ERD2) que podría ser transportado junto a CRT, como se observó en células B16 (Zhu y col. 1997). Otra posibilidad es que, dada la alta sensibilidad del dominio C-terminal a la digestión proteolítica, la señal de retención se pierda por acción de proteasas que actúen en el lumen del RE (Corbett y col. 1999). Por otra parte, tampoco puede descartarse que la saturación de la maquinaria de retención juegue un rol en dicho proceso (Crofts y col. 1999).

En la superficie celular CRT parece participar en una amplia variedad de procesos, pasando por la presentación antigénica (Arosa y col. 1999; Gao y col. 2002; Ghiran y col. 2003), la activación del complemento (Ghebrehiwet y col. 2001), la adhesión celular a través de la unión a proteínas de la matriz extracelular como la laminina (White y col. 1995) o el fibrinógeno (Gray y col. 1995) o a través del desensamblaje de las adhesiones focales mediadas por trombospondina (Goicoechea y col. 2000). También está implicada en la inhibición de la proliferación de células endoteliales (Pike y col. 1998), de la angiogénesis y del crecimiento de tumores (Pike y col. 1998). Además participa en la remoción de células apoptóticas iniciando el proceso de macropinocitosis en los macrófagos (Ogden y col. 2001).

Más sorprendente aún que las actividades de CRT en la superficie celular recién mencionadas son las que se reportaron en el citosol. Por ejemplo, CRT se une a la secuencia KXGFFKR que se encuentra en la cola citoplasmática de las α -integrinas, modulando su actividad (Rojiani y col. 1991; Coppolino y col. 1997). Dado que esa misma secuencia también se encuentra en el dominio de unión al DNA de varios receptores nucleares, diversos laboratorios analizaron la relación de CRT con receptores para glucocorticoides, andrógeno, ácido retinoico y vitamina D. CRT actúa de manera antagónica con la actividad transcripcional de dichos receptores, observándose en ensayos de retardo en gel que bloquea su unión al DNA, lo que sugeriría que la CRT nuclear limitaría la acción de los receptores sobre sus promotores (Burns y col. 1994; Dedhar y col. 1994; Wheeler y col. 1995; Shank y Paschal 2005). Evidencia independiente de que CRT tiene funciones nucleares se obtuvo a partir de la purificación de factores citosólicos que estimulan la exportación de proteínas nucleares en un modelo de células permeabilizadas. CRT recombinante u obtenida de células HeLa puede estimular la exportación nuclear del receptor de glucocorticoides *in vitro* y ese proceso resultó ser defectuoso en células *crt*^{-/-} (Black y col. 2001; Holaska y col. 2002).

Más aún, CRT puede unirse a ciertos elementos estructurales de las regiones 3' no codificantes de algunos mRNA celulares y virales y afectar su estabilidad (Atreya y col. 1995; Timchenko y col. 2002; Yocupicio-Monroy y col. 2003; Helbling y col. 2004; Iakova y col. 2004). Otros estudios identificaron la unión de CRT a un tallo-bucle (stem loop) rico en GC de la región 5' no codificante del mRNA del factor de transcripción mielóide C/EBP y del inhibidor de ciclinas dependientes de quinasa p21 que afecta negativamente la eficiencia de su traducción (Timchenko y col. 2002; Helbling y col. 2004; Iakova y col. 2004).

Los ejemplos recién mencionados son difíciles de reconciliar con una distribución de CRT restringida al lumen del RE o la vía secretoria, pues todas estas actividades ocurren en el núcleo y el citosol. El mecanismo por el cual CRT alcanza estos compartimientos aún se desconoce pero podría depender o bien de la síntesis

de CRT fuera del RE o de un mecanismo que permitiese la relocalización desde el lumen del RE hacia el citosol.

La CRT de *Trypanosoma cruzi*

Al igual que lo que sucede con las CRTs de otros orígenes, la función más estudiada de la CRT de *T. cruzi* es la de lectina-chaperona en el RE que se describió en detalle en la Parte 1 de este trabajo de tesis. Sin embargo, recientemente también se reportó la presencia de esta proteína en otros compartimientos subcelulares del parásito (Souto-Padron y col. 2004). Utilizando un anticuerpo policlonal generado contra la proteína recombinante por inmuno-microscopía electrónica se localizó CRT no solamente en el RE sino también en el complejo de Golgi, la vía endocítica, el bolsillo flagelar y en la superficie celular.

La función que se le atribuye a TcCRT de la superficie celular es la de modular el sistema de complemento del huésped vertebrado. Se ha podido demostrar que, de forma similar a lo que sucede con la CRT de origen humano, TcCRT es capaz de unir la cola de colágeno de C1q e inhibir la activación de C4 (Ferreira y col. 2004). También se ha reportado su asociación con la lectina de unión a manano, sugiriendo que esta elección de subcomponentes que participan en las etapas de reconocimiento de la vía clásica y la vía de lectina de activación del complemento facilitarían la evasión por parte del parásito de este sistema de defensa del hospedador. Además, se detectó por citometría de flujo CRT en la superficie de trypomastigotes, localización necesaria para que la CRT pueda cumplir la función propuesta y, apoyando dicha hipótesis, se observó por microscopía confocal colocalización entre la CRT de la superficie y C1q humano. La interacción entre estas dos proteínas puede ser inhibida por fragmentos F(ab)² de anticuerpos antiCRT (Aguilar y col. 2005). La presencia de CRT en la superficie celular de los parásitos también se corroboraría por el hecho que se pueden detectar anticuerpos contra esta proteína en los sueros de personas infectadas (Aguillon y col. 1997; Marcelain y col. 2000).

Souto-Padrón y col. (Souto-Padron y col. 2004) también demostraron la presencia de CRT en el núcleo, asociada a la cromatina condensada en la periferia y

no al nucleolo. Un análisis comparativo del número de partículas de oro observadas en secciones ultrafinas mostró que los epimastigotes fueron los que se marcaron más intensamente mientras que los trypomastigotes y los amastigotes poseían alrededor de un 40% de la intensidad. La marca en la red de DNA del kinetoplasto fue más notoria en los trypomastigotes y con una distribución heterogénea presumiblemente relacionada con la etapa de la replicación. Nuevamente, resultaron más difíciles de justificar las partículas de oro que se encontraron en el citosol que no estaban asociadas a ninguna estructura en particular.

En este trabajo de tesis, basados en las diversas funciones de CRT en citosol y el núcleo, y en la estrecha relación entre el calcio y la actividad de la CRT, se decidió estudiar el efecto de los niveles de calcio en la localización subcelular de CRT.

Objetivos

Estudiar la relación entre las actividades de lectina y de almacenamiento de calcio de CRT.

Estudiar el efecto de los niveles de calcio en la localización subcelular de CRT.

Materiales y Métodos

Materiales

La GT de hígado de rata se purificó como se indica en (Trombetta y Parodi 1992). La aglutinina de soja (SBA) se purificó de harina de soja sin tostar por cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B tratada con ácido (Allen y Johnson 1976). El [¹⁴C]-G1M9N2 se obtuvo incubando SBA desnaturalizada con GT purificada y 1×10^6 cpm de UDP-[¹⁴C]Glc (300 mCi/mmol) por 18 h a 37 °C.

Obtención y purificación de CRT recombinante

El plásmido pBAD:CRT que contiene el DNA copia que codifica la CRT madura de conejo (desprovista del péptido señal) fue gentilmente cedido por el Dr. Marek Michalak. La proteína madura conteniendo una etiqueta de histidinas se expresó en *E. coli* y se purificó según Vassilakos y col. (Vassilakos y col. 1998) La secuencia de la proteína es idéntica a la CRT madura excepto por el agregado de los residuos PLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH inmediatamente a continuación de la señal de retención KDEL localizada en el extremo C-terminal de la variante salvaje. La variante truncada de CRT (CRT-ΔC) se obtuvo a partir de la expresión del plásmido pBAD:CRT-ΔC, el cual se construyó por PCR inversa usando como templado el plásmido pBAD:CRT y empleando como iniciadores los oligonucleótidos 5'-TTT CAT CTG CTT CTC GG-3' y 5'-GCG GCC GCC GGC CAG GCC-3', eliminándose de esta forma las bases correspondientes a los residuos 343 a 392 de la proteína salvaje. Esta proteína se purificó siguiendo un procedimiento semejante al anterior. Dado que al finalizar la purificación, las lectinas pueden acarrear cantidades variables y no reproducibles de calcio, para homogeneizar la concentración del catión entre las diversas preparaciones de CRT, antes de cualquier medición experimental se sometió a ambas proteínas a cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200, la cual fue eluída con 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 μM CaCl₂ pH 7,5. Este procedimiento también permitió el aislamiento de las formas monoméricas de estas proteínas de las pequeñas cantidades de CRT agregada que en proporciones variables se forman durante el proceso de purificación.

Caracterización espectroscópica de CRT y CRT-ΔC

La concentración de las lectinas se determinó a partir de su absorbancia a 280 nm usando coeficientes de absorción molar de $81485 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $81360 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para CRT y CRT-ΔC, respectivamente. Los espectros de dicroísmo circular (CD) se midieron con un espectropolarímetro Jasco J810, mientras que las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2. En todas las mediciones espectroscópicas las lectinas fueron disueltas a una concentración $1 \mu\text{M}$ en 10 mM MOPS, 150 mM NaCl pH 7,5 con el agregado de EGTA o calcio según se indica en cada experimento.

Marcación de glicopéptidos con FITC

La modificación de los glicopéptidos con fluoresceína fue realizada mediante el agregado de $60 \mu\text{l}$ de isotiocianato de fluoresceína (FITC) disuelto en DMSO (1 mg/ml) a aproximadamente 2 mg de G1M9N2-Asn ó M9N2-Asn previamente disueltos en $650 \mu\text{l}$ de 100 mM KH_2PO_4 pH 8. Luego de incubar 2 h a temperatura ambiente se hizo reaccionar el exceso de FITC con el agregado de $80 \mu\text{l}$ de 1 M Tris-HCl pH 8,8. Los glicanos modificados fueron purificados utilizando una columna Superdex Peptide eluída con H_2O :etanol (90/10, v/v). En ambos casos la eficiencia del acoplamiento fue superior al 90%. Para obtener Tris-FITC se mezclaron $60 \mu\text{l}$ de la solución de FITC con $500 \mu\text{l}$ de 200 mM Tris-HCl pH 8 que se incubaron a temperatura ambiente durante 4 h . El producto se purificó mediante un procedimiento similar al anterior.

Expresión, purificación y glicosilación del CI2

Los CI2(1-58), CI2(1-61) y CI2(1-64) se purificaron y glicosilaron químicamente como se describe en (Caramelo y col. 2004). Para tal fin, se introdujo un residuo de cisteína mediante la mutación E7C, el cual se utilizó para unir covalentemente un glicopéptido de alta manosa de acuerdo al procedimiento descrito más adelante. Los CI2(1-58) y CI2(1-61) se obtuvieron por PCR inversa introduciendo un codón de terminación en la posición apropiada y usando como templado el vector conteniendo la secuencia que codifica para CI2(1-64). La

expresión de estos vectores transformados en *E. coli* se logró induciendo las bacterias cultivadas hasta una OD 1 con 1 mM IPTG durante toda la noche a 37 °C. Luego, las células se cosecharon y se resuspendieron en 1/20 del volumen inicial en 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1% Triton X-100 y 50 µg/ml de lisozima. Después de incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se colocaron las células en un baño de hielo y se sonicaron dos veces durante 1 min con un sonicador Virsonic 550 a una potencia de 225 W. Después de centrifugar por 30 min a 30 600 *x g*, los CI2s se hallaron en cuerpos de inclusión. Estos se lavaron tres veces con 20 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 y 100 mM NaCl, seguido por otros tres lavados con 20 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 500 mM cloruro de guanidinio y 5 mM β-mercaptoetanol. Finalmente, los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 4 °C durante 30 min en 15 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 6 M urea. Después de centrifugar por 30 min a 30 600 *x g*, se sembró el sobrenadante en una columna Superdex-75 HR16/50 y se eluyó con 50 mM Tris-HCl, 400 mM urea y 150 mM NaCl, pH 8. Las fracciones conteniendo CI2s se juntaron y se agregó ácido trifluoroacético y acetonitrilo a una concentración final de 0,05 y 5%, respectivamente. Las proteínas se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa usando una columna Vydac C8 con un gradiente lineal de acetonitrilo/agua en 0,1% de ácido trifluoroacético y se secaron en un SpeedVac.

El glicopéptido G1M9N2-Asn se obtuvo a partir de IgY de yema de huevo digerida completamente con Pronasa (Sigma) y se purificó por cromatografía de afinidad con Concanavalina A-Sepharosa, seguida de una cromatografía por exclusión molecular en una columna Superdex Peptide eluída con H₂O:etanol 90/10 v/v. El M9N2-Asn se obtuvo por digestión de SBA con pronasa y se purificó de manera similar al G1M9N2-Asn. G1M9N2 y M9N2 se obtuvieron por digestión con PNGasa F de los correspondientes glicopéptidos y se purificaron con una columna Superdex Peptide eluída con H₂O:etanol 90/10 v/v a un flujo de 1 ml/min. Finalmente, los glicanos eluídos de esta columna se continuaron purificando por cromatografía de partición usando una columna Glyco-Pak N (Waters) eluída con un

gradiente lineal a partir de una condición inicial de CH₃CN:H₂O (85/25 v/v) a una final de H₂O durante 120 min a un flujo de 0,8 ml/min. Las fracciones conteniendo los *N*-glicanos se juntaron y se secaron en SpeedVac.

Los glicopéptidos G1M9N2-Asn y M9N2-Asn se unieron covalentemente al grupo tiol del residuo de cisteína introducido en los CI2s usando sulfosuccinimidil 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano 1-carboxilato (sulfo-SMCC) como se describe en (Caramelo y col. 2003). Brevemente, 1-2 mg de glicopéptidos se mezclaron con 1 mg de Sulfo-SMCC en PBS pH 7,2. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente los glicopéptidos se desalaron por filtración en gel en una columna Sephadex G-10 (80 x 1 cm) eluída con 7% propanol en agua. Las fracciones conteniendo el glicano se mezclaron y se secaron. Paralelamente, 2-3 mg de cada uno de los CI2s se disolvieron en 300 µl de PBS, 6 M urea, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, pH 7,2 y se incubaron por 90 min a 37 °C. Luego se desalaron con columnas NAP-5 y se agregaron a los glicopéptidos. Después de 4 h a temperatura ambiente el volumen inicial de 800 µl se redujo en SpeedVac a 300 µl y se dejó incubando las muestras durante la noche. La eficiencia de acoplamiento generalmente estuvo por encima del 50%, siendo importante para alcanzar este rendimiento el uso de ambas moléculas a acoplar a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml. Finalmente, las mezclas de reacción se disolvieron en 5% acetonitrilo y las formas glicosiladas se separaron de las no glicosiladas por HPLC de fase reversa con una columna Vydac C8 usando un gradiente de acetonitrilo de 25 a 50% suplementado con 0,05% de ácido trifluoroacético. Las glicoproteínas purificadas se disolvieron en 20 mM Hepes pH 7,4 con 6 M urea y se dializaron contra la misma solución conteniendo concentraciones decrecientes de urea.

Estabilidad proteica

La desnaturalización química se realizó incubando 1 µM CRT durante 18 h a 25 °C en una solución conteniendo 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, pH 7,5 y las concentraciones indicadas en cada caso de EGTA, CaCl₂, G1M9N2 y urea. El agregado del glicano no modificó la concentración del calcio libre en solución, como se pudo determinar usando calcium green 5N como indicador de calcio y midiendo el

efecto del agregado de 30 μM G1M9N2 (no mostrado). El espectro de fluorescencia intrínseca de CRT se obtuvo usando una longitud de onda de excitación de 290 nm y registrando la emisión entre 300 y 430 nm. Los anchos de banda de excitación y emisión fueron de 4 nm. Para describir el estado conformacional de la proteína se utilizaron los valores de centro de masa del espectro de fluorescencia. La desnaturalización térmica de 1 μM CRT se determinó siguiendo la señal de dicroísmo circular a 275 nm con un ancho de banda de 4 nm y un gradiente térmico de 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Para los experimentos de agregación de CRT se incubó la lectina a una concentración de 1 μM a 37 $^{\circ}\text{C}$ en 10 mM MOPS, 150 mM NaCl pH 7,5 y 10 mM EGTA ó 10 μM CaCl_2 . En los tiempos indicados en la figura 2.6 *A* y *B* se tomaron alícuotas de 100 μl a las cuales se les adicionó 5000 cpm de [^{14}C]-G1M9N2 y se las sembró en una columna Superdex 200 eluída con la misma solución reguladora a un flujo de 0,8 ml/min. La elución de la proteína se controló siguiendo la absorbancia a 280 nm y la del glicano se detectó por centelleo líquido de fracciones de 800 μl de las muestras recogidas una vez que terminó de eluir la columna.

Medidas de unión

Los glicanos modificados con FITC o el Tris-FITC se disolvieron en 10 mM MOPS, 150 mM NaCl pH 7,5 a una concentración 0,05 μM y se agregó 10 mM EGTA ó 10 μM CaCl_2 ó 1 mM CaCl_2 y las concentraciones indicadas de CRT o CRT- ΔC . Después de 2 h de incubación se midió la anisotropía de fluorescencia en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Series 2. Se emplearon longitudes de onda de excitación y de emisión de 485 nm y 516 nm con anchos de banda de 8 y 4 nm, respectivamente.

La unión de glicoproteínas se midió utilizando 0,05 μM G1M9N2-Asn-FITC y 1,1 μM ó 3 μM de lectina y la concentración indicada en cada caso de CI2 glicosilado. Las muestras se dejaron equilibrar por 2 h y se midieron en las mismas condiciones que el ensayo anterior.

La unión de [^{14}C]-G1M9N2 a la CRT inmovilizada se realizó como se describe en (Vassilakos y col. 1998). Brevemente, 500 μg de CRT se unieron a 400 mg de

resina IMAC cargada con Ni²⁺ equilibrada con 30 mM MOPS, 150 mM NaCl y 10 mM CaCl₂ pH 7,5. La CRT no unida se removió lavando cuatro veces con 1 ml de la misma solución. Se separaron tres cuartos de la resina que se equilibraron con 30 mM MOPS, 150 mM NaCl y 10 mM EGTA. Ambas porciones se incubaron durante 30 min a 30 °C. La porción que contenía EGTA se volvió a dividir en tres y dos de estas muestras se lavaron dos veces con 1 ml de 30 mM MOPS, 150 mM NaCl y 10 mM CaCl₂ o 10 mM MgCl₂. Se agregó aproximadamente 9000 cpm de [¹⁴C]-G1M9N2 a cada muestra y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente en presencia de 300 µl de 30 mM MOPS, 150 mM NaCl conteniendo 10 mM EGTA, o CaCl₂ o MgCl₂. Las muestras se enfriaron luego en un baño de hielo, se centrifugaron a 13150 x *g* por 1 min, se descartaron los sobrenadantes y la resina se lavó tres veces con 1 ml de la misma solución conteniendo según correspondiese 10 mM EGTA, o Ca²⁺ o Mg²⁺. Luego se midió la radioactividad asociada a la resina por centelleo líquido. Paralelamente, se llevó a cabo el mismo procedimiento con una matriz IMAC cargada con Ni²⁺ pero desprovista de CRT como control de especificidad.

Determinación de actividad de chaperona in vitro

IgY (9,5 mg/ml) purificada de yema de huevo se desnaturalizó en 100 mM Tris-HCl pH 6,8 conteniendo 6 M cloruro de guanidinio y 40 mM DTT. Paralelamente, la IgY fue deglicosilada con PNGasa F según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Se confirmó la completa deglicosilación mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La IgY deglicosilada (PF-IgY) disuelta a una concentración final de 3,2 mg/ml se desnaturalizó de forma similar a la IgY.

