

Tesis Doctoral

Caracterización bioquímica y funcional de las dos UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*

Buzzi, Lucila Inés

2013

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

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

Cita tipo APA:

Buzzi, Lucila Inés. (2013). Caracterización bioquímica y funcional de las dos UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Buzzi, Lucila Inés. "Caracterización bioquímica y funcional de las dos UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Caracterización bioquímica y funcional de las dos UDP-
Glc: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el
genoma de *C. elegans*”

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

Lic. Lucila Inés Buzzi

Directora de Tesis: Dra. Olga Castro

Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

Laboratorio de Glicobiología, Fundación Instituto Leloir - Instituto de Investigaciones
Bioquímicas de Buenos Aires, CONICET

Buenos Aires, 2013.

Caracterización bioquímica y funcional de las dos UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT) es el sensor de la conformación de las glicoproteínas en el “Control de Calidad de Plegamiento de Glicoproteínas” ya que sólo presenta actividad sobre glicoproteínas que no se encuentran en su conformación nativa. Las glicoproteínas que presentan oligosacáridos monoglucosilados interactúan con lectinas-chaperonas presentes en el Retículo endoplásmico (RE) como Calnexina y Calreticulina lo cual previene que los intermediarios de plegamiento inmaduros continúen su camino hacia el Aparato de Golgi. En *C. elegans* existen dos genes, *uggt-1* y *uggt-2*, homólogos a los que codifican para las UGGT en diferentes organismos. La expresión de las proteínas UGGT-1 y UGGT-2 en *S. pombe alg6 gpt1-*, que carece de actividad de UGGT, permitió demostrar que *uggt-1* codifica para una UGGT activa (CeUGGT-1), mientras que la proteína codificada por *uggt-2* carece de actividad de UGGT (CeUGGT-2). Mediante la construcción de proteínas quiméricas, se determinó que el dominio C-terminal de CeUGGT-2 es incapaz de transferir glucosa a proteínas mal plegadas. El estudio del gusano mutante de *uggt-2* (VC1961) reveló que CeUGGT-2 es esencial para la viabilidad del nematodo ya que los gusanos *uggt-2* *-/-* se arrestan en estadios embrionarios y en L1 mostrando un tamaño menor y posibles defectos en la cutícula. Mediante Real Time PCR observamos que ambos genes se expresan durante todo el ciclo de vida de *C. elegans*. Mediante la construcción de gusanos transgénicos pudimos detectar expresión de CeUGGT-1 en todas las células y tejidos del nematodo. *uggt-1* se induce en condiciones de estrés de RE a través de la vía de señalización de *ire-1* en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), mientras que *uggt-2* no lo hace. El silenciamiento de la expresión de la proteína UGGT-1 y UGGT-2 por ensayos de RNAi produjeron un retraso en el desarrollo en gusanos *uggt-1*(RNAi) y *uggt-2*(RNAi) y resultaron en una disminución de la sobrevivencia de gusanos *uggt-1*(RNAi). CeUGGT-1 y CeUGGT-2 juegan un rol protector ante condiciones de estrés de RE ya que con 10 µg/ml de Tunicamicina (TN) se arrestó el crecimiento de gusanos *uggt-1*(RNAi) y *uggt-2*(RNAi) en L2/L3 pero no el de gusanos control. Además ensayos de RNAi a bajas concentraciones de TN en ausencia de *ire-1*, sugirieron que CeUGGT-2 es importante para aliviar los bajos niveles de estrés de RE en ausencia de esta vía de la UPR. Estos resultados indicarían que ambos homólogos de UGGT de *C. elegans* poseerían distintas funciones biológicas.

Palabras clave: Glucosiltransferasa, Retículo Endoplásmico, N-glicosilación, Plegamiento de glicoproteínas, UGGT, Control de Calidad, *Caenorhabditis elegans*, desarrollo.

Biochemical and functional characterization of the two UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase codified in *C. elegans* genome

The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) is the sensor of glycoprotein conformations in the glycoprotein folding quality control as it exclusively glucosylates glycoproteins not displaying their native conformations. Monoglucosylated glycoproteins thus formed may interact with the lectin-chaperones calnexin and calreticulin. This interaction prevents premature exit of folding intermediates to the Golgi. Bioinformatic analysis showed that in *C. elegans* there are two genes, *uggt-1* and *uggt-2*, coding for UGGT homologues. Expression of both genes in *S. pombe* mutants devoid of UGGT activity showed that *uggt-1* codes for an active UGGT protein (CeUGGT-1). On the other hand, *uggt-2* coded for a protein (CeUGGT-2) apparently not displaying a canonical UGGT activity and conversely to what happens in humans, the C-terminal domain of CeUGGT-2 is inactive. However, *uggt-2* is not a pseudogene as we can detect its expression along the entire development. The study of the mutant worm VC1961 revealed that CeUGGT-2 is essential for viability. Worms *uggt-2* *-/-* were arrested in embryonic and L1 stages and they showed smaller size and possible defects in the cuticle. Furthermore, Real-time PCR analysis showed that both *uggt-1* and *uggt-2* genes are expressed during the entire *C. elegans* life cycle. Moreover, transgenic worms constructed by fosmid recombineering technique carrying the *gfp* under the control of *uggt-1* promoter indicated that that CeUGGT-1 is expressed in all cells and tissues of the nematode. *uggt-1*, but not *uggt-2*, is upregulated under ER stress through the *ire-1* arm of the unfolded protein response (UPR). RNAi-mediated depletion of CeUGGT-1 but not of CeUGGT-2 resulted in a reduced lifespan and that of CeUGGT-1 and CeUGGT-2 in a developmental delay. We found that both CeUGGT1 and CeUGGT2 play a protective role under ER stress conditions, since 10 µg/ml tunicamycin (TN) arrested development at the L2/L3 stage of both *uggt-1(RNAi)* and *uggt-2(RNAi)* but not of control worms. Furthermore, we found that the role of CeUGGT-2 but not CeUGGT-1 is significant in relieving low ER stress levels simulated with TN in the absence of the *ire-1* unfolding protein response signaling pathway. Our results indicate that both *C. elegans* UGGT homologues may have distinct biological functions.

Key words: Glucosyltransferase, Endoplasmic reticulum, *N*-glycosylation, Glycoprotein Folding, UGGT, Quality Control, *Caenorhabditis elegans*, development.

A mi madre y mi padre...

A Eduardo...

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado a lo largo de la elaboración de esta tesis. A todos los que han hecho posible que haya llegado a la instancia final de este trabajo.

Agradezco a mi directora de Tesis, la Dra. Olga Castro por haber confiado en mí como estudiante y permitirme llevar a cabo mi trabajo científico para poder actualmente tener mi tesis doctoral realizada. Por haberme permitido formarme como científica y que hoy me sienta preparada para seguir adelante en mi camino.

Agradezco a mi co-director y Jefe de laboratorio, Dr. Armando Parodi, por permitirme formar parte de su laboratorio y darme todas las herramientas necesarias para que pueda llevar adelante mi trabajo. Gracias por haber confiado en mí, por formarme y por haber contribuído a que haya podido llegar al fin de mi doctorado. Gracias por haberme escuchado cuando lo necesité, por haber pensado siempre como seguir adelante con el proyecto. Gracias por su comprensión, generosidad, calidez, inteligencia y sabiduría que me han acompañado a lo largo de todos estos años y me han dado una imagen de un ejemplo a seguir.

Agradezco a mi compañero de laboratorio, Iván Stigliano, por haber estado junto a mí durante todo este tiempo. Nos formamos, crecimos juntos, y compartimos tantas historias felices y tristes. Gracias por haberme ayudado con los experimentos, por haberme explicado tantas cosas, por haberme dado una mano cuando la necesitaba, por haberme ayudado a escribir las cartas para los cursos cuando no sabía que frase usar. Gracias por pasar altas horas en el laboratorio y ser una excelente compañía, por esas músicas que ponías y nos hacías escuchar una y otra vez y por haberme alegrado mis días de trabajo.

A Carlos Labriola, por haberme acompañado durante todo el transcurso de esta tesis. Desde que entré al laboratorio en el año 2007 a realizar mi tesis de licenciatura hasta el día de hoy, siempre Carlos alegró el laboratorio con su sonrisa, con sus chistes, sus comentarios y charlas. Gracias por tu comprensión, por tu ayuda y por haberme escuchado siempre. Por esos debates interminables en los almuerzos que siempre te dejan pensando en un tema nuevo y te cambian la perspectiva. Gracias por haberme ayudado con mi trabajo, haberme aconsejado con el proyecto, haberme enseñado a usar radioactivo cuando no sabía como hacer el Northern Blot, por haberme enseñado a hacer los Western, por haberme explicado hace tanto tiempo como digerir con una enzima de restricción. Gracias por haberme dado una mano leyendo esta tesis y por ser un compañero excepcional.

A Cecilia D'Alessio por haber compartido todos estos años juntas y por haberme escuchado y comprendido. Por estar presente en los momentos difíciles y darme una mano cuando lo necesitaba, esos momentos en los que se puede parar el trabajo y compartir un momento de calidez. Gracias por haber analizado junto a mí el experimento de complementación y haber hecho una lectura crítica de dicho experimento en esta tesis.

A Marcela Arango, mi compañera Colombiana, por haber tomado el valor de ser la primera en trabajar con *C. elegans* y haber puesto el trabajo con gusanos en funcionamiento. Gracias por haberme transmitido todo lo aprendido con gran esfuerzo y haberme allanado el camino para que me sea más fácil el comienzo. Gracias por esa alegría que te caracteriza y por levantar con sonrisas el ánimo del laboratorio cada día. Por haberme mostrado tu fuerza,

empuje y determinación y contagiarme un poquito de todo ello. Gracias por haber compartido en tan poco tiempo tantas cosas.

A Solana Alculumbre, quien en su paso por el laboratorio dejó una huella profunda en todos nosotros. Gracias por haber formado parte de nuestras vidas y nuestro trabajo con tanta felicidad, perspicacia, inteligencia, diversión y por haber comprendido en tan poco tiempo el funcionamiento de esos engranajes que eramos los del lab lo que permitió que todos nos sintamos tan cómodos y a gusto en tu presencia.

A Ramiro Orsi y Micaela Garcia, por alegrar actualmente el laboratorio y compartir conmigo sus vidas, por abrirse y permitirme conocerlos y ayudarnos mutuamente. Por su generosidad, su comprensión, su ayuda y por hacer cada día más divertido.

A Diego Rayes, a quien conocí en el curso de *C.elegans* en Mendoza y luego encontré nuevamente en el CSHL donde conocí a un gran amigo. Muchas gracias por haber confiado en mí, por haberme apoyado con mi trabajo, por haberme brindado ideas, por instruirme, aconsejarme, guiarme y por haberme ayudado a salir adelante. En cuanto al trabajo específico en esta tesis, agradezco a Diego por su interés constante en este proyecto, por aportar nuevas ideas y principalmente por haber realizado las microinyecciones de los gusanos con los fósmidos y por intentar mil veces de realizar la complementación. Gracias por acompañarme a inyectar gusanos en el curso del CSHL hasta las 2 am cuando ya las energías estaban agotadas y convertir ese momento tedioso en un rato agradable. Gracias por recomendarme alternativas y cursos que contribuyeron para que tenga más formación y pudiese seguir adelante con mi proyecto. Gracias por haber contribuído con sus importantes comentarios y sugerencias a la corrección de esta tesis. Por tantas charlas, comprensión y amistad.

A Sergio Simonetta, por haberse involucrado en este proyecto y haber planteado sus ideas y su conocimiento y habernos acercado a la publicación del paper. Por haberme ayudado con ideas o dandome una mano para que pueda seguir adelante. Por haberme ayudado a formarme. Por ser una parte tan importante del engranaje que condujo a mi formación como doctora. Por confiar en mí y apoyarme.

A Javier Bianchi, por ser mi amigo de tantos años, compañero de facultad, del Instituto Leloir y ahora por formar parte del pequeño grupo de gusanólogos argentinos. Gracias por ser una persona tan buena, tan comprensiva, tan compañera y estar siempre en los buenos y malos momentos. Por ayudarme laboralmente y personalmente siempre.

Al Colo, Darío Bichara, por haberse unido a este grupo de gusanólogos y traer todo su entusiasmo, su alegría y por hacer cada día más divertido. Por su actitud positiva y su ayuda en el trabajo y en la vida.

A Julio Caramelo, Rodrigo Pagano, Maximo Lopez Medus, Lucas Landolfo, Gabriela Elena Gomez y Ana Villamil por estar presentes cuando necesitaba ayuda, por escucharme y por compartir tantas cosas formando parte del laboratorio.

A Brad Palanski, Brandon y Oñeka por su breve paso por el laboratorio y por haber compartido el día a día tratando de entender a este grupo de argentinos.

A Micaela Sartoretti por haber compartido tantos años juntas, desde el principio de la facultad hasta el fin de mi doctorado. Por haber recorrido todo este camino conmigo y

haberme acompañado siempre, por ser tan buena persona y por su gran amistad. A Daniela Di Bella, Yanina Petraca, Guillermo Lanuza y Abel Carcagno por haber compartido los días en el Instituto, por haberme dado una mano cuando lo necesité, haberme escuchado y apoyado en todo.

A Vanina Alzogaray, Giselle Gherzi, Nacho Fernandez, Ines Serer, Marielita, Gaby Sycz, Gastón Paris, El Gato, Sebastián Klinke y El Ruso por compartir cada día en el Instituto, por su buena onda y su ayuda siempre que lo necesité. Gracias por prestarme reactivos cuando me hacían falta, por explicarme como usar un equipo cuando no sabía y por compartir siempre unos mates y unas galletitas! Gracias a Sebastián por leer la parte de bioinformática.

A Mariela Trincherero por haber compartido momentos juntas en el Instituto, por transmitir esa alegría y pasión que pone por las cosas. A Diego Alvarez por haber compartido el curso de microscopía Confocal y haberme hecho divertirse tanto.

A Mariela Loschi, Vicky Slomiansky, Malena Pascual, Marcelo Perez Pepe, Luciana Luchelli y Soledad Vazquez por haber compartido tantos almuerzos, charlas y por habernos siempre ayudado mutuamente cuando se necesitaba algún reactivo, algún equipo o algún consejo.

A Agostina Bertolin, Joel Perez Perry, Julieta Acevedo, Maxi Katz por haberme ayudado con los experimentos de RNA y Real Time, haberme ayudado a sortear problemas técnicos, por haberme explicado la puesta a punto de primers, el uso del equipo y el análisis de los datos. Gracias por su buena onda cada vez que iba a pedirles el equipo y por organizarse de la mejor manera para que siempre hubiese un turno más disponible.

A Guillermo Bernabo, por haber compartido días de escritura en los cuales me concentré muchísimo y por hacer esos momentos agradables. Por acompañarme, por estar presente y por compartir tanto en tan poco tiempo. A Martín Klappenbach por haberme ayudado con el papelerío para la entrega de la tesis, por estar presente, por escucharme, por ser una excelente persona y acompañarme cuando lo necesité. A Mercedes Bengochea, por ayudar también con los papeles, por su comprensión y por escucharme.

A Silvina Marcora, por haberme acompañado en todo este largo camino desde la tesis de licenciatura hasta hoy. Por haber compartido tantas cosas, desde la facultad, cursos de postgrado, la vida en el Leloir, por tantas charlas y tantos recuerdos. Gracias por estar dispuesta a dar una mano siempre, por escucharme y comprenderme.

A Gusti y Zek, por haber compartido tantos días en el Instituto después de haber transcurrido un largo camino de facultad juntos. Por tantos años de conocernos, escucharnos y compartir tantas cosas. A Mario Rico, por haber compartido tantos almuerzos y haberme hecho reír tanto.

A Mati Rugnone y Sabri Sanchez por todos los viajes en auto hacia el Instituto que se me han hecho super divertidos, por su buena onda y por escucharme.

A Picu, Rodrigo, Diana y Alfonso, por haberme escuchado, ayudado siempre que necesité un equipo o un reactivo y estar siempre bien dispuestos para dar una mano.

A Diego Alvarez por estar siempre con una sonrisa cada vez que uno baja al droguero, por su comprensión y su ayuda. A Gladys por su importante labor en este Instituto, su eficacia y

su buena onda para recibirte cada día con una sonrisa. A todo el personal de limpieza y mantenimiento del Leloir quienes permiten que el Instituto funcione a la perfección y solucionan todos los problemas lo más rápido posible. A subsidios, compras, administración, soporte informático, biblioteca por dar todo el soporte necesario para solucionar cualquier problema inmediatamente, buscar papers, realizar una compra inmediatamente, solucionar la compra de algún pasaje, por estar en cada detalle. A despacho de aduana, Cristian y Walter, por solucionar siempre todo de la mejor manera posible y hacer un esfuerzo mayor para traer un paquete más rápido o simplemente dar una mano. A Marta Bravo por el excelente servicio de secuenciación y a Susana Raffo por tener siempre marcador de peso molecular, TAQ y todos los reactivos listos.

A Maxi Neme, el técnico de microscopía del Instituto, por haberme ayudado con las imágenes de confocal, por haberme enseñado a usar los microscopios y por estar siempre dispuesto a ayudar cuando necesité algo. Gracias por haberme enseñado y por haber compartido el curso de microscopía en Córdoba.

A toda la gente del Instituto Leloir por compartir cada día juntos, por construir un lugar de trabajo en el que todos nos ayudamos mutuamente y con la mejor disposición luchamos para que el Instituto crezca.

Al grupo de “gusanólogos” argentinos: Jessica Diogo, María Laura, Niki, Andrés Romanowski, Eugenia Goya, Diego Golombek, Guillermina Hernando e Ignacio Bergé por formar esta red de personas que hacemos lo mismo y estamos siempre conectados para ayudar si alguno necesita algo. Gracias por esa buena onda.

Al curso *C. elegans* del CSHL, que me permitió aprender todas las herramientas necesarias para comprender mejor este modelo, sobrellevar los problemas que teníamos y salir adelante. Gracias a Mei Zhen, Eric Lambie y Eric Miska por escuchar mi proyecto y sugerir ideas para salir adelante y sortear las dificultades. Gracias a Maria Lim, Pauline Cottee, Isabele Beets, Antoine Roux, Diego Rayes y Sarah Baas por ser tan buenos compañeros en ese curso.

Al curso Small Brains Big Ideas, a Yuly Fuentes Medel por haber organizado todo y habernos permitido compartir esos días con investigadores tan importantes. A Jenn Pirri, Allie Muthukumar, Tim Rooney, Diego Rayes y Andrea Calixto por habernos ayudado con los experimentos y habernos enseñado todo lo que saben. A mis compañeros de curso por haber compartido esos días con tanto entusiasmo, alegría y buena onda.

A Magdalena Fasson, mi profe de Francés, por haberme acompañado, enseñado y haber hecho cada clase muy divertida. Por haberme escuchado y acompañado en este tiempo de doctorado. A Estela Maidac por haberme ayudado a transcurrir este camino.

A Luisa Cochella, una científica argentina que trabaja en el laboratorio de Oliver Hobert, y que cuando le escribí para pedirle ayuda sobre unos plásmidos me contestó inmediatamente dandome todas las respuestas posibles, ofreciéndome ayuda con los reactivos y todo lo que fuera necesario. Por sus consejos sin los cuales no habría podido llevar a cabo la Técnica de Recombinación de Fósidos y por su buena disposición.

A Mark Alkema por haber aceptado colaborar en este proyecto y abrirnos la puerta de su laboratorio. Por haberse tomado el tiempo de pensar nuevas ideas y alternativas para seguir adelante cuando el proyecto parecía trabarse. Por estar siempre dispuesto a ayudar en lo

que sea necesario, por escucharme, darme su apoyo y ser tan comprensivo. Gracias por la cálida persona que conocí en el curso Small Brains Big Ideas. A Chris Clark por haber sacado las fotos del gusano en el confocal y haber intentado microinyectar la construcción del fósido *uggt-2* a pesar de los sucesivos fracasos. Por haberme enviado cepas para que llegaran más rápido y su buena disposición para lo que se necesite.

A Claire Benard por su interés y por dedicar su tiempo a revisar las fotos de los gusanos, el proyecto y los resultados y darnos su opinión sobre el mismo. Por sus ganas de ayudar y por demostrar su fuerza e infinitas ganas de salir adelante.

Agradezco al CGC, al National Bioresource Project de Japón y el *C. elegans* gene KO Consortium por llevar a cabo una tarea tan importante como la de mantener todas las cepas de *C. elegans* y realizar mutantes para que esta comunidad pueda avanzar cada día más en el conocimiento.

A CONICET por haberme otorgado la beca para poder realizar mis estudios de doctorado sin la cual no hubiese podido hoy terminar este proyecto.

Al "Institut Pasteur Paris", "Amsud Pasteur" y a la Emabajada de Francia por haberme permitido realizar el curso de Genética Celular y Molecular en el Insituto Pasteur, haberme otorgado una beca y el pasaje a Paris para que pudiera asistir al mismo. Gracias por haberme permitido conocer la ciencia en el exterior y entusiasarme infinitamente para que quiera seguir adelante. A mis amigos de Paris: Camilo Arias Goeta, Elise Shaefer, Vero Noya, Sandra Rojo, Roel Woleterink y Maria Iribarne por compartir conmigo aquellos días de curso, por permitirme formar parte de sus vidas y formar un grupo de amigos tan lindo.

A la UBA, por haberme permitido estudiar, realizar tanto en mi carrera de Licenciatura como mis estudios de doctorado. Por tener la máxima calidad y formar a los estudiantes de la mejor manera posible.

A mis amigos de yoga, Kary, Gaby, Nati, Sofi, Cris, Mauri, Mati, Ana por compartir un importante cambio conmigo, por ser siempre tan amorosos y acompañarme en todas las situaciones con la mejor voluntad y cariño.

A mis amigos del ILSE, Pablo, Nati, Andre, Chulis, Vani, Dami y Cesar por acompañarme hace tanto tiempo y haber sido testigos de mi crecimiento desde los 13 años hasta el día de hoy. Por haber formado parte de mi vida y ser un grupo tan lindo.

A Mechi de Stefano, por todos sus años de amistad, por estar juntas desde los 4 años! Por ser tan espontánea cada vez que nos vemos y por el inmenso cariño que nos tenemos. Gracias por acompañarme a lo largo de este camino.

A Jenny Cerrota por formar parte de tantas historias a lo largo de mi carrera científica, por ser testigo de mis buenos y malos momentos y por ayudarme y estar conmigo compartiendo todos ellos.

A mis amigos de la facu; Mari, Lauri, Diana, Mica, Johi, Car, Mati, Ale, Zek, Gusti, Javi, Fede y Mirko por acompañarme durante todo este tiempo y hasta el día de hoy en este largo camino científico. Por entender a la perfección cada sensación que lleva transitarlo y acompañarme siempre.

A Belen, Rebeca y Juan Carlos por formar parte de mi familia, por estar presentes, interesarse por mí, escucharme y acompañarme. Gracias por ser tan maravillosos.

A mi Abuela, que hoy no está, por haber formado una parte tan importante de mi vida y haber contribuido de una forma tan importante en que yo sea hoy quien soy. A mi Madrina Marta, mi tío Eduardo, mi tío Carlos, mis primos hermanos y sobrinos por estar conmigo, por seguir mi camino ya sea cerca, lejos o por Facebook. Por estar presentes y formar parte de esta familia tan linda que siempre se une y sobrelleva cualquier situación. Por ser parte de mi formación como persona para que hoy pueda haber terminado mi doctorado. A toda la familia Perez, tios y primos segundos por acompañarme siempre. A los Trucco por estar siempre tan cerca. A mis tios y primos Garimaldi que están siempre presentes a pesar de la distancia.

A Marilyn, a mis primos paternos Mati, Cali, Santi y Mono, mis primas y mis sobrinos por haberme acompañado en este tiempo, darme fuerzas para seguir, por escucharme, por estar al lado mío y hacerme sentir la fuerza de la familia.

A mi Papá, que lamentablemente me dejó durante el transcurso de mi tesis, por haber estado siempre presente, por ser incondicional, por haberme dado todo lo que estuvo a su alcance para que yo pueda ser una persona feliz, llena de amor y de gratitud hacia la vida. Por haberme brindado todas las experiencias que pudo, por interesarse en cada uno de mis emprendimientos, de mis ideas. Por intentar entender este proyecto aunque a veces pareciera que le hablara en japonés. Por aconsejarme y acompañarme cuando lo necesitaba. Por haber sido testigo y ponerse tan feliz como yo cuando le dije que “el gen 3.3 tiene actividad!!”. Por haber sido un gran padre y estar vivo en mi corazón.

A mi Mamá, a quien no me alcanzan las palabras para agradecerle tanto. Por haberme visto crecer, desarrollarme como persona y acompañarme en cada uno de los momentos de mi vida. Por haber sido testigo de cada uno de mis logros, de mis fracasos y de mi esfuerzo para salir adelante y sobrellevar cada uno. Gracias por haberme acompañado a lo largo de toda mi carrera científica, desde ayudarme a estudiar una tabla de zoología hasta tratar de entender que es lo que hago hoy con las glicoproteínas. Por compartir mi felicidad y hacerla propia. Por acompañarme en los momentos difíciles. Por convertirme en la persona que soy y por haberme ayudado a llegar hoy hasta acá ya que sin ella no podría haber transitado este camino. Gracias por darme la vida, por enseñarme a vivirla de la mejor manera, por todo tu amor y por ser una madre maravillosa.