El ensayo de agregación se comenzó diluyendo 7 µl de IgY ó 22 µl de PF-IgY en 3 ml de 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6 con el agregado de calcio o EDTA según se indica en la figura 2.13, en presencia o ausencia de CRT. La concentración final de ambos sustratos fue de 0,5 µM, expresada como la suma de las concentraciones de cadenas pesadas y livianas. La concentración de lectina fue 0,5 µM y 3 µM para IgY y PF-IgY, respectivamente. Las muestras con IgY se agitaron

constantemente a 37 °C y las de PF-IgY a 31 °C y se monitoreó la densidad óptica a 360 nm en un espectrofotómetro Jasco V-550.

Determinación de actividad de chaperona in vivo

Epimastigotes de *T. cruzi* (1 g de peso líquido) se cosecharon en fase exponencial de crecimiento y se lavaron dos veces con medio DME/F- 12 Base (libre de Met, Gln, Leu, Lys, Sigma) (14,2 mg/ml) suplementado con 365 mg/l de Gln, 59,05 mg/l de Leu, 91,25 mg/l de Lys, 61,2 mg/l MgCl₂, 154,5 mg/l CaCl₂ y 1,2 g/l de NaHCO₃. Los parásitos se resuspendieron en 5 ml del medio antes mencionado y se incubaron en presencia de 6 M DNJ a 28 °C durante 20 min. Luego, se los repartió en cinco alícuotas iguales y se agregó 10 µM ácido ciclopiazónico y 1 mM A23187 como se indica en la figura 2.14 y se incubó por otros 10 min. Se agregó [³⁵S]Met y [³⁵S]Cys (1 mCi; >1000 Ci/mmol; EasyTag protein labeling mix, New England Nuclear) a todas las muestras y se incubó por 5 min a 28 °C. Las suspensiones se sometieron a centrifugaciones a baja velocidad y los precipitados se resuspendieron en 1 ml del mismo medio suplementado con 3 mM Met, 3 mM Cys, 10 µM ácido ciclopiazónico y 1 mM A23187 según se muestra en la misma figura. Después de 10 min de incubación las células se centrifugaron y se lisaron en hielo durante 30 min con 500 µl de buffer 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1% NP-40, 300 mM iodoacetamida y 100 µM E-64, pH 7,5. Los sobrenadantes obtenidos luego de centrifugar se inmunoprecipitaron con suero antiCRT a 4 °C durante toda la noche como se describió en la parte 1 de esta tesis.

Medida de actividad de GT

Los ensayos de actividad de GT se realizaron a 37 °C en 550 µl de una solución conteniendo 40 mM HEPES, 20 mM KCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4, 15 µM UDP-[¹⁴C]Glc y 20 µM CI2(1-58)-M9. La reacción comenzó con el agregado de 20 µg de GT de hígado de rata, a los tiempos indicados en la figura 2.15 se tomaron alícuotas de 10 µl y la reacción se paró agregando 10 µl de buffer de lisis (160 mM Tris-HCl pH 8, 20% glicerol 0,1% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol y 5% SDS). Las muestras se calentaron inmediatamente a 90 °C durante 10 min y alícuotas de 15 µl

se sometieron a electroforesis en geles de tricina y SDS (Caramelo y col. 2004). Una vez secado el gel se expuso en una pantalla de LE phosphor (Amersham Biosciences) por 12 h y se reveló en un Storm 820 PhosphoImager. En las condiciones utilizadas se verificó una relación lineal entre la intensidad de la señal óptica generada por el aparato y la radiactividad presente en las muestras. Por otro lado, después de 110 min de incubación se agregó 140 μ l de la mezcla de reacción a 70 μ l de 15 μ M CRT nativa o precalentada a 100 °C y alícuotas de 10 μ l se trataron como se indicó más arriba.

Efecto del calcio en la localización subcelular de CRT

Epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento (20 x 10⁶/muestra) se incubaron con las cantidades de ácido ciclopiazónico indicadas en la figura 2.16 a 28 °C durante 10 min y luego se centrifugaron y congelaron. El citosol se separó del RE por el procedimiento de fraccionamiento subcelular descrito en la primera parte de esta tesis. Ambas fracciones se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y las CRT y BiP se identificaron por inmunotransferencia. El contenido de CRT en cada fracción se cuantificó por densitometría óptica.

Resultados

La unión del calcio y la del glicano estabilizan a CRT de forma independiente

En primer lugar, se examinó la influencia recíproca entre la unión del calcio y del glicano a CRT a través de la estabilidad térmica y ante agentes desnaturizantes de esta última.

En presencia de 1 mM Ca^{2+} , se determinó la temperatura de desnaturalización de la CRT a distintas concentraciones de G1M9N2 siguiendo la señal de dicroísmo circular (DC) a 275 nm. Se observó un aumento de la estabilidad térmica de la CRT en relación directa con la concentración de glicano (Figura 2.5 A). La especificidad de este comportamiento se comprueba por el hecho que el agregado de M9N2 no tuvo efecto en la estabilidad térmica de la proteína (Figura 2.5 A). Un perfil similar se obtuvo cuando se realizaron estas curvas en presencia de 10 μM Ca^{2+} ó 10 mM EGTA (no se muestra). Sin embargo, en ausencia del glicano la temperatura de desnaturalización de CRT también depende de la concentración de calcio, aumentando de 40,1 °C cuando se determina en 10 mM EGTA a 46,8 °C cuando se la mide en 1 mM Ca^{2+} (Figura 2.5 B), confirmando observaciones previas que muestran el efecto estabilizador del calcio (Corbett y col. 2000; Li y col. 2001). Al representar la temperatura media de desnaturalización en función de la concentración de glicano se pone de manifiesto que la unión del G1M9N2 estabiliza a CRT por encima de lo que lo hace el calcio de forma aislada y siguiendo un comportamiento saturable para todas las concentraciones de calcio empleadas (Figura 2.5 B).

Se ha descrito con anterioridad que la depleción de calcio promueve la formación de especies oligoméricas de CRT que son capaces de unir péptidos (Rizvi y col. 2004). Se estudió cuáles de estas formas son las que tienen la capacidad de unir el glicano por cromatografía de exclusión molecular utilizando [^{14}C]G1M9N2 como ligando. La CRT recombinante purificada eluye de una columna Superdex 200 como un pico único con una masa molecular promedio de aproximadamente 180 kDa cuando se la compara con la masa molecular de proteínas globulares usadas como patrones. Este comportamiento anómalo puede explicarse argumentando que CRT

es una molécula sumamente asimétrica. Aún así, para verificar el estado de agregación de esta proteína se midió su tamaño por dispersión estática de luz y este fue de 56 kDa, semejante al tamaño esperado para la especie monomérica (49,5 kDa).

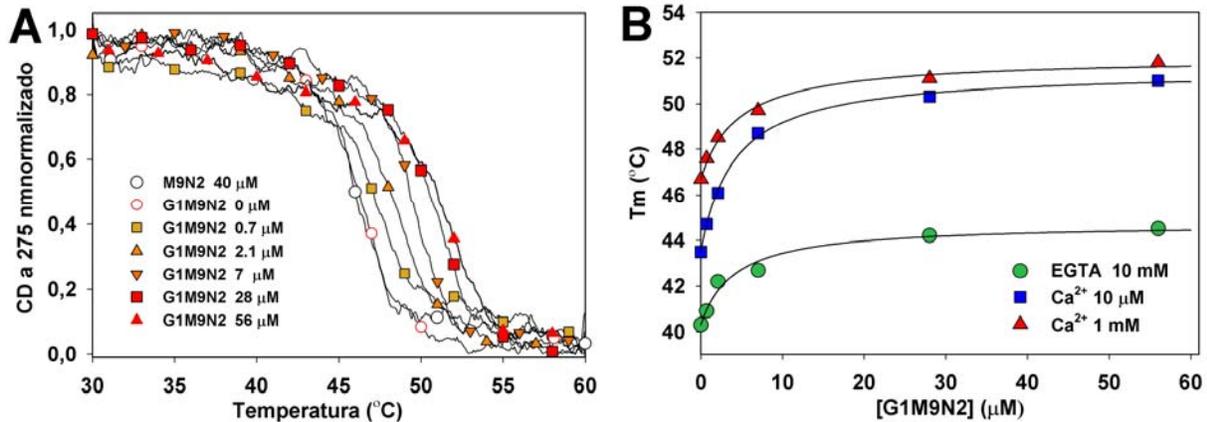


Figura 2.5: Efecto del calcio y los *N*-glicanos en la estabilidad térmica de CRT. *A*, Señal de dicroísmo circular (CD) a 275 nm de la desnaturalización térmica de CRT en 1 mM Ca²⁺ con el agregado de G1M9N2 ó M9N2. *B*, Representación de las temperaturas de desnaturalización medidas como en *A* en función de la concentración de G1M9N2.

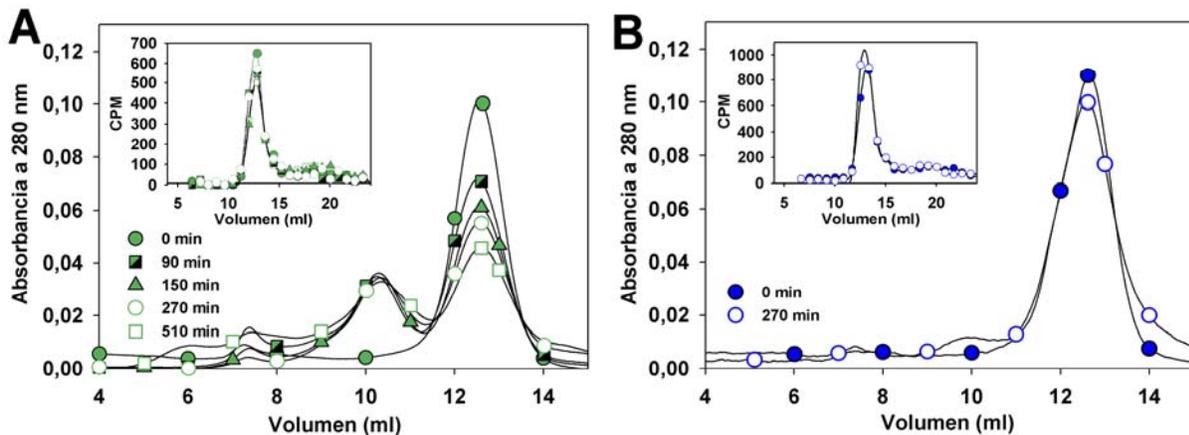


Figura 2.6: Oligomerización de CRT. *A* y *B*, Oligomerización de CRT a 37 °C en presencia de 10 mM EGTA (*A*) o 10 μM Ca²⁺ (*B*) evaluados por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200. CRT se incubó por los tiempos que se indican en la figura con anterioridad a ser inyectadas en la columna *Inset*: Medida de la radiactividad eluída de la columna, el pico corresponde a la unión de aproximadamente 5000 cpm [¹⁴C]-G1M9N2. El pico de radioactividad eluyó en el mismo volumen que la CRT monomérica.

Incubaciones por períodos prolongados con 10 mM EGTA provocan la aparición de especies más pesadas a 37 °C, pero no a 25 °C, pero sólo las formas monoméricas de CRT preservan la capacidad de unir *N*-glicanos (Figura 2.6 *A*). Esta

observación indica que las formas oligoméricas de CRT no son funcionales, al menos, desde el punto de vista de su actividad como lectina. Cuando el ensayo se realiza en presencia de 10 μM Ca^{2+} , no se verifican cambios ni en la aparición de oligómeros ni en su actividad lectina (Figura 2.6 *B*), lo que indica que son necesarias condiciones severas de depleción de calcio para que ocurra la oligomerización *in vitro*.

Finalmente, se determinó el efecto del calcio y de G1M9N2 en la desnaturalización de CRT inducida por urea. Al igual que lo que sucedió en el caso de la desnaturalización térmica, el calcio también estabiliza a CRT (Figura 2.7 *A*). Por otro lado, el agregado de G1M9N2 estabiliza el complejo a todas las concentraciones de calcio medidas (Figuras 2.7 *B, C, D* y Tabla 2.1). Estos experimentos apoyan la idea de que la interacción entre CRT y el *N*-glicano tiene lugar sin importar la concentración de calcio, dado que incluso en 10 mM EGTA el *N*-glicano ejerce un efecto estabilizador y sugiere que el calcio y el glicano contribuyen de manera aditiva e independiente a la estabilidad de CRT.

Tabla 2.1: Efecto del calcio y de G1M9N2 en la desnaturalización de CRT inducida por urea

	G1M9N2 10 μM	$\Delta\text{G}(\text{H}_2\text{O})$ (kcal/mol)	M (kcal/mol/M)	[UREA] ⁵⁰ (M)
[EGTA] = 10 mM	–	3,7	1,6	2,32
	+	6,9	2,6	2,67
[Ca ²⁺] = 10 μM	–	4,7	1,9	2,48
	+	8,1	2,6	3,19
[Ca ²⁺] = 1 mM	–	6,5	2,1	3,09
	+	8,8	2,1	4,21

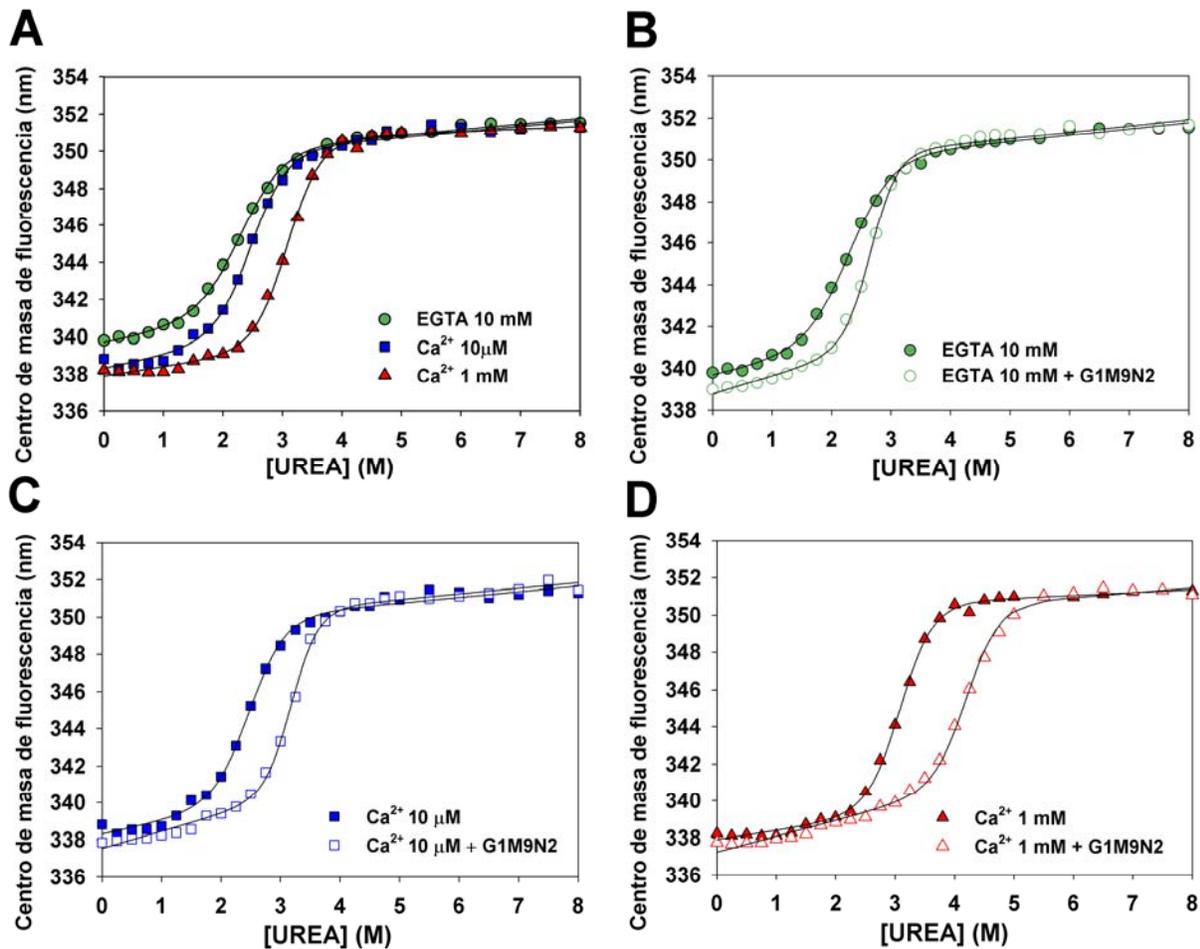


Figura 2.7: Efecto del calcio y los *N*-glicanos en la desnaturalización de CRT inducida por urea. *A*, Desnaturalización inducida por urea de 1 μ M CRT a 25 $^{\circ}$ C evaluada a través del centro de masa de fluorescencia de triptofanos. *B-D*, efecto del agregado de 10 μ M G1M9N2 en la desnaturalización inducida por urea de 1 μ M CRT en presencia de 10 mM EGTA (*B*), 10 μ M Ca^{2+} (*C*), y 1 mM Ca^{2+} (*D*).

La actividad lectina de CRT no depende de la concentración de calcio

Vassilakos y col. (Vassilakos y col. 1998) evaluaron el requerimiento de calcio en la unión de los *N*-glicanos monoglucosilados con CRT utilizando la proteína inmovilizada. Este ensayo consiste en unir CRT a través de seis residuos histidina agregados en su extremo C-terminal a una matriz de Ni^{2+} y luego de incubarla con [^{14}C]G1M9N2, medir la radiactividad retenida en la matriz. Si el ensayo se realiza con agregado de 10 mM EGTA la radiactividad unida a la matriz es menor, volviendo a aumentar con el subsiguiente agregado de calcio, aunque sin recuperar los valores iniciales. Un ensayo similar realizado en nuestro laboratorio produjo resultados prácticamente idénticos (Figura 2.8). Asimismo, la matriz a la cual no se

le unió CRT no presentó capacidad significativa de unión del glicano radiactivo, demostrándose de esta forma la especificidad del ensayo empleado.

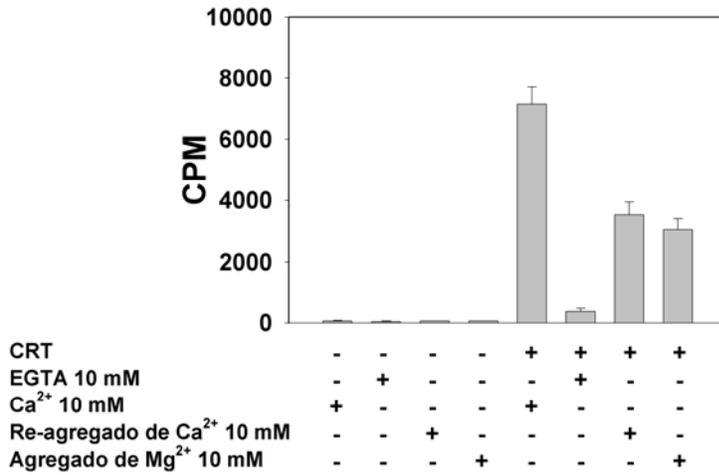


Figura 2.8: Efecto del calcio en la unión del glicano a CRT. Efecto del EGTA, del Ca²⁺ y del Mg²⁺ en la unión de [¹⁴C]-G1M9N2 a CRT inmovilizada en una matriz quelante se Sepharosa- Ni²⁺.

Sin embargo, sorpresivamente se obtuvo un resultado diferente si el requerimiento de calcio en la unión de los *N*-glicanos monoglucosilados con CRT se evaluaba utilizando los mismos componentes en solución (CRT y [¹⁴C]G1M9N2) a través de un equilibrio de diálisis (Figura 2.9), observándose que la cantidad de ligando unido a CRT fue notablemente similar bajo condiciones que fueron desde 10 mM EGTA a 1 mM Ca²⁺.

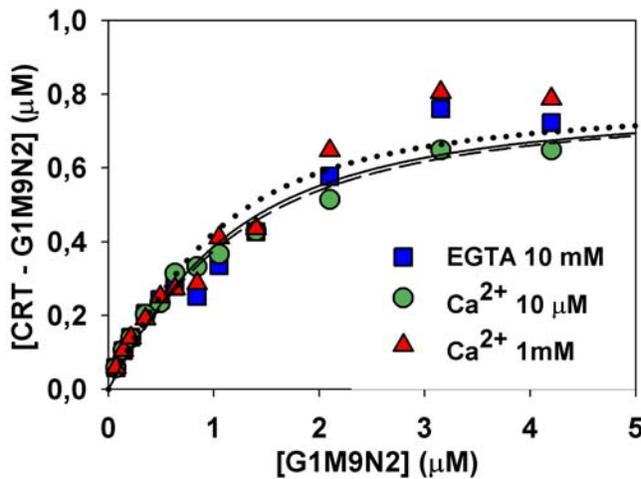


Figura 2.9: Efecto del calcio en la unión del glicano a CRT. Equilibrio de diálisis de G1M9N2 con 0,8 μM de CRT usando 3000 cpm de [¹⁴C]-G1M9N2 como indicador. Las curvas representan el ajuste de los datos a un modelo de sitio único.

Con el objeto de resolver la aparente contradicción entre ambos experimentos se diseñó un tercer ensayo de unión en el que se utiliza como ligando el glicopéptido

G1M9N2-Asn modificado con FITC en el grupo amino del residuo Asn. Esta modificación permite medir la formación del complejo CRT:glicano a partir de los cambios de la anisotropía de fluorescencia de la fluoresceína al variar la concentración de CRT. Los valores de anisotropía medidos para el glicopéptido modificado en ausencia de CRT fueron menores que aquellos medidos al agregar la lectina, hecho indicativo del menor radio de giro y la consiguiente mayor libertad rotacional del ligando libre. En concordancia con el ensayo de equilibrio de diálisis, el complejo formado demostró tener una constante de disociación similar para todas las concentraciones de calcio empleadas, aún en presencia de 10 mM EGTA (Figura 2.10 y Tabla 2.2). Las constantes de disociación fueron aproximadamente 0,2 μ M, un valor similar al que se obtiene por calorimétrica de titulación isotérmica (ITC) (Kapoor y col. 2003). La especificidad de este último ensayo se sostiene en las siguientes observaciones: (i) un exceso molar de G1M9N2, pero no así de M9N2, fue capaz de desplazar el complejo formado y (ii) la anisotropía de fluorescencia de M9N2-Asn-FITC y de Tris-FITC se mantuvo constante al aumentar la concentración de CRT (Figura 2.10). Estas observaciones muestran el papel fundamental que juega la glucosa terminal en la unión del *N*-glicano a la CRT y prueban que la aparición del complejo lectina:glicano no es inducida de forma artificial por la modificación química con la sonda fluorescente. Asimismo, se observaron comportamientos similares a 25 °C y 37 °C, aunque los valores de las constantes de unión medidos a esta última temperatura fueron menores (Tabla 2.2).

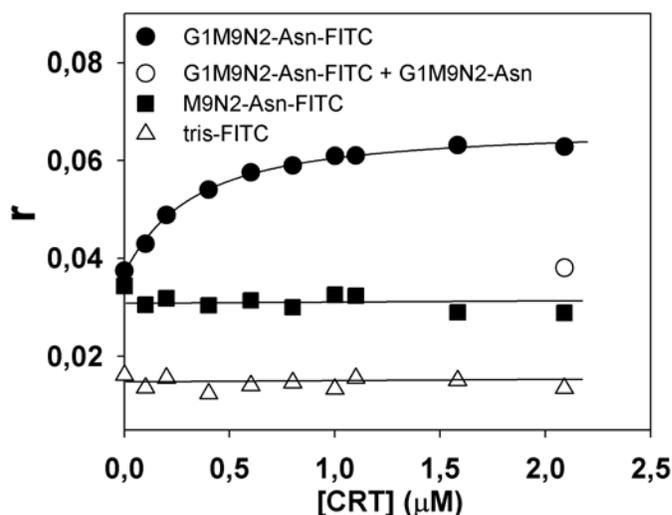


Figura 2.10: Efecto del calcio en la unión del glicano a CRT. Anisotropía de fluorescencia de G1M9N2-Asn-FITC, M9N2-FITC y Tris-FITC con concentraciones crecientes de CRT. La concentración del ligando en todos los casos se fijó en 0,05 μM. El círculo blanco indica el agregado de 30 μM G1M9N2 a la curva de G1M9N2-Asn-FITC. La unión se midió a 25 °C en 10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 μM CaCl₂, pH 7,5. Los resultados en otras condiciones se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Unión de G1M9N2-Asn-FITC a CRT.

Temperatura	Kd (μM) ^a	
	25 °C	37 °C
[EGTA] = 10 mM	0,23 ± 0,06	1,6 ± 0,3
[Ca ²⁺] = 10 μM	0,17 ± 0,05	1,0 ± 0,2
[Ca ²⁺] = 1 mM	0,24 ± 0,06	0,9 ± 0,2

^a Los valores son las medias ± el desvío estándar de tres experimentos independientes.

A su vez, con el objetivo de comprender por qué se obtenían resultados diferentes cuando la unión del glicano a la lectina se determinaba con todos los componentes en solución o con CRT inmovilizada se repitió este último ensayo pero agregando 10 mM Mg²⁺ a la muestra pretratada con EGTA y se observó una recuperación de la capacidad de unión similar a la que se observaba con el agregado de Ca²⁺ (Figura 2.8). Este resultado indica que el efecto observado refleja un artefacto de la técnica utilizada y no un efecto del calcio en la actividad lectina de CRT. Además, una electroforesis en geles de poliacrilamida de los sobrenadantes y de la matriz tratada con EGTA, mostraron que parte de la CRT es desplazada de la columna cargada con Ni²⁺ lo que justificaría por qué luego de la readición de los cationes no se alcanzan los mismos valores de unión que sin el pretratamiento (no se muestra).

Los resultados aquí presentados indican que la capacidad de lectina de CRT es independiente de la concentración de calcio.

Para confirmar la independencia entre ambas actividades de CRT, se obtuvo una proteína recombinante desprovista del dominio C-terminal. Como fue mencionado en la introducción, este dominio posee un sitio de unión a calcio de baja afinidad ($K_d \approx 2\text{mM}$) y alta capacidad (un alrededor de 25 iones), siendo el responsable de la actividad reguladora de calcio de la proteína. La eliminación del dominio C-terminal no alteró de manera significativa la estructura secundaria de la CRT, pues se obtuvieron espectros de DC en el UV lejano prácticamente idénticos para la CRT y su forma truncada (CRT- Δ C) (Figura 2.11 A). Además, las constantes de disociación entre G1M9N2-Asn-FITC y CRT o CRT- Δ C fueron muy semejantes, mostrando una variación mínima con la concentración de calcio presente en el medio (Figura 2.11 B y Tabla 2.3). Estas observaciones concuerdan con resultados publicados previamente por otros grupos (Leach y col. 2002) y confirman que el dominio C-terminal es prescindible para la actividad de lectina de CRT.

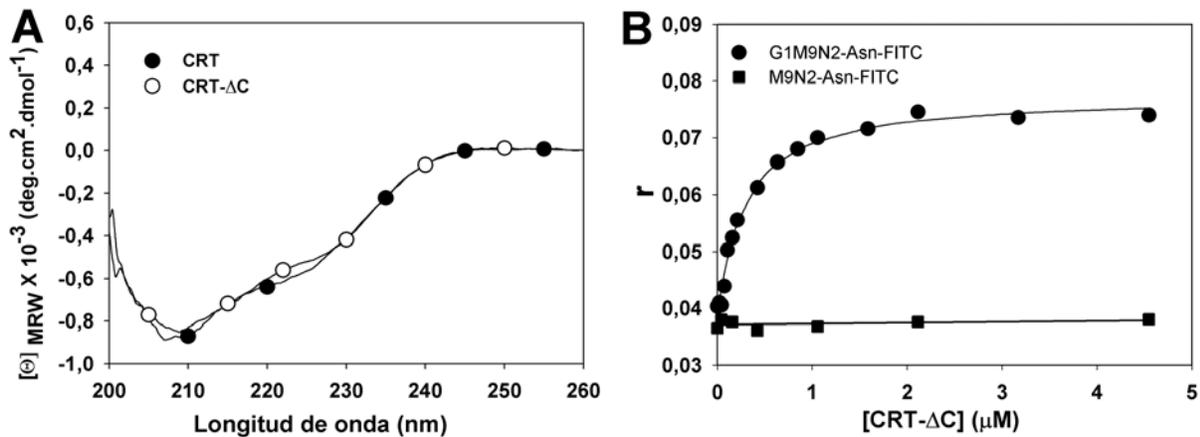


Figura 2.11: Caracterización de CRT- Δ C. A, espectro de CD en el UV lejano de CRT y CRT- Δ C. B, Unión de 0,05 μM de G1M9N2-Asn-FITC a CRT- Δ C seguido a través de la anisotropía de fluorescencia con el agregado de 10 μM Ca^{2+} .

Tabla 2.3: Unión de G1M9N2-Asn-FITC a CRT-ΔC a 25 °C	
	K_d (μM)^a
[EGTA] = 10 mM	0,33 \pm 0,07
[Ca²⁺] = 10 μM	0,26 \pm 0,05
[Ca²⁺] = 1 mM	0,21 \pm 0,06

^a Los valores son las medias \pm el desvío estándar de tres experimentos independientes.

La unión in vitro de glicoproteínas a CRT no depende de la concentración de calcio

Si bien por lo demostrado hasta aquí, el calcio no afecta la actividad lectina de CRT con respecto al glicano, cabe la posibilidad de que la afinidad de CRT por glicoproteínas pueda verse afectada con la concentración de este catión, pues su ausencia podría inducir un cambio conformacional en la chaperona el cual podría favorecer el establecimiento de contactos proteína-proteína, aumentando de esta forma la afinidad por glicoproteínas. Para explorar dicha posibilidad se midió la afinidad de CRT por glicoproteínas a través de un ensayo de desplazamiento por glicoproteínas no marcadas del complejo CRT:G1M9N2-Asn-FITC (Figura 2.12). Como glicoproteínas modelo se utilizaron proteínas glicosiladas químicamente (neoglicoproteínas) derivadas del CI2, una proteína pequeña cuyo comportamiento biofísico ha sido ampliamente caracterizado (de Prat Gay y col. 1995). La incorporación de un residuo de cisteína en el CI2 (E7C) mediante mutagénesis dirigida permitió la unión covalente del glicopéptido G1M9N2-Asn utilizando el reactivo de entrecruzamiento sulfoSMCC, generando la neoglicoproteína CI2(1-64)-G1M9. Como consecuencia del alto grado de exposición que posee el residuo de cisteína introducido, esta glicoproteína presenta una conformación nativa muy similar a la de su contraparte no glicosilada (Caramelo y col. 2003; Caramelo y col. 2004). La afinidad de CRT por CI2(1-64)-G1M9, determinada tanto con 1,1 μM como 3 μM CRT, fue idéntica a la medida para G1M9N2-Asn-FITC a todas las concentraciones de calcio empleadas (Tabla 2.4). Por otra parte, en concordancia con lo observado con los glicopéptidos, las constantes de unión medidas a 37 °C fueron menores que aquellas medidas a 25 °C (Tabla 2.4). Vale la pena mencionar que se obtuvieron valores de afinidad similares de CRT por G1M9N2 e inmunoglobulina Y (una glicoproteína naturalmente monoglucosilada) al ser medidos por resonancia de plasmón superficial (Patil y col. 2000). Si bien la afinidad de CRT por el CI2(1-64)-G1M9 fue muy similar a la medida con el glicopéptido, existe la posibilidad que la ausencia de calcio en el medio induzca la aparición de contactos hidrofóbicos con sus ligandos que no pudieron ser detectados por emplear una proteína en conformación

nativa en el ensayo de desplazamiento. Para profundizar en este tema, se utilizó una segunda neoglicoproteína, CI2(1-61)-G1M9, la cual carece de los últimos tres aminoácidos del extremo C-terminal. Este fragmento tiene una conformación de tipo glóbulo fundido, hecho evidenciado por un incremento en su capacidad de unión al ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico (ANS), una sonda fluorescente sensible a la exposición de parches de aminoácidos hidrofóbicos. Vale la pena mencionar que los derivados no glucosilados de estas dos neoglicoproteínas [CI2(1-64)-M9 y CI2(1-61)-M9] exhiben un comportamiento muy diferente cuando se los utiliza como sustrato de la GT. Mientras que el primero es un pobre aceptor de Glc, el segundo es fácilmente glucosilado porque muestra una conformación que se espera en un intermediario de plegamiento (Caramelo y col. 2004). Los valores de afinidad de CRT por CI2(1-61)-G1M9, tanto a 25 °C como a 37 °C, fueron similares a los medidos para G1M9N2-Asn-FITC y CI2(1-64)-G1M9 tanto en presencia de calcio como de EGTA, indicando que la unión entre CRT y CI2(1-61)-G1M9 es independiente de la concentración de calcio y que las interacciones hidrofóbicas no juegan un papel importante en la unión de CRT a las glicoproteínas (Tabla 2.4). De haber existido un aporte de dichas interacciones en la formación del complejo, hubiera sido esperable obtener valores de afinidad más altos por CI2(1-61)-G1M9 al compararlo con los otros dos ligandos. Para confirmar que los cambios observados en la anisotropía fueron originados por la competencia entre los ligandos por la CRT y no por la unión directa entre las neoglicoproteínas y el glicopéptido fluorescente, se midieron los cambios en la anisotropía de fluorescencia de G1M9N2-Asn-FITC al aumentar la concentración de la neoglicoproteína en ausencia de CRT, mostrando ser prácticamente indetectables (Figura 2.12). Sin embargo, la ausencia de interacciones proteína-proteína con los ligandos empleados en este estudio no excluye la posibilidad de que tales interacciones puedan ser importantes al emplearse como sistema modelo otras glicoproteínas (ver próxima sección).

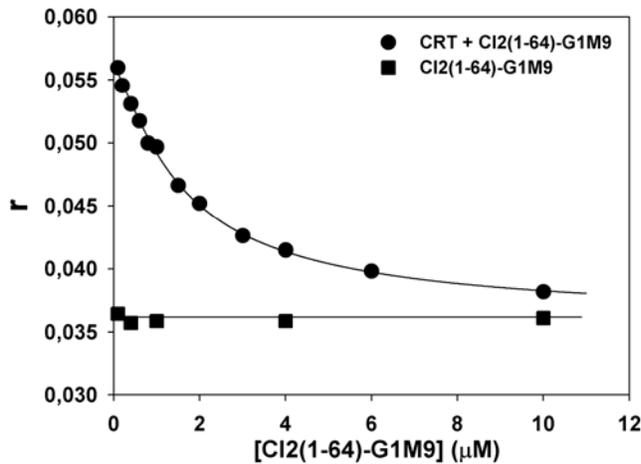


Figura 2.12: Unión de CRT a neoglicoproteínas monoglucosiladas. Desplazamiento del complejo CRT:G1M9N2-Asn-FITC por CI2(1-64)-G1M9 en presencia de 1,1 μM CRT. Los cuadrados muestran el mismo experimento sin CRT.

Tabla 2.4: Unión de glicoproteínas a CRT

Ligando	CI2(1-64)-G1M9 Kd (μM) ^a			CI2(1-61)-G1M9 Kd (μM) ^a		
	25 °C	25 °C	37 °C	25 °C	25 °C	37 °C
Temperatura	25 °C	25 °C	37 °C	25 °C	25 °C	37 °C
[CRT] (μM)	1,1	3,0	1,1	1,1	3,0	1,1
[EGTA] = 10 mM	0,25 ± 0,08	0,20 ± 0,07	1,2 ± 0,3	0,30 ± 0,10	0,28 ± 0,09	1,3 ± 0,3
[Ca ²⁺] = 10 μM	0,16 ± 0,07	0,18 ± 0,05	0,7 ± 0,2	0,20 ± 0,04	0,22 ± 0,06	0,9 ± 0,2
[Ca ²⁺] = 1 mM	0,17 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,8 ± 0,2	0,21 ± 0,06	0,26 ± 0,08	1,0 ± 0,2

^a Los valores son las medias ± el desvío estándar de tres experimentos independientes.

Las actividades in vitro como chaperona de CRT son independientes de la concentración de calcio

Mientras que la concentración de calcio no afectó la unión de CRT a glicopéptidos o glicoproteínas con distintos estados de plegamiento, la presencia del catión podría tener un efecto en la actividad de CRT como chaperona *N*-glicano dependiente. Esta posibilidad se examinó midiendo el efecto del calcio en la inhibición de la agregación mediada por CRT de IgY desnaturalizada químicamente. Asimismo, para estudiar la actividad de CRT de chaperona convencional o clásica, *N*-glicano independiente, se utilizó la forma deglicosilada por peptidil *N*-glicanasa F de esta proteína (PF-IgY). En todas las condiciones estudiadas, que variaron desde 10 mM EGTA a 1 mM calcio, la CRT fue capaz de disminuir la agregación de IgY de manera similar (Figura 2.13 A) PF-IgY mostró una tendencia mayor a agregarse que IgY, probablemente debido al incremento en la solubilidad que le otorgan a esta última los glicanos, pero CRT también disminuyó su agregación de manera calcio

independiente (Figura 2.13 *B*). Cabe destacar aquí que al usar PF-IgY como sustrato fue necesario emplear concentraciones de CRT seis veces más altas con el fin de obtener una inhibición de la agregación similar a la observada con el sustrato glicosilado. De estos experimentos puede concluirse que tampoco la actividad de chaperona de CRT se ve afectada por la concentración de calcio, observación válida tanto para proteínas glicosiladas como no glicosiladas. También, hay que resaltar que como estos ensayos fueron realizados a 37 °C y 31 °C, temperatura a la que CRT no muestra ningún cambio conformacional detectable, se pueden descartar efectos espúreos debido a la inestabilidad térmica de la lectina.

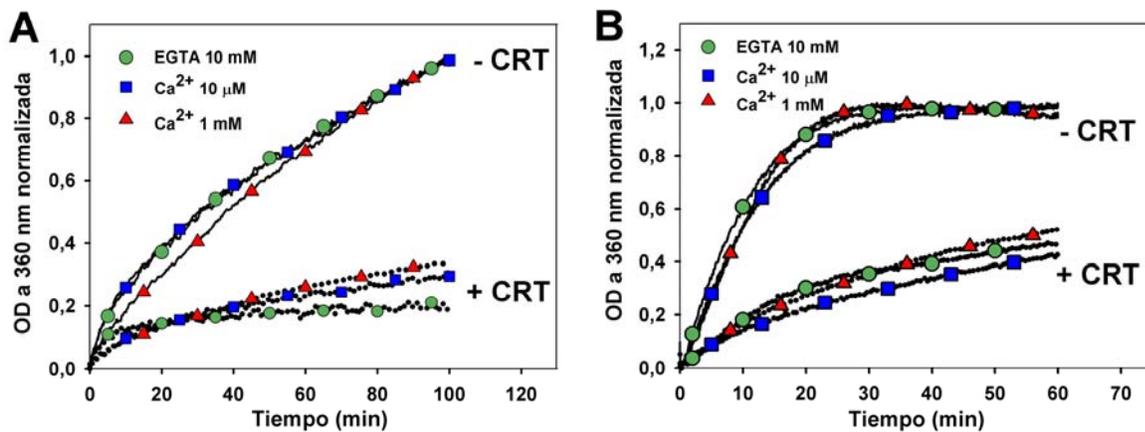


Figura 2.13: Actividades de chaperona de CRT. *A* y *B*, Efecto del calcio en la agregación de 0,5 μM de IgY desnaturalizada (*A*) y PF-IgY desnaturalizada (*B*) evaluado por densidad óptica a 360 nm con o sin el agregado de 0,5 μM (*A*) o 3 μM (*B*) de CRT. Los ensayos se realizaron en 10 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6 con el agregado de EGTA o Ca²⁺ como se indica en cada caso. La concentración final de ambos sustratos fue 0,5 μM de cadenas H y L monoméricas. Las muestras se agitaron contantemente a 37 °C y 31 °C para IgY e PF-IgY, respectivamente. Los valores a cada concentración de calcio se normalizaron con el valor máximo obtenido sin CRT.