A mi compañero de vida, Edu, por haberme apoyado en cada una de mis decisiones, por haberme dado la fuerza para seguir adelante, por entusiasmarse con cada resultado. Por hacer un esfuerzo sobrehumano para entender el proyecto y hoy poder explicarlo! Por poner infinita paciencia para entender que es una PCR. Por todo tu amor, tu compañerismo, por acompañarme en cada momento: los felices y los tristes y darme las fuerzas para seguir. Por compartir su vida conmigo, por alegrarme cada día, por ser un ser humano excepcional a quien amo con toda mi alma.

Indice

Abreviaturas.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
Proteínas de la vía secretoria	18
Translocación de las proteínas secretorias a través de la membrana del RE.....	18
Retención de proteínas en el RE	19
Plegamiento de proteínas en el RE	20
N-glicosilación.....	22
Síntesis del Dol-PP-Oligosacárido.....	23
Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE	24
La Glucosidasa I.....	27
La Glucosidasa II.....	28
La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa	29
UGGT: Chaperona y glucosiltransferasa	29
Estructura de la UGGT	31
Conservación de los dominios	32
Dos clases de UGGTs.....	32
Estudio de la función biológica de la UGGT en diferentes organismos.....	34
Importancia biológica de las chaperonas moleculares.....	35
ERAD.....	36
Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	38
Caenorhabditis elegans.....	41
CICLO DE VIDA DE <i>C. elegans</i>	43
<i>C. elegans</i> y el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas	44
ARN de interferencia y silenciamiento génico	51
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
Cepas, plásmidos y primers.....	62
Cepas.....	62
Plásmidos	63
Primers utilizados	66
Técnicas de <i>C. elegans</i>	67
Medios y condiciones de cultivo.....	67
Antibióticos	68

Conservación.....	68
Preparación de bacterias como fuente de alimento para <i>C. elegans</i>	68
Preparación de placas de NGM con bacterias	68
Transferencia y visualización de <i>C. elegans</i>	69
Descontaminación y sincronización de <i>C. elegans</i>	69
Montaje de los gusanos para observación al microscopio.....	69
Método de “RNAi feeding”	69
Bacterias y levaduras: Medios, condiciones de cultivo y conservación.....	70
Análisis bioinformático.....	70
Preparación de muestras	71
Preparación de microsomas	71
Cuantificación de proteínas totales (Bradford)	73
Ensayos bioquímicos	73
Ensayo de actividad de Glucosiltransferasa <i>in vitro</i> utilizando TG o AG.....	73
Ensayo de actividad de Glucosiltransferasa <i>in vivo</i>	74
Hidrólisis ácida	75
Caracterización del oligosacáridos <i>in vitro</i>	75
Clonados.....	76
Clonado y expresión de <i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i> en células <i>S. pombe gpt1/alg6</i>	76
Agregado de una etiqueta c-Myc	76
Construcción de proteínas quiméricas.....	77
Construcciones reporteras utilizadas para estudiar la expresión de los promotores de <i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i>	78
Construcción de <i>uggt-1::gfp</i> y <i>uggt-2::mCherry</i> mediante la técnica de recombinación de fósmidos	79
Secuenciación	82
Procedimientos con DNA	82
Preparación de DNA genómico de levaduras <i>S. pombe</i>	82
Extracción de DNA plasmídico y de fósmidos.....	83
Reacciones de PCR	83
Worm PCR.....	85
Métodos de RNA y Real Time PCR.....	85
Preparación de RNA de levaduras y RT-PCR.....	85
Preparación de RNA de <i>C. elegans</i>	86

Preparación de cDNA.....	86
Análisis por Real Time PCR.....	87
Análisis de expresión de proteínas	87
Análisis de la expresión de las proteínas expresadas por Western Blot	87
Preparación de células competentes y transformación.....	88
Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	88
Transformación de levaduras <i>S. pombe</i>	88
Microscopía confocal, Nomarski y de fluorescencia.....	89
Ensayos de complementación en <i>S. pombe</i>	89
Ensayos de RNAi y Tunicamicina en <i>C. elegans</i>	89
Actividad de UGGT en gusanos sometidos a RNAi en medio líquido	89
Expresión de <i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i> durante el desarrollo.....	90
RNAi y sobrevivencia.....	90
Expresión de <i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i> con tunicamicina (TN)	90
Ensayo de sensibilidad a TN.....	90
Caracterización de los gusanos VC1961.....	91
RESULTADOS	92
Caracterización bioquímica de las dos putativas UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasas de <i>C. elegans</i>	93
Análisis bioinformático sobre la secuencia de los genes <i>uggt-1</i> (F48E3.3) y <i>uggt-2</i> (F26H9.8)	94
.....	94
Análisis de las secuencias	95
Dominios conservados	98
Actividad bioquímica de UGGT en <i>C. elegans</i>	103
<i>C. elegans</i> posee una UGGT activa	104
Caracterización de la actividad de UGGT de <i>C. elegans</i>	105
El gen <i>uggt-1</i> codifica para una UGGT activa	107
Expresión de UGGT-1 y UGGT-2 en <i>S. pombe</i>	111
Estudio de los dominios de las UGGTs de <i>C. elegans</i>	113
Ensayos de complementación funcional en levaduras.....	115
Estudio de la expresión de los genes <i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i> en <i>C. elegans</i>	118
<i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i> se expresan en distintos niveles durante el desarrollo	119
<i>uggt-1</i> se expresa en sistema nervioso	119
Expresión de UGGT por el sistema de recombinación de fósmidos.....	122

Expresión de <i>uggt-1</i> y <i>uggt-2</i> en condiciones de estrés de RE	130
<i>uggt-1</i> se induce en condiciones de estrés de RE	131
Activación de la UPR.....	133
UGGT-1 y UGGT-2: Rol en la expectativa de vida y desarrollo de <i>C. elegans</i>	135
<i>uggt-2</i> es un gen esencial	136
Los gusanos heterocigotas <i>uggt-2</i> (ok2510)/+ presentan un retraso en el desarrollo	137
Estudio de la cepa VC1961 al microscopio	139
UGGT-1 y UGGT-2 juegan un rol protector ante condiciones de estrés	141
UGGT-2 es relevante para aliviar el estrés de RE en ausencia de la proteína IRE-1 en la vía de la Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	144
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.....	147
CeUGGT-1 es el sensor del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en <i>C. elegans</i> mientras que CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT.	148
CeUGGT-1 posee una expresión ubicua en <i>C.elegans</i> . Tanto CeUGGT-1 como CeUGGT-2 se expresan durante todo el ciclo de vida del nematodo con un pico de expresión en L2/L3	151
CeUGGT-1 y CeUGGT-2 cumplirían distintas funciones biológicas.....	154
Conclusiones	158
REFERENCIAS	160

ABREVIATURAS

AG: Aglutinina
CCPG: Control de Calidad de Plegamiento de Glicoproteínas
cDNA: DNA copia
CeUGGT: UDP-glucosa:glicoproteína glucosiltransferasa de *C. elegans*
CNX: Calnexina
CRT: Calreticulina
CZ: Cruzipaina
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNJ: 1-deoxinokirimicina
Dol-P-P: Dolicol pirofosfato
DTT: 1,4-Dithiothreitol
EDEM: Proteína estimuladora de la degradación asociada al retículo endoplásmico
Endo H: Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
ERAD: Degradación asociada al Retículo Endoplásmico
ERES: ER exit sites (sitio de salida del RE)
ERGIC: Compartimento intermedio entre el RE y el Golgi (ER-Golgi intermediate compartment)
ERSE: ER stress response element- Elemento de respuesta a estrés de RE
Ex: Embriones de ratón de X días
GA: Aparato de Golgi
GI: Glucosidasa I
GII: Glucosidasa II
Gal: Galactosa
GalNac: N-acetilgalactosamina
GFP: Proteína verde Fluorescente
Glc: Glucosa
GlcNAc: N-acetilglucosamina
GXMY: Oligosacárido de composición $\text{Glc}_x\text{Man}_y\text{GlcNAc}_2$
HRP: Peroxidasa de rabanita
HSP: Heat Shock Protein
IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KO: Knock Out o disrupción génica
L1: Larva 1
L2/L3: Larva 2 o 3
L4: Larva 4
M6PR: Receptor de manosa 6 fosfato
M9: Oligosacárido de composición $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$
Man: Manosa
Man6P: Manosa 6 fosfato
MHC: Complejo mayor de Histocompatibilidad
MRH: Dominio homólogo al dominio lectina del M6PR
mRNA: RNA mensajero
NLS: Señal de localización nuclear

O.N.: Incubación durante toda la noche
OST: Oligosacariltransferasa
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDI: Proteína Disulfuro Isomerasa
PPI: Peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa
PNGasa F: Peptido-N(4)-(N-acetil-beta-D-glucosaminil)asparagina amidasa F
pNPG: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pri-siRNA: RNA de silenciamiento primario
RdRP: RNA polimerasa dependiente de RNA
RE: Retículo endoplásmico
RNA: Ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
RNAds: RNA doble cadena
SBA: Aglutinina de granos de soja
SRP: Partícula de reconocimiento de la señal de transporte a RE
SRPR: Receptor de SRP
TCA: Tricloroacético
TG: Tiroglobulina
TN: Tunicamicina
tRNA: RNA de transferencia
siRNA: RNA de silenciamiento
UGGT: UDP-glucosa:glicoproteína glucosiltransferasa
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas
UPRE: elemento de unión a UPR en el DNA (UPR element)
WT: Wild type (salvaje)

INTRODUCCIÓN

Un tercio de las proteínas sintetizadas en las células eucariontes son translocadas co-traduccionalmente al retículo endoplásmico (RE) donde son subsecuentemente modificadas ⁽¹⁾. En el lumen del RE se encuentra presente la maquinaria de proteínas que forman parte del Mecanismo de Control de Calidad del Plegamiento de las Glicoproteínas. Las glicoproteínas son necesarias para la viabilidad celular y desarrollan importantes funciones en la célula participando en procesos como la respuesta inmune, la cascada de coagulación, cascadas de señalización y diversas funciones celulares. Dada su importancia, el correcto funcionamiento de este mecanismo de control es fundamental para mantener la homeostasis celular. En esta tesis se estudiará el Control de Calidad de Plegamiento de Glicoproteínas utilizando como modelo el nematodo *C. elegans*.

Proteínas de la vía secretoria

Aquellas proteínas cuyo destino final es el espacio extracelular, la membrana plasmática, el Aparato de Golgi (GA) o los lisosomas, son denominadas proteínas secretorias y son translocadas co-traduccionalmente al RE para su correcto plegamiento. Estas proteínas presentan un péptido señal que las dirige al RE y una vez en el lumen del mismo la maquinaria de plegamiento compuesta por distintas enzimas y chaperonas, las asisten para que adquieran la estructura tridimensional funcional y puedan alcanzar su destino final en los diferentes compartimentos subcelulares o en el exterior celular.

Translocación de las proteínas secretorias a través de la membrana del RE

La síntesis de las proteínas secretorias comienza en ribosomas libres en el citosol hasta que se sintetiza en el extremo amino terminal de los polipéptidos nacientes una secuencia señal hidrofóbica de 16 a 30 residuos que forma el sitio de unión para la Partícula de Reconocimiento de la Señal (SRP) ⁽²⁾. La SRP es una ribonucleoproteína que se une transitoriamente a la secuencia señal de la proteína naciente, a la subunidad mayor del ribosoma y al Receptor de SRP (SRPR) dirigiendo entonces el ribosoma hacia la membrana del RE (Fig. 1). Una vez que el complejo SRP-ribosoma se encuentra unido al SRPR en la membrana del RE, se inicia la transferencia de la cadena polipeptídica naciente a través de un complejo proteico denominado translocón. En ese momento la partícula SRP se disocia del ribosoma y es liberada al citosol quedando disponible para interactuar nuevamente con el péptido señal.

El translocón es un conjunto de proteínas que forman un canal a través de la membrana del RE. La unión del ribosoma con el complejo polipeptídico naciente produce el

cambio conformacional que forma el poro acuoso del translocón ⁽³⁾. La fuerza que dirige la translocación proviene tanto de la elongación misma de la cadena polipeptídica como de la hidrólisis de GTP durante la traducción ⁽⁴⁾. La proteína ingresa a través del canal en un estado desplegado y el plegamiento no comienza hasta que la misma llega al interior del compartimento subcelular. En el caso de las proteínas solubles, se elimina el péptido señal mediante la “Peptidasa de la señal” asociada a la cara luminal del complejo del translocón y la proteína es liberada finalmente en el interior del RE (Fig.1).

Las proteínas de membrana poseen señales específicas que dirigen su inserción en la membrana y la orientación de los diferentes segmentos, determinando de esta manera la topología final que adquirirá la proteína.

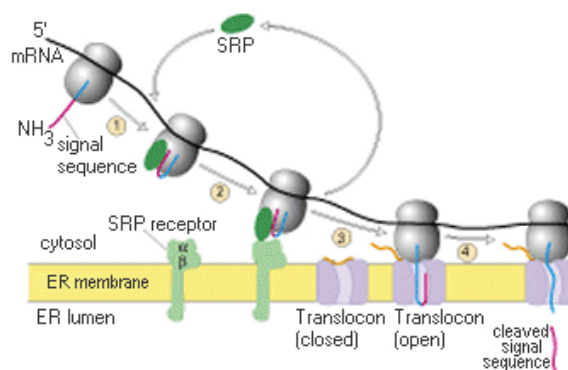


Fig. 1- Unión del ribosoma al RE. La partícula SRP se une a la secuencia señal en el extremo amino terminal del polipéptido nascente que luego es conducido al receptor de SRP en la membrana del RE. La unión del complejo SRP-SRPR modifica la conformación del translocón formando un poro y permitiendo de esta manera que el polipéptido ingrese al lumen del RE. Figura tomada de la Referencia 5.

Retención de proteínas en el RE

Si bien la mayoría de las proteínas que son incorporadas al RE, continúan su camino a través del GA y de la vía secretoria, las proteínas denominadas residentes de RE llevan a cabo su función en dicho compartimento (chaperonas, peptidasa de la señal, la proteína disulfuro isomerasa, etc.). La recuperación de las proteínas solubles residentes de RE se realiza mediante una secuencia C-terminal específica, XDEL, que es reconocida por el receptor de XDEL. Este receptor es una proteína de siete pasos transmembrana, que continuamente cicla entre el RE y el ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment), un compartimento intermedio entre el RE y el GA ⁽⁶⁾. Este receptor de XDEL interacciona en su extremo luminal con la proteína soluble que posee la señal XDEL y en su extremo citosólico con un complejo proteico formado por diferentes proteínas adaptadoras y la proteína COPI que reviste a las vesículas de transporte ⁽⁷⁾ y las dirige nuevamente al RE ⁽⁸⁾ donde las

vesículas se fusionan liberando las proteínas solubles al lumen del mismo. La unión de las proteínas al receptor XDEL se regula por diferencias de pH del lumen entre el GA y el RE ⁽⁹⁾.

Plegamiento de proteínas en el RE

El lumen del RE es el sitio donde los polipéptidos se pliegan, oligomerizan y sufren modificaciones post traduccionales tales como *N*-glicosilación, isomerización de prolinas, formación de puentes disulfuro, etc ⁽¹⁰⁾. Existen condiciones específicas en el RE que lo hacen propicio para el plegamiento de proteínas como el ambiente oxidante que favorece la formación de enlaces disulfuro ⁽¹¹⁾.

Como se explicó anteriormente, las proteínas que ingresan al RE se encuentran desplegadas por lo que exponen parches hidrofóbicos y cisteínas reactivas desapareadas por lo cual tienden a agregarse fácilmente y/o formar enlaces disulfuro no nativos. Por lo tanto, la maquinaria de chaperonas moleculares presentes en el RE desempaña un rol crucial en el correcto plegamiento y ensamblado de las proteínas.

La interacción de las distintas chaperonas con las proteínas presentes en el RE depende tanto de los componentes estructurales que presentan los intermediarios de plegamiento como de la afinidad de la unión de la chaperona por la proteína mal plegada. En el lumen del RE se encuentra presente un gran número de chaperonas moleculares, por lo tanto existe cierta competencia entre las mismas por el polipéptido naciente. Aquella chaperona que posea una afinidad mayor es la que se une al polipéptido, impidiendo de esta forma que otras chaperonas de menor afinidad interactúen con el mismo.

En la primera fase del plegamiento, intervienen chaperonas moleculares como BiP/Grp78 (familia de Hsp70) (Fig. 2). Las proteínas que ingresan al RE a través del translocón, interaccionan primero con BiP ⁽¹²⁾ ya que la misma es atraída al dominio J de la proteína Sec63 que forma parte del translocón. El dominio J es un dominio conservado de las familias de ATPasas que median cambios conformacionales en las proteínas ⁽¹³⁾. BiP podría actuar tirando del polipéptido hacia el lumen del RE o bien impidiendo movimientos reversos del polipéptido hacia el citosol ⁽¹⁴⁾. Además, BiP interacciona con polipéptidos altamente desplegados ya que se une a segmentos hidrofóbicos formados por 7 u 8 aminoácidos en aquellos polipéptidos que aún no se han plegado correctamente; mantiene la estructura desplegada de los mismos impidiendo de esta manera su interacción con otras moléculas y evitando su agregación.

Los pasos posteriores en el plegamiento de las proteínas hasta que alcanzan su estructura tridimensional funcional pueden ser variados. Algunas proteínas se pliegan sin asistencia de otras chaperonas ^(15,16) mientras que otras interactúan con GRP94 ⁽¹⁷⁾ o Calreticulina/ Calnexina (CRT/CNX) ^(18, 19) (Fig. 2). Si bien, la mayoría de las proteínas se asocia primero con BiP y luego interactúa con CRT/CNX, en algunos casos, las proteínas se asocian directamente con estas últimas y no con BiP ⁽²⁰⁾.

GRP94 es una proteína de estrés de RE representante de la familia de HSP90 ⁽²¹⁾ que se une a intermediarios de plegamiento avanzados o a proteínas incorrectamente ensambladas, por reconocer moléculas totalmente oxidadas. Por estas características, su interacción es posterior a la de BiP ⁽¹⁷⁾.

Las proteínas N-glicosiladas co-traduccionalmente, como se explicará más adelante, pueden asociarse a CNX o CRT, lectinas-chaperonas no convencionales que reconocen oligosacáridos monoglucosilados de estructura G1M9 (Fig.2). CNX es una proteína de membrana de tipo I y CRT es su homólogo soluble. Ambas proteínas contienen un único dominio globular de unión a carbohidratos y un dominio rico en prolina, llamado dominio P al cual se unen proteínas como ERp57 ⁽²²⁾. La asociación de las chaperonas-lectinas a las glicoproteínas que aún no han alcanzado su estructura nativa facilita la actividad de enzimas del plegamiento como las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs), que catalizan reacciones como la formación de puentes disulfuro intra o intercatenarias; o las Peptidil-prolil-cis-trans-isomerasas (PPIs) que producen la peptidil-prolil-*cis-trans* isomerización. Las PDIs, entre las que se encuentran ERp57, ERp72 y PDI, catalizan la ruptura de puentes disulfuro incorrectos y la re-formación de aquellos puentes disulfuro que estabilizan la estructura tridimensional funcional. Las PPIs como FKBP51 y FKBP52, son chaperonas pequeñas que catalizan la isomerización correcta de los enlaces amida que involucran residuos de prolina. La configuración *cis* de las uniones peptídicas en el caso de los residuos de prolina conduce a un giro en la cadena polipeptídica que puede ser el adecuado en el caso de ciertas estructuras, pero que puede obstaculizar el plegamiento de proteínas en otros casos.

Mediante este conjunto de procesos se evita la agregación, se mantiene a las proteínas nacientes en un estado competente de plegamiento y se facilita las fases de maduración oxidativa del polipéptido. De esta forma las proteínas pueden comenzar a plegarse y ensamblarse en los complejos multiméricos incluso antes de que se complete su síntesis ⁽¹⁰⁾ (Fig. 2). Las chaperonas funcionan *in vivo* no como catalizadores de estructura secundaria y terciaria sino para reconocer y estabilizar los intermediarios de plegamiento. Sin

embargo, las reglas que gobiernan la selección de las diferentes chaperonas que participan en el plegamiento y la maduración de cada proteína en particular aún deben esclarecerse.

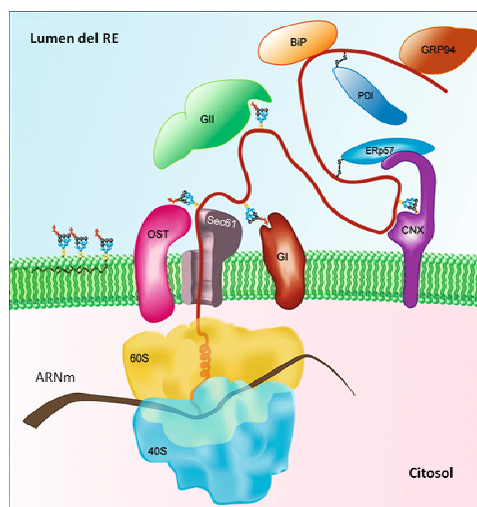


Figura 2. Translocación co-traduccional de proteínas al lumen del RE y maduración. Las cadenas nascentes son co-traduccionalmente transportadas al lumen del RE a través del complejo Sec61 del translocón. Las proteínas nascentes se asocian con distintas chaperonas moleculares y enzimas del plegamiento residentes del RE (ERp57, PDI, GRP94, BiP; CNX y CRT) y son sustrato de diversas enzimas modificadoras (Oligosaciltransferasa (OST); G1 y G2: glucosidasas I y II respectivamente). Los residuos de Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr son modificados por la OST con la adición covalente de un oligosacárido pre ensamblado sobre un lípido, dolicol pirofosfato (Dolicol-P-P) (*N*-glicosilación). Figura modificada de cita 10.

N-glicosilación

La *N*-glicosilación es un proceso esencial para la viabilidad celular y constituye una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes ^(23,24). Esta modificación se encuentra altamente conservada en Eubacteria, Archaea y Eukarya ⁽²⁵⁾. La adición de oligosacáridos cumple un papel fundamental en diversas actividades biológicas tales como el destino intracelular de proteínas, la motilidad celular, el reconocimiento célula-célula, la adhesión celular, la transducción de señales y la respuesta inmune ^(26, 27). Los glicanos presentes en las glicoproteínas, poseen un gran número de grupos hidroxilo que les confieren un carácter altamente hidrofílico modificando las propiedades fisicoquímicas de las proteínas tales como su conformación, su resistencia a la digestión por proteasas, su estabilidad y su solubilidad ⁽²⁸⁾. Como se explicó anteriormente, el agregado de azúcares puede ser beneficioso durante la maduración de las glicoproteínas, ya que permite la interacción con proteínas-lectinas

como CNX y CRT, facilitando su plegamiento y su transporte a lo largo de la vía secretoria ⁽²⁶⁾.

La *N*-glicosilación es un proceso por el cual se transfiere a las proteínas un glicano de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3M9) a los residuos de Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Prolina) de péptidos nacientes en el lumen del RE (Fig.3). Además de esta secuencia consenso, se necesitan ciertos requerimientos estructurales como la exposición de el residuo Asn. Por ello, los potenciales sitios de glicosilación pueden encontrarse glicosilados, parcialmente glicosilados o no glicosilados. Cuando el residuo de Asn se encuentra a una distancia de 10-12 aminoácidos de la membrana interna del RE, la oligosacariltransferasa (OST) lleva a cabo la transferencia del glicano completo G3M9, previamente formado, desde el dador lipídico dolicol pirofosfato-G3M9 (Dol-P-P-G3M9) ^(3,29) (Fig.3).

Síntesis del Dol-PP-Oligosacárido

La síntesis del Dol-PP-oligosacárido es un proceso complejo (Fig. 3). Se inicia en la cara citoplasmática del RE mediante el agregado secuencial de dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (cuadrados azules Fig. 3) y cinco residuos de Man (círculos verdes Fig. 3) sobre el Dolicol-P por glicosiltransferasas específicas (codificadas por genes *alg*), a partir de los nucleótidos azúcares UDP-GlcNAc y GDP-Man ^(30,31). El intermediario de la síntesis Dol-P-P-Man₅GlcNAc₂ es translocado por una flipasa hacia la cara interna del RE ⁽³²⁾ y la síntesis se completa con el agregado de cuatro residuos de Man y tres residuos de Glc a partir de Dol-P-Man y Dol-P-Glc ⁽³³⁾. El sustrato completo Dol-PP-oligosacárido queda en el lumen del RE donde se encuentra el sitio activo de la OST. El agregado de los distintos residuos de Man o Glc es secuencial y las glicosiltransferasas específicas reconocen una estructura en la que participa el residuo transferido en el paso anterior. Por lo tanto, si la célula carece de alguna enzima que participa en este proceso el residuo posterior no es transferido al oligosacárido, formándose entonces un glicano truncado que es transferido con dicha estructura al polipéptido naciente. Por ejemplo, las levaduras *S. pombe alg6*-transfieren un glicano de composición Man₉GlcNAc₂ (M9).

Tanto el Dol-P-Man como el Dol-P-Glc son sintetizados en la cara citoplasmática del RE mediante la transferencia de residuos de Man o Glc al Dol-P a partir de los nucleótidos azúcares correspondientes (GDP-Man y UDP-Glc) a partir de glicosiltransferasas específicas codificadas los genes *dpm1* y *alg5* respectivamente (Fig. 3).