La concentración de calcio en el RE no afecta la asociación in vivo entre CRT y glicoproteínas en proceso de plegamiento

Para estudiar el efecto de la variación de los niveles de calcio en la asociación entre CRT y glicoproteínas *in vivo* se utilizaron células de *T. cruzi*. Nuevamente, dada su abundancia, se escogió la CZ como ligando. El contenido de calcio del RE puede modularse con el agregado de ácido ciclopiazónico, que inhibe la fosforilación del ortólogo de la bomba SERCA de células animales, y también con el ionóforo de

calcio A23187, el cuál facilita la difusión del calcio a través de las bicapas lipídicas. Habitualmente en células de mamífero se utiliza tapsigargina como inhibidor de la SERCA, pero la isoforma de la bomba presente en los parásitos es insensible a dicha droga, siendo necesario el empleo del ácido ciclopiazónico para lograr un efecto similar (Fuyura y col. 2001). Las células se marcaron con [³⁵S]-Cys y [³⁵S]-Met antes o después del agregado de las drogas, se lisaron e inmunoprecipitaron con suero antiCRT. Los inmunocomplejos formados se analizaron mediante electroforesis de SDS-PAGE. Mediante este procedimiento se puede determinar si la movilización del calcio afecta la formación del complejo CRT:CZ o la estabilidad de los complejos ya establecidos. Así, cuando las células se marcaron y luego se trataron con ácido ciclopiazónico, sólo o junto con A23187, la intensidad de la banda de CZ fue similar a la de las células no tratadas (Figura 2.14). Esto muestra que, en concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*, la depleción de calcio no afecta la interacción CRT:CZ una vez que esta se estableció. Sin embargo, el resultado fue diferente cuando la concentración de calcio fue disminuida antes de la marcación. En este caso, si bien se pudo detectar la señal de CZ cuando se empleó ácido ciclopiazónico, dicha señal fue de menor intensidad que su correspondiente del experimento anterior, y al emplearse ambas drogas para movilizar calcio la formación del complejo fue prácticamente abolida. Por lo tanto, como la variación en los niveles de calcio no afecta la estabilidad de los complejos ya formados, esta última observación sugiere fuertemente que la depleción de calcio *in vivo* afecta la actividad de la GT, siendo este efecto el motivo de la desaparición de los complejos con la lectina. En relación con esta conclusión, cabe destacar que la GT requiere calcio en el orden milimolar para su actividad (Sousa y col. 1992).

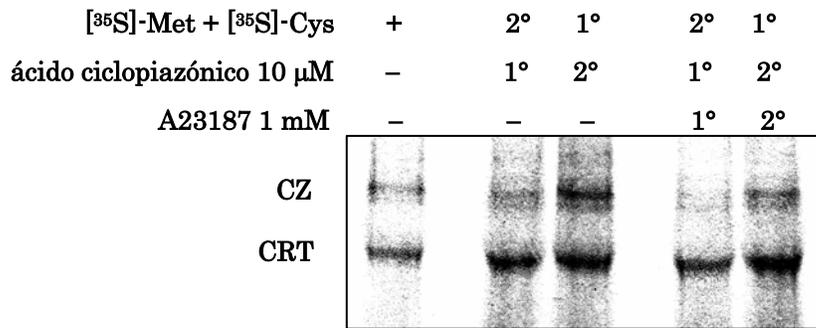


Figura 2.14: Efecto de la movilización de calcio en la asociación de CZ a CRT en *T. cruzi*. Epimastigotes de *T. cruzi* se marcaron con [³⁵S]-Met y [³⁵S]-Cys antes o después del agregado de ácido ciclopiazónico y/o A23187. Luego se lisaron y se inmunoprecipitaron con suero antiCRT. Los inmunocomplejos resultantes se separaron por SDS-PAGE 10 % y se revelaron por autorradiografía.

¿Participa CRT en aliviar la inhibición por producto de GT?

Usualmente, cuando se mide actividad de GT en ensayos libres de células la generación de producto se detiene luego de un cierto período de incubación. Esto puede atribuirse a la pérdida de actividad de la enzima, al agotamiento de los sustratos o a la inhibición de la enzima por los productos de reacción (glicanos monoglucosilados unidos a proteína con una conformación no nativa y/o UDP). Aunque la inhibición de enzimas glicosiltransferasas por nucleótidos difosfato es un hecho bien documentado incluso para la GT, el efecto de pérdida de actividad se observa a concentraciones de UDP que están muy lejos de las necesarias para ejercer un efecto inhibitorio sobre la enzima. Para estudiar la posible inhibición de GT por el otro producto, las glicoproteínas monoglucosiladas, se midió la actividad enzimática usando un sustrato soluble el cual presenta una estructura de glóbulo fundido bien caracterizada, el CI2(1-58)-M9N2.

En dicho ensayo pudo observarse que al cabo de 100 min de reacción la formación de producto prácticamente se detuvo (Figura 2.15). No se observó ningún incremento en la concentración de producto ya formado cuando se agregó a la mezcla de reacción CRT precalentada a 100°C durante 30 min. Por el contrario, sí se observó una recuperación de la actividad enzimática al agregarse CRT nativa (Figura 2.15). Este resultado descarta las dos primeras explicaciones mencionadas más arriba así como también la inhibición por UDP y sugiere que la actividad

continua de GT a largo plazo depende de la presencia del sistema de lectinas, las cuales removerían los productos de GT dentro del superpoblado ambiente del RE. De esta manera, el rol de CRT sería complementario al de la GII. Sin embargo cabe aclarar que este experimento, si bien lo sugiere, no es una demostración definitiva de una inhibición por producto de la actividad de la GT. Una prueba definitiva de dicha hipótesis requeriría una medición directa de dicho efecto, midiendo la actividad enzimática en condiciones de velocidad inicial bajo concentraciones crecientes de producto. Si embargo, el glicopéptido G1M9N2-Asn utilizado para la síntesis de las neoglicoproteínas en esta tesis tiene una pureza del 80 %, siendo el principal contaminante el glicopéptido M9N2-Asn, justamente aquel que es utilizado para sintetizar los sustratos de la GT. Si bien este nivel de impureza no afecta la medición de la unión a CRT, sí influye considerablemente al realizar ensayos de inhibición por producto de la GT.

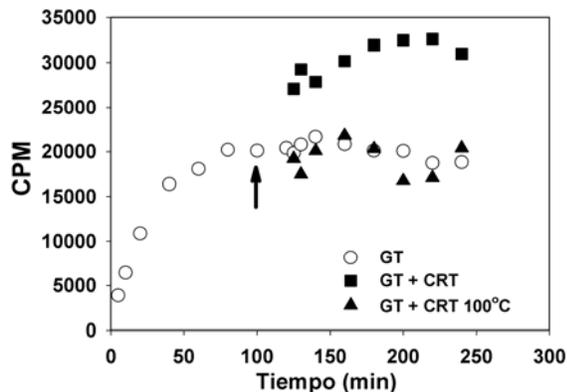


Figura 2.15: Efecto de CRT en la actividad de GT. Generación de producto mediada por GT usando 15 μM UDP- ^{14}C Glc y 20 μM CI2(1-58)-M9 como sustratos. Al cabo de 100 min se agregó 5 μM de CRT nativa (cuadrados) o calentada a 100 °C (triángulos).

El movimiento de calcio afecta la localización subcelular de CRT

Los resultados anteriores sugieren que el dominio C-terminal de CRT funciona como una unidad relativamente independiente encargada de regular la concentración de calcio y sin afectar las propiedades de lectina-chaperona de CRT. Cabe preguntarse aquí por qué durante la evolución se mantuvieron dos funciones tan importantes en una misma proteína si ambas son independientes. Posiblemente el dominio C-terminal cumple funciones adicionales más allá de su conocido papel como regulador de calcio, y en base a lo expuesto en la introducción acerca de las

múltiples localizaciones intracelulares de CRT, se especuló que la unión del calcio al dominio C-terminal podría tener un rol en la regulación de dicha localización. Como una primera aproximación para evaluar esta hipótesis se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* que se trataron con ácido ciclopiazónico y luego se separaron el citosol del RE por el procedimiento de fraccionamiento subcelular descrito en la primera parte de este trabajo y se identificó CRT por Western blot. Al cuantificarse el contenido de CRT en ambas fracciones por densitometría óptica se observó que en ausencia de ácido ciclopiazónico la cantidad de CRT en el citosol representa aproximadamente el 10% del total, mientras que la depleción de calcio del RE provoca un incremento de dicho porcentaje aproximadamente 3 veces (Figura 2.16 *A* y *B*). Sin embargo, cabe la posibilidad de que la CRT observada en el primer sobrenadante no provenga del citosol, sino más bien que sea producto de una lisis parcial del RE. Para descartar dicha posibilidad se estudió por Western blot la presencia de BiP, la HSP70 residente del RE, no encontrándose en ninguna condición experimental ninguna traza de dicha proteína en el primer sobrenadante. Este último experimento confirma que el RE no fue dañado durante el experimento, y que efectivamente la CRT detectada en el primer sobrenadante proviene de la fracción citoplasmática. (Figura 2.16 *A* y *B*).

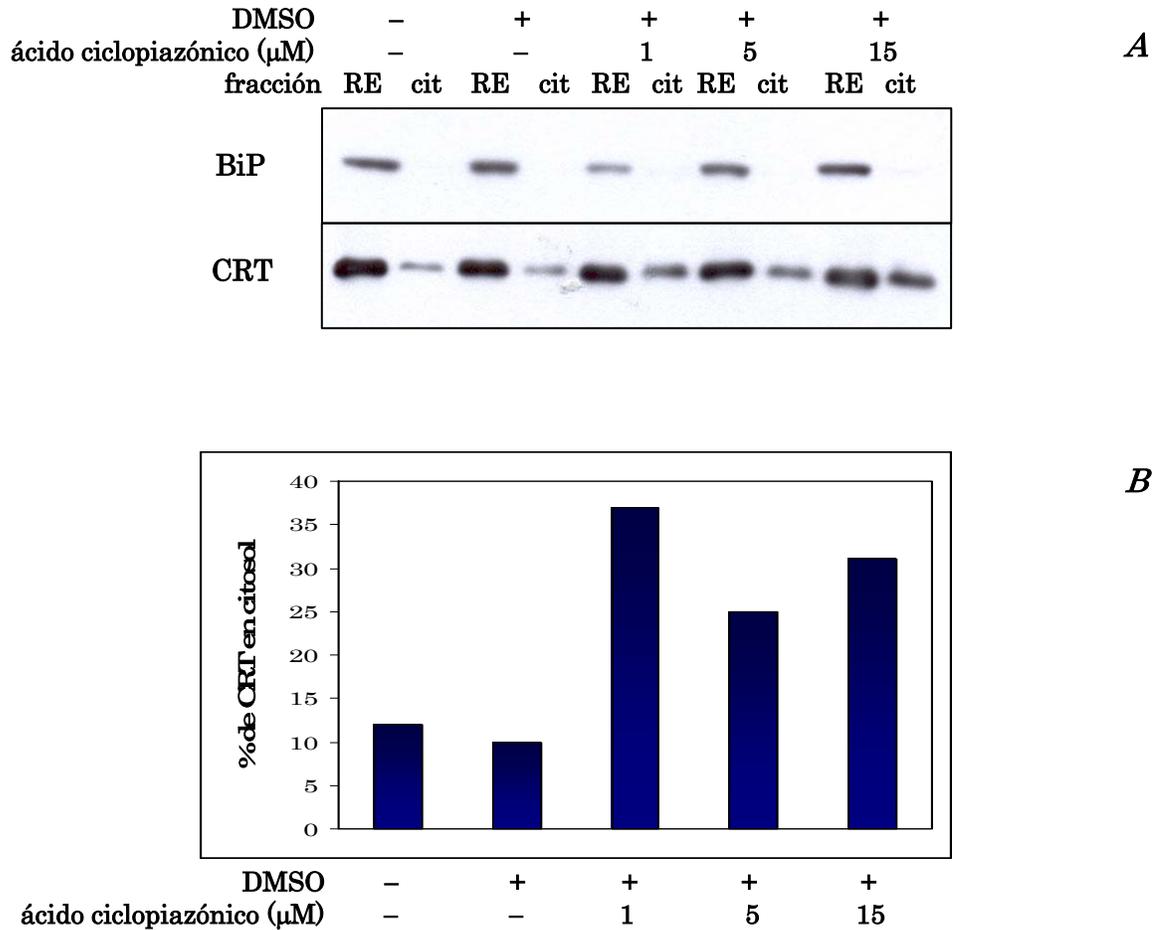


Figura 2.16: Efecto de la movilización de calcio en la localización subcelular de CRT. *A*, Epimastigotes de *T. cruzi* se trataron con las concentraciones que se indican en la figura de ácido ciclopiazónico y se separó el citosol del RE por el procedimiento de fraccionamiento subcelular que se describe en Materiales y Métodos Parte 1. Luego, estas fracciones se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida y se analizaron por inmunotransferencia con antisueros para CRT y BiP. *B*, Representación de la cuantificación por densitometría óptica de las bandas de CRT que se muestran en *A*.

Discusión

El RE juega un rol esencial en una variedad de procesos celulares que incluyen el almacenamiento de calcio, la síntesis de lípidos, y la modificación postraducciona y plegamiento de las proteínas de la vía secretoria (Gething y Sambrook 1992; Bergeron y col. 1994; Williams 1995; Trombetta y Helenius 1998; Ellgaard y col. 1999; Ferrari y Soling 1999). El lumen del RE es un ambiente dinámico perfectamente diseñado para cumplir estas tareas, que contiene una gran variedad de chaperonas y enzimas catalizadoras del plegamiento así como una concentración óptima de iones y nucleótidos. Asimismo, el ambiente oxidante de este compartimiento asegura las condiciones necesarias para la formación de los puentes disulfuro de aquellas proteínas que así lo requieran. Diversos estudios experimentales indican que los cambios en la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE afectan muchas de sus funciones, tales como el plegamiento, las modificaciones postraduccionales y la secreción de proteínas, al igual que las interacciones chaperona-chaperona y chaperona-sustrato (Booth y Koch 1989; Lodish y Kong 1990; Sambrook 1990; Lodish y col. 1992; Baksh y col. 1995; Meldolesi 1998; Meldolesi y Pozzan 1998; Vassilakos y col. 1998; Corbett y col. 1999).

La CRT es una de las principales proteínas del lumen del RE que unen calcio. Esta proteína se divide en tres dominios estructurales: el dominio globular (N-terminal), el brazo extendido o dominio P y el dominio C-terminal (Schrag y col. 2001). El primer dominio contiene un sitio de unión a calcio de alta afinidad y baja capacidad y el último tiene otro sitio de baja afinidad y alta capacidad (Baksh y Michalak 1991). En el RE la CRT cumple dos funciones principales: a través de su actividad como lectina-chaperona localizada en los dominios N-terminal y P funciona como chaperona no convencional de glicoproteínas, y a través del sitio de unión de calcio localizado en el dominio C-terminal actúa como regulador del nivel de calcio del RE (Michalak y col. 1999). Es importante considerar que CRT responde a las fluctuaciones en los niveles de calcio modulando su capacidad de interacción con otras proteínas del RE (Corbett y col. 1999), motivo por el cual es esperable que los cambios en la concentración de este catión puedan tener serios efectos en la estructura, la estabilidad y la actividad de CRT.

La opinión prevalente acerca del requerimiento de calcio de la CRT para funcionar como lectina proviene principalmente de experimentos realizados por el grupo de David. Williams (Universidad de Toronto) en los cuales se utilizó la lectina inmovilizada a una matriz (Vassilakos y col. 1998). Un experimento similar fue realizado en nuestro laboratorio, y consistentemente con el trabajo citado, se observó que la CRT inmovilizada es incapaz de unir G1M9N2 cuando se la incuba con un agente quelante del calcio. Inesperadamente, mediante otras dos técnicas experimentales independientes que utilizan ambos componentes del equilibrio de unión en solución, se pudo establecer que la unión al glicano no depende de la concentración de calcio. Dicho resultado se vio reforzado por el hecho que el glicano G1M9N2 estabilizó a CRT frente a la desnaturalización térmica y química, incluso en presencia de 10 mM EGTA. Si bajo estas condiciones no fuese posible la unión entre CRT y el *N*-glicano no se observaría un efecto estabilizador del glicano sobre la proteína, una predicción ejemplificada por el efecto nulo ejercido por M9N2 durante el desplegamiento térmico de la lectina. Sin embargo quedan por explicarse las observaciones realizadas en el experimento con la CRT inmovilizada. Puede especularse que en ausencia de calcio la CRT inmovilizada interaccionaría con la matriz de Ni²⁺ a través de sitios distintos de los residuos de histidina agregados para tal fin, afectando sus propiedades dinámicas y alterando así su actividad de lectina. En este sentido, un análisis de la estructura primaria de la proteína revela una gran cantidad de residuos cargados negativamente a lo largo de toda la secuencia, los cuales podrían asociarse con la matriz de forma inespecífica y alterar sus propiedades funcionales. Es concebible que el agregado de un catión divalente como el calcio pueda romper dichas interacciones. Justamente, si en lugar de calcio se utiliza otro catión divalente, el magnesio, se obtiene un resultado similar. Como la CRT no necesita magnesio para su actividad de lectina, la recuperación de la capacidad de unión de glicanos se deba probablemente a un efecto no específico de los cationes divalentes en las propiedades dinámicas de la CRT inmovilizada.

Se ha propuesto que el estrés en el RE podría inducir cambios conformacionales en CRT que podrían facilitar el reconocimiento de péptidos y

proteínas. Consecuentemente, la actividad de CRT como chaperona no convencional basada en *N*-glicanos podría cambiar a la de una chaperona "clásica" frente a una depleción de calcio, la eliminación del dominio C-terminal, o frente a estrés térmico, con la concomitante aparición de formas oligoméricas de CRT que muestren propiedades de unión a péptidos (Rizvi y col. 2004). El estudio cuantitativo realizado en esta tesis descarta estas especulaciones, al menos para el caso de las neoglicoproteínas empleadas. Las constantes de unión a CRT a 25 °C y 37 °C de dos neoglicoproteínas, una que presenta una conformación nativa y otra una conformación de tipo glóbulo fundido, fue similar a las obtenidas con G1M9N2-Asn-FITC en todas las condiciones experimentales empleadas, incluyendo la presencia de EGTA. Esto sugiere que las interacciones proteína-proteína no juegan un papel predominante en el sistema experimental utilizado. Sin embargo, estas observaciones no excluyen la posibilidad que con sustratos más hidrofóbicos las interacciones proteína-proteína puedan ser importantes. Además, aunque la incubación a 37 °C en presencia de 10 mM EGTA promovió la aparición de formas más pesadas de CRT, sólo las formas monoméricas retuvieron la actividad de unión a *N*-glicanos. Por lo tanto, las formas oligoméricas de CRT o bien son el resultado de un proceso que anula la actividad de lectina para transformarla en una chaperona convencional, o bien son intermediarios en un proceso de desplegamiento disparado por la depleción de calcio. De cualquier manera, para que ocurra el proceso de oligomerización de CRT *in vitro* la concentración de calcio debe mantenerse extremadamente baja por un largo período de tiempo, situación que es altamente improbable que ocurra en una célula viva. La capacidad de CRT de suprimir la agregación de IgY y PF-IgY desnaturalizadas químicamente no fue afectada por la ausencia de calcio, mostrando que no sólo la capacidad de lectina-chaperona de CRT no depende del calcio sino tampoco la actividad de chaperona clásica, independiente de *N*-glicanos.

También se estudió el mecanismo mediante el cual el calcio y los *N*-glicanos afectan la estabilidad térmica y frente a agentes desnaturalizantes de CRT. Ambos ligandos aumentan la estabilidad de CRT en un modo que aparenta ser aditivo,

sugiriendo que estos interaccionan de forma independiente con la proteína. Además, la actividad lectina de CRT- Δ C fue idéntica a la observada para CRT, en concordancia con resultados previos que muestran que el dominio C-terminal no tiene efectos en la unión a glicanos (Leach y col. 2002). Resumiendo, contrariamente a lo que se asume, la concentración de calcio no influye en las actividades de chaperona de CRT dependientes o independientes del *N*-glicano, al menos en ensayos *in vitro*.

Con el propósito de trasladar esta conclusión a la situación que puede suceder *in vivo* se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* que, como se mencionó anteriormente, transfieren a las glicoproteínas nacientes el glicano M9N2 por lo que las formas monoglucosiladas aparecen únicamente como consecuencia de la actividad de la GT. En este sistema, la depleción de calcio del RE no afectó la estabilidad de los complejos CRT:CZ una vez establecidos. Por el contrario, cuando se redujo la concentración de calcio antes que se estableciese la interacción, entonces sí se observó una disminución en la cantidad de CZ asociada a CRT. En este sentido, al hacer más extrema la reducción de calcio incluyendo el ionóforo A23187 la formación del complejo fue completamente suprimida. Este resultado sugiere que el componente del sistema de control de calidad que se altera con una depleción de calcio es la GT y no la CRT. Estos resultados son similares a los observados para la unión de la molécula H2-L^d del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) a la CNX, donde el A23187 impide la formación del complejo pero no la afecta una vez formado este (Capps y Zuniga 1994). Por otra parte, el agregado de un inhibidor de la SERCA, la tapsigargina, no alteró la cantidad de tiroglobulina unida a CNX y CRT, aunque la cinética de disociación se vio acelerada (Di Jeso y col. 2003). Estas observaciones apoyan la idea de que *in vivo* la variación de la concentración de calcio tampoco altera la actividad de lectina-chaperona de CRT.

Por otra parte, analizando la relación entre la actividad de GT y la presencia de CRT en el medio, puede especularse que esta última actúa atrapando los productos de la primera, separándolos de ella y aliviando la inhibición que se generaría en el superpoblado ambiente del RE. Esta activación de la actividad de GT

luego del agregado de CRT también fue observado recientemente por otro grupo, que además reportó que dicho comportamiento era dosis dependiente y que una mutante de CRT carente de actividad lectina no tenía efecto en la formación del glicano monoglucosilado catalizada por la GT (Totani y col. 2005). Estos resultados refuerzan la idea de la interdependencia funcional entre los distintos componentes del sistema de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas.

Por último, ya que la función lectina y la de unión a calcio de CRT son independientes cabría preguntarse por qué ambas funciones biológicas han sido mantenidas en la misma proteína a lo largo de la evolución. Teniendo en cuenta que 1) el dominio C-terminal es un dominio nativamente desestructurado, 2) la Kd de este dominio por el calcio está en el orden mM, indicando que las fluctuaciones fisiológicas de este catión en el RE afectarán la cantidad unida a la proteína, 3) las proteínas mal plegadas son retrotraslocadas al citosol para su degradación (ERAD) y 4) en una proteína con varios dominios es suficiente que uno de ellos esté mal plegado para que toda la proteína sea sustrato de ERAD, propusimos la hipótesis que al disminuir la concentración de Ca^{2+} del RE, el dominio C-terminal de CRT podría desestabilizarse y hacer que CRT sea susceptible de ser traslocada al citosol, donde por un mecanismo desconocido podría escapar a la degradación proteasomal y cumplir allí las múltiples funciones que se le atribuyen. Como una primera aproximación para evaluar esta hipótesis, estudiamos si las variaciones en la concentración de calcio del RE tenían algún efecto sobre la localización subcelular de CRT y observamos que al inhibirse la SERCA de *T. cruzi* con ácido ciclopiazónico aumentaba CRT en el citosol.

Recientemente se publicaron dos trabajos que estudian el origen de la CRT citosólica y que llegan a distintas conclusiones. En (Shaffer y col. 2005) los autores proponen que la gran diversidad de péptidos señal de las proteínas de la vía secretoria no representa una falta de presión selectiva para mantener una secuencia exacta sino que, por el contrario, dicha variedad tiene consecuencias funcionales, como ser, distintas eficiencias en la interacción con la maquinaria del traslocón. De esta manera, existirían péptidos que hacen que unas proteínas se inserten en el

lumen del RE con más eficiencia que otras. Así, la CRT posee un péptido señal que se inserta en la membrana del RE y es escindido por la peptidasa de péptido señal, pero luego la proteína no quedaría fuertemente asociada al traslocón y se “deslizaría hacia atrás” generando la forma citosólica de CRT. Sin embargo, la mayoría de los ensayos que les permiten llegar a esta conclusión utilizan sistemas de membranas reconstituidas, en donde también podrían estar afectándose otros procesos y algunos de los resultados obtenidos podrían justificarse en el marco de otra teoría. Por otra parte, en (Afshar y col. 2005) demuestran por medio de ensayos elegantes que, *in vivo*, CRT se inserta completamente en el RE y que una vez allí es retrotraslocada al citosol. En este trabajo también se demuestra que el dominio C-terminal es necesario y suficiente para que la retrotraslocación ocurra. Hasta el momento las únicas proteínas conocidas que retrotraslocan son aquellas mal plegadas o mal ensambladas, la cadena pesada del MHC I cuando las proteínas US11 y US2 del citomegalovirus humano la dislocan de la membrana del RE, y la cadena A1 de la toxina colérica (Shamu y col. 1999; Tsai y col. 2002; van der Wal y col. 2002; Lencer y Tsai 2003). Una vez en el citosol las proteínas mal plegadas y el MHC I son degradados, mientras que la toxina bacteriana escapa de la degradación presumiblemente como una consecuencia de su bajo contenido de lisinas, hecho que evitaría su poliubiquitinación y el consecuente reconocimiento por el proteasoma (Rodighiero y col. 2002). Este no sería el caso para la CRT, pues tiene un alto contenido de lisinas (37 de un total de 400 aminoácidos), sin embargo tampoco se observó que esta proteína fuese modificada con ubiquitinas (Afshar y col. 2005). Otra posibilidad es que una vez en el citosol CRT adopte una conformación no susceptible a ser degradada, una posible consecuencia del efecto que tienen diversos factores como Ca^{2+} , Zn^{2+} y ATP en la estabilidad conformacional de CRT (Corbett y col. 2000). Podría ocurrir que al aumentar la concentración de calcio en el citosol el dominio C-terminal de la CRT retrotraslocada se reestructure y evite así la degradación. A su vez, la conformación de CRT podría ayudar a especificar el reconocimiento del sustrato determinando si se une a carbohidratos o a proteínas (Saito y col. 1999; Rizvi y col. 2004). Efectivamente se ha demostrado que la unión de CRT a receptores

nucleares de hormonas esteroideas y a integrinas depende del calcio. Asimismo, los niveles de calcio presentes en el núcleo determinan la capacidad de CRT para participar en los procesos de exportación ya descritos (Holaska y col. 2002). Por lo que, sin lugar a dudas, el calcio sigue jugando un papel fundamental en la actividad de CRT aún después de haber sido retrotraslocada. Sin embargo, tampoco puede descartarse la fosforilación como la fuerza impulsora de un cambio conformacional, pues diversos trabajos ha identificado dicha modificación postraducciona en la CRT citosólica (Singh y col. 1994; Droillard y col. 1997; Li y col. 2003) y existe un sitio de fosforilación en el dominio N-terminal de CRT.

Finalmente, dado que CRT es el primer ejemplo de una proteína eucariota que sufre retrotraslocación para cumplir una función en el citosol, se puede vislumbrar un interesante campo de investigación acerca de las señales reconocidas por la maquinaria de retrotraslocación, el mecanismo por el cual CRT atraviesa la membrana del RE y los factores que determinan la conformación que adquiere en el citosol y le permiten desarrollar sus nuevas funciones biológicas.

Referencias

- Aebi, M y Hennet, T **2001**. *Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way*. Trends Cell Biol 11(3): 136-41.
- Afshar, N, Black, BE y Paschal, BM **2005**. *Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol*. Mol Cell Biol 25(20): 8844-53.
- Aguilar, L, Ramirez, G, Valck, C, Molina, MC, Rojas, A, Schwaeble, W, Ferreira, V y Ferreira, A **2005**. *F(ab')₂ antibody fragments against Trypanosoma cruzi calreticulin inhibit its interaction with the first component of human complement*. Biol Res 38(2-3): 187-95.
- Aguillon, JC, Harris, R, Molina, MC, Colombo, A, Cortes, C, Hermosilla, T, Carreno, P, Orn, A y Ferreira, A **1997**. *Recognition of an immunogenetically selected Trypanosoma cruzi antigen by seropositive chagasic human sera*. Acta Trop 63(2-3): 159-66.
- Allen, HJ y Johnson, EA **1976**. *The isolation of lectins on acid-treated agarose*. Carbohydr Res 50(1): 121-31.
- Alves, MJM, Abuin, G, Kuwajima, VY y Colli, W **1986**. *Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 21: 75-82.
- Andersson, H, Kappeler, F y Hauri, HP **1999**. *Protein targeting to endoplasmic reticulum by dilysine signals involves direct retention in addition to retrieval*. Journal of Biological Chemistry 274: 15080-4.
- Andrews, NW, Abrams, CK, Slatin, SL y Griffiths, G **1990**. *A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH*. Cell 61(7): 1277-87.
- Andrews, NW, Hong, KS, Robbins, ES y Nussenzweig, V **1987**. *Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol 64(3): 474-84.
- Andrews, NW, Katzin, AM y Colli, W **1984**. *Mapping of surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity*. Eur J Biochem 140(3): 599-604.
- Anfinsen, CB **1973**. *Principles that govern the folding of protein chains*. Science 181(96): 223-30.
- Antoniou, AN, Ford, S, Alphey, M, Osborne, A, Elliott, T y Powis, SJ **2002**. *The oxidoreductase ERp57 efficiently reduces partially folded in preference to fully folded MHC class I molecules*. EMBO J 21(11): 2655-63.
- Appenzeller, C, Andersson, H, Kappeler, F y Hauri, HP **1999**. *The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins*. Nat Cell Biol 1: 330-4.
- Appenzeller-Herzog, C, Roche, AC, Nufer, O y Hauri, HP **2004**. *pH-induced conversion of the transport lectin ERGIC-53 triggers glycoprotein release*. Journal of Biological Chemistry 279: 12943-50.
- Arnaudeau, S, Frieden, M, Nakamura, K, Castelbou, C, Michalak, M y Demaurex, N **2002**. *Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria*. J Biol Chem 277(48): 46696-705.

- Arnold, SM, Fessler, LI, Fessler, JH y Kaufman, RJ **2000**. *Two homologues encoding human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity*. *Biochemistry* 39(9): 2149-63.
- Arnold, SM y Kaufman, RJ **2003**. *The noncatalytic portion of Human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase I confers UDP-glucose binding and transferase function to the catalytic domain*. *Journal of Biological Chemistry* 278(44): 43320-8.
- Arosa, FA, de Jesus, O, Porto, G, Carmo, AM y de Sousa, M **1999**. *Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules*. *J Biol Chem* 274(24): 16917-22.
- Atreya, CD, Singh, NK y Nakhasi, HL **1995**. *The rubella virus RNA binding activity of human calreticulin is localized to the N-terminal domain*. *J Virol* 69(6): 3848-51.
- Baksh, S, Burns, K, Andrin, C y Michalak, M **1995**. *Interaction of calreticulin with protein disulfide isomerase*. *J Biol Chem* 270(52): 31338-44.
- Baksh, S y Michalak, M **1991**. *Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains*. *J Biol Chem* 266(32): 21458-65.
- Baldauf, SL y Palmer, JD **1993**. *Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11558-62.
- Ballou, L, Gopal, P, Krummel, B, Tammi, M y Ballou, CE **1986**. *A mutation that prevents glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide precursor leads to underglycosylation of secreted yeast invertase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10): 3081-5.
- Balow, JP, Weissman, JD y Kearse, KP **1995**. *Unique expression of major histocompatibility complex class I proteins in the absence of glucose trimming and calnexin association*. *J Biol Chem* 270(48): 29025-9.
- Bangs, JD, Doering, TL, Englund, PT y Hart, GW **1988**. *Biosynthesis of a variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei. Processing of the glycolipid membrane anchor and N-linked oligosaccharides*. *J Biol Chem* 263(33): 17697-705.
- Barboza, M, Duschak, VG, Fukuyama, Y, Nonami, H, Erra-Balsells, R, Cazzulo, JJ y Couto, AS **2005**. *Structural analysis of the N-glycans of the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi. Identification of sulfated high-mannose type oligosaccharides*. *FEBS J* 272(15): 3803-15.
- Barrett, MP, Burchmore, RJ, Stich, A, Lazzari, JO, Frasch, AC, Cazzulo, JJ y Krishna, S **2003**. *The trypanosomiases*. *Lancet* 362(9394): 1469-80.
- Bastianutto, C, Clementi, E, Codazzi, F, Podini, P, De Giorgi, F, Rizzuto, R, Meldolesi, J y Pozzan, T **1995**. *Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their lumenal microenvironment and function*. *J Cell Biol* 130(4): 847-55.
- Baumann, O y Walz, B **2001**. *Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains*. *Int Rev Cytol* 205: 149-214.
- Bergeron, JJ, Brenner, MB, Thomas, DY y Williams, DB **1994**. *Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Trends Biochem Sci* 19(3): 124-8.
- Bergman, LW y Kuehl, WM **1977**. *Addition of glucosamine and mannose to nascent immunoglobulin heavy chains*. *Biochemistry* 16(20): 4490-7.

- Berridge, MJ **1995**. *Capacitative calcium entry*. *Biochem J* 312 (Pt 1): 1-11.
- Black, BE, Holaska, JM, Rastinejad, F y Paschal, BM **2001**. *DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals*. *Curr Biol* 11(22): 1749-58.
- Blond-Elguindi, S, Fourie, AM, Sambrook, JF y Gething, MJ **1993**. *Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers*. *J Biol Chem* 268(17): 12730-5.
- Bonifacino, JS y Weissman, AM **1998**. *Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 19-57.
- Bontempi, E, Martinez, J y Cazzulo, JJ **1989**. *Subcellular localization of a cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 33(1): 43-7.
- Booth, C y Koch, GL **1989**. *Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins*. *Cell* 59(4): 729-37.
- Borst, P, Frasch, AC, Bernards, A, Hoeijmakers, JH, Van der Ploeg, LH y Cross, GA **1980**. *The genes for variant antigens in trypanosomes*. *Am J Trop Med Hyg* 29(5 Suppl): 1033-6.
- Bosch, M, Trombetta, S, Engstrom, U y Parodi, AJ **1988**. *Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa*. *J Biol Chem* 263(33): 17360-5.
- Bouvier, M y Stafford, WF **2000**. *Probing the three-dimensional structure of human calreticulin*. *Biochemistry* 39(48): 14950-9.
- Bradford, MM **1976**. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Breitfeld, PP, Rup, D y Schwartz, AL **1984**. *Influence of the N-linked oligosaccharides on the biosynthesis, intracellular routing, and function of the human asialoglycoprotein receptor*. *J Biol Chem* 259(16): 10414-21.
- Brener, Z **1973**. *Biology of Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27: 347-82.
- Briones, MR, Souto, RP, Stolf, BS y Zingales, B **1999**. *The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity*. *Mol Biochem Parasitol* 104(2): 219-32.
- Brodsky, JL y McCracken, AA **1999**. *ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation*. *Semin Cell Dev Biol* 10(5): 507-13.
- Brostrom, MA y Brostrom, CO **2003**. *Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability*. *Cell Calcium* 34(4-5): 345-63.
- Burda, P y Aebi, M **1999**. *The dolichol pathway of N-linked glycosylation*. *Biochim Biophys Acta* 1426(2): 239-57.
- Burleigh, BA, Caler, EV, Webster, P y Andrews, NW **1997**. *A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells*. *J Cell Biol* 136(3): 609-20.

- Burleigh, BA y Woolsey, AM **2002**. *Cell signaling and Trypanosoma cruzi invasion*. Cellular Microbiology 4(11): 701-11.
- Burnette, WN **1981**. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 112(2): 195-203.
- Burns, K, Duggan, B, Atkinson, EA, Famulski, KS, Nemer, M, Bleackley, RC y Michalak, M **1994**. *Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor*. Nature 367(6462): 476-80.
- Cabral, CM, Liu, Y y Sifers, RN **2001**. *Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway*. Trends Biochem Sci 26(10): 619-24.
- Caler, EV, Vaena de Avalos, S, Haynes, PA, Andrews, NW y Burleigh, BA **1998**. *Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. EMBO J 17(17): 4975-86.
- Camacho, P y Lechleiter, JD **1995**. *Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca²⁺ waves*. Cell 82(5): 765-71.
- Campetella, O, Henriksson, J, Aslund, L, Frasch, AC, Pettersson, U y Cazzulo, JJ **1992**. *The major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes*. Mol Biochem Parasitol 50(2): 225-34.
- Capps, GG y Zuniga, MC **1994**. *Class I histocompatibility molecule association with phosphorylated calnexin. Implications for rates of intracellular transport*. J Biol Chem 269(15): 11634-9.
- Caramelo, JJ, Castro, OA, Alonso, LG, De Prat-Gay, G y Parodi, AJ **2003**. *UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates*. Proc Natl Acad Sci U S A 100(1): 86-91.
- Caramelo, JJ, Castro, OA, de Prat-Gay, G y Parodi, AJ **2004**. *The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates*. J Biol Chem 279(44): 46280-5.
- Casagrande, R, Stern, P, Diehn, M, Shamu, C, Osario, M, Zuniga, M, Brown, PO y Ploegh, H **2000**. *Degradation of proteins from the ER of S. cerevisiae requires an intact unfolded protein response pathway*. Mol Cell 5(4): 729-35.
- Castro, O, Movsichoff, F y Parodi, AJ **2006**. *Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A 103(40): 14756-60.
- Cazzulo, JJ **2002**. *Proteinases of Trypanosoma cruzi: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease*. Curr Top Med Chem 2(11): 1261-71.
- Cazzulo, JJ, Cazzulo Franke, MC y Franke de Cazzulo, BM **1989**. *On the regulatory properties of the pyruvate kinase from Trypanosoma cruzi epimastigotes*. FEMS Microbiol Lett 50(3): 259-63.
- Cazzulo, JJ, Cazzulo Franke, MC, Martinez, J y Franke de Cazzulo, BM **1990**. *Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi*. Biochim Biophys Acta 1037(2): 186-91.
- Cazzulo, JJ, Franke de Cazzulo, BM, Engel, JC y Cannata, JJ **1985**. *End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids*. Mol Biochem Parasitol 16(3): 329-43.