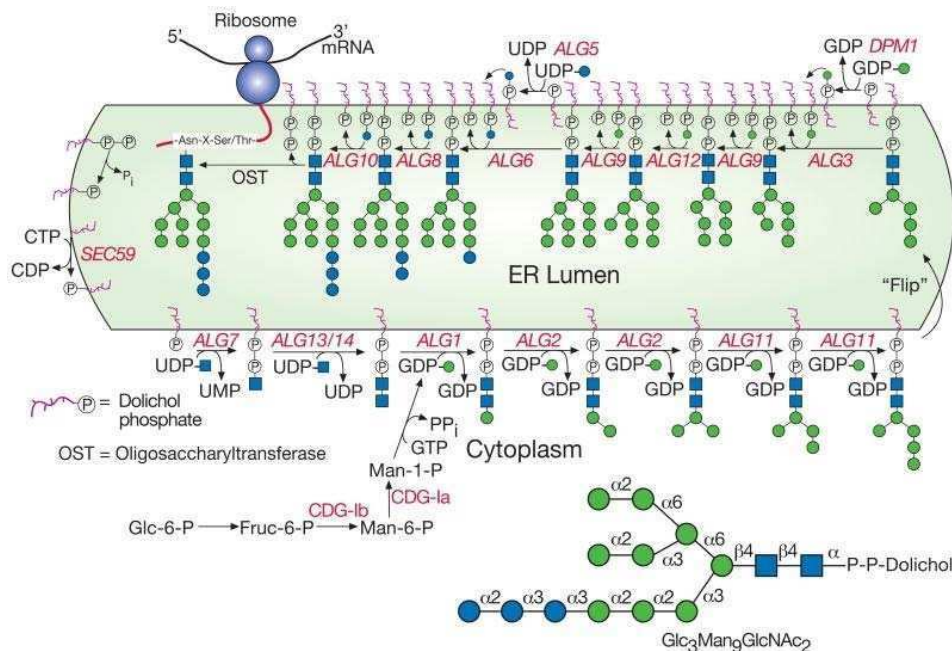


Fig. 3- Formación del glicano de estructura G3M9. El glicano comienza a formarse en la cara citoplasmática del RE, hasta tener una estructura Man5GlcNac2, luego es transferido a la cara interna del RE donde se continúa el agregado de Man y Glc hasta que se genera la estructura del glicano completo Glc3Man9GlcNac2 (G3M9).

La composición del oligosacárido transferido (G3M9) durante la *N*-glicosilación se encuentra conservada en eucariotas y es la misma en animales, hongos y plantas. Inmediatamente después de la transferencia del glicano al polipéptido naciente comienza su procesamiento por parte de glucosidasas y manosidasas del RE y luego puede continuar su procesamiento en el GA. El procesamiento de *N*-glicanos en el GA involucra la acción de numerosas glicosiltransferasas que resultan en la generación de glicanos altamente complejos y diversos ⁽³⁴⁾.

Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE

El plegado de proteínas en una célula viva es un proceso complejo, con alta probabilidad de seguir caminos equivocados. Errores en el plegamiento o procesos de agregación producidos durante el mismo pueden llevar a que las proteínas queden irreparablemente mal plegadas. Existen numerosas enfermedades asociadas a problemas en el plegamiento de las glicoproteínas conocidas como enfermedades conformacionales. Este conjunto de enfermedades se puede dividir en dos grandes grupos: el primero se

caracteriza por la acumulación de proteínas mal plegadas y su posterior degradación en el proteasoma, como ejemplo de este tipo de enfermedades podemos mencionar a la fibrosis quística y a ciertos tipos de enfisema. El segundo grupo, en cambio, está compuesto por enfermedades caracterizadas por la acumulación de proteínas mal plegadas que forman placas insolubles en diversos órganos; en este grupo podemos mencionar a las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y la diabetes tipo II ^(35,36).

En el RE existen mecanismos destinados a asegurar que las glicoproteínas recientemente sintetizadas alcancen su estructura espacial funcional. En los mismos participan numerosas chaperonas y enzimas que asisten al plegamiento de otras proteínas.

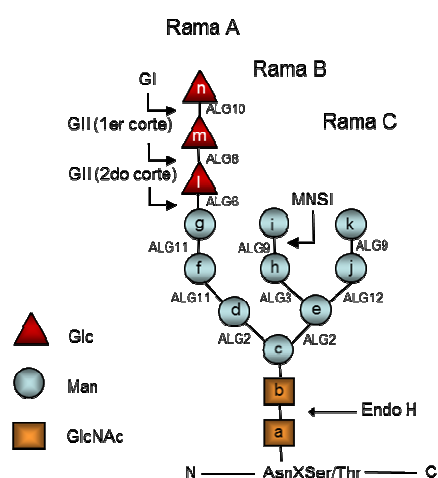


Fig. 4- Estructura del oligosacárido transferido a las proteínas durante la N-glicosilación (Glc3Man9GlcNAc2). Las letras (a, b, c,...) siguen el orden de adición de monosacáridos durante la biosíntesis del derivado dolicol-PP y se indican los genes alg involucrados en dichos pasos. La Glucosidasa I (GI) remueve el residuo n y la Glucosidasa II (GII) los residuos m y l. La UGGT adiciona nuevamente el residuo l. EndoH: sitio de corte de la Endo H. La rama A comprende los residuos d, f, g y l-n. La rama B comprende los residuos h e i. La rama C comprende los residuos j y k.

El mecanismo de control de calidad de glicoproteínas comienza con el procesamiento del glicano G3M9 transferido a proteínas. La Glucosidasa I (GI) remueve el residuo de glucosa (Glc) más externo (residuo n en la Fig. 4) formándose $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G2M9) y posteriormente la Glucosidasa II (GII) remueve los dos residuos de Glc restantes (Glc m y l en la Fig. 4), formándose sucesivamente $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1M9) y $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9) ⁽²⁵⁾. Si la glicoproteína ha adquirido su conformación nativa continúa su camino a través de la vía secretoria. Sin embargo, si aún no ha adquirido su estructura tridimensional funcional, es re-glicosilada por la UDP-glucosa::glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT) que funciona como el sensor del estado conformacional de las glicoproteínas ya que sólo reconoce aquellas proteínas que no se encuentran en su conformación nativa (Fig. 5).

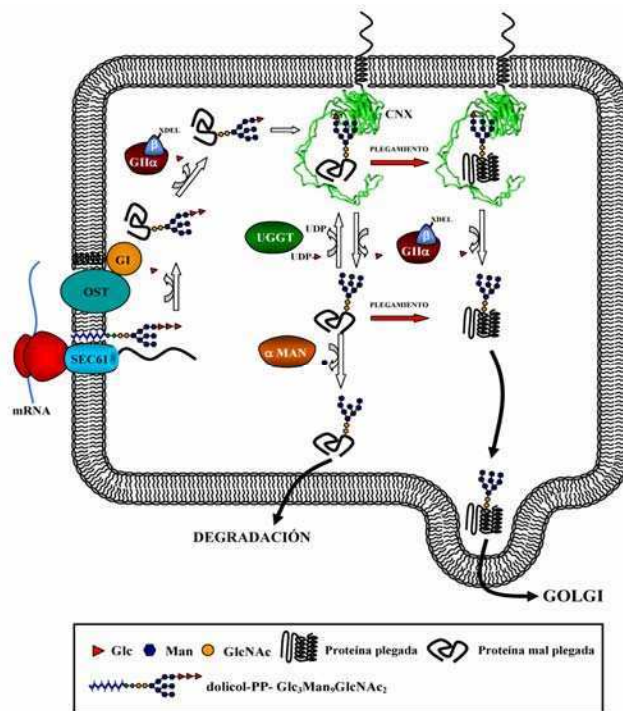


Fig. 5- Control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE. Las proteínas que ingresan al RE son *N*-glicosiladas por la OST al emerger del translocón Sec61. Dos Glucosas (Glc) son removidas por la acción secuencial de G1 y GII para generar especies monoglucosiladas que son reconocidas por CNX y/o CRT (sólo se muestra CNX). El complejo formado por CNX y las glicoproteínas en proceso de plegamiento o mal plegadas es disociado cuando el residuo de Glc mas interno es removido por GII. Si la proteína continúa mal plegada la UGGT agrega un residuo de Glc permitiéndole interactuar nuevamente con CNX/CRT. Una vez que las glicoproteínas han alcanzado su conformación nativa, GII remueve el residuo de Glc remanente y libera a la glicoproteína del anclaje a la lectina. Estas especies, correctamente plegadas, ya no son reconocidas por UGGT y son transportadas al GA. Las glicoproteínas incapaces de plegarse correctamente son demanosiladas por la ER- α -manosidasa I (ERManI) y retrotranslocadas al citosol donde son degradadas por los proteasomas. Figura tomada de la referencia 37.

La adición del residuo de Glc (residuo *I* en fig. 4) por la UGGT permite la interacción del oligosacárido monoglucosilado con las lectinas/chaperonas del RE, CNX y CRT. De esta forma CNX y CRT retienen a las glicoproteínas en el RE hasta que adquieran su estructura nativa (Fig. 5). La remoción de la Glc mas interna (residuo *I*, Fig. 5) dada por GII libera a las glicoproteínas de la unión a CNX y/o CRT⁽³⁴⁾ (Fig. 5). Las estructuras monoglucosiladas durante el plegamiento pueden formarse tanto por deglucosilación parcial dado por la acción de G1 y GII o por la re-glucosilación producida por UGGT sobre oligosacáridos deglucosilados. Las actividades opuestas de UGGT y GII permiten la re-asociación y disociación de las glicoproteínas con CNX y CRT dando lugar al llamado “ciclo de CNX/CRT” (Fig.5). Dicho proceso tiene lugar hasta que las glicoproteínas adquieren su estructura espacial funcional, por lo que se convierten en sustrato de GII pero ya no de

UGGT debido a que esta última reconoce determinantes en las glicoproteínas sustrato que no se encuentran expuestos en la estructura nativa. Las glicoproteínas que han adquirido su estructura tridimensional funcional continúan su camino hacia el GA (Fig. 5).

Si el plegamiento resulta defectuoso, la prolongada permanencia en el RE de los *N*-glicanos permite que las α 1,2-manosidasas de RE (ERManI y EDEM 1, 2 y 3, en mamíferos, o MnsIp y Htm1p en levaduras) remuevan los residuos terminales de Man. La progresiva demanosilación del glicano facilitaría la interrupción del ciclo CNX/CRT y conduciría a las glicoproteínas irreversiblemente mal plegadas a ser retrotranslocadas al citosol donde son degradadas en los proteasomas. Este proceso es conocido como “degradación asociada al RE” (ERAD) ^(26, 38). En caso de que la respuesta de ERAD no sea suficiente para mantener la homeostasis del RE se desencadena la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) que se explicará más adelante ⁽³⁹⁾.

Para una mejor comprensión de estos procesos, se describen a continuación las características de las proteínas que participan en el control de calidad de plegamiento.

La Glucosidasa I

La GI es una proteína de membrana de tipo II, miembro de la familia de las glicosil hidrolasas 63. Es una α 1,2-exoglucosidasa, que se encuentra asociada al complejo del translocón muy cercana a la OST (Fig. 2). La OST transfiere el *N*-glicano a la cadena polipeptídica nascente cuando el oligosacárido se halla a 72 residuos del sitio P del ribosoma, la misma distancia requerida para que posteriormente la GI remueva la Glc más externa (Glc *n* en Fig. 4) ⁽³⁾. Debido a la rapidez de la reacción, se sugiere que los sitios activos de OST y GI se encuentran en gran proximidad uno del otro ⁽¹⁰⁾. La remoción de la glucosa por GI previene la subsecuente interacción del oligosacárido con la OST.

La estructura generada por GI (G2M9) no ha sido muy estudiada, tomándose sólo como un intermediario transitorio del procesamiento que rápidamente era procesado por la GII. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado una proteína de membrana tipo I llamada Malectina, residente de RE y altamente conservada entre especies, como una putativa lectina de oligosacáridos diglucosilados de alto contenido en Man ⁽⁴⁰⁾. La identificación de Malectina sugiere una posible función para el intermediario de procesamiento del glicano generado por GI (G2M9) en la biogénesis de glicoproteínas, pero la misma no ha sido definida aún ⁽²⁵⁾.

En *C. elegans* la GI está codificada por el gen F13H10.4 y aún no ha sido estudiada su función. Los gusanos mutantes para GI (F13H10.4(ok2135)IV/nT1[qIs51] (IV;V).) son

mantenidos en heterocigosis ya que en homocigosis presentan un fenotipo estéril y vulva anormal. Experimentos de RNAi contra la GI en *C. elegans* han dado como resultado distintos fenotipos como un retraso en el crecimiento, un color pálido en los nematodos, modificaciones en la locomoción ⁽⁴¹⁾ y formación de agregados proteicos ⁽⁴²⁾. Esto se explicará con mayor detalle más adelante.

La Glucosidasa II

La GII es una glicosil hidrolasa soluble del RE responsable de la remoción de las dos Glc más internas presentes en los *N*-glicanos transferidos a las proteínas durante su biogénesis (residuos *l* y *m* de la Fig. 4). Además es responsable de la remoción de la Glc agregada por la UGGT sobre las proteínas que aún no han alcanzado su conformación nativa (Fig. 4 y 5).

La GII es un heterodímero compuesto por las subunidades GII α (subunidad catalítica de 107 kDa) y GII β (subunidad regulatoria de 58 kDa) unidas de forma no covalente ^(43,44). La naturaleza heterodimérica de la GII fue demostrada bioquímicamente ⁽⁴⁵⁾ y por aproximación genética en la levadura de fisión *S. pombe* ⁽⁴⁶⁾. Este organismo, a diferencia de la levadura *S. cerevisiae* que no posee UGGT ⁽⁴⁷⁾, posee un mecanismo de control de calidad del plegamiento de glicoproteínas similar al presente en células de mamíferos ⁽⁴⁶⁾. La GII actúa con un pH óptimo neutro y se inhibe por 1-deoxinojirimicina (DNJ).

La subunidad GII α , se encuentra ampliamente conservada en levaduras, mamíferos, nematodos, parásitos y plantas. La GII α es la subunidad catalítica, ya que posee la secuencia (G/F)(L/I/V/M)WXDMNE característica del sitio activo de la familia de glicosilhidrolasas 31. Posee, además, la secuencia *N*-terminal hidrofóbica de ingreso a vía secretoria (péptido señal) ⁽³⁷⁾. En todas las especies estudiadas, esta subunidad carece de la señal aminoacídica consenso para la retención de proteínas solubles en el RE de tipo XDEL en su extremo C-terminal ^(48,44). La subunidad GII β , contiene, según la especie, motivos EF-hand de unión a Ca²⁺, un motivo rico en ácido glutámico (dominio ácido), y un dominio homólogo al dominio lectina del receptor de Man6P (M6PR, receptor responsable del llenado de las vesículas lisosomales en el *trans* Golgi) denominado MRH por M6PRhomologous domain ⁽⁴⁹⁾. La superficie de GII β que interaccionaría con GII α se encontraría en un dominio altamente conservado entre GII β de distintas especies llamado G2B, situado en la región *N*-terminal ⁽⁵⁰⁾. Se le atribuyeron funciones estructurales a la subunidad GII β asistiendo al plegamiento y/o maduración de GII α ⁽⁵¹⁾ y se postuló que GII β participaría en la maduración del heterodímero pero no en la actividad de GII una vez plegadas las subunidades y formado

el complejo ⁽⁴⁸⁾. Recientemente se demostró que GII β es fundamental para la actividad de GII ya que es requerida para la deglucosilación eficiente de los sustratos fisiológicos G2M9 y G1M9 mediante la interacción del dominio MRH presente en GII β con las manosas en las ramas B y/o C del glicano ⁽⁵²⁾. Estudios realizados en *S. pombe* demostraron que la actividad de GII es dependiente de la cantidad de manosas presentes ya que la misma disminuye con la remoción de manosas del glicano. Sin embargo, este efecto no se observó para UGGT ⁽⁵²⁾. Los resultados obtenidos indicarían que aquellas glicoproteínas que permanecen en el RE por un período prolongado y cuyos glicanos son demanosilados, ya no serían sustratos de la GII pero sí de la UGGT.

En *C. elegans*, GII no ha sido estudiada hasta el momento. GII α está codificada por los genes *aagr-3* y *aagr-4* y ha sido definida como una α -ácido-gluosidasa neutral ya que se ha estudiado si era capaz de degradar glicógeno a glucosa en los lisosomas careciendo de dicha actividad ⁽⁵³⁾. No se ha propuesto su actividad como GII. Por otro lado, se estudió que tanto *aagr-3* y *aggr-4* interactúan con GII β (codificada por gen ZK1307.8) que también posee función desconocida en *C. elegans* ⁽⁵⁴⁾. Posteriormente se ampliará la información sobre estos genes.

La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa

La UGGT es una enzima soluble de RE ⁽⁵⁵⁾ que funciona como el sensor del estado de plegamiento de las glicoproteínas ⁽⁵⁶⁾ ya que reconoce aquellas proteínas que aún no se han plegado correctamente. Es una enzima clave en el control de calidad de plegamiento y constituye el tema principal de estudio de esta tesis.

UGGT: Chaperona y glucosiltransferasa

La UGGT es una glucosiltransferasa de la familia 8 (IPR002495) ⁽⁵⁷⁾ capaz de sensar el estado de plegamiento de las glicoproteínas en el lumen del RE. Posee características particulares combinando las actividades de chaperona clásica y la de glucosiltransferasa.

La principal característica de esta enzima es que sólo presenta actividad sobre proteínas parcialmente plegadas que aún no han alcanzado su estructura tridimensional funcional y no presenta actividad sobre las proteínas en su conformación nativa ⁽⁵⁸⁾ ni tampoco sobre proteínas totalmente desnaturalizadas ⁽⁵⁹⁾, las cuales son reconocidas por otro tipo de chaperonas como BiP ⁽⁶⁰⁾. Esta característica se basa en el reconocimiento de dos componentes estructurales que no se encuentran expuestos en las proteínas nativas: el primero es la GlcNAc más interna que se encuentra oculta en la conformación nativa de la

proteína ⁽⁶¹⁾ y el segundo es una región de aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran expuestos en intermediarios de plegamiento avanzados con estructura de glóbulo fundido ^(62,63,64). Además de sensar estructuras terciarias, la UGGT también puede actuar sobre estructuras cuaternarias, como en el caso de las subunidades del receptor T cuya reglucosilación continúa hasta que el mismo se encuentra completamente formado y ensamblado ⁽⁶⁵⁾. Otra evidencia del reconocimiento de la estructura cuaternaria por UGGT ha sido demostrada mediante ensayos *in vitro*, en los cuales se ha observado que la UGGT reconoce complejos formados por subunidades correctamente plegadas de Aglutinina de granos de soja (SBA) que aún no se han ensamblado ⁽⁶⁶⁾. En cuanto al reconocimiento de proteínas con múltiples dominios que se pliegan de forma independiente, la UGGT reconoce los defectos de plegamiento en cada uno de estos dominios por separado y reglucosila solo los glicanos presentes en aquellos dominios proteicos que aún no han adquirido su estructura nativa ⁽⁶⁷⁾. Sin embargo, el mecanismo molecular exacto mediante el cual la UGGT reconoce las proteínas mal plegadas debe ser aún determinado.

A pesar de que reconoce una gran variedad de sustratos endógenos, solo unos pocos han podido caracterizarse. El primero fue la proteína lisosomal de *Trypanosoma cruzi* Cruzipaina (CZ) ⁽⁶⁸⁾. Se observó en experimentos *in vivo* en parásitos que CZ se asocia con CRT en estadios de plegamiento en los cuales los puentes disulfuro ya se han formado, indicando que UGGT actúa sobre intermediarios avanzados de plegamiento ⁽⁶⁹⁾ mientras que formas completamente o parcialmente reducidas de CZ interactúan principalmente con BiP. En este organismo, como el glicano transferido del Dol-P-P carece de glucosa, el único camino mediante el cual la glicoproteína puede asociarse con CRT es habiendo sido glucosidado anteriormente por UGGT. Otro sustrato de UGGT que se ha identificado es una proteasa lisosomal de células animales rica en puentes disulfuro llamada Prosaposina ⁽⁷⁰⁾. Tanto para CZ como para Prosaposina, la falta de UGGT produce una deficiencia en el tráfico de las mismas a los lisosomas y una posterior formación de agregados en el RE. Algunos otros sustratos endógenos reportados incluyen la proteína de influenza HA ⁽⁷¹⁾, la proteína G del virus de estomatitis vesicular y la transferrina ⁽⁷²⁾.

La actividad enzimática de UGGT consiste en la transferencia de un residuo de Glc a la manosa (g) de la Rama A del N-glicano de estructura M9 unido a proteínas mal plegadas utilizando UDP-Glc como dador (Fig. 4) ^(73,74). Requiere para su actividad concentraciones milimolares de Ca⁺² como las que posee el lumen del RE ^(74,75). La actividad de UGGT ha sido parcialmente caracterizada en *T. cruzi* ^(76, 26), *S. pombe* ⁽⁴⁷⁾, *D. melanogaster* ⁽⁷⁷⁾, e hígado de rata ⁽⁷³⁾.

Con respecto al reconocimiento del oligosacárido, se ha comprobado que reconoce glicanos de alto contenido de Man (M6-9) cercanos al parche hidrofóbico ^(55, 73, 78). Debido a estas características, la tiroglobulina desnaturalizada (TG) se ha utilizado en diversos ensayos como aceptor de esta enzima ya que posee el N-glicano de estructura M9 ⁽⁵⁵⁾. Ensayos *in vitro* han demostrado que glicanos aislados de composición Man₈GlcNAc₂ (M8) y Man₇GlcNAc₂ (M7), que poseen intacta la rama A son glucosilados por la UGGT sólo un 50% y un 15% respectivamente de la glucosilación del glicano de composición M9 ^(27, 59). Si bien estos resultados indicarían que un mayor procesamiento de los residuos de Man por las manosidasas del RE, disminuiría el grado de glucosilación por UGGT, las evidencias *in vivo* demuestran que la UGGT no discrimina entre M9, M8 o M7 ⁽⁵²⁾. Estos resultados indicarían que la UGGT reglucosila con la misma eficiencia los intermediarios mal plegados de alto contenido de manosas aumentando la probabilidad de interacción de los mismos con las chaperonas/lectinas.

Estructura de la UGGT

La UGGT es una proteína monomérica soluble del RE compuesta por aproximadamente 1600 residuos aminoacídicos (aprox. 175 kDa) que posee un péptido señal que la dirige al RE y que luego es eliminado en el lumen del mismo. Además, la UGGT presenta una señal peptídica del tipo XDEL para la retención/recuperación en el RE en su extremo C-terminal y es normalmente encontrada en el RE y el ERGIC ^(79,37). Todas las UGGTs conocidas poseen esta secuencia en su región carboxilo-terminal, con excepción de la de *T. cruzi* de la cual se desconoce el modo en que es retenida en el RE ⁽⁸⁰⁾.

La UGGT está compuesta por dos dominios; el N-terminal, que comprende el 80% de la proteína, no presenta homología con otras proteínas conocidas y estaría involucrado en el reconocimiento de los confórmeros que aún no han alcanzado su estructura nativa; y un dominio C-terminal que comprende el 20% de la proteína, con actividad catalítica que contiene el sitio de unión a UDP-Glc ⁽⁸¹⁾. Este último posee un dominio *glyco-trans-8* similar al de la familia de glicosiltransferasas 8 involucrado en la transferencia de azúcares desde moléculas dadoras a moléculasceptoras específicas formando enlaces glicosídicos. En el extremo C-terminal se han detectado dos motivos conservados: DxD (x puede ser cualquier aminoácido) es el motivo que se encuentra más conservado en la familia B de las galactosiltransferasas que probablemente provee el sitio de unión a UDP-azúcar ^(57,82) y el motivo conservado DQDxxN, que probablemente se encuentre involucrado en el reconocimiento del residuo de N-acetilglucosamina unido al residuo de Asn de la

glicoproteína sustrato a la cual es transferido el azúcar ^(82,57). Por otro lado, otros estudios determinaron que los residuos D1334, D1336, Q1429 y N1433 de la UGGT de rata resultaron necesarios para la actividad catalítica ⁽⁵⁷⁾. Estos residuos se encuentran conservados en el nematodo.

Conservación de los dominios

Si bien los extremos C-terminales de las UGGTs de diferentes organismos presentan un alto grado de similitud (65-70%), no ocurre lo mismo con los extremos N-terminales (15-49%) ⁽⁸¹⁾.

Los extremos N-terminales de *Rattus norvegicus* y *Drosophila melanogaster* comparten un 32.6% de similitud. Sin embargo, comparándolos con el extremo N-terminal de *S. pombe* se encuentra que presentan un porcentaje de similitud notablemente más bajo de 15.5 y 16.3% respectivamente. A pesar de que existen tanto evidencias estructurales como experimentales que apoyan la idea de que el extremo N-terminal estaría involucrado en el reconocimiento de los confórmers no nativos, este punto no ha sido demostrado aún. El bajo porcentaje de similitud encontrado entre los distintos extremos N-terminales podría tener dos explicaciones especulativas. La primera es que el extremo que debe reconocer las proteínas mal plegadas se encuentre menos conservado debido a que debe reconocer proteínas propias de cada especie que pueden presentar grandes variaciones de una especie a otra. La segunda es que estructuralmente los extremos N-terminales sean similares para reconocer el mismo tipo de sustrato a pesar de que su secuencia aminoacídica no lo sea. Quimeras combinando los extremos N y C terminales de las UGGTs de *Drosophila* y *S. pombe* dieron actividad de UGGT *in vivo*, indicando que los extremos N-terminales podrían poseer estructuras similares ⁽⁸¹⁾.

El extremo C-terminal donde se encuentra el dominio catalítico presenta un alto grado de similitud entre las distintas especies. Esto se debe a que el sitio de reconocimiento al sustrato UDP-Glc se encuentra altamente conservado.

Dos clases de UGGTs

La UGGT se encuentra conservada en células eucariotas que transfieren glicanos de alta manosa como mamíferos, plantas, nematodos, hongos y parásitos. El único organismo eucariota conocido hasta el momento que transfiere glicanos de alta manosa y carece de UGGT es *S. cerevisiae* ⁽⁴⁷⁾. Este organismo posee una proteína llamada Kre5p que a pesar de poseer características de UGGT carece de dicha actividad y participaría en la biosíntesis

de glucano-6 beta-1, que es un componente mayoritario de la pared de las levaduras⁽⁸³⁾. Además, UGGT se encuentra ausente en organismos que transfieren versiones cortas del glicano como *Giardia lamblia* y *Plasmodium falciparum*⁽⁸⁴⁾.

En *S. pombe*, *Drosophila melanogaster*, *T. cruzi* y plantas la proteína UGGT es codificada por un solo gen^(85,80,77) mientras que en Eutelostomi, un clado que incluye más del 90% de los vertebrados, existen dos genes que codifican para homólogos de UGGT. Fuera de este grupo, *Caenorhabditis* es el único organismo multicelular que posee dos genes que codifican para UGGTs.

En humanos, se identificaron dos genes (HUGT1 y HUGT2) que codifican proteínas con un 55% de identidad entre ellas, y ambas presentan un 31-45% de identidad con los genes que codifican las UGGTs de *Drosophila*, *C. elegans* y *S. pombe*. El extremo C-terminal, donde se encuentra el dominio catalítico, es el más conservado (81% de similitud), mientras que el N-terminal se encuentra menos conservado (49% de similitud)⁽⁸²⁾.

HUGT1 codifica un polipéptido de 1555 aminoácidos con un péptido señal en el extremo N-terminal y una señal de retención REEL en el extremo C-terminal que produce una proteína madura de un peso molecular predicho de 173 kDa. HUGT1 posee tres sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos 296, 536 y 1220 que no se encuentran conservados en *Drosophila*, *C. elegans* o *S. pombe*. HUGT2 codifica para una proteína de 1516 aminoácidos, contiene también el péptido señal y la señal de retención HDEL. La proteína madura posee un peso molecular predicho de 172 kDa y posee cuatro sitios de N-glicosilación en los residuos 256, 286, 920 y 950. El primero de estos residuos se encuentra conservado entre los homólogos humanos, pero ninguno de ellos se encuentra conservado en *Drosophila*, *C. elegans* o *S. pombe*.

Se analizó la expresión de los genes HUGT1 y HUGT2 y se observó que se expresan en diversos tejidos y difieren moderadamente en su distribución. HUGT1 se expresa como múltiples especies de mRNA que son inducidas en niveles similares ante un estrés de RE dado por Tunicamicina (TN) o el ionóforo de calcio A23187. Sin embargo, HUGT2 se transcribe como una única especie de mRNA y no se induce en condiciones similares. Por otra parte, se midió actividad *in vitro* utilizando TG DES (DES) como sustrato de UGGT en extractos de células de mono COS-1 transfectadas con vectores de expresión conteniendo el gen HUGT1 o el HUGT2 observándose que la proteína HUGT2 carecía de actividad de UGGT en esas condiciones⁽⁸²⁾.

Se construyeron proteínas quiméricas combinando los extremos N y C terminales de HUGT1 y HUGT2. Si bien la proteína HUGT2 carecía de actividad de UGGT, si se

combinaba su extremo C-terminal con el extremo N-terminal de HUGT1, dicha proteína quimérica podía transferir Glc a proteínas desnaturalizadas. Por lo tanto, se demostró que el dominio catalítico era activo en la proteína HUGT2 mientras que el dominio involucrado en el reconocimiento de las proteínas mal plegadas era inactivo. Aún no se ha dilucidado el papel que juega la proteína codificada por el gen HUGT2 de humanos. La misma podría reconocer una clase de sustratos específicos o bien podría haber evolucionado para cumplir otra actividad biológica ⁽⁸⁶⁾.

Mediante análisis bioinformáticos, se han identificado en *C. elegans* dos ORFs (F48E3.3 y F26H9.8, de ahora en más llamados *uggt-1* y *uggt-2* respectivamente) que codifican proteínas con un alto grado de similitud con las UGGTs de levadura y de diversos organismos. Presentan un 40% de identidad entre ellas (52% en el extremo C-terminal y 31% en el N-terminal). Al iniciar esta tesis se desconocía si ambas proteínas poseían actividad de glucosiltransferasa, si participaban en el mecanismo de control de calidad del plegamiento o si alguna de las mismas participaba en algún otro proceso en la célula no relacionado con este último. En esta tesis se estudiará si ambos genes se encuentran involucrados en el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas y se caracterizará la proteína codificada por los mismos.

Estudio de la función biológica de la UGGT en diferentes organismos

La delección de UGGT es usualmente tolerada en organismos unicelulares como *S. pombe* y *T. cruzi* en condiciones normales, sin embargo su crecimiento se altera en condiciones de estrés de RE ^(80,87). En algunos casos se ha observado que la delección de UGGT dispara la UPR, debido a que los intermediarios de plegamiento no pueden interactuar con CNX/CRT. Las cepas mutantes de *S. pombe spgt1-* poseen una tasa de crecimiento similar a las *S. pombe* salvajes tanto en condiciones normales como de estrés de RE, aunque poseen un tamaño reducido (30% más pequeñas que las salvajes) ⁽⁸⁵⁾. Las células *S. pombe alg6 gpt1-* en cambio, no pueden crecer a temperaturas restrictivas como 37°C ⁽⁸⁷⁾ debido a que las proteínas se encuentran hipoglicosiladas por carecer del gen *alg6* y debido a la falta de UGGT que impide la interacción de las glicoproteínas con CNX/CRT aumentando el estrés de RE.

La delección de UGGT en *T. cruzi* resulta en una menor infectividad de los parásitos y en un aumento de BiP ⁽⁸⁰⁾. El mutante nulo de UGGT de *Arabidopsis thaliana*, no presenta un fenotipo evidente, sin embargo se observó un aumento de varias chaperonas como BiP, PDI, CNX y CRT ⁽⁸⁸⁾.

Estudios realizados en ratones, demostraron que ratones *uggt-1* (-/-) presentan un fenotipo letal embrionario de 13 días (E13), la penetrancia de este fenotipo es variable y algunos ratones sobreviven hasta su nacimiento ⁽⁸⁹⁾. Sin embargo, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) nulas para *uggt-1* derivados de dichos embriones son viables en cultivo.

El estudio de la UGGT se ha llevado a cabo en gran medida en organismos unicelulares, sin embargo en organismos multicelulares se conoce muy poco sobre la importancia de esta proteína. En ratones, el fenotipo encontrado es letal, por lo que la acción y relevancia biológica de esta proteína en el organismo adulto se desconoce. En esta tesis estudiaremos el papel que desempeña la UGGT tanto en el desarrollo larval de *C. elegans* como en el nematodo adulto y analizaremos la relevancia de la misma.

Importancia biológica de las chaperonas moleculares

El estudio del requerimiento de las chaperonas moleculares mediante la supresión de genes ha permitido comprender la importancia biológica de las mismas. El procedimiento tradicional en mamíferos para crear la supresión en homocigosis de los genes que codifican para GRP78 ⁽⁹⁰⁾, GRP94, GRP58/ERp57 ⁽⁹¹⁾, CRT ⁽⁹²⁾ y la UGGT ⁽⁸⁹⁾ han resultado en letalidad embrionaria. Estos estudios demuestran que en mamíferos, la falta de estas chaperonas no puede ser compensada por otras proteínas durante el desarrollo.

La falta de GRP78 causa letalidad en embriones de ratón de 3.5 días (E3.5) debido a la falla en la peri-implantación del embrión ⁽⁹⁰⁾. Los embriones *Grp78* -/- no pueden desarrollarse más allá de la zona pelúcida *in vitro*, no pueden crecer en cultivo y exhiben defectos en la proliferación. Se ha observado también un incremento masivo de la apoptosis en la masa de células internas que son los precursores de células madre embrionarias ⁽⁹⁰⁾. Estos resultados indican que GRP78 es esencial para el crecimiento del embrión y la supervivencia de células pluripotentes. Por otro lado, los ratones mutantes *Grp78* +/- son viables y superficialmente lucen como los ratones salvajes. Sin embargo, el nivel de expresión de GRP78 en dichos ratones es un 50% menor al de los salvajes y los niveles de expresión de GRP94 y PDI se encuentran elevados. En forma contraria a lo esperado, los niveles de CNX y CRT no se vieron afectados por la disminución de GRP78.

Por otro lado, se observó letalidad embrionaria en ratones que poseen suprimido el gen que expresa GRP58/ERp57, mientras que el ratón mutante condicional que no posee esta proteína solo en células B lucen normales. Sin embargo, estos últimos no pueden realizar la presentación de antígeno por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I ⁽⁹¹⁾.

La supresión del gen que expresa CRT es letal en embriones de ratón en el estadio E14.5 debido a problemas en el desarrollo del corazón. La pared ventricular, formada por cardiomiocitos, es más fina en los embriones *crt* *-/-*. CRT se encuentra altamente expresada en cardiomiocitos en estadios tempranos del desarrollo y su expresión disminuye luego del nacimiento⁽⁹²⁾. GRP78 y GRP94 también se encuentran altamente expresadas en las células que participan del desarrollo del corazón en embriones, indicando que algunas proteínas de RE podrían ser esenciales en este proceso^(93,92,94).

Los ratones que poseen el gen que codifica para CNX suprimido son viables, sin embargo el 50% de los ratones *cnx* *-/-* mueren a los dos días de haber nacido y aquellos que sobreviven son más pequeños que los ratones salvajes además de presentar problemas motores⁽⁹⁵⁾. Además, los ratones *cnx* *-/-* presentan una pérdida muy grande de fibras nerviosas de mielina medianas y largas, por lo que el nervio ciático se ve afectado presentando un tamaño notablemente menor.

Debido a que en mamíferos la supresión de estos genes produce un efecto letal, la importancia biológica de muchos de ellos debe ser estudiada en otros organismos. *C. elegans* es un excelente modelo para el estudio de los efectos fenotípicos producidos por la falta de determinadas proteínas y de esta forma poder estudiar la función que cumplen las mismas en el organismo adulto.

ERAD

Una vez que las proteínas poseen su estructura tridimensional adecuada continúan su camino a través de la vía secretoria hacia su destino final en la célula. Sin embargo, aquellas proteínas que finalmente fallan en su intento de alcanzar su conformación nativa deben ser removidas del lumen del RE y degradadas en un proceso conocido como ERAD (degradación asociada al RE) ya que su acumulación podría resultar en la formación de agregados y afectar el plegamiento de otras proteínas⁽⁹⁶⁾. El proceso de ERAD implica el reconocimiento del sustrato, su transporte y retrotranslocación al citosol donde es ubiquitinado y degradado por el proteasoma 26S.

Las reglas que gobiernan las interacciones entre las chaperonas y los sustratos para dirigir a las proteínas a degradación aún no han sido firmemente establecidas. El proceso de selección de las proteínas sustrato de ERAD depende de la presencia de parches hidrofóbicos, cisteínas no apareadas y N-glicanos demanosilados (Fig. 6). Por un lado, las chaperonas de la familia Hsp70 (como BiP) y Hsp40 estarían involucradas en la selección de aquellas proteínas que son consideradas por la célula como irreversiblemente mal plegadas

reconociendo parches hidrofóbicos y manteniendo la solubilidad de las mismas para luego ser enviadas a degradación ^(97,98,99). La prolongada interacción entre el sustrato de ERAD y Hsp70 sería suficiente para reclutar a la ubiquitin ligasa E3, poli-ubiquitinar el sustrato y conducirlo a degradación.

Por otro lado, el procesamiento del *N*-glicano presente en las glicoproteínas jugaría un rol esencial en el proceso de diferenciar un intermediario de plegamiento que puede continuar en el ciclo de CNX/CRT, de una glicoproteína irreversiblemente mal plegada. La intervención secuencial de las α 1,2 manosidasas lleva al reconocimiento de proteínas similares a manosidasas llamadas EDEM que dirigen a las glicoproteínas mal plegadas a degradación. Se han identificado tres homólogos de EDEM (EDEM1, EDEM2 y EDEM3) que se inducen transcripcionalmente con estrés de RE mediante la vía de IRE1/Xbp-1 de la UPR ⁽¹⁰⁰⁾. EDEM es requerida para generar la señal de ERAD en el glicano y la sobreexpresión de EDEM1 acelera la liberación de las glicoproteínas mal plegadas del ciclo de CNX/CRT para su posterior degradación ⁽¹⁰¹⁾. Proteínas como OS-9 que poseen un dominio MRH, reconocerían la estructura del oligosacáridos para conducirlo a ERAD.

La mayoría de los sustratos de ERAD se ubiquitinan antes de ser transportados al proteasoma. La ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma requiere la acción de la enzima activadora de ubiquitina E1, la enzima conjugada a ubiquitina E2 y la ubiquitin ligasa E3 ⁽¹⁰²⁾.

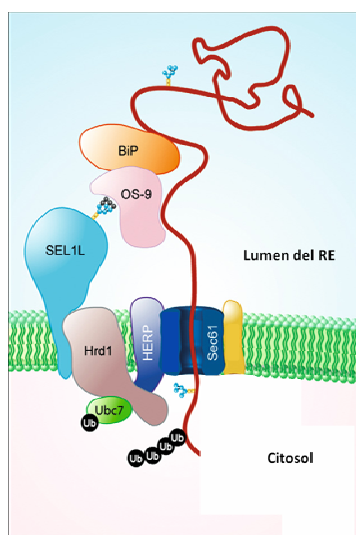


Figura 6. Modelo de retrotranslocación de proteínas irreversiblemente mal plegadas al citosol. Complejo regulador de la retrotranslocación desde el lumen del RE al citosol de una glicoproteína que no logró alcanzar su estado nativo de plegamiento. Se muestra parte del complejo Hrd1p (E3 ubiquitin ligasa) y el canal en la membrana del RE, Sec61, por el que se retrotransloca la glicoproteína (Figura modificada a partir de la referencia 10).

C. elegans posee los genes que codifican para todas las proteínas participantes de ERAD presentes en mamíferos pero muchos de ellos aún no han sido estudiados como es el caso de los genes que codifican para EDEM. En *C. elegans* se ha podido estudiar la importancia biológica de la proteína p97/Cdc48 y las ubiquitin ligasas E3 (HRDL-1, HRD-1 y MARC-6). Se determinó que las mismas participan en la UPR y que gusanos que carecen de actividad de las tres ubiquitin-ligasas a la vez poseen un gran retraso en el crecimiento ⁽¹⁰³⁾.

Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

Estímulos fisiológicos y bioquímicos como perturbaciones en la concentración de calcio, modificaciones del potencial redox o la inhibición de la glicosilación pueden alterar la capacidad del RE para plegar correctamente las proteínas. Cuando el RE es sometido a alguno de estos estímulos, se activan caminos de señalización específicos destinados a eliminar el exceso de proteínas mal plegadas. La UPR (Unfolded protein response) es un complejo sistema de señales intracelulares transcripcionales y traduccionales activadas en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE y resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular ante condiciones de estrés de RE ⁽³⁹⁾.

La acumulación de estas proteínas en el lumen inicia un sistema de señales que son transmitidas tanto al núcleo como al citoplasma y tienen tres funciones: 1) Activar transcripcionalmente genes que codifican para proteínas chaperonas residentes en el RE para aumentar la capacidad de plegamiento, 2) Degradar a través de complejos de degradación de proteínas aquellas proteínas que hayan sido mal plegadas, 3) Atenuar la traducción para limitar el número de proteínas mal plegadas en el RE ⁽¹⁰⁴⁾. Si estas respuestas fallan, se inicia entonces una respuesta apoptótica activándose la protein-quinasa JNK y las caspasas 7, 12 y 3 ⁽¹⁰⁵⁾.

Inicialmente, se identificó y caracterizó la UPR en levaduras y luego se probó su existencia en otros organismos eucariotas superiores ⁽¹⁰⁶⁾. Actualmente se sabe que la UPR es operativa en numerosos organismos entre los cuales se puede mencionar a mamíferos y a *C. elegans*. Tanto en mamíferos como en *C. elegans*, la UPR está mediada por tres tipos de proteínas de membrana del RE: IRE-1 (protein-quinasa y endoribonucleasa sitio específica), ATF-6 (activador transcripcional) ⁽¹⁰⁰⁾ y PERK/PEK (factor kinasa 2 eucariótico de iniciación de la traducción) ⁽¹⁰⁷⁾. En mamíferos, a diferencia de nematodos, existen dos homólogos de IRE-1 (IRE1 α e IRE1 β), el primero se expresa de forma ubicua mientras que el segundo se expresa sólo en intestino. En *S. cerevisiae* sólo existe el transductor IRE-1 ^(108,109).

La BiP (homóloga a la *hsp-4* de *C. elegans*) se encuentra unida al dominio luminal de IRE-1, ATF-6 y PERK/PEK en condiciones normales. Si aumenta el número de proteínas mal plegadas, BiP se une preferentemente a éstas últimas y libera el dominio luminal de IRE-1, ATF-6 y PERK/PEK (Fig. 7 A). IRE-1 se dimeriza y se activa su dominio RNasa citosólico que corta 26 nucleótidos de una secuencia intrónica del mRNA de la proteína de unión a DNA X-box (XBP-1) ^(39,110). Posteriormente, XBP-1 migra al núcleo y se une al elemento UPR en el ADN (UPRE) con el fin de activar los genes de la UPR esenciales para el plegamiento y degradación de proteínas en el RE ⁽¹⁰⁰⁾. ATF-6, al liberarse BiP, migra al GA y es sustrato de dos proteasas site-1 (S1P) y site-2 (S2P) liberándose un dominio citosólico de 50KDa ⁽¹¹¹⁾. *C. elegans* solo expresa la proteasa S2P. El fragmento citosólico se dirige entonces al núcleo donde, por un lado se une a la secuencia de DNA ERSE (un elemento de respuesta a estrés de RE), y por otro al factor de unión CCAAT (CBF) para promover la transcripción de chaperonas y otras enzimas de plegamiento ⁽¹¹²⁾ (Fig. 7A). A diferencia de *C. elegans* y *D. melanogaster* donde solo existe una isoforma de ATF-6, en mamíferos se expresan de forma ubicua dos isoformas de ATF-6 (α y β). PERK se homodimeriza y atenúa temporalmente la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la subunidad α del factor de iniciación 2 (eIF2 α) que entonces no puede atraer al tRNA de metionina a la subunidad ribosomal 40s. De todas formas, se pueden traducir preferentemente algunos mRNA con eIF2 α fosforilado ya que existen ORFs en la región 5' sin traducir del mRNA ^(107,112). El factor de transcripción 4 (ATF-4) aumenta su traducción a partir de la fosforilación de eIF2 α y activa genes involucrados con el metabolismo y transporte de aminoácidos, reacciones de óxido-reducción y apoptosis inducida por estrés de RE (Fig. 7 B). Alternativamente ante UPR prolongado se pierde la homeostasis del calcio del RE llevando a la activación de caspasas 12 que activa a caspasas 9 y 3 conduciendo a la célula a apoptosis ⁽³⁹⁾.

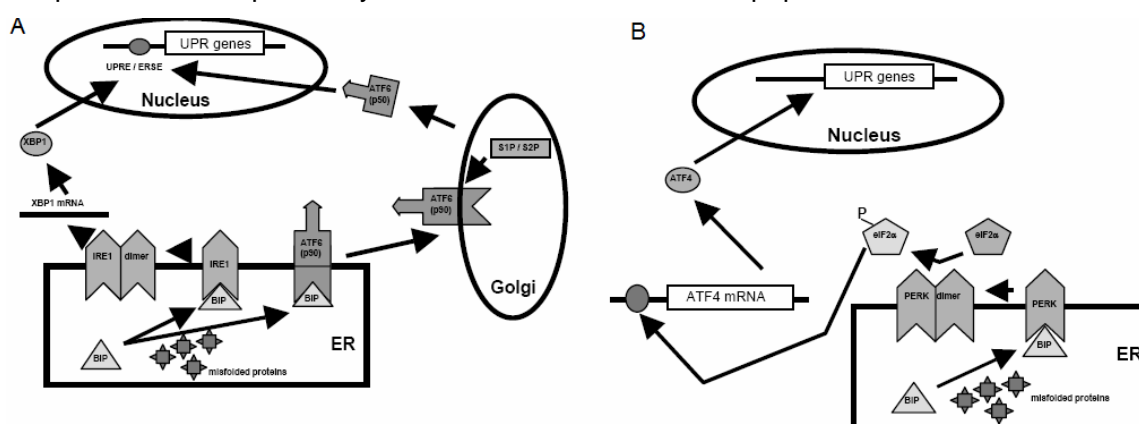


Fig. 7- Mecanismo de la UPR. A) Activación de los genes de la UPR por XBP-1 y ATF-6 con iniciación del UPR. B) Arresto traduccional mediado por PERK mediante la fosforilación de eIF2 α .

El análisis de nematodos mutantes y el estudio mediante RNAi permite conocer la función y relevancia biológica de los genes del gusano. En *C. elegans* el mutante nulo para el gen *ire-1* es viable pero es sensible a estrés de RE ⁽¹¹³⁾, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*. Se realizó un análisis por microarreglos mediante el cual se ha demostrado que 202 de los 4050 genes examinados en *C. elegans* son inducibles por estrés de RE y de ellos la mayor parte (170 genes) dependen del camino de transducción de *ire-1/xbp-1*. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, la vía de *ire-1* es la responsable de la inducción de la mayoría de los genes canónicos de la UPR, incluyendo la inducción de chaperonas y componentes de ERAD ⁽¹¹⁴⁾. Lo mismo ocurre en *D. melanogaster* ⁽¹¹⁵⁾. Esto indicaría que la vía de *atf-6* funciona de manera muy distinta en *C. elegans* y en *D. melanogaster* del modo en que actúa en mamíferos, a pesar de que sus genomas posean un único gen *atf-6*. De hecho, un análisis de RNAi en *C. elegans* demostró que pocos genes dependen de ATF-6 para su inducción en respuesta a estrés de RE y que las chaperonas de RE y los componentes de ERAD se encuentran totalmente inducidos en los nematodos mutantes nulos para *atf-6*. Además, los gusanos mutantes nulos para *atf-6* no presentan fenotipos evidentes al ser comparados con el nematodo salvaje (N2) ⁽¹¹⁴⁾.

De los 4050 genes analizados, 324 requirieron por lo menos uno de los transductores de la UPR para su expresión constitutiva (*ire-1*, *xbp-1*, *perk-1* o *atf-6*). 84 de ellos, dependientes de *atf-6*, son fundamentales para aliviar el estrés de RE en el gusano, particularmente en la ausencia de inducción transcripcional de chaperonas y componentes de ERAD. El doble mutante nulo para *ire-1* y *atf-6* es letal.

El gusano mutante nulo para *pek-1* es indistinguible del gusano salvaje bajo condiciones normales de crecimiento, pero es sensible a estrés de RE ⁽¹¹³⁾. Sin embargo, el gusano doble mutante nulo para *pek-1* e *ire-1* presenta un fenotipo letal embrionario, por lo que la atenuación traduccional de *pek-1* es considerada esencial para el desarrollo del nematodo cuando la transcripción de chaperonas de RE y componentes de ERAD no se inducen en respuesta a estrés de RE dada la ausencia de la vía de *ire-1/xbp-1*. Además del control traduccional de *pek-1*, el análisis de microarreglos ha demostrado que 47 de los 202 genes inducibles por estrés dependen de *pek-1* para su inducción transcripcional. Sólo 9 genes de los 324 requieren de *pek-1* para mantener su expresión constitutiva, sin embargo estos últimos también dependen de *ire-1/xbp-1* ⁽¹¹⁶⁾.

Debido a los resultados encontrados en los gusanos *atf-6*(RNAi) y *pek-1*(RNAi), la vía de *ire-1/xbp-1* parece ser la principal vía para contrarrestar el estrés de RE en *C. elegans*. Sin

embargo, las células de los nematodos han evolucionado para poder sobrevivir aún en ausencia de la misma.

Caenorhabditis elegans

C. elegans es un organismo metazoario microscópico que forma parte de una de las 10.000 especies de nematodos existentes, clasificado como pseudocoelomata, chromadorea (por su cutícula) rabditida, pelloderinae⁽¹¹⁷⁾.

C. elegans es un gusano pequeño que habita en el suelo donde sobrevive alimentándose de bacterias. Puede llegar a medir hasta 1 mm cuando es adulto y tiene una estructura bilateral simétrica, vermiforme, con un cuerpo cilíndrico tubular típico de cualquier nematodo⁽¹¹⁸⁾ (Fig. 8).