- Cazzulo, JJ, Labriola, C, Parussini, F, Duschak, VG, Martinez, J y Franke de Cazzulo, BM **1995**. *Cystein proteinases in Trypanosoma cruzi and other Trypanosomatid parasites*. Acta Chimica Slovenica 42: 409-18.
- Cazzulo, JJ, Martinez, J, Parodi, AJ, Wernstedt, C y Hellman, U **1992**. *On the post-translational modifications at the C-terminal domain of the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett 79(1-3): 411-6.
- Chapman, R, Sidrauski, C y Walter, P **1998**. *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus*. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 459-85.
- Chavan, M, Yan, A y Lennarz, WJ **2005**. *Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex*. J Biol Chem 280(24): 22917-24.
- Chu, FK, Takase, K, Guarino, D y Maley, F **1985**. *Diverse properties of external and internal forms of yeast invertase derived from the same gene*. Biochemistry 24(22): 6125-32.
- Clayton, CE **2002**. *Life without transcriptional control? From fly to man and back again*. EMBO J 21(8): 1881-8.
- Conner, EC **1992**. *The role of the cathepsin D propeptide in sorting to the lysosome*. J Biol Chem 25: 21738-45.
- Coppolino, MG, Woodside, MJ, Demaurex, N, Grinstein, S, St-Arnaud, R y Dedhar, S **1997**. *Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion*. Nature 386(6627): 843-7.
- Corbett, EF, Michalak, KM, Oikawa, K, Johnson, S, Campbell, ID, Eggleton, P, Kay, C y Michalak, M **2000**. *The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment*. J Biol Chem 275(35): 27177-85.
- Corbett, EF, Oikawa, K, Francois, P, Tessier, DC, Kay, C, Bergeron, JJ, Thomas, DY, Krause, KH y Michalak, M **1999**. *Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones*. J Biol Chem 274(10): 6203-11.
- Couto, AS, Goncalves, MF, Colli, W y de Lederkremer, RM **1990**. *The N-linked carbohydrate chain of the 85-kilodalton glycoprotein from Trypanosoma cruzi trypomastigotes contains sialyl, fucosyl and galactosyl (alpha 1-3)galactose units*. Mol Biochem Parasitol 39(1): 101-7.
- Couto, AS, Katzin, AM, Colli, W y de Lederkremer, RM **1987**. *Sialic acid in a complex oligosaccharide chain of the Tc-85 surface glycoprotein from the trypomastigote stage of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 26(1-2): 145-53.
- Croft, SL, Barrett, MP y Urbina, JA **2005**. *Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis*. Trends Parasitol 21(11): 508-12.
- Crofts, AJ, Leborgne-Castel, N, Hillmer, S, Robinson, DG, Phillipson, B, Carlsson, LE, Ashford, DA y Denecke, J **1999**. *Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow*. Plant Cell 11(11): 2233-48.
- Dairaku, K y Spiro, RG **1997**. *Phylogenetic survey of endomannosidase indicates late evolutionary appearance of this N-linked oligosaccharide processing enzyme*. Glycobiology 7(4): 579-86.

- D'Alessio, C, Fernandez, F, Trombetta, ES y Parodi, AJ **1999**. *Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunit-encoding genes on glycoprotein folding*. J Biol Chem 274(36): 25899-905.
- Danilczyk, UG y Williams, DB **2001**. *The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo*. J Biol Chem 276(27): 25532-40.
- de la Canal, L y Parodi, AJ **1987**. *Synthesis of dolichol derivatives in trypanosomatids. Characterization of enzymatic patterns*. J Biol Chem 262(23): 11128-33.
- de Prat Gay, G, Ruiz-Sanz, J, Neira, JL, Corrales, FJ, Otzen, DE, Ladurner, AG y Fersht, AR **1995**. *Conformational pathway of the polypeptide chain of chymotrypsin inhibitor-2 growing from its N terminus in vitro. Parallels with the protein folding pathway*. J Mol Biol 254(5): 968-79.
- de Silva, AM, Balch, WE y Helenius, A **1990**. *Quality control in the endoplasmic reticulum: folding and misfolding of vesicular stomatitis virus G protein in cells and in vitro*. J Cell Biol 111(3): 857-66.
- De Souza, W **2002**. *Basic cell biology of Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des 8(4): 269-85.
- de Titto, EH y Araujo, FG **1987**. *Mechanism of cell invasion by Trypanosoma cruzi: importance of sialidase activity*. Acta Trop 44(3): 273-82.
- Dedhar, S, Rennie, PS, Shago, M, Hagesteijn, CY, Yang, H, Filmus, J, Hawley, RG, Bruchovsky, N, Cheng, H, Matusik, RJ y et al. **1994**. *Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin*. Nature 367(6462): 480-3.
- Dempski, RE, Jr. y Imperiali, B **2002**. *Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway*. Curr Opin Chem Biol 6(6): 844-50.
- Denzel, A, Molinari, M, Trigueros, C, Martin, JE, Velmurgan, S, Brown, S, Stamp, G y Owen, MJ **2002**. *Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression*. Mol Cell Biol 22(21): 7398-404.
- Di Jeso, B, Ulianich, L, Pacifico, F, Leonardi, A, Vito, P, Consiglio, E, Formisano, S y Arvan, P **2003**. *Folding of thyroglobulin in the calnexin/calreticulin pathway and its alteration by loss of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum*. Biochem J 370(Pt 2): 449-58.
- Dias, JC, Silveira, AC y Schofield, CJ **2002**. *The impact of Chagas disease control in Latin America: a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz 97(5): 603-12.
- Docampo, R, de Souza, W, Miranda, K, Rohloff, P y Moreno, SN **2005**. *Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man*. Nat Rev Microbiol 3(3): 251-61.
- Doerrler, WT y Lehrman, MA **1999**. *Regulation of the dolichol pathway in human fibroblasts by the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(23): 13050-5.
- Dong, Z, Zuber, C, Spiro, MJ, Spiro, RG y Roth, J **2000**. *Immunohistochemical evaluation of endomannosidase distribution in rat tissues: evidence for cell type-specific expression*. Histochem Cell Biol 114(6): 461-7.
- Dorta, ML, Ferreira, AT, Oshiro, ME y Yoshida, N **1995**. *Ca²⁺ signal induced by Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion*. Mol Biochem Parasitol 73(1-2): 285-9.

- Droillard, MJ, Guclu, J, Le Caer, JP, Mathieu, Y, Guern, J y Lauriere, C **1997**. *Identification of calreticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells*. *Planta* 202(3): 341-8.
- Dube, S, Fisher, JW y Powell, JS **1988**. *Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function*. *J Biol Chem* 263(33): 17516-21.
- Dutra, WO, Rocha, MO y Teixeira, MM **2005**. *The clinical immunology of human Chagas disease*. *Trends Parasitol* 21(12): 581-7.
- Dvorak, J **1975**. *New in vitro approach to quantitation of Trypanosoma cruzi vertebrate cell interactions*. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research (PAHO)* 318: 109-20.
- Eakin, AE, Mills, AA, Harth, G, McKerrow, JH y Craik, CS **1992**. *The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzain) from Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 267: 7411-20.
- Edge, CJ, Joao, HC, Woods, RJ y Wormald, MR **1993**. *The conformational effects of N-linked glycosylation*. *Biochem Soc Trans* 21(2): 452-5.
- Elias, MC, da Cunha, JP, de Faria, FP, Mortara, RA, Freymuller, E y Schenkman, S **2006**. *Morphological Events during the Trypanosoma cruzi Cell Cycle*. *Protist*.
- Ellgaard, L, Molinari, M y Helenius, A **1999**. *Setting the standards: quality control in the secretory pathway*. *Science* 286(5446): 1882-8.
- Ellgaard, L, Riek, R, Herrmann, T, Guntert, P, Braun, D, Helenius, A y Wuthrich, K **2001**. *NMR structure of the calreticulin P-domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3133-8.
- Ellgaard, LH, A. **2003**. *Quality control in the endoplasmic reticulum*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 181-9.
- Elliott, JG, Oliver, JD y High, S **1997**. *The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins*. *J Biol Chem* 272(21): 13849-55.
- Engel, JC, Doyle, PS, Hsieh, I y McKerrow, JH **1998**. *Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection*. *J Exp Med* 188(4): 725-34.
- Engman, DM y Leon, JS **2002**. *Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity*. *Acta Trop* 81(2): 123-32.
- Failer, BU, Braun, N y Zimmermann, H **2002**. *Cloning, expression, and functional characterization of a Ca(2+)-dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase*. *J Biol Chem* 277(40): 36978-86.
- Fairlamb, AH, Blackburn, P, Ulrich, P, Chait, BT y Cerami, A **1985**. *Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids*. *Science* 227(4693): 1485-7.
- Fanchiotti, S, Fernandez, F, D'Alessio, C y Parodi, AJ **1998**. *The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for Schizosaccharomyces pombe viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress*. *J Cell Biol* 143(3): 625-35.
- Farmery, MR, Allen, S, Allen, AJ y Bulleid, NJ **2000**. *The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system*. *J Biol Chem* 275(20): 14933-8.

- Fasolato, C, Pizzo, P y Pozzan, T **1998**. *Delayed activation of the store-operated calcium current induced by calreticulin overexpression in RBL-1 cells*. Mol Biol Cell 9(6): 1513-22.
- Ferguson, MA **1999**. *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*. J Cell Sci 112 (Pt 17): 2799-809.
- Fernandez, F, Jannatipour, M, Hellman, U, Rokeach, LA y Parodi, AJ **1996**. *A new stress protein: synthesis of Schizosaccharomyces pombe UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability*. EMBO J 15(4): 705-13.
- Fernandez, FS, Trombetta, SE, Hellman, U y Parodi, AJ **1994**. *Purification to homogeneity of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase from Schizosaccharomyces pombe and apparent absence of the enzyme from Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 269(48): 30701-6.
- Fernandez, MA, Munoz-Fernandez, MA y Fresno, M **1993**. *Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of Trypanosoma cruzi into human macrophages*. Eur J Immunol 23(2): 552-7.
- Ferrari, DM y Soling, HD **1999**. *The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds*. Biochem J 339 (Pt 1): 1-10.
- Ferreira, V, Valck, C, Sanchez, G, Gingras, A, Tzima, S, Molina, MC, Sim, R, Schwaeble, W y Ferreira, A **2004**. *The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from Trypanosoma cruzi*. J Immunol 172(5): 3042-50.
- Ferrero-Garcia, MA, Trombetta, SE, Sanchez, DO, Reglero, A, Frasch, AC y Parodi, AJ **1993**. *The action of Trypanosoma cruzi trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins*. Eur J Biochem 213(2): 765-71.
- Field, H, Sherwin, T, Smith, AC, Gull, K y Field, MC **2000**. *Cell-cycle and developmental regulation of TbRAB31 localisation, a GTP-locked Rab protein from Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 106(1): 21-35.
- Fischer, PB, Karlsson, GB, Dwek, RA y Platt, FM **1996**. *N-butyldeoxynojirimycin-mediated inhibition of human immunodeficiency virus entry correlates with impaired gp120 shedding and gp41 exposure*. J Virol 70(10): 7153-60.
- Fliegel, L, Burns, K, MacLennan, DH, Reithmeier, RA y Michalak, M **1989**. *Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem 264(36): 21522-8.
- Foulquier, F, Duvet, S, Klein, A, Mir, A, Chirat, F y Cacan, R **2004**. *Endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins bearing Man5GlcNAc2 and Man9GlcNAc2 species in the M18-5 CHO cell line*. Eur J Biochem 271: 398-404.
- Frank, CG y Aebi, M **2005**. *ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis*. Glycobiology 15(11): 1156-63.
- Franke de Cazzulo, BM, Martinez, J, North, MJ, Coombs, GH y Cazzulo, JJ **1994**. *Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett 124(1): 81-6.
- Freeze, HH y Aebi, M **2005**. *Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation*. Curr Opin Struct Biol 15(5): 490-8.

- Frenkel, Z, Gregory, W, Kornfeld, S y Lederkremer, GZ **2003**. *Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2*. Journal of Biological Chemistry 278: 34119-24.
- Frickel, EM, Riek, R, Jelesarov, I, Helenius, A, Wuthrich, K y Ellgaard, L **2002**. *TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(4): 1954-9.
- Fuyura, T, Okura, M, Ruiz, FA, Scott, DA y Docampo, R **2001**. *TcSCA complementes Yeast Mutants Defective in Ca²⁺ pumps and encodes a Ca²⁺-ATPase that localizes to the endoplasmic reticulum of Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry 276: 32437-45.
- Ganan, S, Cazzulo, JJ y Parodi, AJ **1991**. *A major proportion of N-glycoproteins are transiently glucosylated in the endoplasmic reticulum*. Biochemistry 30(12): 3098-104.
- Gao, B, Adhikari, R, Howarth, M, Nakamura, K, Gold, MC, Hill, AB, Knee, R, Michalak, M y Elliott, T **2002**. *Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin*. Immunity 16(1): 99-109.
- Garzoni, LR, Waghahi, MC, Baptista, MM, de Castro, SL, Meirelles Mde, N, Britto, CC, Docampo, R, Oldfield, E y Urbina, JA **2004**. *Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease*. Int J Antimicrob Agents 23(3): 286-90.
- Gavin, AC, Bosche, M, Krause, R, Grandi, P, Marzioch, M, Bauer, A, Schultz, J, Rick, JM, Michon, AM, Cruciat, CM, Remor, M, Hofert, C, Schelder, M, Brajenovic, M, Ruffner, H, Merino, A, Klein, K, Hudak, M, Dickson, D, Rudi, T, Gnau, V, Bauch, A, Bastuck, S, Huhse, B, Leutwein, C, Heurtier, MA, Copley, RR, Edlmann, A, Querfurth, E, Rybin, V, Drewes, G, Raida, M, Bouwmeester, T, Bork, P, Seraphin, B, Kuster, B, Neubauer, G y Superti-Furga, G **2002**. *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature 415(6868): 141-7.
- George, ST, Ruoho, AE y Malbon, CC **1986**. *N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors*. J Biol Chem 261(35): 16559-64.
- Gething, MJ y Sambrook, J **1992**. *Protein folding in the cell*. Nature 355(6355): 33-45.
- Ghebrehiwet, B, Lim, BL, Kumar, R, Feng, X y Peerschke, EI **2001**. *gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection*. Immunol Rev 180: 65-77.
- Ghiran, I, Klickstein, LB y Nicholson-Weller, A **2003**. *Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule*. J Biol Chem 278(23): 21024-31.
- Goicoechea, S, Orr, AW, Pallero, MA, Eggleton, P y Murphy-Ullrich, JE **2000**. *Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin*. J Biol Chem 275(46): 36358-68.
- Gonzalez Clemente, MC, Garcia Ferrero, MA, Bossio, JC, Bosch, M y Parodi, AJ **1990**. *The structure of a galactofuranose-containing oligosaccharide isolated from glycoproteins of the trypanosomatid Herpetomonas samuelpessoai*. Mol Biochem Parasitol 42(2): 289-91.
- Gray, AJ, Park, PW, Broekelmann, TJ, Laurent, GJ, Reeves, JT, Stenmark, KR y Mecham, RP **1995**. *The mitogenic effects of the B beta chain of fibrinogen are mediated through cell surface calreticulin*. J Biol Chem 270(44): 26602-6.

- Grinna, LS y Robbins, PW **1980**. *Substrate specificities of rat liver microsomal glucosidases which process glycoproteins*. J Biol Chem 255(6): 2255-8.
- Gruters, RA, Neefjes, JJ, Tersmette, M, de Goede, RE, Tulp, A, Huisman, HG, Miedema, F y Ploegh, HL **1987**. *Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase*. Nature 330(6143): 74-7.
- Guerin, M y Parodi, AJ **2003**. *The UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase is organized in at least two tightly bound domains from yeast to mammals*. J Biol Chem 278(23): 20540-6.
- Guhl, F, Jaramillo, C, Vallejo, GA, Yockteng, R, Cardenas-Arroyo, F, Fornaciari, G, Arriaza, B y Aufderheide, AC **1999**. *Isolation of Trypanosoma cruzi DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile*. Am J Phys Anthropol 108(4): 401-7.
- Gull, K **2003**. *Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies*. Curr Opin Microbiol 6(4): 365-70.
- Guo, L, Nakamura, K, Lynch, J, Opas, M, Olson, EN, Agellon, LB y Michalak, KM **2002**. *Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse*. Journal of Biological Chemistry 277: 50776-9.
- Haas, IG y Wabl, M **1983**. *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. Nature 306(5941): 387-9.
- Halic, M y Beckmann, R **2005**. *The signal recognition particle and its interactions during protein targeting*. Curr Opin Struct Biol 15(1): 116-25.
- Hall, BF, Webster, P, Ma, AK, Joiner, KA y Andrews, NW **1992**. *Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by Trypanosoma cruzi: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm*. J Exp Med 176(2): 313-25.
- Hammond, C, Braakman, I y Helenius, A **1994**. *Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control*. Proc Natl Acad Sci U S A 91(3): 913-7.
- Hanke, J, Sanchez, DO, Henriksson, J, Aslund, L, Pettersson, U, Frasch, AC y Hoheisel, JD **1996**. *Mapping the Trypanosoma cruzi genome: analyses of representative cosmid libraries*. Biotechniques 21(4): 686-8, 690-3.
- Hannaert, V, Bringaud, F, Opperdoes, FR y Michels, PA **2003**. *Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida*. Kinetoplastid Biol Dis 2(1): 11.
- Hara-Kuge, S, Ahkura, T, Seko, A y Yamashita, K **1999**. *Vesicular-integral membrane protein, VIP36, recognizes high-mannose type glycans containing alpha 1-2 mannosyl residues in MDCK cells*. Glycobiology 9: 833-9.
- Harth, G, Andrews, N, Mills, AA, Engel, JC, Smith, R y McKerrow, JH **1993**. *Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 58(1): 17-24.
- Hebert, DN, Foellmer, B y Helenius, A **1996**. *Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes*. EMBO J 15(12): 2961-8.

- Hebert, DN, Zhang, JX, Chen, W, Foellmer, B y Helenius, A **1997**. *The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding association with calnexin and calreticulin*. J Cell Biol 139: 613-23.
- Helbling, D, Mueller, BU, Timchenko, NA, Hagemeyer, A, Jotterand, M, Meyer-Monard, S, Lister, A, Rowley, JD, Huegli, B, Fey, MF y Pabst, T **2004**. *The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EVI1 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(36): 13312-7.
- Helenius, A **1994**. *How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum*. Mol Biol Cell 5(3): 253-65.
- Helenius, A y Aebi, M **2004**. *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum*. Annu Rev Biochem 73: 1019-49.
- Helenius, J, Ng, DT, Marolda, CL, Walter, P, Valvano, MA y Aebi, M **2002**. *Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein*. Nature 415(6870): 447-50.
- Hendrick, JP y Hartl, FU **1993**. *Molecular chaperone functions of heat-shock proteins*. Annu Rev Biochem 62: 349-84.
- Henriquez, D, Piras, R y Piras, MM **1981**. *The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of Trypanosoma cruzi trypomastigotes*. Mol Biochem Parasitol 2(5-6): 359-66.
- Herscovics, A **1999**. *Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis*. Biochim Biophys Acta 1473(1): 96-107.
- Holaska, JM, Black, BE, Rastinejad, F y Paschal, BM **2002**. *Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin*. Mol Cell Biol 22(17): 6286-97.
- Holst, B, Bruun, AW, Kielland-Brandt, MC y Winther, JR **1996**. *Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum*. EMBO J 15(14): 3538-46.
- Hosokawa, N, Tremblay, LO, You, Z, Herscovics, A, Wada, I y Nagata, K **2003**. *Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I*. Journal of Biological Chemistry 278: 26287-94.
- Hosokawa, N, Wada, I, Hasegawa, K, Yoriyuzi, T, Tremblay, LO, Herscovics, A y Nagata, K **2001**. *A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation*. EMBO Rep 2(5): 415-22.
- Hubbard, SC y Ivatt, RJ **1981**. *Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem 50: 555-83.
- Hurtley, SM y Helenius, A **1989**. *Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum*. Annu Rev Cell Biol 5: 277-307.
- Iakova, P, Wang, GL, Timchenko, L, Michalak, M, Pereira-Smith, OM, Smith, JR y Timchenko, NA **2004**. *Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate*. EMBO J 23(2): 406-17.
- Ihara, Y, Cohen-Doyle, MF, Saito, Y y Williams, DB **1999**. *Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro*. Mol Cell 4(3): 331-41.

- Ikawa, M, Wada, I, Kominami, K, Watanabe, D, Toshimori, K, Nishimune, Y y Okabe, M **1997**. *The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility*. Nature 387(6633): 607-11.
- Imperiali, B y Hendrickson, TL **1995**. *Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase*. Bioorg Med Chem 3(12): 1565-78.
- Itin, C, Roche, AC, Monsigny, M y Hauri, HP **1996**. *ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins*. Mol Biol Cell 7: 483-93.
- Jacobsen, W, Christians, U y Benet, LZ **2000**. *In vitro evaluation of the disposition of A novel cysteine protease inhibitor*. Drug Metab Dispos 28(11): 1343-51.
- Jakob, CA, Bodmer, D, Spirig, U, Battig, P, Marcil, A, Dignard, D, Bergeron, JJ, Thomas, DY y Aebi, M **2001**. *Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast*. EMBO Rep 2(5): 423-30.
- Jakob, CA, Burda, P, Roth, J y Aebi, M **1998**. *Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in Saccharomyces cerevisiae is determined by a specific oligosaccharide structure*. J Cell Biol 142(5): 1223-33.
- Jannatipour, M y Rokeach, LA **1995**. *The Schizosaccharomyces pombe homologue of the chaperone calnexin is essential for viability*. J Biol Chem 270(9): 4845-53.
- Jones, D, Mehlert, A y Ferguson, MA **2004**. *The N-glycan glucosidase system in Trypanosoma brucei*. Biochem Soc Trans 32(Pt 5): 766-8.
- Kalil, J y Cunha-Neto, E **1996**. *Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last?* Parasitol Today 12(10): 396-9.
- Kalz-Fuller, B, Bieberich, E y Bause, E **1995**. *Cloning and expression of glucosidase I from human hippocampus*. Eur J Biochem 231(2): 344-51.
- Kang, SJ y Cresswell, P **2002**. *Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain*. J Biol Chem 277(47): 44838-44.
- Kapoor, M, Ellgaard, L, Gopalakrishnapai, J, Schirra, C, Gemma, E, Oscarson, S, Helenius, A y Surolia, A **2004**. *Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition*. Biochemistry 43(1): 97-106.
- Kapoor, M, Srinivas, H, Kandiah, E, Gemma, E, Ellgaard, L, Oscarson, S, Helenius, A y Surolia, A **2003**. *Interactions of substrate with calreticulin, an endoplasmic reticulum chaperone*. J Biol Chem 278(8): 6194-200.
- Kaufman, RJ, Scheuner, D, Schroder, M, Shen, X, Lee, K, Liu, CY y Arnold, SM **2002**. *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*. Nat Rev Mol Cell Biol 3(6): 411-21.
- Kelleher, DJ y Gilmore, R **2006**. *An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase*. Glycobiology 16(4): 47R-62R.
- Kellenberger, C, Hendrickson, TL y Imperiali, B **1997**. *Structural and functional analysis of peptidyl oligosaccharyl transferase inhibitors*. Biochemistry 36(41): 12554-9.
- Kern, G, Kern, D, Jaenicke, R y Seckler, R **1993**. *Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of invertase from Saccharomyces cerevisiae*. Protein Sci 2(11): 1862-8.

- Kern, G, Schulke, N, Schmid, FX y Jaenicke, R **1992**. *Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast*. Protein Sci 1(1): 120-31.
- Kiely, ML, McKnight, GS y Schimke, RT **1976**. *Studies on the attachment of carbohydrate to ovalbumin nascent chains in hen oviduct*. J Biol Chem 251(18): 5490-5.
- Kim, PS y Arvan, P **1995**. *Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol 128(1-2): 29-38.
- Konig, R, Ashwell, G y Hanover, JA **1988**. *Glycosylation of CD4. Tunicamycin inhibits surface expression*. J Biol Chem 263(19): 9502-7.
- Kornfeld, R y Kornfeld, S **1985**. *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem 54: 631-64.
- Labriola, C, Cazzulo, JJ y Parodi, AJ **1995**. *Retention of glucose units added by the UDP-GLC:glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol 130(4): 771-9.
- Labriola, C, Cazzulo, JJ y Parodi, AJ **1999**. *Trypanosoma cruzi calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins*. Mol Biol Cell 10(5): 1381-94.
- Labriola, C, Sousa, M y Cazzulo, JJ **1993**. *Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi by affinity chromatography*. Biol Res 26(1-2): 101-7.
- Laemmli, UK **1970**. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227(5259): 680-5.
- Landfear, SM y Ignatushchenko, M **2001**. *The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids*. Mol Biochem Parasitol 115: 1-17.
- Leach, MR, Cohen-Doyle, MF, Thomas, DY y Williams, DB **2002**. *Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin*. J Biol Chem 277(33): 29686-97.
- Leach, MR y Williams, DB **2004**. *Lectin-deficient calnexin is capable of binding class I histocompatibility molecules in vivo and preventing their degradation*. J Biol Chem 279(10): 9072-9.
- Lencer, WI y Tsai, B **2003**. *The intracellular voyage of cholera toxin: going retro*. Trends Biochem Sci 28(12): 639-45.
- Ley, V, Robbins, ES, Nussenzweig, V y Andrews, NW **1990**. *The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments*. J Exp Med 171(2): 401-13.
- Li, YT y Lee, YC **1972**. *Pineapple - and -D-mannopyranosidases and their action on core glycopeptides*. J Biol Chem 247(11): 3677-83.
- Li, Z, Onodera, H, Ugaki, M, Tanaka, H y Komatsu, S **2003**. *Characterization of calreticulin as a phosphoprotein interacting with cold-induced protein kinase in rice*. Biol Pharm Bull 26(2): 256-61.
- Li, Z, Stafford, WF y Bouvier, M **2001**. *The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability*. Biochemistry 40(37): 11193-201.
- Lima, MF y Kierszenbaum, F **1982**. *Biochemical requirements for intracellular invasion by Trypanosoma cruzi: protein synthesis*. J Protozool 29(4): 566-70.

- Lindquist, JA, Hammerling, GJ y Trowsdale, J **2001**. *ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain*. FASEB J 15(8): 1448-50.
- Liu, B, Liu, Y, Motyka, SA, Agbo, EE y Englund, PT **2005**. *Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA*. Trends Parasitol 21(8): 363-9.
- Liu, Y, Choudhury, P, Cabral, CM y Sifers, RN **1999**. *Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome*. J Biol Chem 274(9): 5861-7.
- Lo Conte, L, Brenner, SE, Hubbard, TJ, Chothia, C y Murzin, AG **2002**. *SCOP database in 2002: refinements accommodate structural genomics*. Nucleic Acids Res 30(1): 264-7.
- Lodish, HF y Kong, N **1990**. *Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum*. J Biol Chem 265(19): 10893-9.
- Lodish, HF, Kong, N y Wikstrom, L **1992**. *Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem 267(18): 12753-60.
- Low, P, Dallner, G, Mayor, S, Cohen, S, Chait, BT y Menon, AK **1991**. *The mevalonate pathway in the bloodstream form of Trypanosoma brucei. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues*. J Biol Chem 266(29): 19250-7.
- Marcelain, K, Colombo, A, Molina, MC, Ferreira, L, Lorca, M, Aguillon, JC y Ferreira, A **2000**. *Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against Trypanosoma cruzi calreticulin, an immunodominant antigen*. Acta Trop 75(3): 291-300.
- Marquardt, T, Hebert, DN y Helenius, A **1993**. *Post-translational folding of influenza hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum-derived microsomes*. J Biol Chem 268(26): 19618-25.
- Martinez, J, Campetella, O, Frasch, AC y Cazzulo, JJ **1993**. *The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains*. Immunol Lett 35: 191-6.
- Mast, SW, Diekman, K, Karaveg, K, Davis, A, Sifers, RN y Moremen, KW **2005**. *Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins*. Glycobiology 15(4): 421-36.
- Matthews, KR, Tschudi, C y Ullu, E **1994**. *A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes*. Genes Dev 8(4): 491-501.
- Mazzarella, RA, Srinivasan, M, Haugejorden, SM y Green, M **1990**. *ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active site sequences of protein disulfide isomerase*. J Biol Chem 265(2): 1094-101.
- McConville, MJ, Mullin, KA, Ilgoutz, SC y Teasdale, RD **2002**. *Secretory pathway of trypanosomatid parasites*. Microbiol Mol Biol Rev 66(1): 122-54; table of contents.
- McGrath, ME, Eakin, AE, Engel, JC, McKerrow, JH, Craik, CS y Fletterick, RJ **1995**. *The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease*. J Mol Biol 247(2): 251-9.
- McIntyre, GF, Godbold, GD y Erickson, AH **1994**. *Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles*. J Biol Chem 266: 15438-45.

- Mehta, A, Lu, X, Block, TM, Blumberg, BS y Dwek, RA **1997**. *Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A 94(5): 1822-7.
- Meirelles, MN, Juliano, L, Carmona, E, Silva, SG, Costa, EM, Murta, AC y Scharfstein, J **1992**. *Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro*. Mol Biochem Parasitol 52(2): 175-84.
- Meldolesi, J **1998**. *Calcium signalling. Oscillation, activation, expression*. Nature 392(6679): 863, 865-6.
- Meldolesi, J y Pozzan, T **1998**. *The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function*. J Cell Biol 142(6): 1395-8.
- Melnick, J, Aviel, S y Argon, Y **1992**. *The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains*. J Biol Chem 267(30): 21303-6.
- Mendelzon, DH y Parodi, AJ **1986**. *N-linked high mannose-type oligosaccharides in the protozoa Crithidia fasciculata and Crithidia hamosa contain galactofuranose residues*. J Biol Chem 261(5): 2129-33.
- Mendelzon, DH, Previato, JO y Parodi, AJ **1986**. *Characterization of protein-linked oligosaccharides in trypanosomatid flagellates*. Mol Biochem Parasitol 18(3): 355-67.
- Mery, L, Mesaeli, N, Michalak, M, Opas, M, Lew, DP y Krause, KH **1996**. *Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx*. J Biol Chem 271(16): 9332-9.
- Mesaeli, N, Nakamura, K, Zvaritch, E, Dickie, P, Dziak, E, Krause, KH, Opas, M, MacLennan, DH y Michalak, M **1999**. *Calreticulin is essential for cardiac development*. J Cell Biol 144(5): 857-68.
- Metzner, SI, Sousa, MC, Hellman, U, Cazzulo, JJ y Parodi, AJ **1996**. *The use of UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase for radiolabeling protein-linked high mannose-type oligosaccharides*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 42(5): 631-5.
- Michalak, M, Corbett, EF, Mesaeli, N, Nakamura, K y Opas, M **1999**. *Calreticulin: one protein, one gene, many functions*. Biochem J 344 Pt 2: 281-92.
- Michalak, M, Milner, RE, Burns, K y Opas, M **1992**. *Calreticulin*. Biochem J 285 (Pt 3): 681-92.
- Ming, M, Ewen, ME y Pereira, ME **1995**. *Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway*. Cell 82(2): 287-96.
- Miyawaki, A, Llopis, J, Heim, R, McCaffery, JM, Adams, JA, Ikura, M y Tsien, RY **1997**. *Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature 388(6645): 882-7.
- Molinari, M, Calanca, V, Galli, C, Lucca, P y Paganetti, P **2003**. *Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle*. Science 299(5611): 1397-400.
- Molinari, M, Eriksson, KK, Calanca, V, Galli, C, Cresswell, P, Michalak, KM y Helenius, A **2004**. *Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control*. Molecular Cell 13: 125-35.

- Molinari, M, Galli, C, Piccaluga, V, Pieren, M y Paganetti, P **2002**. *Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER*. J Cell Biol 158(2): 247-57.
- Molinari, M y Helenius, A **1999**. *Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells*. Nature 402(6757): 90-3.
- Molinari, M y Helenius, A **2000**. *Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum*. Science 288(5464): 331-3.
- Moraes, CT, Bosch, M y Parodi, AJ **1988**. *Structural characterization of several galactofuranose-containing, high-mannose-type oligosaccharides present in glycoproteins of the trypanosomatid Leptomonas samueli*. Biochemistry 27(5): 1543-9.
- Moremen, KW, Trimble, RB y Herscovics, A **1994**. *Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway*. Glycobiology 4(2): 113-25.
- Muller, S, Liebau, E, Walter, RD y Krauth-Siegel, RL **2003**. *Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites*. Trends Parasitol 19(7): 320-8.
- Murzin, AG, Brenner, SE, Hubbard, T y Chothia, C **1995**. *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. J Mol Biol 247(4): 536-40.
- Nakamura, K, Zuppini, A, Arnaudeau, S, Lynch, J, Ahsan, I, Krause, R, Papp, S, De Smedt, H, Parys, JB, Muller-Esterl, W, Lew, DP, Krause, KH, Demaurex, N, Opas, M y Michalak, M **2001**. *Functional specialization of calreticulin domains*. J Cell Biol 154(5): 961-72.
- Nikonov, AV y Kreibich, G **2003**. *Organization of translocon complexes in ER membranes*. Biochem Soc Trans 31(Pt 6): 1253-6.
- Nilsson, I, Kelleher, DJ, Miao, Y, Shao, Y, Kreibich, G, Gilmore, R, von Heijne, G y Johnson, AE **2003**. *Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex*. J Cell Biol 161(4): 715-25.
- Nilsson, IM y von Heijne, G **1993**. *Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem 268(8): 5798-801.
- Nufer, O, Guldbrandsen, S, Degen, M, Kappeler, F, Paccaud, JP, Tani, K y Hauri, HP **2002**. *Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export*. J Cell Sci 115: 619-28.
- O'Conner, SE y Imperiali, B **1998**. *A molecular basis for glycosylation-induced conformational switching*. Chem Biol 5(8): 427-37.
- Ogden, CA, deCathelineau, A, Hoffmann, PR, Bratton, D, Ghebrehiwet, B, Fadok, VA y Henson, PM **2001**. *C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. J Exp Med 194(6): 781-95.
- Oliver, JD, Roderick, HL, Llewellyn, DH y High, S **1999**. *ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin*. Mol Biol Cell 10(8): 2573-82.
- Oliver, JD, van der Wal, FJ, Bulleid, NJ y High, S **1997**. *Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins*. Science 275(5296): 86-8.

- Opperdoes, FR **1987**. *Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes*. Annu Rev Microbiol 41: 127-51.
- Otteken, A y Moss, B **1996**. *Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin*. Journal of Biological Chemistry 271: 97-103.
- Ou, WJ, Bergeron, JJ, Li, Y, Kang, CY y Thomas, DY **1995**. *Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca²⁺*. J Biol Chem 270(30): 18051-9.
- Packchanian, A **1953**. *Chemotherapy of experimental Chagas' disease with thirty antibiotics*. Am J Trop Med Hyg 2(2): 243-53.
- Padilla, A, Noiva, R, Lee, N, Mohan, KV, Nakhasi, HL y Debrabant, A **2003**. *An atypical protein disulfide isomerase from the protozoan parasite Leishmania containing a single thioredoxin-like domain*. J Biol Chem 278(3): 1872-8.
- Pahl, HL y Baeuerle, PA **1995**. *A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B*. EMBO J 14(11): 2580-8.
- Pamer, E y Cresswell, P **1998**. *Mechanisms of MHC class I-restricted antigen precessing*. Annu Rev Immunol 16: 323-58.
- Parker, CG, Fessler, LI, Nelson, RE y Fessler, JH **1995**. *Drosophila UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins*. EMBO J 14(7): 1294-303.
- Parlati, F, Dignard, D, Bergeron, JJ y Thomas, DY **1995a**. *The calnexin homologue cnx1+ in Schizosaccharomyces pombe, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain*. EMBO J 14(13): 3064-72.
- Parlati, F, Dominguez, M, Bergeron, JJ y Thomas, DY **1995b**. *Saccharomyces cerevisiae CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus*. J Biol Chem 270(1): 244-53.
- Parodi, AJ **2000**. *Protein glycosylation and its role in protein folding*. Annu Rev Biochem 69: 69-93.
- Parodi, AJ y Cazzulo, JJ **1982**. *Protein glycosylation in Trypanosoma cruzi. II. Partial characterization of protein-bound oligosaccharides labeled "in vivo"*. J Biol Chem 257(13): 7641-5.
- Parodi, AJ, Labriola, C y Cazzulo, JJ **1995**. *The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain*. Mol Biochem Parasitol 69(2): 247-55.
- Parodi, AJ, Lederkremer, GZ y Mendelzon, DH **1983**. *Protein glycosylation in Trypanosoma cruzi. The mechanism of glycosylation and structure of protein-bound oligosaccharides*. J Biol Chem 258(9): 5589-95.
- Parodi, AJ y Leloir, LF **1979**. *The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell*. Biochim Biophys Acta 559(1): 1-37.

- Parodi, AJ, Mendelzon, DH, Lederkremer, GZ y Martin-Barrientos, J **1984**. *Evidence that transient glucosylation of protein-linked Man9GlcNAc2, Man8GlcNAc2, and Man7GlcNAc2 occurs in rat liver and Phaseolus vulgaris cells*. J Biol Chem 259(10): 6351-7.
- Parodi, AJ, Quesada Allue, LA y Cazzulo, JJ **1981**. *Pathway of protein glycosylation in the trypanosomatid Crithidia fasciculata*. Proc Natl Acad Sci U S A 78(10): 6201-5.
- Parodi, AJ y Quesada-Allue, LA **1982**. *Protein glycosylation in Trypanosoma cruzi. I. Characterization of dolichol-bound monosaccharides and oligosaccharides synthesized "in vivo"*. J Biol Chem 257(13): 7637-40.
- Parodi, AJ, Staneloni, RJ, Cantarella, AI, Leloir, LF y Behrens, NH **1973**. Carbohydr Res 26: 393-400.
- Parsons, M **2004**. *Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose*. Mol Microbiol 53(3): 717-24.
- Patil, AR, Thomas, CJ y Surolia, A **2000**. *Kinetics and the mechanism of interaction of the endoplasmic reticulum chaperone, calreticulin, with monoglucosylated (Glc1Man9GlcNAc2) substrate*. J Biol Chem 275(32): 24348-56.
- Paulson, JC **1989**. *Glycoproteins: what are the sugar chains for?* Trends Biochem Sci 14(7): 272-6.
- Perez, M y Hirschberg, CB **1987**. *Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Methods Enzymol 138: 709-15.
- Peterson, JR, Ora, A, Van, PN y Helenius, A **1995**. *Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins*. Mol Biol Cell 6(9): 1173-84.
- Pieren, M, Galli, C, Denzel, A y Molinari, M **2005**. *The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins*. Journal of Biological Chemistry 280: 28265-71.
- Pike, SE, Yao, L, Jones, KD, Cherney, B, Appella, E, Sakaguchi, K, Nakhasi, H, Teruya-Feldstein, J, Wirth, P, Gupta, G y Tosato, G **1998**. *Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth*. J Exp Med 188(12): 2349-56.
- Pinton, P y Rizzuto, R **2006**. *Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum*. Cell Death Differ 13(8): 1409-18.
- Pipe, SW, Morris, JA, Shah, J y Kaufman, RJ **1998**. *Differential interaction of coagulation factor VII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin*. Journal of Biological Chemistry 273: 8537-44.
- Piras, MM, Henriquez, D y Piras, R **1985**. *The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction Trypanosoma cruzi-fibroblasts*. Mol Biochem Parasitol 14(2): 151-63.
- Piras, MM, Henriquez, D y Piras, R **1987**. *The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the in vitro penetration of Trypanosoma cruzi trypomastigotes into fibroblastic cells*. Mol Biochem Parasitol 22(2-3): 135-43.
- Pitta, AM, Rose, JK y Machamer, CE **1989**. *A single-amino-acid substitution eliminates the stringent carbohydrate requirement for intracellular transport of a viral glycoprotein*. J Virol 63(9): 3801-9.
- Plempner, RK y Wolf, DH **1999**. *Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease*. Trends Biochem Sci 24(7): 266-70.