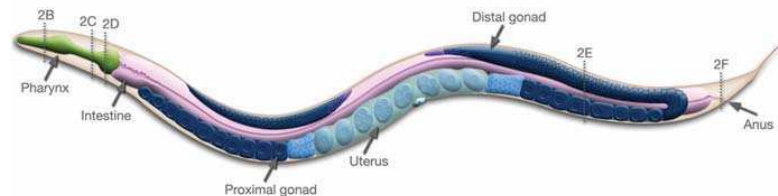


Fig. 8- Estructura de un hermafrodita adulto. Se observa la faringe (verde), el intestino (violeta) y el sistema reproductor (en celeste y azul oscuro). El sistema reproductor está formado por la gónada distal y la gónada proximal, la espermateca y el útero donde comienza el desarrollo de los huevos. Figura referencia 118.

Su cuerpo está formado por un tubo externo y un tubo interno separados por el pseudocoeloma (Fig. 9). El tubo externo está formado por una cutícula de colágeno, la hipodermis, el sistema excretor, neuronas y músculos. El tubo interno comprende la faringe, el intestino y la gónada en los adultos. Todos los tejidos están bajo una presión hidrostática interna controlada por un sistema osmoregulador. Los fluidos que contiene en su interior le dan un aspecto transparente.

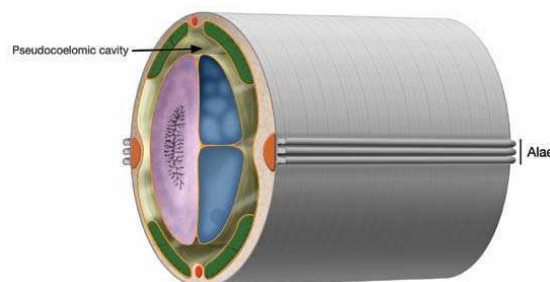


Fig. 9- Sección de la región posterior del cuerpo del nematodo. Pared del cuerpo (tubo externo) separada por un pseudocoeloma del tubo interno que está formado por el intestino (violeta) y la gónada (azul). Fig. referencia 118.

C. elegans está constituido por un número de células fijas cuya posición relativa es invariable durante el desarrollo de individuo a individuo, de modo que todo el proceso del desarrollo, desde el cigoto al adulto, puede esquematizarse como un árbol genealógico celular. Este “árbol genealógico” se conoce en forma completa gracias al estudio exhaustivo de todas las secciones del cuerpo del nematodo mediante microscopía electrónica ^(119,120).

El nematodo realiza un movimiento sinusoidal gracias a sus músculos longitudinales y posee dos sexos: hermafrodita (XX) que puede auto-fertilizarse, y macho (XO) que surge de una no disyunción meiótica (0.1%) pero que también puede reproducirse sexualmente. El macho adulto está compuesto por 1031 células, mientras que el hermafrodita está constituido de 959 células. Este último es capaz de autofecundarse y de engendrar únicamente hermafroditas. Posee una cabeza con un orificio bucal que le permite ingerir las bacterias con las que se alimenta y su único requerimiento de crecimiento y reproducción es un medio húmedo y un ambiente templado (15-25°C) con oxígeno en la atmósfera.

El huevo es generalmente el estadio más resistente en el ciclo de vida del gusano y posee tres capas: la capa vitelina externa, la capa media de quitina y la capa interna de lípidos. La capa de quitina juega un papel importante como escudo protector para el huevo y su resistencia permite la descontaminación de los nematodos en el laboratorio.

Este nematodo fue el primer eucariota cuyo genoma fue completamente secuenciado ⁽¹²¹⁾. Su genoma posee 97×10^7 pb, contiene 19000 genes ⁽¹²²⁾ y se compone de 5 autosomas y un cromosoma sexual X. Los gusanos hermafroditas son diploides para todos los cromosomas, mientras que los machos lo son sólo para los autosomas.

Aproximadamente el 50% de los genes humanos poseen homólogos en el nematodo y codifican para proteínas que tienen funciones semejantes. El nematodo comparte estructuras celulares y moleculares con organismos superiores. *C. elegans* se ha convertido en un importante modelo de estudio para la biología, especialmente para la genética de desarrollo, y fue introducido en laboratorios de genética y bioquímica en los años 70 por Sydney Brenner.

Este organismo modelo en biología molecular, se ha adaptado para estudios genéticos con el fin de estudiar, entre otros mecanismos, el silenciamiento génico; la apoptosis y su relación con el proceso de desarrollo animal; el envejecimiento celular; el desarrollo embrionario y la fisiología sensorial.

C. elegans presenta varias condiciones morfológicas y funcionales favorables para la investigación. Su ciclo de vida es corto y su genoma es compacto; presenta transparencia

a lo largo de toda su vida (lo que facilita su observación bajo el microscopio); al ser hermafrodita, es posible la obtención y mantenimiento de individuos con mutaciones recesivas; resulta relativamente fácil silenciar genes específicos con RNAi; es un organismo diploide de fácil mantención en el laboratorio en cajas de Petri a una temperatura constante de aprox. 20°C; tiene un gran número de descendencia y los fenotipos que se observan en el nematodo son sencillos de observar o medir. Las cepas pueden ser mantenidas congeladas por largos períodos de tiempo y son capaces de resistir condiciones ambientales desfavorables gracias a que pueden entrar a un estadio de desarrollo alternativo llamado “Dauer” en el cual pueden sobrevivir entre cuatro y ocho veces su ciclo normal de tres semanas de vida ⁽¹²³⁾.

A pesar de su simple sistema anatómico, el nematodo es capaz de realizar un gran repertorio de conductas incluyendo: locomoción, alimentación, defecación, puesta de huevos, formación de estadio “dauer”, respuestas sensoriales al toque, gusto, olores y temperatura. También poseen algunos comportamientos complejos como el apareamiento del macho, comportamiento social, aprendizaje y memoria ⁽¹²⁴⁾.

CICLO DE VIDA DE *C. elegans*

El ciclo de vida completo de *C. elegans* demora aproximadamente 3.5 días en condiciones óptimas y varía con la temperatura. Su embriogénesis ocurre en 12 horas durante las cuales el embrión continúa dividiéndose y utilizando las reservas energéticas almacenadas en los gránulos. La proliferación celular puede dividirse en dos fases: en la primera, el cigoto establece las células fundadoras del embrión y en la segunda, que comprende desde la gastrulación hasta el comienzo de la organogénesis, se produce una serie de divisiones celulares. Las primeras divisiones ocurren en el útero del gusano hermafrodita y cuando el embrión llega a un estadio de 30 células es ovipuesto.

Al finalizar el desarrollo embrionario, nace una larva 1 (L1) con 558 células (hermafrodita) o 560 células (macho), donde la organogénesis está casi terminada. Las divisiones celulares suplementarias (959 células) se producirán hasta el desarrollo del estadio adulto (2.5 días). Se suceden cuatro estadios larvarios entre la eclosión y el adulto, comenzando en L1 luego de la eclosión y finalizando en L4 antes del estadio adulto. El nematodo se reproduce cada 2 ó 3 días, coloca entre 200 y 300 huevos y tiene una esperanza de vida de 2 a 3 semanas (Fig. 10).

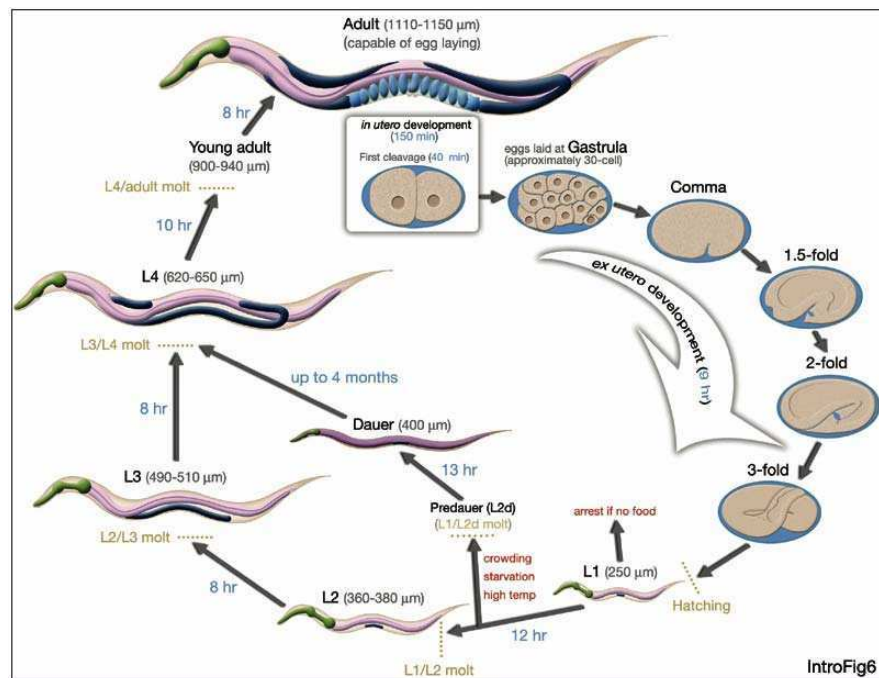


Fig. 10- Ciclo de vida de *C. elegans*. Se indican los distintos estadios del desarrollo y la duración aproximada de los mismos. El embrión comienza a desarrollarse en el útero hasta un estadio de 30 células donde es ovipuesto. Continúan las divisiones celulares pasando por estadio de comma, 1.5-fold, 2-fold y 3-fold. Luego nace y pasa por cuatro estadios larvares (L1, L2, L3, L4) hasta llegar a adulto. Si existen condiciones adversas puede entrar en el estadio “dauer”. Figura referencia 118.

Como se mencionó anteriormente, en caso de sobrepoblación, ausencia de alimento o cambios de temperatura, la L1 puede entrar en un estadio larvario alternativo o de hibernación, generando la formación de individuos *dauer* (*dauer state*) que no se alimentan, poseen un metabolismo particularmente lento y pueden sobrevivir en estas condiciones más de cuatro meses, siendo resistentes al estrés y al envejecimiento (Fig. 10). Cuando el gusano está en estadio de larva “*dauer*”, su cutícula es más densa y cierra todos los orificios para evitar la pérdida de agua ⁽¹¹⁸⁾.

C. elegans y el control de calidad de plegamiento de glicoproteínas

El genoma de *C. elegans* codifica para homólogos de genes de mamíferos implicados en el ensamblado y procesamiento de una gran variedad de glicanos ⁽¹²⁵⁾. Todos los genes de mamíferos que codifican para las proteínas participantes del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas se encuentran presentes en *C. elegans*. Sin embargo, sólo la función de algunos de ellos ha sido confirmada ya que muchos genes aún no han sido estudiados.

A pesar de que los N- y O-glicanos en *C. elegans* posean características en común con los glicanos de vertebrados en términos de la biosíntesis del núcleo del mismo, las estructuras terminales presentan variaciones. El conocimiento del rol de los glicoconjugados en *C. elegans* se ha logrado en gran medida gracias a la identificación de mutaciones en genes involucrados en su biosíntesis.

Entre las enzimas involucradas en la biosíntesis del oligosacárido G3M9, se encuentran en *C. elegans* todas las proteínas codificadas por los genes *alg* presentes en mamíferos (Fig. 3 y tabla 1). Entre ellas, las enzimas ALG-1, ALG-3, ALG-6, ALG-7, ALG-8, ALG-9 y ALG-10 no poseen función conocida hasta el momento ya que nunca han sido caracterizadas en el nematodo. Existen mutantes nulas tanto para *alg-6* como para *alg-8* y ambas presentan un fenotipo similar: en homocigosis los gusanos son estériles o presentan un fenotipo letal. También el gusano mutante de la enzima codificada por el gen *alg-10*, presenta un fenotipo letal. Sin embargo, se ha observado que la penetrancia de este fenotipo no es total y ciertos gusanos homocigotas para la delección de *alg-10* nacen aunque presentan arresto larval, crecimiento lento, tamaño pequeño y morfología más ancha y corta ("Dumpy"-dpy). La enzima ALG-2 que transfiere el segundo residuo de manosa al glicano Dol-P-P-GlcNAc-Man en el lado citoplasmático del RE, ha sido estudiada en el nematodo. Es requerida para la colonización por *Microbacterium nematophilum* y genera una respuesta de hinchazón en la cola del nematodo ante la infección. Es esencial también para la morfogénesis del embrión durante la organización del neuroblasto y facilita la migración de la epidermis. Es requerida también para la integridad de la cutícula y la locomoción (tabla 1).

También se encuentran presentes en el nematodo los genes que codifican para el complejo de la Oligosacaryltransferasa formado por OST1/riboforina, Riboforina II, Ost48, OST2/DAD-1 y STT3 (tabla 1). No se ha podido estudiar el efecto de dichos genes en gusanos mutantes nulos. Sin embargo, gracias a las técnicas de RNAi se ha observado que la disminución en la expresión de dichos genes produce un fenotipo letal embrionario o estéril. Además de estos dos fenotipos, también se han observado otros más suaves que se presentan en la tabla 1.

Por otro lado, existen genes que codifican para las glicosidasas de procesamiento del oligosacárido G3M9. Entre ellos se encuentran genes que codifican para GI y GII (subunidades α y β) (tabla 1). La función de dichos genes no ha sido estudiada hasta el presente y sólo se infiere su función por homología de secuencia. Se han realizado estudios a gran escala de RNAi clonando una biblioteca genómica que posee todos los genes de *C. elegans*, en un vector que posee promotores para generar RNAs (RNA doble cadena) y

luego se utilizó el método de “RNA feeding” (alimentación de los nematodos con bacterias que expresan dicho vector). Dicho estudio reveló que la falta de GI produce problemas de locomoción, retraso en el crecimiento, agregación de proteínas y fenotipo pálido. El gusano mutante para GI *F13H10.4 (ok2135)* presenta en homocigosis un fenotipo estéril con vulva anormal.

En el caso de la GII, como se mencionó anteriormente, la subunidad α de la misma está codificada por dos genes (*aagr-3* y *aagr-4*) mientras que la subunidad β se encuentra codificada por el gen ZK1307.8. Los genes *aagr-3* y *aagr-4* han sido estudiados junto con *aagr-1* y *aagr-2* como cuatro α -ácido-glucosidasas y se propuso que *aagr-3* y *aagr-4* codificaban para enzimas neutrales activas del tipo GH31 (glicosil hidrolasa de la familia 31 que catalizan la hidrólisis de uniones α -1,4- y α -1,6-glucosídicas a pH ácido) ignorando su actividad como GII. Mediante un ensayo de RNAi para cada uno de los genes se evaluó el impacto de la actividad α glucosidasa a pH 4.0 (ácido) y pH 6.5 (neutral), con o sin el inhibidor acarboxa. Sólo se ha encontrado dicha actividad para las dos primeras variantes y no para *aagr-3* y *aagr-4* por lo que su función aún es desconocida. El gen *aagr-3* fue estudiado por RNAi y presenta un fenotipo letal embrionario y arresto de larvas tempranas y tardías. No se ha aislado un mutante del gen *aagr-3* pero sí de *aagr-4*, aunque el mismo no presenta ningún fenotipo detectable, al igual que muestran los estudios de RNAi. Análisis bioinformáticos muestran que estos genes presentan un alto grado de similitud con los genes que codifican para GII α en otras especies (38-43%). Se ha visto que *aagr-3* se expresa en la faringe, en el intestino, epitelio rectal y sistema nervioso. Por otro lado, se observó que tanto AAGR-3 como AAGR-4 en *C. elegans* interactúan con la proteína codificada por el gen ZK1307.8 (GII β) que posee dominios EF-hand y de unión a calcio, aunque dicha subunidad tampoco ha sido caracterizada en el nematodo. La falta de GII β en humanos produce la enfermedad de hígado poliquístico. Existe un gusano mutante nulo para GII β que no presenta ningún fenotipo evidente, sin embargo ha sido producido en proyectos a gran escala y no ha sido estudiado con detalle hasta el momento. Los mismos resultados se han observado en ensayos de RNAi.

Las UGGT de *C. elegans* tampoco habían sido caracterizadas hasta el comienzo de esta tesis. Como se mencionó anteriormente, las variantes de *C. elegans* presentaban homología con las UGGTs de otros organismos. No se habían observado defectos fenotípicos detectables mediante RNAi y se había estudiado la expresión para el gen *uggt-1*, el cual se expresó en sistema nervioso. El mutante del gen *uggt-2* fue producido por

mutagénesis con EMS gracias al trabajo del consorcio de mutantes (*C. elegans* gene Knock-out consortium) durante el año 2010.

Las lectinas-chaperonas CNX y CRT y la enzima formadora de enlaces disulfuro PDI-2 han sido estudiadas en *C. elegans*. CNX-1 se une a calcio y se ha predicho que funciona como una chaperona molecular requerida para el plegamiento y maduración de las glicoproteínas como también para la regulación de los niveles de calcio intracelular. La actividad de CNX-1 es requerida para que los nematodos posean un nivel de fertilidad adecuado y para el correcto desarrollo del embrión y la larva a la temperatura máxima tolerada por *C. elegans* para su desarrollo (25°C). Por otro lado, la actividad de CNX-1 es necesaria para mantener la viabilidad durante condiciones de estrés⁽¹²⁶⁾. Los mutantes nulos de *cnx-1* presentan diversos fenotipos entre los que se encuentra letalidad o arresto en el embrión y larva temprana, desarrollo larval anormal, crecimiento lento, desarrollo de la gónada anormal, presencia de vacuolas intestinales, menor descendencia, desarrollo sensible ante condiciones de estrés e hipersensibilidad a Tunicamicina (TN). CNX-1 se expresa de forma ubicua en el embrión temprano y luego su expresión se restringe a la cabeza y cola. En cuanto a la expresión post-embriónica, la misma se observa en células excretoras con forma de H ("H-shaped"), intestino, cordón nervioso ventral y dorsal, espermateca, neuronas de la cabeza y de la cola. Los niveles de expresión del mRNA de *cnx-1* y los niveles proteicos aumentan ante condiciones de estrés de RE sugiriendo su participación en la UPR como se ha visto con anterioridad. CNX-1 se encuentra N-glicosilada en los residuos Asn(203) y Asn(571) y dicha glicosilación es fundamental para su actividad⁽¹²⁶⁾.

CRT-1 es una chaperona que une calcio localizada en el lumen del RE. En *C. elegans* se ha demostrado que la expresión de *crt-1* se induce ante condiciones de estrés de RE (con TN) y, mediante ensayos *in vitro*, se ha observado que su expresión puede prevenir la agregación de proteínas inducida por calor. *crt-1* no es necesaria para la viabilidad del nematodo en condiciones normales de crecimiento, pero sí es requerida para el desarrollo normal del esperma, para la eficiencia en la cópula en el macho y para la fertilidad del hermafrodita a altas temperaturas, lo que pone en evidencia su papel en la respuesta a estrés. Los gusanos mutantes nulos *crt-1(bz30)* y *crt-1(jh101)* presentan una menor tasa de crecimiento y dejan menor descendencia a 25°C. Además, los gusanos *crt-1(jh101)* poseen un tamaño relativamente menor y su esperma es defectuoso. Por otro lado, se ha demostrado que *crt-1* requiere IRE-1 y XBP-1 pero no ATF-6 ni PEK-1 para su expresión en condiciones de estrés. Dicha observación es coincidente con la presencia de una región de unión de

XBP-1 en el promotor de *cnx-1* (entre -284pb y -278 pb) necesaria para la inducción por TN. Estudios de RNAi demostraron que la disminución de la expresión de *crt-1*, *pdi-2* o *pdi-3* aumentan la expresión de *crt-1* mientras que la disminución de la expresión de *hsp-3* o *hsp-4* no tienen ningún efecto en la expresión de *crt-1* por lo que existe una red compensatoria compleja ante estrés de RE ⁽¹²⁷⁾.

Ratones mutantes nulos para CNX/CRT presentan un fenotipo severo mientras que en *C. elegans* los mutantes nulos calreticulina [*crt-1*(jh101)]- y calnexina [*cnx-1*(nr2009)] presentan un fenotipo leve sugiriendo que existiría una maquinaria de chaperonas que pueden compensar su falta. Un posible mecanismo que podría estar funcionando es el aumento de los miembros de la familia hsp70 y PDI ⁽¹²⁸⁾.

PDI es una proteína disulfuro isomerasa formada por dos subunidades α (PHY-1 y PHY-2) y una subunidad β (PDI-2). En *C. elegans* puede formar un tetrámero PHY-1/PHY-2/2(PDI-2) o bien dímeros PHY-1/PDI-2 o PHY-2/PDI-2 ⁽¹²⁹⁾. PDI-2 es requerida para varios procesos en el nematodo como la locomoción, la fertilidad, la muda, la deposición de colágeno y la correcta morfología del cuerpo (tabla 1). Los gusanos mutantes nulos de *pdi-2* son letales o estériles. Los niveles de mRNA de *pdi-2* aumentan en respuesta a estrés de RE ⁽¹³⁰⁾. *pdi-2* se expresa en la hipodermis que es el tejido encargado de secretar la cutícula de colágeno ⁽¹²⁹⁾.

hsp-3 y *hsp-4* codifican dos proteínas hsp70 de *C. elegans*, homólogas a grp78/BiP en mamíferos ⁽¹³¹⁾. Se ha estudiado que la disminución de la expresión de *hsp-4* por RNAi afecta la viabilidad de embriones y larvas (tabla 1). También se han observado otros fenotipos por RNAi como defectos durante la división celular en la fase diplotene, morfología defectuosa del RE y contenido graso aumentado (tabla 1). *hsp-4* se expresa en varios tejidos incluyendo hipodermis, intestino y espermateca. Por otro lado, participaría en la UPR ya que se observó que el mRNA de *hsp-4* se induce ante condiciones de estrés de RE ⁽¹³²⁾.

HSP-3 es una chaperona molecular soluble de RE que posee un extremo amino terminal hidrofóbico y una secuencia KDEL de retención en RE ⁽¹³¹⁾. Se expresa constitutivamente (su expresión no es inducida por calor) a lo largo de todo el desarrollo con un pico de expresión en L1. Los niveles de mRNA de *hsp-3* aumentan en condiciones de estrés de RE (dado por DTT o TN) ⁽¹³²⁾. Estudios realizados por RNAi han demostrado que la disminución de *hsp-3* produce fenotipos como letalidad embrionaria, arresto larval o esterilidad, así como también fenotipos más leves como defectos en la locomoción, agregación de proteínas o gusanos con morfología gorda y pequeña (*dpy*) (tabla 1).

Las proteínas que participan en la UPR (IRE-1, PEK-1, ATF-6 y XBP-1) han sido muy estudiadas en *C. elegans* y han dado origen a una numerosa cantidad de papers. *C. elegans* posee, como se mencionó anteriormente, todos los genes que codifican para los transductores de señal de la UPR.

ire-1 se expresa en todas las células de embriones y larvas⁽¹³³⁾. Mediante estudios de RNAi se ha demostrado que la falta de *ire-1* impide la inducción de *crt-1* en condiciones de estrés generadas por TN⁽¹²⁷⁾. Otros estudios de RNAi han dado como resultado diversos fenotipos tales como arresto larvario en L2, gusanos lentos y enfermos, gusanos con intestino anormal, estériles o nematodos con un aumento del contenido graso. Los gusanos mutantes de *ire-1* presentan un fenotipo hipersensible a TN y al hambreado además de un intestino de color más oscuro dado por la falta de hidrólisis de las gotas de lípidos presentes en el mismo (tabla 1).

xbp-1 se expresa en todas las células del embrión y de la larva, pero a diferencia de *ire-1* se observa un aumento de su expresión en neuronas, sobre todo durante el desarrollo. Un estudio del tráfico de proteínas neuronales en *C. elegans* a través del RE indicaría que las neuronas requieren de la señalización de la UPR para transportar las subunidades de los receptores de glutamato (GLR-1, GLR-2 y GLR-5) desde el RE a través de la vía secretoria⁽¹³³⁾. Por otro lado, un estudio del gusano mutante nulo de *xpb-1* mostró que su ausencia impide la inducción de *crt-1* en condiciones de estrés de RE dadas con TN. *xbp-1* tendría también funciones en condiciones normales ya que su falta produce la pérdida de miosina en la faringe aunque el músculo faríngeo se encuentre presente⁽¹³⁴⁾. Estudios de RNAi contra *xbp-1* han producido diversos fenotipos en el nematodo como arresto larvario en larva temprana o en L2, intestino anormal, defectos en la locomoción y una reducción de la sobrevivencia del nematodo (tabla 1).

En *C. elegans* *pek-1* se expresa en células del intestino. Estudios de RNAi han dado como resultado que la disminución en su expresión produce diversos fenotipos tales como retraso en el desarrollo, arresto larvario en L2, intestino anormal, gusanos lentos y enfermos (tabla 1,¹¹³). PEK-1 es requerida para la inducción de 23% de aquellos genes inducibles por UPR mientras que su falta no afecta la expresión de los genes constitutivos de UPR. En humanos la mutación de *pek-1* produce el síndrome de Wolcott-Rallison, un desorden autosómico recesivo que produce diabetes mellitus en la infancia, displasia, osteopenia y retardo mental o retraso en el desarrollo.