- Porto-Carreiro, IA, M.; Miranda, K; De Souza, W.; Cuhna-e-Silva, N. **2000**. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the citostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur J Cell Biol* 79: 858-69.
- Prata, A **2001**. *Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease*. *Lancet Infect Dis* 1(2): 92-100.
- Previato, JO, Andrade, AF, Pessolani, MC y Mendonca-Previato, L **1985**. *Incorporation of sialic acid into Trypanosoma cruzi macromolecules. A proposal for a new metabolic route*. *Mol Biochem Parasitol* 16(1): 85-96.
- Quesada-Allue, LA y Parodi, AJ **1983**. *Novel mannose carrier in the trypanosomatid Crithidia fasciculata behaving as a short alpha-saturated polyprenyl phosphate*. *Biochem J* 212(1): 123-8.
- Ramirez, MI, Ruiz, R, Araya, JE, da Silveira, JF y Yoshida, N **1993**. *Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host-cell invasion*. *Infect Immun* 61: 3636-41.
- Rauch, F, Prud'homme, J, Arabian, A, Dedhar, S y St-Arnaud, R **2000**. *Heart, brain, and body wall defects in mice lacking calreticulin*. *Exp Cell Res* 256(1): 105-11.
- Ray, MK, Yang, J, Sundaram, S y Stanley, P **1991**. *A novel glycosylation phenotype expressed by Lec23, a Chinese hamster ovary mutant deficient in alpha-glucosidase I*. *J Biol Chem* 266(34): 22818-25.
- Reitman, ML, Trowbridge, IS y Kornfeld, S **1982**. *A lectin-resistant mouse lymphoma cell line is deficient in glucosidase II, a glycoprotein-processing enzyme*. *J Biol Chem* 257(17): 10357-63.
- Ritter, C y Helenius, A **2000**. *Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase*. *Nat Struct Biol* 7(4): 278-80.
- Rizvi, SM, Mancino, L, Thammavongsa, V, Cantley, RL y Raghavan, M **2004**. *A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region*. *Mol Cell* 15(6): 913-23.
- Rodan, AR, Simons, JF, Trombetta, ES y Helenius, A **1996**. *N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin*. *EMBO J* 15(24): 6921-30.
- Rodighiero, C, Tsai, B, Rapoport, TA y Lencer, WI **2002**. *Role of ubiquitination in retro-translocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation*. *EMBO Rep* 3(12): 1222-7.
- Rodriguez, A, Rioult, MG, Ora, A y Andrews, NW **1995**. *A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells*. *J Cell Biol* 129(5): 1263-73.
- Rodriguez, A, Samoff, E, Rioult, MG, Chung, A y Andrews, NW **1996**. *Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport*. *J Cell Biol* 134(2): 349-62.
- Rodriguez, A, Webster, P, Ortego, J y Andrews, NW **1997**. *Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells*. *J Cell Biol* 137(1): 93-104.
- Rojiani, MV, Finlay, BB, Gray, V y Dedhar, S **1991**. *In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits*. *Biochemistry* 30(41): 9859-66.

- Ronnett, GV, Knutson, VP, Kohanski, RA, Simpson, TL y Lane, MD **1984**. *Role of glycosylation in the processing of newly translated insulin proreceptor in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem 259(7): 4566-75.
- Roth, J **2002**. *Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions*. Chem Rev 102(2): 285-303.
- Rothman, JE y Lodish, HF **1977**. *Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein*. Nature 269(5631): 775-80.
- Ruddock, LW y Molinari, M **2006**. *N-glycan processing in ER quality control*. Journal of Cell Science 119(21): 4373-80.
- Russell, SJ, Ruddock, LW, Salo, KE, Oliver, JD, Roebuck, QP, Llewellyn, DH, Roderick, HL, Koivunen, P, Myllyharju, J y High, S **2004**. *The primary substrate binding site in the b' domain of ERp57 is adapted for endoplasmic reticulum lectin association*. J Biol Chem 279(18): 18861-9.
- Saito, Y, Ihara, Y, Leach, MR, Cohen-Doyle, MF y Williams, DB **1999**. *Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins*. EMBO J 18(23): 6718-29.
- Sambrook, J y Russell, DW **2001**. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, JF **1990**. *The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum*. Cell 61(2): 197-9.
- Samuelson, J, Banerjee, S, Magnelli, P, Cui, J, Kelleher, DJ, Gilmore, R y Robbins, PW **2005**. *The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases*. Proc Natl Acad Sci U S A 102(5): 1548-53.
- Sanger, F, Nicklen, S y Coulson, AR **1977**. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Schenk, B, Fernandez, F y Waechter, CJ **2001**. *The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum*. Glycobiology 11(5): 61R-70R.
- Schenkman, S, Jiang, MS, Hart, GW y Nussenzweig, V **1991**. *A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells*. Cell 65(7): 1117-25.
- Schenkman, S, Yoshida, N y Cardoso de Almeida, ML **1988**. *Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 29(2-3): 141-51.
- Schmid, FX **2001**. *Prolyl isomerases*. Adv Protein Chem 59: 243-82.
- Schmidt, A y Krauth-Siegel, RL **2002**. *Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development*. Curr Top Med Chem 2(11): 1239-59.
- Schneider, A y Marechal-Drouard, L **2000**. *Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms?* Trends Cell Biol 10(12): 509-13.
- Schrag, JD, Bergeron, JJ, Li, Y, Borisova, S, Hahn, M, Thomas, DY y Cygler, M **2001**. *The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding*. Mol Cell 8(3): 633-44.

- Schrag, JD, Procopio, DO, Cygler, M, Thomas, DY y Bergeron, JJ **2003**. *Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway*. Trends Biochem Sci 28(1): 49-57.
- Schroder, M y Kaufman, RJ **2005**. *ER stress and the unfolded protein response*. Mutat Res 569(1-2): 29-63.
- Schulke, N y Schmid, FX **1988**. *Effect of glycosylation on the mechanism of renaturation of invertase from yeast*. J Biol Chem 263(18): 8832-7.
- Schweizer, A, Fransen, JA, Bachi, T, Ginsel, L y Hauri, HP **1988**. *Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-KDa protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus*. J Cell Biol 107: 1643-53.
- Sefton, BM **1977**. *Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane proteins*. Cell 10(4): 659-68.
- Semenkovich, CF, Luo, CC, Nakanishi, MK, Chen, SH, Smith, LC y Chan, L **1990**. *In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site asparagine 43 is important for both enzyme activity and secretion*. J Biol Chem 265(10): 5429-33.
- Sevier, CS y Kaiser, CA **2002**. *Formation and transfer of disulphide bonds in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol 3(11): 836-47.
- Shaffer, KL, Sharma, A, Snapp, EL y Hegde, RS **2005**. *Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function*. Dev Cell 9(4): 545-54.
- Shailubhai, K, Pukazhenti, BS, Saxena, ES, Varma, GM y Vijay, IK **1991**. *Glucosidase I, a transmembrane endoplasmic reticular glycoprotein with a luminal catalytic domain*. J Biol Chem 266(25): 16587-93.
- Shamu, CE, Story, CM, Rapoport, TA y Ploegh, HL **1999**. *The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate*. J Cell Biol 147(1): 45-58.
- Shan, SO y Walter, P **2005**. *Molecular crosstalk between the nucleotide specificity determinant of the SRP GTPase and the SRP receptor*. Biochemistry 44(16): 6214-22.
- Shang, J, Korner, C, Freeze, H y Lehrman, MA **2002**. *Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts*. Glycobiology 12(5): 307-17.
- Shank, LC y Paschal, BM **2005**. *Nuclear transport of steroid hormone receptors*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 15(1): 49-73.
- Silvennoinen, L, Myllyharju, J, Ruoppolo, M, Orru, S, Caterino, M, Kivirikko, KI y Koivunen, P **2004**. *Identification and characterization of structural domains of human ERp57: association with calreticulin requires several domains*. J Biol Chem 279(14): 13607-15.
- Simons, JF, Ebersold, M y Helenius, A **1998**. *Cell wall 1,6-beta-glucan synthesis in Saccharomyces cerevisiae depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p*. EMBO J 17(2): 396-405.
- Singh, NK, Atreya, CD y Nakhasi, HL **1994**. *Identification of calreticulin as a rubella virus RNA binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A 91(26): 12770-4.

- Slieker, LJ, Martensen, TM y Lane, MD **1986**. *Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem 261(32): 15233-41.
- Soares, MJ, Souto-Padron, T y De Souza, W **1992**. *Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon Trypanosoma cruzi*. J Cell Sci 102 (Pt 1): 157-67.
- Sorger, PK y Pelham, HR **1987**. *The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90*. J Mol Biol 194(2): 341-4.
- Sosa Estani, S, Segura, EL, Ruiz, AM, Velazquez, E, Porcel, BM y Yampotis, C **1998**. *Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease*. Am J Trop Med Hyg 59(4): 526-9.
- Sousa, M y Parodi, AJ **1995**. *The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase*. EMBO J 14(17): 4196-203.
- Sousa, MC, Ferrero-Garcia, MA y Parodi, AJ **1992**. *Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase*. Biochemistry 31(1): 97-105.
- Souto-Padron, T, de Souza, W y Heuser, JE **1984**. *Quick-freeze, deep-etch rotary replication of Trypanosoma cruzi and Herpetomonas megaseliae*. J Cell Sci 69: 167-78.
- Souto-Padron, T, Labriola, CA y de Souza, W **2004**. *Immunocytochemical localisation of calreticulin in Trypanosoma cruzi*. Histochem Cell Biol 122(6): 563-9.
- Spiro, RG **2002**. *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology 12(4): 43R-56R.
- Spiro, RG, Zhu, Q, Bhoyroo, V y Soling, HD **1996**. *Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi*. J Biol Chem 271(19): 11588-94.
- Stoka, V, Nycander, M, Lenarcic, B, Labriola, C, Cazzulo, JJ, Bjork, I y Turk, V **1995**. *Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, Trypanosoma cruzi, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily*. FEBS Lett 370(1-2): 101-4.
- Stronge, VS, Saito, Y, Ihara, Y y Williams, DB **2001**. *Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates*. J Biol Chem 276(43): 39779-87.
- Stuart, KD, Schnauffer, A, Ernst, NL y Panigrahi, AK **2005**. *Complex management: RNA editing in trypanosomes*. Trends Biochem Sci 30(2): 97-105.
- Su, K, Stoller, T, Rocco, J, Zemsky, J y Green, R **1993**. *Pre-Golgi degradation of yeast prepro-alpha-factor expressed in a mammalian cell. Influence of cell type-specific oligosaccharide processing on intracellular fate*. J Biol Chem 268(19): 14301-9.
- Suh, K, Bergmann, JE y Gabel, CA **1989**. *Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins*. J Cell Biol 108(3): 811-9.
- Suzuki, T, Park, H y Lennarz, WJ **2002**. *Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions*. Faseb J 16(7): 635-41.

- Tardieux, I, Webster, P, Ravesloot, J, Boron, W, Lunn, JA, Heuser, JE y Andrews, NW **1992**. *Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells*. Cell 71(7): 1117-30.
- Tarleton, RL **2001**. *Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease*. Int J Parasitol 31(5-6): 550-4.
- Taylor, JE y Rudenko, G **2006**. *Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe?* Trends Genet 22(11): 614-20.
- Teixeira, MM y Yoshida, N **1986**. *Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies*. Mol Biochem Parasitol 18(3): 271-82.
- Tessier, DC, Dignard, D, Zapun, A, Radomska-Pandya, A, Parodi, AJ, Bergeron, JJ y Thomas, DY **2000**. *Cloning and characterization of mammalian UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase and the development of a specific substrate for this enzyme*. Glycobiology 10(4): 403-12.
- Thomson, SP y Williams, DB **2005**. *Delineation of the lectin site of the molecular chaperone calreticulin*. Cell Stress Chaperones 10(3): 242-51.
- Tibbetts, RS, Kim, IY, Olson, CL, Barthel, LM, Sullivan, MA, Winquist, AG, Miller, SD y Engman, DM **1994**. *Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 62(6): 2499-507.
- Timchenko, LT, Iakova, P, Welm, AL, Cai, ZJ y Timchenko, NA **2002**. *Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins*. Mol Cell Biol 22(20): 7242-57.
- Tomita, Y, Yamashita, T, Sato, H y Taira, H **1999**. *Kinetics of interactions of sendai virus envelope glycoproteins, F and HN, with endoplasmic reticulum-resident molecular chaperones, BiP, calnexin, and calreticulin*. J Biochem (Tokyo) 126(6): 1090-100.
- Totani, K, Ihara, Y, Matsuo, I, Koshino, H y Ito, Y **2005**. *Synthetic substrates for an endoplasmic reticulum protein-folding sensor, UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase*. Angew Chem Int Ed Engl 44(48): 7950-4.
- Travers, KJ, Patil, CK, Wodicka, L, Lockhart, DJ, Weissman, JS y Walter, P **2000**. *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation*. Cell 101(3): 249-58.
- Trombetta, ES **2003**. *The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis*. Glycobiology 13(9): 77R-91R.
- Trombetta, ES, Fleming, KG y Helenius, A **2001**. *Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II*. Biochemistry 40(35): 10717-22.
- Trombetta, ES y Helenius, A **1998**. *Lectins as chaperones in glycoprotein folding*. Curr Opin Struct Biol 8(5): 587-92.
- Trombetta, ES y Helenius, A **1999**. *Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum*. EMBO J 18(12): 3282-92.
- Trombetta, ES y Helenius, A **2000**. *Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol 148(6): 1123-29.

- Trombetta, ES, Simons, JF y Helenius, A **1996**. *Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit*. J Biol Chem 271(44): 27509-16.
- Trombetta, SE, Bosch, M y Parodi, AJ **1989**. *Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes*. Biochemistry 28(20): 8108-16.
- Trombetta, SE, Ganan, SA y Parodi, AJ **1991**. *The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum*. Glycobiology 1(2): 155-61.
- Trombetta, SE y Parodi, AJ **1992**. *Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase*. J Biol Chem 267(13): 9236-40.
- Tsai, B, Ye, Y y Rapoport, TA **2002**. *Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol*. Nat Rev Mol Cell Biol 3(4): 246-55.
- Tu, BP y Weissman, JS **2004**. *Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences*. J Cell Biol 164(3): 341-6.
- Turco, SJ, Stetson, B y Robbins, PW **1977**. *Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 74(10): 4411-4.
- Ullu, E, Matthews, KR y Tschudi, C **1993**. *Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts*. Mol Cell Biol 13(1): 720-5.
- Urbina, JA y Docampo, R **2003**. *Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances*. Trends Parasitol 19(11): 495-501.
- van der Wal, FJ, Kikkert, M y Wiertz, E **2002**. *The HCMV gene products US2 and US11 target MHC class I molecules for degradation in the cytosol*. Curr Top Microbiol Immunol 269: 37-55.
- van Hellemond, JJ, Opperdoes, FR y Tielens, AG **2005**. *The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in Trypanosoma brucei*. Biochem Soc Trans 33(Pt 5): 967-71.
- van Leeuwen, JE y Kears, KP **1996**. *Deglucosylation on N-linked glycans is an important step in the dissociation of calreticulin-class I-TAP complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 13997-14001.
- Van Leeuwen, JEM y Kears, KP **1996**. *The related molecular chaperones calnexin and calreticulin differentially associate with nascent T cell antigen receptor proteins within the endoplasmic reticulum*. Journal of Biological Chemistry 271: 25345-9.
- Vandersall-Nairn, A, Merkle, RK, O'Brien, K, Oeltmann, TN, Moremen, KW **1998**. *Cloning, expression, purification, and characterization of the acid α -mannosidase from Trypanosoma cruzi*. Glycobiology 8(12): 1183-94.
- Varki, A **1993**. *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology 3(2): 97-130.
- Vassilakos, A, Michalak, M, Lehrman, MA y Williams, DB **1998**. *Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin*. Biochemistry 37(10): 3480-90.
- Vickerman, K **1976**. *The diversity of the kinetoplastid flagellates*. *En: Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, WHR y Envans, DA. New York, Academic Press. 1: 1-34.

- Villalta, F y Kierszenbaum, F **1984**. *Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: role of cell surface galactose residues*. Biochem Biophys Res Commun 119(1): 228-35.
- Villalta, F, Ruiz-Ruano, A, Valentine, AA y Lima, MF **1993**. *Purification of a 74-kilodalton surface glycoprotein from heart myoblasts that inhibits binding and entry of Trypanosoma cruzi into heart cells*. Mol Biochem Parasitol 61(2): 217-30.
- Wada, I, Imai, S, Kai, M, Sakane, F y Kanoh, H **1995**. *Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms*. Journal of Biological Chemistry 270: 20298-304.
- Wada, I, Rindress, D, Cameron, PH, Ou, WJ, Doherty, JJ, 2nd, Louvard, D, Bell, AW, Dignard, D, Thomas, DY y Bergeron, JJ **1991**. *SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem 266(29): 19599-610.
- Wang, C, Eufemi, M, Turano, C y Giartosio, A **1996**. *Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins*. Biochemistry 35(23): 7299-307.
- Ware, FE, Vassilakos, A, Peterson, PA, Jackson, MR, Lehrman, MA y Williams, DB **1995**. *The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins*. J Biol Chem 270(9): 4697-704.
- Waser, M, Mesaeli, N, Spencer, C y Michalak, M **1997**. *Regulation of calreticulin gene expression by calcium*. J Cell Biol 138(3): 547-57.
- Weerapana, E y Imperiali, B **2006**. *Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems*. Glycobiology 16(6): 91R-101R.
- Weng, S y Spiro, RG **1993**. *Demonstration that a kifunensine-resistant alpha-mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells*. J Biol Chem 268(34): 25656-63.
- Wheeler, DG, Horsford, J, Michalak, M, White, JH y Hendy, GN **1995**. *Calreticulin inhibits vitamin D3 signal transduction*. Nucleic Acids Res 23(16): 3268-74.
- White, TK, Zhu, Q y Tanzer, ML **1995**. *Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading*. J Biol Chem 270(27): 15926-9.
- WHO **2002**. *Control of Chagas disease*. World Health Organ Tech Rep Ser 905: 1-109.
- Wildt, S y Gerngross, TU **2005**. *The humanization of N-glycosylation pathways in yeast*. Nat Rev Microbiol 3(2): 119-28.
- Williams, DB **1995**. *The Merck Frosst Award Lecture 1994/La conference Merck Frosst 1994. Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate*. Biochem Cell Biol 73(3-4): 123-32.
- Williams, DB **2006**. *Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum*. J Cell Sci 119(Pt 4): 615-23.
- Xiao, G, Chung, TF, Pyun, HY, Fine, RE y Johnson, RJ **1999**. *KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells*. Brain Res Mol Brain Res 72(2): 121-8.
- Yan, Q y Lennarz, WJ **1999**. *Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum*. Biochem Biophys Res Commun 266(3): 684-9.

Yan, Q y Lennarz, WJ **2002**. *Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process.* J Biol Chem 277(49): 47692-700.

Yocupicio-Monroy, RM, Medina, F, Reyes-del Valle, J y del Angel, RM **2003**. *Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3' untranslated region RNA.* J Virol 77(5): 3067-76.

Yoshida, N, Blanco, SA, Araguth, MF, Russo, M y Gonzalez, J **1990**. *The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi.* Mol Biochem Parasitol 39(1): 39-46.

Yoshida, Y, Chiba, T, Tokunaga, F, Kawasaki, H, Iwai, K, Suzuki, T, Ito, Y, Matsuoka, K, Yoshida, M, Tanaka, K y Tai, T **2002**. *E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains.* Nature 418(6896): 438-42.

Zamze, SE, Ashford, DA, Wooten, EW, Rademacher, TW y Dwek, RA **1991**. *Structural characterization of the asparagine-linked oligosaccharides from Trypanosoma brucei type II and type III variant surface glycoproteins.* J Biol Chem 266(30): 20244-61.

Zhang, JX, Braakman, I, Matlack, KE y Helenius, A **1997**. *Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations.* Mol Biol Cell 8(10): 1943-54.

Zhu, Q, Zelinka, P, White, T y Tanzer, ML **1997**. *Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex.* Biochem Biophys Res Commun 232(2): 354-8.

Zingales, B, Katzin, AM, Arruda, MV y Colli, W **1985**. *Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from Trypanosoma cruzi with parasite interiorization into mammalian cells.* Mol Biochem Parasitol 16(1): 21-34.

Zuber, C, Spiro, MJ, Guhl, B, Spiro, RG y Roth, J **2000**. *Golgi apparatus immunolocalization of endomannosidase suggests post-endoplasmic reticulum glucose trimming: implications for quality control.* Mol Biol Cell 11(12): 4227-40.