En *C. elegans*, ATF-6 es una proteína transmembrana con un dominio de transcripción bZIP en su extremo citosólico amino-terminal que es liberado mediante la

acción de la actividad proteolítica de la enzima codificada por el gen Y56A3A.2 (un homólogo de la proteasa S2P) en condiciones de estrés. En *C. elegans* tanto la delección de *ire-1* o *xbp-1* junto con *atf-6* o *pek-1* es letal, produciendo un arresto en el estadio L2. Sin embargo el mutante nulo de *atf-6* superficialmente no presenta ningún fenotipo. No obstante, los gusanos *atf-6(RNAi)* se arrestan en larva temprana y poseen alteraciones en el intestino (tabla 1).

Nombre	Secuencia codificante	Fenotipos por RNAi	Mutante y fenotipos
Síntesis del oligosacárido			
<i>alg-6</i>	C08B11.8	WT	tm1540: ste, let (NBP)
<i>alg-8</i>	C08H9.3	<i>lva</i> , <i>pvl</i> , <i>ste</i> ⁽¹³⁵⁾ , <i>emb</i> , <i>rbs</i> ⁽¹³⁶⁾	tm5407/tm5711: ste, let (NBP of Japan)
<i>alg-7</i>	T08D2.2	WT	RB1580: WT
<i>alg-1</i>	T26A5.4	<i>emb</i> , <i>ste</i> ⁽¹³⁷⁾	-
<i>alg-2</i>	T23F2.1 (<i>bus-8</i>)	<i>inf</i> , <i>blch</i> , <i>drg</i> , <i>ctl</i> , <i>emb</i> ⁽¹³⁸⁾ , <i>lco</i> , <i>gro</i> , <i>pvl</i> <i>dpy</i> ⁽⁴¹⁾ , <i>mlt</i> ⁽¹³⁹⁾	CB6055: <i>Inf</i> , <i>ctl</i> , <i>drg</i> (CGC)/ tm1410: <i>let</i> , <i>ste</i> (NBP)
<i>alg-3</i>	K09E4.2	WT	-
<i>alg-9</i>	C14A4.3	WT	-
<i>alg-10</i>	T24D1.4	<i>pha</i> , <i>loc</i> ⁽¹⁴⁰⁾	VC569: <i>dpy</i> , <i>gro</i> , <i>emb</i> , <i>lva</i> (CGC)
Complejo de la Oligosacariltransferasa			
OST1/ribophorin	<u>T22D1.4</u>	<i>emb</i> ⁽¹⁴¹⁾ , <i>ste</i> , <i>lva</i> ⁽¹³⁶⁾ , <i>lco</i> ⁽¹⁴²⁾ , <i>lon</i> ⁽¹⁴³⁾ , <i>div</i> ⁽¹⁴⁴⁾	-
Ribophorin II	<u>M01A10.3</u>	<i>div</i> ⁽¹⁴⁴⁾ , <i>emb</i> ⁽¹⁴¹⁾ , <i>let</i> , <i>ste</i> ⁽¹⁴⁵⁾	-
WBP1/DDOST/Ost48	<u>T09A5.11</u>	<i>emb</i> , <i>lva</i> , <i>gro</i> , <i>lon</i> , <i>loc</i> ⁽¹⁴³⁾	-
OST2/DAD-1	<u>F57B10.10</u> (<i>d ad-1</i>)	<i>emb</i> ⁽¹⁴¹⁾ , <i>gro</i> ⁽¹⁴⁶⁾ , <i>lva</i> , <i>unc</i>	-
STT3	<u>T12A2.2</u>	<i>emb</i> ⁽¹⁴¹⁾ , <i>lva</i> , <i>lon</i> ⁽¹⁴³⁾ , <i>ste</i> ⁽¹⁴⁵⁾	-
Glicosidasas de procesamiento			
<i>Gl</i>	F13H10.4	<i>pale</i> , <i>gro</i> , <i>loc</i> , <i>agr</i> ⁽¹⁴⁴⁾	VC1681: <i>vlv</i> , <i>ste</i> (CGC)
<i>aagr-3</i> (GII α)	F40F9.6	<i>emb</i> , <i>lva</i> ^(141,147)	-
<i>aagr-4</i> (GII α)	F52D1.1	WT	RB1307: WT
ZK1307.8	ZK1307.8	WT	RB1610: WT

(GII β)			
Glicosiltransferasas del Control de Calidad de Plegamiento			
<i>uggt-1</i>	F48E3.3	WT	-
<i>uggt-2</i>	F26H9.8	WT	VC1961
Chaperonas del control de calidad de plegamiento			
<i>cnx-1</i>	ZK632.6	emb ⁽¹⁴⁸⁾	VC1801: WT /NS2938: snt DTT y EGTA, emb, lva, rbs, gro, drg ⁽¹²⁶⁾
<i>crt-1</i>	Y38A10A.5	loc ⁽¹⁴³⁾ , rbs ⁽¹⁴⁸⁾ , let ⁽¹⁴⁹⁾	KJ216: gro, rbs, sprm, snt TN, sma ⁽¹⁵⁰⁾ / RB1021 (CGC)/ ZB1029: gro y rbs
<i>pdi-2</i>	C07A12.4	dpy, lva, lco, emb ⁽¹⁴³⁾ , agr ⁽¹⁴⁴⁾	VC858: let, ste/TP69: dpy, let (CGC)
<i>hsp-3</i>	C15h9.6	Ste ⁽¹⁵¹⁾ , loc ⁽¹⁴²⁾ , agr ⁽¹⁵²⁾ , lva, emb, dpy, fat ⁽¹⁵³⁾ , ERv ⁽¹⁵⁴⁾	RB1104: WT (CGC)
<i>hsp-4</i>	F43E2.8	Div, emb, fat ⁽¹⁵³⁾ , ERv ⁽¹⁵⁴⁾	VC1099: WT (CGC)
Proteínas participantes de la UPR			
<i>ire-1</i>	C41C4.4	lva (L2), slu, sck, int ⁽¹¹³⁾ , fat ⁽¹⁵³⁾ , ste ⁽¹⁵¹⁾ ,	SJ30/RB925/RE666: int ⁽¹⁵³⁾ , strv ⁽¹⁵³⁾ , snt TN ⁽¹²⁷⁾ (CGC)
<i>xbp-1</i>	R74.3	lva (L2), int ⁽¹¹³⁾ , loc ⁽¹⁵⁵⁾ , lfs ⁽¹⁵⁶⁾	SJ17 (CGC)
<i>pek-1</i>	F46C3.1	gro ⁽¹⁵⁷⁾ , int, lva (L2), slu, sck ⁽¹¹³⁾	RB545 (CGC)
<i>atf-6</i>	F45E6.2	lva, int ⁽¹¹⁴⁾	RB772 (CGC)

Tabla 1- Genes que codifican para proteínas relacionadas al control de calidad de plegamiento de glicoproteínas del RE y de la UPR en el genoma de *C. elegans*. Fenotipos: letal embrionario (emb), estéril (ste), letal (let), menor número de descendencia (rbs), vulva protuyente (pvl), arresto larvario (lva), gusanos más cortos y gordos (dpy), tasa de crecimiento anormal (gro), movimientos faríngeos alterados (pha), alteraciones en la locomoción (loc), resistente a infecciones de *Microbacterium nematophilum* (inf), cutícula frágil (ctl), hipersensible a drogas (drg), hipersensible a lavandina (blch), deficiencia en la muda (mlt), gusanos largos y finos (lon), gusanos descoordinados (unc), problemas en la división celular (div), gusanos pálidos (pale), agregación de proteínas (agr), vulva anormal (vlv), sensible (snt), esperma defectuoso (sprm), gusanos chicos (sma), alteración en la morfología del RE (ERv), aumento del contenido graso (fat), intestino anormal (int), hipersensible al hambre (strv), gusanos con movimiento más lento (“sluggish”- slu), gusanos enfermos: tamaño, movimiento, pigmentación, viabilidad o fertilidad alteradas (sck), reducción en la supervivencia (lfs). NBP of japan: National Bioresource Project for the Experimental Animal “Nematode *C. elegans*”. Department of Physiology, Tokyo Women’s Medical University School of Medicine, Tokyo, Japan. CGC: Caenorhabditis Genetic Center- University of Minnesota.

ARN de interferencia y silenciamiento génico

La interferencia de RNA (RNAi) es un método eficiente para inhibir la expresión de genes y es utilizada como estrategia en la investigación científica. Esta estrategia de estudio

por pérdida de función debido a la inhibición de la expresión de una proteína permite evaluar los cambios que ocurren en los organismos y así definir el papel que juega la misma.

El llamado silenciamiento génico es un mecanismo que ocurre a nivel del RNA, impidiendo que el mismo se traduzca a proteína mediante la degradación específica de la secuencia de mRNA. Este proceso en algunas especies se induce mediante la expresión de RNA simple cadena (la cadena complementaria del mRNA que se desea inhibir), mientras que en otros se induce por la producción de moléculas de RNA doble cadena (RNADs). Este último funciona con mayor eficiencia en el caso de *C. elegans* ^(158, 159).

Los siRNAs se dividen en dos clases: aquellos que derivan directamente de RNADs y funcionan sin amplificación, y los siRNAs que requieren amplificación de un RNA inicial doble cadena por una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). Este último caso es el que ocurre en *C. elegans*. Los siRNAs primarios son producidos a partir de RNADs mediante la enzima Dicer que procesa el RNADs desde su extremo moviéndose cada 21 nucleótidos, por lo que deja RNA pequeños de ese tamaño. El RNADs producido forma un complejo con Argonauta y otras proteínas. Este complejo efector contiene solo una de las dos cadenas de siRNA ancladas mediante su extremo 5' a un dominio de unión a fosfato en dicho complejo.

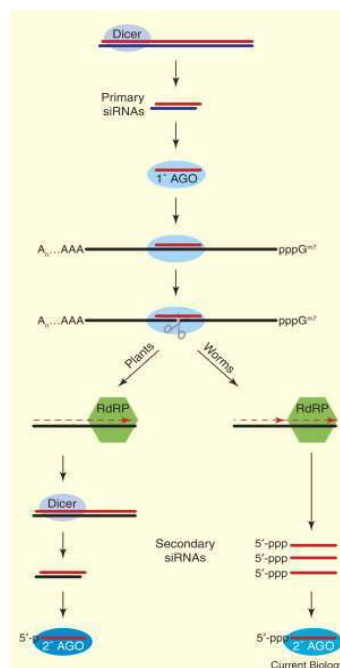


Fig. 11- Amplificación de la respuesta de RNAi por la RdRPs en plantas y gusanos

Plantas, hongos y algunos animales como *C. elegans* codifican para enzimas RdRP. El pri-siRNA producido gatilla la producción de siRNAs secundarios por una RdRP que usa el

RNA blanco como templado (Fig. 11). Este siRNA secundario es transcripto directamente sin necesidad de un intermediario de RNAds por lo que aumenta mucho su abundancia en la célula. Los siRNAs secundarios son antisentido al mRNA blanco. En *C. elegans* estos siRNAs además poseen secuencias 5' con grupos di o trifosfato característicos de la transcripción más que del producto de Dicer. Es decir que la función primaria de los pri-siRNAs en el gusano es la de reclutar RdRps al RNA blanco. Se cree además que luego estos siRNAs son acomplejados con otro tipo de Argonauta que anclaría siRNAs multifosfato.

En *C. elegans* el RNAi es extremadamente específico y solo las secuencias de mRNA idénticas son secuencias blanco. Las secuencias que se encuentran altamente relacionadas o poseen alta homología no serían secuencias blanco⁽¹⁶⁰⁾.

En algunos organismos, como *C. elegans*, el silenciamiento es heredable, ya que los mediadores de interferencia pueden viajar desde las células en que se producen hasta otras células del organismo, logrando así el silenciamiento génico en el organismo completo y en su descendencia⁽¹⁶¹⁾. Este mecanismo sería gracias a la presencia de un canal llamado SID-1 que se encuentra presente en todas las células de *C. elegans* con excepción de las células del sistema nervioso^(160,162,163).

Existen tres métodos para la incorporación del RNAds en *C. elegans*: el primero consiste en sumergir al gusano en una solución de RNAds y de este modo el RNA es incorporado⁽¹⁶¹⁾, el segundo consiste en alimentar al nematodo con bacterias que expresan el RNAds⁽¹⁶⁴⁾ y el tercero es mediante la inyección del RNAds en el intestino.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general del trabajo es comprender cuál es la función biológica que desempeñan las dos putativas UGGTs codificadas en el genoma de *C. elegans*. Se detallan a continuación los objetivos puntuales propuestos y las hipótesis de trabajo que hemos construido para analizar el objetivo planteado. Utilizaremos como modelo experimental, principalmente, al nematodo *C. elegans* ya que al igual que vertebrados posee dos UGGTs codificadas en su genoma. Además es un organismo modelo de fácil manipulación en el laboratorio y una herramienta genética valiosa para estudiar la función biológica que desempeñan las UGGTs en la fisiología del mismo. En particular, podrían extenderse los estudios ya existentes realizados en organismos unicelulares sobre la importancia del papel que desempeña la UGGT como sensora del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas (CCPG) en un organismo multicelular. También utilizaremos la levadura de fisión *S. pombe* que es un microorganismo versátil para la manipulación genética y posee un CCPG similar al presente en células de mamíferos para la expresión heteróloga de las UGGTs. Utilizamos este modelo tanto en experimentos bioquímicos como para experimentos de complementación funcional de ambas UGGTs en levaduras mutantes de la vía de glicosilación.

Objetivos específicos

1) Determinar si *C. elegans* posee actividad de UGGT

El genoma de *C. elegans* posee dos genes (*uggt-1* y *uggt-2*) que codifican proteínas con características similares a las UGGTs de otros organismos. Nuestra hipótesis es que alguno de los dos genes debe codificar para una proteína con actividad de UGGT ya que el nematodo tiene genes homólogos que codifican para todas las proteínas que participan en el CCPG. Para verificar esta hipótesis, se realizarán ensayos de actividad de UGGT *in vitro* utilizando proteínas microsomales (fracción subcelular enriquecida en RE) como fuente de enzima, tiroglobulina desnaturalizada (de estructura M9 desprovista de glucosa) como sustrato y se analizará la presencia de glucosa en la estructura del oligosacárido unido a proteína. También se caracterizará bioquímicamente la UGGT de *C. elegans*, se analizará la dependencia de la actividad con el pH y el requerimiento de cationes para la misma. Además, se ensayarán distintos aceptores exógenos. Si nuestra hipótesis es cierta y *C. elegans* posee actividad de UGGT observaremos incorporación de glucosa radioactiva a la estructura del oligosacárido unido a proteína.

2) Determinar si *Ceuggt-1*, *Ceuggt-2* o ambos codifican para una UGGT activa

Si bien la presencia de actividad de UGGT en los ensayos *in vitro* nos indicaría que *C.elegans* posee actividad de UGGT, no podemos determinar si la responsable de dicha actividad es en particular CeUGGT-1, CeUGGT-2 o si ambas contribuyen de una manera determinada a los niveles de actividad encontrados. En humanos, como se mencionó anteriormente, existen dos genes que codifican para putativas UGGTs. Mediante experimentos de sobreexpresión, se comprobó que HUGT-1 posee actividad de UGGT mientras que HUGT-2 es inactiva. Nuestra hipótesis es que al igual que ocurre en humanos, la proteína UGGT-1 poseería actividad de UGGT mientras que UGGT-2 podría haber adquirido una nueva función biológica. Para poder examinar nuestra hipótesis se clonarán los genes *uggt-1* y *uggt-2* de *C. elegans* en el vector pREP3x y se expresarán en levaduras *S. pombe alg6 gpt1-* (que no poseen glicanos glucosilados y carecen de UGGT). Se realizarán ensayos de actividad de UGGT tanto *in vitro* como *in vivo*. Para corroborar que ambas proteínas se expresan en el compartimento subcelular correcto (RE) y con el peso molecular esperado se fusionará una etiqueta c-Myc en el extremo C-terminal y se realizará un ensayo de Western Blot. Por otro lado, se realizará un experimento de silenciamiento génico contra los genes *uggt-1* y *uggt-2* en *C. elegans* y se analizará la actividad de UGGT remanente en estos gusanos. Para ello, se realizarán ensayos actividad *in vitro* de UGGT utilizando proteínas microsomales totales preparadas a partir de gusanos *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* y *gfp(RNAi)*. En el caso de que nuestra hipótesis sea correcta, observáramos presencia de glucosa en el oligosacárido unido a proteína para aquellas levaduras transformadas con *uggt-1* y no con *uggt-2*; y sólo observaríamos disminución de la actividad en gusanos tratados con RNAi contra *uggt-1*.

3) Estudiar la funcionalidad de los dominios N y C terminales de las UGGTs de *C. elegans*

Las UGGTs de diversos organismos están compuestas por dos dominios estructurales, el C-terminal que corresponde a un 20% de la proteína y se encuentra altamente conservado entre diferentes especies, y el N-terminal que corresponde al 80% restante y posee un porcentaje de similitud menor (30%). El extremo C-terminal es el encargado de reconocer UDP-Glc y transferir la glucosa al oligosacárido mientras que el extremo N-terminal sería el encargado de reconocer glicoproteínas con estructura de glóbulo fundido. En humanos, mediante experimentos de sobreexpresión en células se comprobó que si bien HUGT-2 es inactiva, si se sobreexpresaba en esas mismas células una proteína

quimérica combinando el extremo C-terminal de HUGT-2 con el N-terminal de HUGT-1, entonces dicha proteína poseía actividad de UGGT. Este resultado indicaba que el extremo C-terminal de la proteína HUGT-2 era activo siendo capaz transferir la glucosa al oligosacárido. Nuestra hipótesis es que el extremo C-terminal de CeUGGT-2 es capaz de transferir glucosa a proteínas mal plegadas si posee un extremo N-terminal que sea capaz de reconocer proteínas mal plegadas. Para probar dicha hipótesis construiremos proteínas quiméricas combinando los extremos N y C terminales de CeUGGT-2 y SpGpt1+ (UGGT de *S.pombe*), transformaremos levaduras *S.pombe alg6 gpt1-* y mediremos actividad de UGGT *in vitro* en fracciones microsomales. Si nuestra hipótesis es correcta, detectaríamos actividad de UGGT en las levaduras transformadas con la proteína quimérica Spgpt1+N/ CeUGGT-2 C.

4) Analizar si las UGGTs de *C. elegans* pueden complementar el fenotipo mutante encontrado de las levaduras *S.pombe alg6 gpt1-*

A temperaturas restrictivas donde se produce la acumulación de proteínas mal plegadas, las células *S. pombe alg6 gpt1-* al no poseer UGGT, no pueden compensar esta acumulación y presentan problemas de crecimiento. Nuestra hipótesis es que CeUGGT-1 que poseería actividad de UGGT, sería capaz de complementar el fenotipo observado mientras que CeUGGT-2 no lo haría. Para ensayar dicha hipótesis se realizará un experimento de complementación funcional en placa en medio YEA. Allí se sembrarán distintas diluciones de un cultivo de levaduras sp61 (WT) o *S. pombe alg6 gpt1-* transformada con pREP3X, pREP3X *uggt-1*, pREP3X *uggt-2* o pREP3X *gpt1+*.

Si los niveles de actividad de CeUGGT-1 son comparables a los de de SpUGGT entonces *uggt-1* complementarían la cepa mutante *alg6 gpt1-* y observaríamos crecimiento de *S. pombe WT*, *S. pombe alg6 gpt1-* transformada con pREP3X *uggt-1* y pREP3X *gpt1+* mientras que las levaduras *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X y pREP3X *uggt-2* no podrían crecer a temperaturas donde comienzan a acumularse proteínas mal plegadas.

5) Estudiar el patrón de expresión de *uggt-1* y *uggt-2* en los distintos estadios del desarrollo de *C. elegans*

C. elegans ugg-2 podría ser un pseudogen y no ser transcrito *in vivo*. Postulamos que si bien UGGT-2 carecería de actividad de UGGT debería haber adquirido una nueva función biológica. Para ello analizaremos por Real Time PCR los niveles de expresión de *uggt-1* y *uggt-2* en L1, L2/L3, L4 y adulto. La expresión de *uggt-2* indicaría que no es un pseudogen y ambos genes se expresarían en el nematodo.

6) Determinar el patrón de expresión corporal de los genes *uggt-1* y *uggt-2* en *C. elegans*

La determinación del patrón de expresión de las proteínas UGGT-1 y UGGT-2 es importante para comprender la función biológica de las mismas. El patrón de expresión de la proteína UGGT-1 de *C. elegans* fue determinada mediante un estudio a gran escala, sin embargo no fue posible determinar el patrón de UGGT-2. En dicho estudio se muestra la expresión de CeUGGT-1 en sistema nervioso. Nuestra hipótesis es que CeUGGT-1 al ser la UGGT de *C. elegans* que participa en el mecanismo de CCPG, debe expresarse en todas las células y tejidos del nematodo para poder resguardar la homeostasis del RE ante condiciones de estrés. La expresión de UGGT-2 podría ser localizada y hallarse solo en ciertos tejidos del nematodo. Para poder determinar el patrón de expresión de UGGT-1 y UGGT-2 se harán dos tipos de construcciones. La primera consistirá en el clonado del promotor de ambos genes en el plásmido pPD95_75 (Fire). La segunda construcción implicará el clonado del gen *gfp* o *mCherry* río abajo del gen *uggt-1* o *uggt-2* respectivamente para poder conservar todas las secuencias regulatorias y los intrones. Si la proteína CeUGGT-1 se expresa en todas las células y tejidos observaríamos la presencia de GFP ubicuamente (quizá más intensamente en aquellos tejidos que posean alta síntesis proteica), mientras que la expresión de mCherry podría detectarse localizada en ciertos tejidos del nemátodo.

7) Estudiar si los genes *uggt-1* y *uggt-2* se inducen en condiciones de estrés de RE

Los niveles de expresión de las proteínas involucradas en estrés de RE aumentan en condiciones en las cuales se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del mismo. Para poder estudiar si ambos genes están involucrados en el plegamiento de glicoproteínas decidimos estudiar el incremento en la transcripción de *uggt-1* y *uggt-2* en condiciones de estrés generadas por Tunicamicina (TN). Nuestra hipótesis es que los niveles de expresión de *uggt-1* aumentan ante condiciones de estrés de RE mientras que los niveles de expresión de *uggt-2* podrían incrementarse o no, según si la actividad que desarrolla hubiera divergido de la de UGGT-1.

8) Determinar cuál es la vía de señalización de la UPR por la que se produce la inducción de la expresión de los genes *uggt-1* y *uggt-2*

Identificamos un elemento UPRE en el promotor *uggt-1*. Este elemento es el lugar donde se une el factor de transcripción XBP-1 que participa en la vía de IRE-1. Para poder estudiar si se incrementa la transcripción de *uggt-1* en condiciones de estrés involucrando a la vía de *ire-1*, analizaremos los niveles de expresión de *uggt-1* y *uggt-2* en condiciones de estrés generadas por TN en gusanos salvajes N2 o en mutantes en *ire-1*, *pek-1* y *atf-6*. Si la expresión de *uggt-1* se encuentra regulada por la vía de *ire-1*, esperaríamos que no se observe inducción de *uggt-1* en dicha mutante y sí en las mutantes de *pek-1* o *atf-6*. No encontramos en la región promotora del gen *uggt-2* secuencias UPRE, ERSE I o ERSE II, a las cuales se unen factores de transcripción que inducen la UPR, por lo que no esperamos inducción de *uggt-2* en las mutantes de la vía de UPR.

9) Investigar que efectos producen la ausencia de CeUGGT-1 y CeUGGT-2 en el nematodo

La ausencia de una proteína en un determinado organismo produce efectos fenotípicos que pueden ser severos o leves dependiendo de la importancia de la función que desempeñe dicha proteína y de la expresión de proteínas redundantes que desempeñen la misma función. Nuestra hipótesis es que la ausencia de las proteínas UGGT-1 y UGGT-2 podría generar fenotipos diferentes en los gusanos asociados a las funciones que desarrollan y los mismos podrían colaborar a dilucidar la función aún desconocida de la proteína UGGT-2. Para poder estudiar el efecto que produce la ausencia de los genes *uggt-1* y *uggt-2* se realizarán experimentos de silenciamiento génico por RNAi contra los mismos y se analizarán distintos aspectos de la biología de los mismos como el desarrollo, la supervivencia y las alteraciones morfológicas en los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)*. Esperaríamos encontrar diferencias morfológicas, diferentes curvas de crecimiento y supervivencia. También se estudiará el gusano mutante de *uggt-2*. Se estudiarán las diferencias morfológicas, las curvas de crecimiento y supervivencia para los gusanos interferidos contra cada uno de los genes. También se estudiará el gusano mutante de *uggt-2*. No se dispone de una mutante de *uggt-1* que permita realizar estudios equivalentes.

10) Estudiar los efectos biológicos de la ausencia de CeUGGT-1 y CeUGGT-2 en condiciones de estrés de RE en gusanos salvajes y en gusanos que carecen de las proteínas transductoras de las vías de señalización de la UPR en estas condiciones

El objetivo es analizar si en estas condiciones la falta de CeUGGT-1 y CeUGGT-2 ante condiciones de estrés de RE genera fenotipos más pronunciados que colaboren a

dilucidar la función que llevan a cabo cada una de ellas y la importancia de las mismas en distintos procesos. Nuestra hipótesis es que se observará un aumento de los efectos observados con RNAi en ausencia de estrés. Para comprobar dicha hipótesis, realizaremos experimentos de silenciamiento génico por RNAi contra los genes *uggt-1*, *uggt-2* o *gfp* en gusanos KP3948, hipersensibles al RNAi, en condiciones de estrés de RE provocadas con TN.

Por otro lado, también estudiaremos el efecto fenotípico en gusanos KP3948, *ire-1*, *atf-6* y *pek-1* tratados con RNAi para cada uno de los genes mencionados anteriormente en bajas concentraciones de TN para simular un bajo nivel de estrés basal (un poco mayor al que puede generarse durante el desarrollo en períodos donde se requiere de la síntesis elevada de proteínas).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

El extracto de levadura y la bactopectona fueron de Difco. El extracto de malta fue de Britania. La Endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa H (Endo H), los inhibidores de proteasa, el ditioneitol (DTT), los aminoácidos y suplementos para medios de cultivo fueron de Sigma. La [14 C]Glc (301 Ci/mol) fue de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA). La *N*-metil-1-deoxinojirimicina (NMDNJ) fue de Research Chemicals (North York, ON, Canada). Las enzimas utilizadas en procedimientos de DNA recombinante fueron de New England Biolabs (Ipswich, MA). El resto de los reactivos fueron provistos por Sigma (St. Louis, MO).

Cepas, plásmidos y primers

Durante la realización de esta tesis se utilizaron distintas cepas de bacterias, de la levadura *S.pombe* y del nematodo de vida libre *C.elegans*. En la siguiente tabla se resume las cepas utilizadas en cada caso.

Cepas

Cepa	Genotipo	Origen
Bacterias		
OP50	Auxótrofa para URA. Fuente de alimento para mantenimiento de <i>C. elegans</i>	CGC
HT115(DE3)	Transformadas con el vector L4440 vacío o con los <i>target</i> de los genes F48E3.3 y F26H9.8. También transformadas con L4440 <i>gfp</i> ("RNAi feeding")	Open Biosystems
<i>E. coli</i> STBL3	F- <i>mcrB mrr hsdS20</i> (rB-, mB-) <i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Str ^R) <i>xyl-5 λ- leu mtl-1</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA
EPI300	F <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 <i>recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL (Str^R) nupG trfA tonA</i></i>	Oliver Hobert 2009 National Cancer Institute
SW105	Derivada de la cepa DH10B-. Estas bacterias contienen un profago defectuoso λ con las proteínas recombinantes <i>exo</i> , <i>bet</i> , and <i>gam</i> siendo controladas por un represor sensible a temperatura <i>cl857</i> Genotipo: F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZ M15 ΔlacX74 <i>deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7649 galU galK rpsL nupG [λcl857 (<i>cro-bioA</i>)]</i>. También contienen un gen <i>flpe</i> controlado por arabinosa que media la recombinación entre dos sitios <i>frt</i>. A su vez, estas células se pueden utilizar para recombinación positiva/negativa mediante selección por <i>galK</i> al contener un gen <i>Flpe</i> inducible por <i>ara</i>.</i>	Oliver Hobert 2009 National Cancer Institute

S. pombe		
Sp61 (WT)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1</i>	D'Alessio et al., 1999
<i>gpt1/alg6 S. pombe</i>	(Sp61G4A (<i>h⁻, ade6-M210, ade1, leu1-32, ura4-D18, gpt1::ura4-D1684, alg6::ura4+</i>))	Fanchiotti et al.1998
<i>gpt1/alg6 S. pombe pREP3X gpt1</i>	(Sp61G4A (<i>h⁻, ade6-M210, ade1, leu1-32, ura4-D18, gpt1::ura4-D1684, alg6::ura4+</i>) Transformada con pREP3X <i>gpt1+</i>).	Fanchiotti et al.1998
<i>gpt1/alg6 S. pombe pREP3X ugg1-1 o pREP3X ugg1-2</i>	Sp61G4A (<i>h⁻, ade6-M210, ade1, leu1-32, ura4-D18, gpt1::ura4-D1684, alg6::ura4+</i>), transformada con pREP3X <i>ugg1-1 c-Myc</i> o pREP3X <i>ugg1-2 c-Myc</i>	Esta tesis
<i>gpt1/alg6 S. pombe, pREP3X (gpt1+N-ugg1-2C) o (ugg1-2N-gpt1+C)</i>	Sp61G4A (<i>h⁻, ade6-M210, ade1, leu1-32, ura4-D18, gpt1::ura4-D1684, alg6::ura4+</i>). Transformada con pREP3X <i>gpt1N-ugg1-2C c-Myc</i> o pREP3X <i>ugg1-2N-gpt1C c-Myc</i>	Esta tesis
Caenorhabditis elegans		
N2	<i>C. elegans</i> wild type, subclon DR de CB original (Tc1 patrón I).	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), Universidad de Minnesota, EE.UU.
KP3948	(<i>eri-1(mg366) IV; lin15B (n744) X</i>). Sensible para ARNi. Crecimiento de 15 a 20°C. Temperatura sensible: 25°C. Mutágeno EMS.	
RB772	[<i>atf-6 (ok551) X</i>],	
RB545	[<i>pek-1 (ok275) X</i>]	
SJ30	[<i>ire-1(zcl4) II; zcls4 V</i>]	
MT8190	<i>lin-15B(n765) nls51X</i> .	
VC1961	[<i>ugg1-2 (ok2510)/hT2[bli-4(e937) let-?(q782) qls48</i>]	<i>C.elegans</i> Reverse Genetics Core Facility at the University of British Columbia
Gusanos pPD95_75 <i>Pugg1-1</i>	Gusanos N2 transformados con vector pPD95_75 <i>ugg1-1</i> y plásmido de co-inyección <i>rol-6</i>	Esta tesis Agradezco a la Dra. Pauline Cottee por la microinyección.
Gusanos transformados con fósido WRM0610Af03 <i>ugg1-1::SL2-gfp</i>	Gusanos <i>lin-15</i> transformados con el fósido <i>ugg1-1::SL2-gfp</i>	Esta tesis Agradezco al Dr. Diego Rayes por la microinyección.

Tabla 2. Cepas de levaduras bacterias, *S. pombe* y *C. elegans* utilizadas en este trabajo.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis fueron:

Plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
PDONR TM 201	Kan ^R , vector de clonado	Invitrogen
pREP3X	Leu+, derivado del REP3	Mumberg et al Provisto por la Dra. Susan Forsburg (Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles, CA)
pCR-2.1TOPO	3.9 Kb, Promotor Lac, sitio para primer M13, LacZα ORF, MCS,	Invitrogen

	gen letal <i>ccdB</i> , resistencia a Ampicilina y Kanamicina, ori pUC y f1 ori.	
pL4440	2790 pb, promotores T7 RNAPol con orientación invertida, RNADs, inducible por IPTG, Ori, LacZ, Amp ^r , feeding	Timmons and Fire
pL4440 <i>gfp</i>	Contiene un fragmento target del gen <i>gfp</i>	Cold Spring Harbor Course
pL4440 F48E3.3	Contiene la secuencia del gen F48E3.3 para realizar RNAi	Esta tesis
pL4440 F26H9.8	Contiene la secuencia del gen F26H9.8 para realizar RNAi	Esta tesis
pPD95_75	IVSA, <i>gfpN</i> , IVSR, <i>gfpS65C</i> , IVSS, IVST, <i>gfpC</i> , IVSL, decoy. AMPR	Andrew Fire Lab
pBALU9	Promotor <i>gpd-2::NLS::gfp</i> (intronic FgF). <i>KANR</i>	Luisa Cochella (Oliver Hobert Lab)
pBALU12	Promotor <i>gpd-2::NLS::mChopti</i> (intronic FgF). <i>KANR</i>	Luisa Cochella (Oliver Hobert Lab)
Fósmido WRM0610Af03	El vector del fósmido es el pCC1FOS (Epicentre) de bajo n° de copias (1 a 5 por bacteria) hasta ser inducido. Posee el gen F48E3.3 entre otros.	Source BioScience LifeSciences
Fósmido WRM02625Ca09	Posee el gen F26H9.8 entre otros.	
Fósmido WRM0610Af03 (<i>uggt-1</i> STOP + SL2 + <i>gfp</i>)	Posee el gen F48E3.3 con su codón stop, luego una secuencia intercistronica SL2 y el gen de la <i>gfp</i> .	Esta tesis
Fósmido WRM02625Ca09 (<i>uggt-2</i> STOP + SL2 + mCherry)	Posee el gen F26H9.8 con su codón stop, luego una secuencia intercistronica SL2 y el gen de la <i>gfp</i> .	Esta tesis

Tabla 3- Plásmidos utilizados en esta tesis

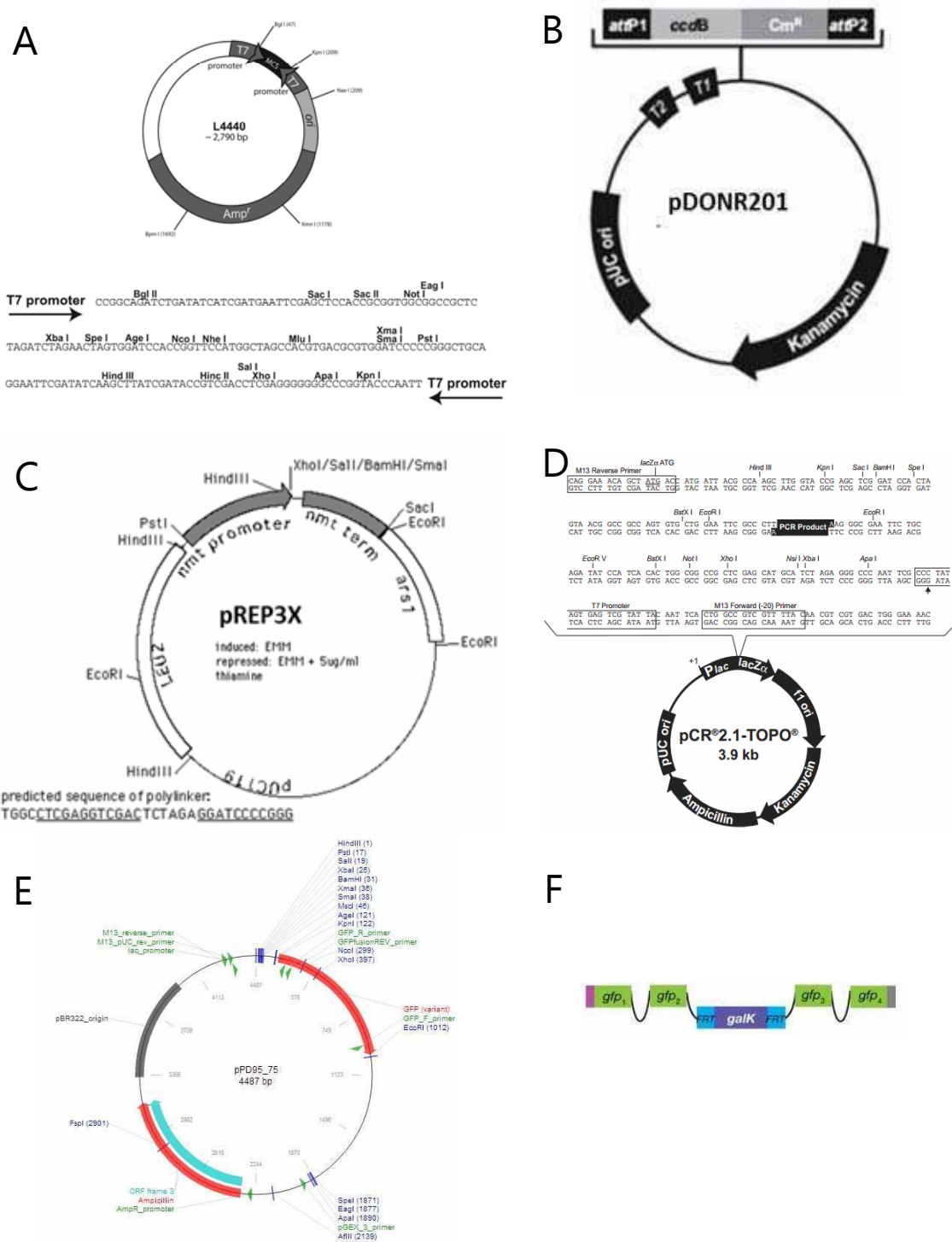


Figura 12. Vectores utilizados en este trabajo. A Mapa del plásmido pL4440 y estructura del sitio de clonación múltiple (MCS). B) Mapa circular del plásmido pDONR201 C) Mapa circular del plásmido pREP3X D) Mapa del plásmido pCR 2.1 TOPO y MCS E) Mapa del plásmido pPD95_75 F) Esquema de la GFP contenida en el plásmido pBalu9.

Primers utilizados

Nombre	Secuencia
GTp quimera Xho FWD	GACGGTCTCGAGATGAGATGGGGCTTTTGGTTTGCT
9.8 quimera Xho FWD	GACGGTCTCGAGATGCGTTTAACTCATTTCTTTTG
3.3 quimera Xho FWD	GACGGTCTCGAGATGAACTTGACTGGTCTTCTTATC
GTp N ter 9.8 C Ter FWD	TTTAATTTCAAACGTAAAGAAGCAGTTATTAACGTTTTCTCTCTTGCT
GTp N ter 9.8 C Ter REV	AGCAAGAGAGAAAACGTTAATAACTGCTTCTTTACGTTTGAAATTA
9.8 Nter GTp C ter FWD	TTTGCTTCTCCTGAACCTTCTGAATCTATAAATATTTTTCTGTTGCC
9.8 Nter GTp C ter REV	GGCAACAGAAAAAATATTTATAGATTCAGAAGGTTTCAGGAGAAGCAAA
3.3 N ter 9.8 C ter FWD	TCTTCTAAGGAAAAGACTCAAGAAGTTATTAACGTTTTCTCTCTTGCT
3.3 N ter 9.8 C ter REV	AGCAAGAGAGAAAACGTTAATAACTTCTTGAGTCTTTTCTTAGAAGA
Prom 3.3 FWD	GCCGAAGCTTACTCTTTCCACATTCCCTTTTTCTC
Prom 3.3 Rev	CAGATCCCGGGCATAATTACCTGGAAAATTG
Prom 9.8 Fwd	GCCGAAGCTTTAATGTAGCAAAATGACTTAAATAC
Prom 9.8 Rev	GCGCATCCCGGGCATTGGAGACGGGTCAAATTTAAC
act-4 FWD	TGAAGATCCTCACTGAGCGC
act-4 REV	AGCACTTGCGGTGGACAATC
act1-1008Fwd RealT	CAAGTACTCCGTCTGGATCGGA
act1-1068Rev RealT	CATCTGTTGGAAGGTGGAGAGG
ama-1 F	CCTACGATGTATCGAGGCAAA
ama-1 R	CCTCCCTCCGGTGTAAATATG
9.8idt F2	CAACATGCTTCACGAAGTTCC
9.8idt R2	GCCGAGTTCAGTTTTGGTTC
3.3 idt F4	GATTCAACGTCACTTTTAGCCG
3.3 idt R4	TTTTCCAATTCAATGTACCGAC
hsp-4 FWD	GCAGATGATCAAGCCCAAAAAG
hsp-4 REV	GCGATTTGAGTTTTCATCTGATAGG
9.8 external left	GTGACCCTTCGAAAAGTGGA
9.8 external right	TTTCAGTTTTTGGCACGTTTT
9.8 interno delección REV	CGCCTGACCACCATATAC
9.8 Fusion mCho FWD C	TCGAAAGTTTTGAATTCTGCAGATATCAACACTCCATCACCATCAGTGG ATATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAGATAACATGG

9.8 Fusion mCho REV con RDEL	GATACAGTTTAAAGAAACAAAAAATTCAAATAATGAAAAATACAGGAAAA TTATAATTCATCTCGCTTATACAATTCATCCATGCCACC
3.3 FosmidRec FWD	CTTCGGATAATGTCATTTCTGAAAATGATGACTCTCACACGGAACTTTAA GCTGTCTCATCCTACTTTCACCTAGTTAAC
3.3 FosmidRec REV	GAAACATTTTCAATAAATAACGGGTAACTTGGCATATGAAAAGATTAAT CTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
9.8 FosmidRec FWD	CTGCAGATATCAACACTCCATCACCATCAGTGGATCGAGATGAATTATG AGCTGTCTCATCCTACTTTCACCTAGTTAAC
9.8 FosmidRec REV	GATACAGTTTAAAGAAACAAAAAATTCAAATAATGAAAAATACAGGAAAA TTACTTATACAATTCATCCATGCCACC
A 3.3 Fosmid-150 FWD	AATGCTGTGCCATTGATCTG
B 3.3 Fosmid+150 REV	TTTATTGGATAGAGAGAGGC
A 9.8 Fosmid-200 FWD	GTGTGATGATGGAAGTAAAG
B 9.8 Fosmid+200 REV	ACGCAGATTATTTTATTTTG
C GalK pBalu REV	TATGCCGATGATTAATTGTC
D pBALU9 GFP FWD	GGAGAAGAACTTTTCACTGG
E pBALu9 GFP REV	CTGCCATGATGTATACATTG
D pBALU12mCho FWD	AAGGTGCATATGGAGGGATC
E pBALU12mCho REV	CTCGAAGTTTGACTTTATAA
GTp c myc BAM REV	CGCAATGGATCCTTATAATTCATCAGGCAGATCTTCTTCAGAAATAAGTT TTTGTTCAAGTTCGTCCGGAGATGAGTTG
<i>uggt-1</i> FWDRT	GATGAGAAGACAACCTTATGC
<i>uggt-1</i> REVRT	TATCATAATCAGAGTTGA
<i>uggt-2</i> FWDRT	GTAGTGTCGAATGGATTG
<i>uggt-2</i> REVRT	TGTCATAGTTCTTGCCAC
<i>gpt-1</i> FWD	AGGAATTGATGGATATGGATT
<i>gpt-1</i> REV	AAATCGATTGTTTTGGCG
<i>act-1</i> FWD	GGCTCTGGTATGTGCAAAG
<i>act-1</i> REV	CAACGTTACCGTACAAATC

Tabla 4. Primers utilizados en este trabajo.

Técnicas de *C. elegans*

Medios y condiciones de cultivo

C. elegans fue crecido a 15-20°C en medio NGM sólido compuesto por NaCl 0,3%, Bactopeptona 0,25%, Buffer KPO4 1M 2,5%, Colesterol 5mg/ml 0,1%, CaCl₂ 1M 0,1%, MgSO₄ 1M 0,1%, IPTG 0.8 M 0,125% y Ampicilina 50 µg/µl final (Estos dos últimos solo en el

caso de placas de RNAi). Para el crecimiento en medio líquido se utilizó medio S (S. Basal 100%, Citrato de potasio 1%, Solución trace metal 1%, Cloruro Calcio 1M 0,3%, MgSO₄ 1M 0,3%) con agitación a 150 rpm. Los medios sólidos se hicieron con agar 2%. Los componentes de los medios de *C. elegans* se describen a continuación:

- Buffer KPO₄ (1 l.): KH₂PO₄ 108.3 g, K₂HPO₄ 35.6g
- Colesterol (50 ml): Colesterol 250 mg, Etanol 95% c.s.p
- Basal (1 l.): NaCl 5.85 g, Colesterol (5 mg/ml) 1 ml, K₂HPO₄ 1 g.
- Citrato de potasio 1M (1 l.): Ácido Cítrico 20 g, Citrato de Potasio 293.5 g
- Solución trace metal (1 l.): EDTA disódico 1.86 g, FeSO₄ 7H₂O 0.69 g, MnCl₂ H₂O 0.2 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.29 g, CuSO₄ 5H₂O 0.025 g

Antibióticos

Antibiótico	Solución madre (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)
Kanamicina	200	25
Ampicilina	200	200 (bacterias) , 50 (<i>C. elegans</i>)
Cloranfenicol	125	12.5

Tabla 5- Antibióticos y concentraciones utilizadas.

Conservación

Los gusanos se mantienen a corto plazo en placas NGM con bacterias OP50 y se incuban a una temperatura entre 15 a 22°C. Para su conservación a largo plazo, los nematodos pueden congelarse como se indica en la referencia 165.

Preparación de bacterias como fuente de alimento para *C. elegans*

Se crecen bacterias de la cepa OP50 o de la cepa HT115 (en el caso de cultivos para RNAi) como se indica en la referencia 165.

Preparación de placas de NGM con bacterias

Para la preparación del medio NGM se siguió el protocolo de la referencia 165. Las placas se dejan secar dos o tres días a temperatura ambiente o 40 min. en flujo laminar antes de sembrarlas con bacterias para que las mismas se absorban fácilmente. Para sembrar las placas de NGM se sigue el protocolo indicado en la referencia 165. Las placas

se conservan a 5-8°C hasta su uso. Las placas para RNAi deben utilizarse en un período no mayor de 7 días ya que el IPTG se oxida.

Transferencia y visualización de *C. elegans*

El gusano adulto alcanza un tamaño de aprox. 1 mm por lo que no es posible distinguirlo a simple vista. Se utilizó una lupa Nikon 3X (magnificación total 5X a 20X).

Se utilizaron dos técnicas para transferir los nematodos de una placa a otra. La primera, llamada "chunk" consiste en cortar de la placa un trozo de agar y apoyarla boca abajo sobre una nueva placa conteniendo bacterias OP50 y de esta forma los gusanos se trasladan a la nueva placa. El otro método consiste en la utilización de un ansa de platino, llamado "pick". Este método es el utilizado en caso de necesitar seleccionar gusanos individualmente. Para mayor detalle consultar la referencia 165.

Descontaminación y sincronización de *C. elegans*

Usualmente las placas de *C. elegans* pueden contaminarse con hongos u otras bacterias que no son las utilizadas normalmente como alimento. Estos contaminantes no dañan al gusano ya que su hábitat es el suelo, pero dificultan su visualización y si son incorporadas podrían alterar la fisiología del nematodo por lo tanto las placas deben mantenerse sin contaminantes. Para ello, se siguió el protocolo indicado en la referencia 165.

Montaje de los gusanos para observación al microscopio

Precalentar a 65°C 2% de agarosa en agua, colocar una gota en el centro de un portaobjetos y aplastarla con otro portaobjetos de manera de obtener una película delgada. Dejar secar y deslizar el portaobjetos de arriba. De esta forma queda una fina capa de agarosa que servirá de "colchón" sobre la cual se colocarán los gusanos y así no serán dañados al colocar el cubreobjetos encima.

Método de "RNAi feeding"

Se utilizó la técnica de silenciamiento mediado por RNAi por alimentación. Para realizar este procedimiento, las bacterias HT115 (DE3) se transformaron con el plásmido L4440 conteniendo los ORF completos F48E3.3 (*uggt-1*) y F26H9.8 (*uggt-2*). Las mismas se utilizaron como fuente de alimento para los nematodos en las placas de NGM. El plásmido pL4440 a partir de los promotores T7 ubicados en direcciones opuestas en los extremos del MCS, permite la transcripción de RNA doble cadena (RNAds) del fragmento que se

encuentre clonado. En particular, del gen blanco del que se desea inhibir su expresión. HT115 se utiliza tanto como alimento para los gusanos como para introducir el RNAs a los mismos. De esta forma el RNAs producido por las mismas actúa inhibiendo la traducción de los mRNA específicos y por ende la expresión de las proteínas producto de dichos genes (ver introducción sección RNAi). Como se explicó anteriormente, la solución de IPTG utilizada en la preparación de las placas debe ser fresca y las mismas deben usarse en no más de 7 días para evitar la inactivación del IPTG ya que el mismo es un compuesto lábil y de fácil oxidación. Se sincronizaron los gusanos y se crecieron las L1 en las placas con RNAi hasta el estadio deseado.

Bacterias y levaduras: Medios, condiciones de cultivo y conservación

E. coli fue cultivada en medio LB (NaCl 0,5%, triptona 1%, extracto de levadura 0,5%) a 37°C con agitación (200 rpm) con ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o en ausencia de antibiótico (ver concentraciones en tabla 5) según se indica en cada caso. En todos los casos los medios sólidos se hicieron con agar 2%.

Las levaduras *S. pombe* se crecieron a 28°C (a 200-250 rpm en el caso de los cultivos líquidos), en medio rico YEA (extracto de levadura 0,5%, Glc 3%, adenina 75 mg/L) o en medio mínimo MM (KH ftalato 0,3%, Na₂HPO₄ 0,22%, NH₄Cl 0,5%, Glc 2%, con agregado de sales, minerales y vitaminas (descriptas en referencias 166 y 167). Los medios mínimos fueron suplementados con adenina (75 mg/L).

Por períodos breves las cepas se conservaron a 5-8°C. Para su conservación a largo plazo se congelaron las células en glicerol 20 % a -80°C.

Análisis bioinformático

Las secuencias de los genes *uggt-1* (F48E3.3) y *uggt-2* (F26H9.8) pueden encontrarse en la base de datos de *C. elegans* en la página www.wormbase.org. En dicha página también se encuentra toda la información disponible sobre los mismos hasta el momento como su patrón de expresión, posible actividad de los genes, interacciones predichas, etc.

Se analizó la similitud de secuencia existente entre las proteínas que codifican para los genes de UGGT de *C. elegans* y los de humanos mediante el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Para la identificación de los dominios conservados presentes en las proteínas CeUGGT-1 y CeUGGT-2, se utilizó el programa “SMART” (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Este programa permite encontrar, además de dominios conservados, otras estructuras dentro de la proteína como el péptido señal, regiones de desorden intrínseco, etc. Por otro lado, se utilizó el programa HHPRED (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) para encontrar dominios de estructura conservados en las proteínas.

Preparación de muestras

Preparación de microsomas

Para la obtención de microsomas de *S. pombe* se siguió el siguiente protocolo:

Se utilizaron cultivos en MMA en un volumen final de de 0.25 l, utilizando un inóculo de levaduras crecido a OD₆₀₀ 1 o 1.5. Se realizó una dilución 1/200 de dicho inóculo en medio fresco y se lo cultivó 14 - 24 h a 28°C, hasta que el cultivo alcanzara una OD₆₀₀= 1. Se cosecharon los cultivos por centrifugación con el rotor JA 14 en centrífugas Beckman a 3000 xg por 10 min. Se eliminó el remante de medio de cultivo resuspendiendo el pellet de células en agua fría y transvasándolas a un tubo más pequeño, para el rotor JA20. Las células resuspendidas se centrifugaron a 3000 xg durante 10 min. Finalmente, las mismas se resuspendieron en 2 ml de Solución A con inhibidores de proteasas (ver concentraciones en tabla 6) y se agregaron bolitas de vidrio de manera tal que representaran las ¾ partes del volumen obtenido. Para romper la pared y lisar las células, se utilizó el vortex a máxima potencia 20 veces por 1 min. Una vez finalizado este procedimiento, se centrifugaron las células a 3000 xg por 10 min., se tomó el sobrenadante y se lo conservó en hielo. Se resuspendió el pellet en 2 ml. más de SN A y se repitió nuevamente el procedimiento anterior. Finalmente se reunieron ambos sobrenadantes y se centrifugaron a 3000 xg por 10 min. El sobrenadante obtenido en esta última centrifugación se colocó en un tubo de ultracentrífuga y se centrifugó posteriormente a 100000 xg 1 h, al finalizar se tomó el pellet obtenido y se lo conservó en freezer a -80°C hasta el momento de su utilización. Finalmente, el pellet fue resuspendido en solución A con inhibidores a una concentración final de 20-50 mg/ml de proteínas.

Solución A: Buffer Imidazol pH 7,5 20 mM, Sacarosa 0.25M y EDTA 5mM.

	Concentración de uso
Leupeptina	10 μ M
Pepsatina	1 μ M
PMSF	1 mM
TPCK	1 mM
E-64	1 μ M

Tabla 6- Inhibidores de proteasas utilizados en la preparación de microsomas

Microsomas de *C. elegans*

Se tomaron gusanos crecidos en 4 placas de Petri grandes, se colocó 1 ml de medio S y se aspiró el medio con los gusanos con pipeta. Se colocaron en un erlenmayer con 250 ml de medio S basal. Como alimento se utilizó *E. coli* OP50. Para ello, se inoculó 1 l. de medio LB con bacterias OP50 y se cultivó O.N. a 37°C. Se cosecharon las bacterias por centrifugación en centrifugas Beckman a 6800 xg por 10 min., y se agregaron a los 250 ml. de medio S basal. Los gusanos se cultivaron 5 días a 20°C con agitación (150 rpm). Para recuperar los gusanos del medio de cultivo, se colocó el Erlenmayer en hielo con lo cual los gusanos decantaron a la base del mismo y se retiraron las bacterias que quedaron en suspensión.

El líquido remanente en el Erlenmeyer se centrifugó a 3000 xg por 5 min., los gusanos formaron un pellet denso y se descartó el sobrenadante conteniendo las bacterias. El remanente de bacterias fue eliminado resuspendiendo en medio M9 y centrifugando a 3000xg dos veces, a este procedimiento se le llamará “lavar”. Finalmente los gusanos se resuspendieron en solución A con inhibidores (concentraciones en tabla 6). La lisis de los gusanos se realizó mediante ruptura con vortex y bolitas de vidrio 30 veces por 1 min. conservando los tubos en hielo. Luego, los tubos se centrifugaron por 5 min. a 3000xg, se tomó el sobrenadante y se lo conservó en hielo. El pellet de gusanos se resuspendió en 2 ml más de Solución A, y se volvió a realizar la ruptura con vortex 15 veces más. Se tomó el sobrenadante de gusanos sin centrifugar y se sonicó 3 veces durante 20 s. en sonicador con un output de 0.4 volts y un intervalo de 10 s. Por último, se centrifugaron los tubos a 6800 xg por 7 min obteniéndose el sobrenadante con los microsomas. El sobrenadante obtenido en esta última centrifugación se colocó en un tubo de ultracentrifuga y se centrifugó posteriormente a 100000 xg 1 h, al finalizar se tomó el pellet obtenido y se lo conservó en freezer a -80°C hasta el momento de su utilización. Finalmente, el pellet fue resuspendido en solución A con inhibidores a una concentración final de 20-50 mg/ml de proteínas.

Microsomas de hígado de rata

Los microsomas de hígado de rata fueron preparados como se describe en la referencia 73.

Cuantificación de proteínas totales (Bradford)

Para la cuantificación de proteínas totales se siguió el método de Bradford, un sistema de medición espectrofotométrico ⁽¹⁶⁸⁾. Se utilizó el kit de Bradford de Biorad (Bio-Rad Protein Assay) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se realizó la medición en un lector de Elisa a OD₅₉₅.

Ensayos bioquímicos

Ensayo de actividad de Glucosiltransferasa *in vitro* utilizando TG o AG

Se utilizó el siguiente protocolo para: A) La determinación de la actividad bioquímica de UGGT en *C. elegans* utilizando microsomas de gusanos N2, B) En los ensayos realizados para la caracterización de la UGGT en *C. elegans* (con diferentes cationes, pH y aceptores), C) Para los ensayos de actividad de UGGT en animales interferidos y D) En el estudio de los dominios de las proteínas quiméricas.

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 50 µl los siguientes componentes:

Compuestos	Concentración final
Tiroglobulina o Aglutinina desnaturalizada o nativa 12.5 mg/ml	225 µg por reacción
Tris HCl 20mM pH 7.5 ^{*A}	6 mM
UDP-[¹⁴ C] Glc (295 µCi/µmol)	200.000 CPM - 3 µCi
Lubrol 5%	0.5%
CaCl ₂ 0.1 M ^{*B}	10 mM
DNJ* (deoxinojirimicina) 50mM	1 mM
Microsomas	(50-800 µg)

Tabla 7- Mezcla de incubación

*DNJ es un análogo estructural de la glucosa que funciona como inhibidor competitivo de la GII.

En los ensayos de caracterización de la UGGT de *C. elegans* se utilizó:

^{*A} Buffer imidazol (pH 8, 8.5, 9 y 9.5) o Tris-Cl (pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8)

*^B CaCl₂, MnCl₂ o MgCl₂ 0, 2.5, 5, 10 o 20 mM.

La TG fue desnaturalizada con urea 8 M como se indica en la referencia 55.

El protocolo utilizado para realizar el ensayo fue el siguiente:

Los microsomas obtenidos de la forma en que se explico anteriormente, en las concentraciones presentadas en la tabla 7, se incorporaron a la mezcla de incubación en tubos de vidrio y se dejaron en hielo. Luego, se solubilizaron los mismos con agitación, se incubó la reacción por 30 min. a la T° correspondiente y se detuvo la reacción mediante el agregado de 1 ml de TCA 10%. En el caso del tubo de tiempo cero (T0) la reacción se detuvo inmediatamente. Los tubos se incubaron a 80°C durante 5 min. hasta que se observó la aparición de un precipitado blanco que se recuperó por centrifugación (5 min. en centrífuga clínica a máxima velocidad). Se volcó el sobrenadante y se “lavó” 3 veces el precipitado de proteínas con 1 ml de TCA 10%. El precipitado se resuspendió en 500 µl de hidróxido de Hiamina y se calentó a 65°C para completar la solubilización. Una vez solubilizada la mezcla, se agregaron 10 µl de ácido acético glacial para disminuir el pH y que no interfiera con la reacción. La radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido utilizando 2.5 ml de Tolueno PPO como mezcla centelleadora.

Ensayo de actividad de Glucosiltransferasa *in vivo*

Se realizó el ensayo utilizando células *S. pombe alg6/gpt1-* transformadas con pREP3X-*uggt-1*, pREP3X-*uggt-2* y pREP3X*gpt1+* y se marcaron las mismas con [¹⁴C]Glc. Para ello, se cultivaron 250 ml de células de *S. pombe* anteriormente mencionadas hasta la fase exponencial (OD₆₀₀ 1) se resuspendieron en 40 ml de YNB 1% (Difco) y se centrifugaron; este procedimiento se repitió 3 veces. Se obtuvo aproximadamente 1 g. de células de cada una de las cepas. Las células se resuspendieron en 1% YNB con DTT 2.5 mM y se incubaron 5 min. a 24 o 28°C en un volumen total de 2 ml de YNB y 3.6 mM 1-deoxinojirimicina (DNJ). Se agregaron 100 µl de YNB conteniendo 150 µCi de [¹⁴C]Glc (301 Ci/mol) y 50 mM de glucosa y se incubaron las células durante 20 min. a 24 o 28°C según corresponda. La reacción se detuvo mediante el agregado de 4 ml de metanol y 6 ml de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y luego se centrifugó a baja velocidad obteniéndose una interfase que se “lavó” 3 veces con 2 ml de metanol y 1 ml de agua. El extracto de proteínas obtenido se digirió con 50 mg de pronasa (una mezcla de proteinasas aisladas de *Streptomyces griseus*) O.N. a 37° C en una mezcla conteniendo 3ml de Tris 150 mM pH 8 y CaCl₂ 5mM. Una vez terminada la digestión, la mezcla fue concentrada a un

volumen final de 0.5 ml, se centrifugó a baja velocidad para eliminar los restos sólidos remanentes y el glicopéptido se separó del resto de los componentes marcados a través de una columna de Sephadex G10 equilibrada con 2-propanol 7%. El material obtenido en el volumen de elusión fue sometido a electroforesis en papel en ácido fórmico 10% por 3 h. a 25 V/cm. Las sustancias cargadas positivamente que migraron entre 8 y 20 cm hacia el cátodo fueron eluidas y tratadas con EndoH (una enzima recombinante que digiere entre las dos N-acetilglucosaminas del N-glicano) liberando el oligosacáridos de la Asparagina. La digestión se llevo a cabo en 250 µl de buffer acetato de trietilamina 50 mM pH 5.5 por 16 h. a 37°C. Los productos obtenidos en esta reacción se sometieron nuevamente a una electroforesis en papel en ácido fórmico 10% por 3 h. y luego se eluyeron del papel (el pico neutro corresponde a los oligosacaridos EndoH sensibles que no migraron y permanecieron en el origen). Los compuestos obtenidos se analizaron por una cromatografía en papel Whatman 1 en solución: **(A)** 1-propanol/nitrometano/agua (5: 2: 4)

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó según se describe en la referencia 47 y los compuestos se analizaron por cromatografía en papel utilizando el solvente **(B)** que contiene: 1-butanol/piridina/agua (10:3:3).

Caracterización del oligosacáridos *in vitro*

Se determinó la estructura del oligosacárido y la presencia de glucosa radioactiva en el mismo mediante un ensayo de actividad *in vitro*, en el cual se estudió la actividad de UGGT en microsomas de *C. elegans* y en microsomas de *S. pombe alg6 gpt1-* transformados con pREP3X *uggt-1* y pREP3X *uggt-2*. Para ello se realizó el protocolo siguiente:

Compuestos	Concentración final
Tiroglobulina desnaturalizada (90 mg/ml)	3 mg/ ml
Tris Maleato 50 mM pH 7.5	5 mM
UDP-[¹⁴ C] Glc (325 µCi/µmol)	1 µCi ---9 µM
Triton X-100	0.6%
CaCl ₂ 0.1 M	10 mM
NMDNJ (1-deoximanojirimicina) 50mM	5 mM
Microsomas	(6.5mg)

Tabla 9- Compuestos utilizados para el ensayo *in vitro*.

Las mezclas de reacción contenían un volumen final de 1 ml y las incubaciones se realizaron a 24°C (en el caso de *C. elegans* y *S. pombe*) y 37 °C (para el caso de microsomas de hígado de rata), por 30 min. La reacción se detuvo mediante el agregado de 3 volúmenes de metanol y se incubó a 50 °C durante 5 min para favorecer el proceso.

El precipitado de proteínas obtenido se trató como en el caso de la medición de la actividad *in vivo* en levaduras descrito en la sección "Ensayo de actividad de Glucosiltransferasa *in vivo*". Se obtuvieron los oligosacáridos EndoH sensibles y se analizaron por cromatografía en papel con solvente (A).

Clonados

Clonado y expresión de *uggt-1* y *uggt-2* en células *S. pombe gpt1/alg6*

Se sintetizaron versiones optimizadas (GenScript - Piscataway, NJ) de los ORFs F48E3.3 (*uggt-1*) (Cromosoma X: 7500939-7495639) y F26H9.8 (*uggt-2*) (Cromosoma I: 9317728-9327204) para la expresión en levaduras. Las secuencias de *uggt-1* y *uggt-2* fueron optimizadas en el uso de codones incrementando el "Índice de Adaptación de Codones" (Codon Adaptation Index-CAI) de 0.66 a 0.92 para *uggt-1* y de 0.70 a 0.92 para *uggt-2*. La frecuencia de utilización óptima de codones se incrementó de 48 a 86 % para *uggt-1* y de 56 a 87 % para *uggt-2*. El contenido de GC y los picos desfavorables fueron optimizados para prolongar la vida media de los mRNA. Se rompieron los enlaces que pueden formar hélices en la estructura del mRNA y así alterar la unión ribosomal y la estabilidad del mensajero. Estas secuencias optimizadas fueron clonadas en el vector de expresión pREP3x (LEU2) en *S. pombe alg6 gpt1*- bajo el control del promotor *nmt*. Los plásmidos fueron introducidos por electroporación en células *S. pombe alg6/gpt1*- y las transformantes fueron seleccionadas en placas de MM Adenina conteniendo 15 µM de tiamina. Un valor CAI de 1 es considerado perfecto en el organismo deseado y un valor CAI > 0.9 es considerado muy bueno. El valor CAI obtenido para ambos genes es 0.92, por lo que los niveles de expresión de ambos genes deberían ser muy buenos.

Agregado de una etiqueta c-Myc

Para el agregado de la etiqueta de c-Myc en el extremo C-terminal de UGGT-1 y UGGT-2 se realizó el siguiente procedimiento:

Se realizó una PCR en la cual se utilizó como templado DNA de los plásmidos pREP3x *uggt-1* y pREP3x *uggt-2* conteniendo las versiones optimizadas (Genescript) y se utilizaron los primers:

- 3.3 quimera Xho Fwd y 3.3 BamHI c-Myc Rev para *uggt-1*
- 9.8 quimera Xho Fwd y 9.8 BamHI c-Myc Rev para *uggt-2*

El fragmento de PCR obtenido de esta PCR se clonó en el vector PCR Topo 2.1 siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se subclonó en los sitios Xho-BamHI presentes en el MCS del vector pREP3X.

Construcción de proteínas quiméricas

A fin de determinar la funcionalidad de los extremos N y C terminales de la proteína UGGT-2, se realizaron proteínas quiméricas combinando el extremo N terminal de *S. pombe* con el C-terminal de CeUGGT-2 y también se realizó la construcción inversa. Para ello se clonaron las secuencias correspondientes en el vector pREP3X:

- A) *Spgpt1*+ N terminal- *uggt-2* C terminal c-Myc (Quimera A)
 B) *uggt-2* N terminal - *Spgpt1*+C terminal c-Myc (Quimera B)

Para realizar dichas construcciones se realizaron dos PCR. Una primer PCR para obtener la región de DNA correspondiente al extremo N terminal y la región correspondiente al extremo C terminal por separado, y una segunda PCR donde se fusionaron los extremos generados (Fig. 13).

En la primer PCR se utilizó como templado el vector pREP3X-*uggt-2* y pREP3X-*gpt1+* y los primers:

Extremo N-terminal de A: GTp quimera Xho FWD/ GTp N ter 9.8 C ter REV

Extremo C-terminal de A: GTp N ter 9.8 C Ter FWD /9.8 c-Myc BAM REV

Extremo N-terminal de B: 9.8 quimera Xho FWD (Primer 1 en fig. 13)/9.8 Nter GTp C ter REV(Primer 2 en fig. 13)

Extremo C-terminal de B: 9.8 Nter GTp C ter FWD (Primer 3 en fig. 13) / GTp c-Myc BAM REV (Primer 4 en fig. 13)

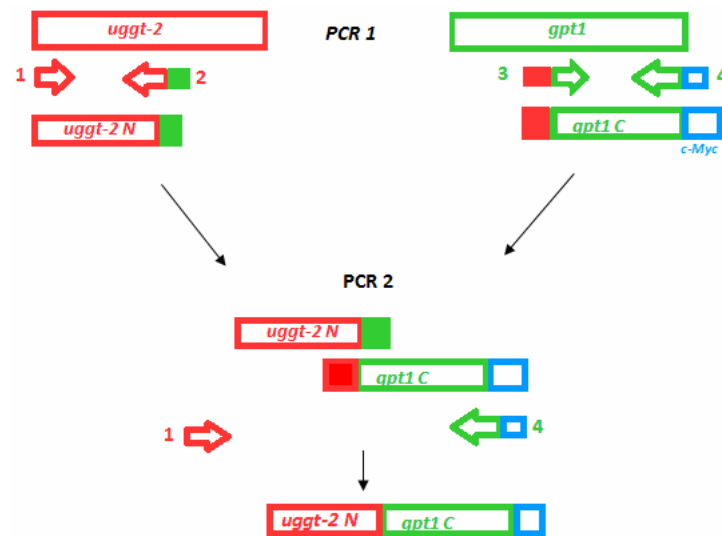


Fig. 13- Ejemplo de la construcción de la quimera **(B)** *ugg-2 N/gpt1C*

Se purificaron los fragmentos obtenidos en la primer PCR y se utilizaron como templado para una segunda PCR con los primers:

A) GTP quimera Xho FWD y 9.8 c-Myc BAM REV

B) 9.8 quimera Xho FWD (Primer 1 Fig. 13) y GTP c-Myc BAM REV (Primer 4 fig. 13)

Cabe aclarar que los primers que contactan los extremos N y C terminales poseen extremos de 20 pb protuyentes, de manera de que los productos de PCR obtenidos posean 40 pb que se solapan entre sí para poder producir una PCR de fusión y obtener de esta forma la quimera correspondiente. Luego se purificaron los fragmentos de PCR conteniendo la quimera deseada, se clonaron en el vector TOPO 2.1 según las instrucciones del fabricante y finalmente se subclonaron al vector pREP3X.

Construcciones reporteras utilizadas para estudiar la expresión de los promotores de *uggt-1* y *uggt-2*

Se amplificaron mediante PCR las regiones promotoras de los genes *uggt-1* y *uggt-2* de *C. elegans* clonados en el vector pDONR P4-P1R por el proyecto Promoterome (*C. elegans* promoter library) de Open Biosystems⁽¹⁶⁹⁾ con los primers Prom 3.3FWD- Prom 3.3REV y Prom 9.8FWD-Prom 9.8REV respectivamente. Estas regiones corresponden al espacio que hay entre el final de un gen y el comienzo del siguiente. El primero corresponde a una región de 300 pb río arriba del ATG iniciador del gen *uggt-1* y el segundo corresponde a una región de 2000 pb río arriba del ATG iniciador del gen *uggt-2*. Los fragmentos de PCR correspondientes a ambos promotores fueron amplificados mediante la polimerasa (Hot start

KOD, Roche) y clonados en el MCS del vector pPD95.75 (Addgene) río arriba de la secuencia codificante de la GFP para generar Promotor *uggt-1::gfp* y Promotor *uggt-2::gfp*. Las construcciones fueron microinyectadas a 50–75 ng/μl en la gónada sincicial de adultos jóvenes N2 junto con 100 ng/μl del plásmido pRF4 conteniendo el gen dominante *rol-6* (su1006) ⁽¹⁷⁰⁾. Se agradece a la Dra. Pauline Cottee por haber realizado las microinyecciones. Se obtuvieron varias líneas de nematodos conteniendo el marcador de co-transfección *rol-6* y se estudió en los mismos la expresión de GFP. Los gusanos que dieron origen a líneas estables se visualizaron mediante microscopía confocal según se describe en la sección “Microscopía Confocal”.

Construcción de *uggt-1::gfp* y *uggt-2::mCherry* mediante la técnica de recombinación de fósmidos

Esta técnica se basa en la inserción de la secuencia de una proteína fluorescente río arriba del gen de interés en un fragmento de DNA de gran tamaño llamado fósmido. La inserción puede realizarse en fase removiendo el codón STOP lo que genera una proteína de fusión fluorescente, o bien puede realizarse luego del codón STOP mediante una secuencia intercistronica llamada SL2 por lo que se generan dos proteínas independientes reguladas mediante el mismo promotor. Esta última estrategia es utilizada para proteínas cuyo destino final es algún compartimento subcelular, donde la fusión podría afectar su localización o plegamiento, por lo que fue utilizada en esta tesis dadas las condiciones oxidantes presentes en el RE que pueden generar enlaces disulfuro no nativos. De esta forma se puede estudiar la expresión del gen de interés teniendo todas las secuencias regulatorias del mismo incluyendo el 3`UTR del propio gen.

La construcción del fósmido se realizó siguiendo el protocolo indicado en la referencia 171. Básicamente, la técnica implica la recombinación de un fragmento de PCR con extremos homólogos al gen, que contiene tanto la proteína fluorescente como un cassette de FRT-galK-FRT, mediante la λ Red recombinasa en el contexto genómico del fósmido. (ver primer panel figura 14). Una vez insertado este cassette en la posición correspondiente (ver tercer y cuarto panel en fig 14) se induce con arabinosa una Flp recombinasa que remueve el cassette de GalK y de esta forma deja el gen fusionado a la secuencia de la proteína fluorescente o bien sin fusionar mediante un SL2 (ver último panel fig. 14 y Fig. 15).

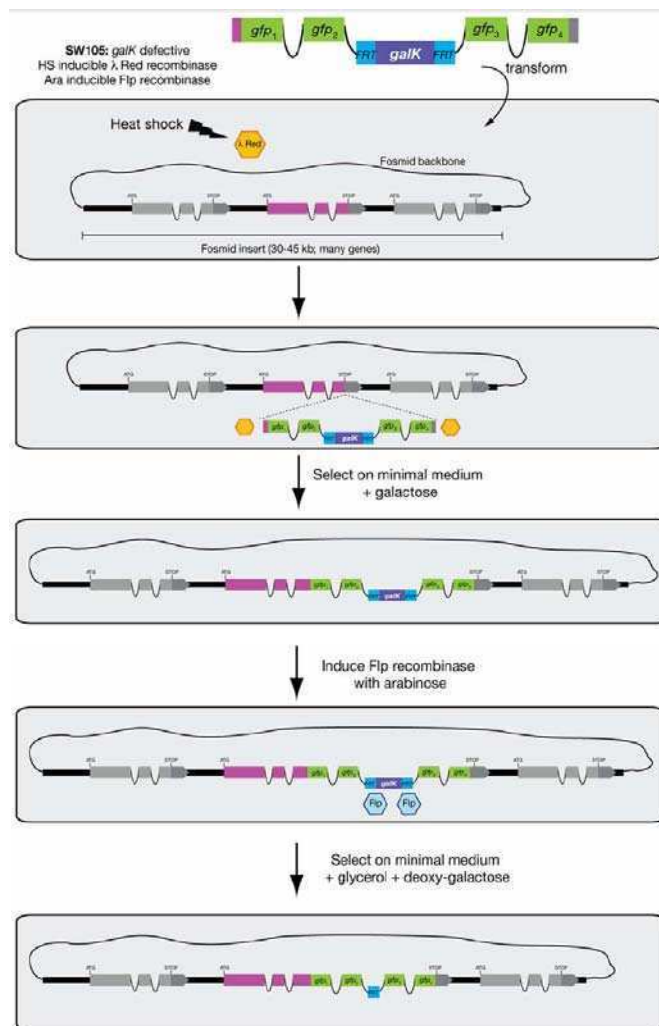


Fig. 14- Esquema de la técnica de recombinación de fósmidos para generar una proteína de fusión

Se prepararon bacterias competentes SW105 (una cepa de *E. coli* que induce la λ Red recombinase con calor) y se transformaron con los fósmidos WRM0610aF03 y WRM02625cA09. Luego se prepararon bacterias competentes SW105 transformadas con los fósmidos (induciendo la recombinasa presente en dicha bacteria). Se realizó una PCR utilizando los plásmidos pBalu9 (para *uggt-1*) y pBalu12 (para *uggt-2*) como templado a fin de obtener la secuencia de *gfp* y *mCherry* respectivamente. Se utilizaron los primers 9.8 fosmid Rec FWD-9.8 Fosmid Rec Rev para levantar la *mCherry* del pBalu12 y 3.3 Fosmid Rec Fwd- 3.3Fosmid Rec Rev para levantar el ORF del gen *gfp* del pBalu9. Los fragmentos de PCR obtenidos presentan 50 pb homólogos a las presentes en los fósmidos para insertar la secuencia de la proteína fluorescente en la zona de interés.

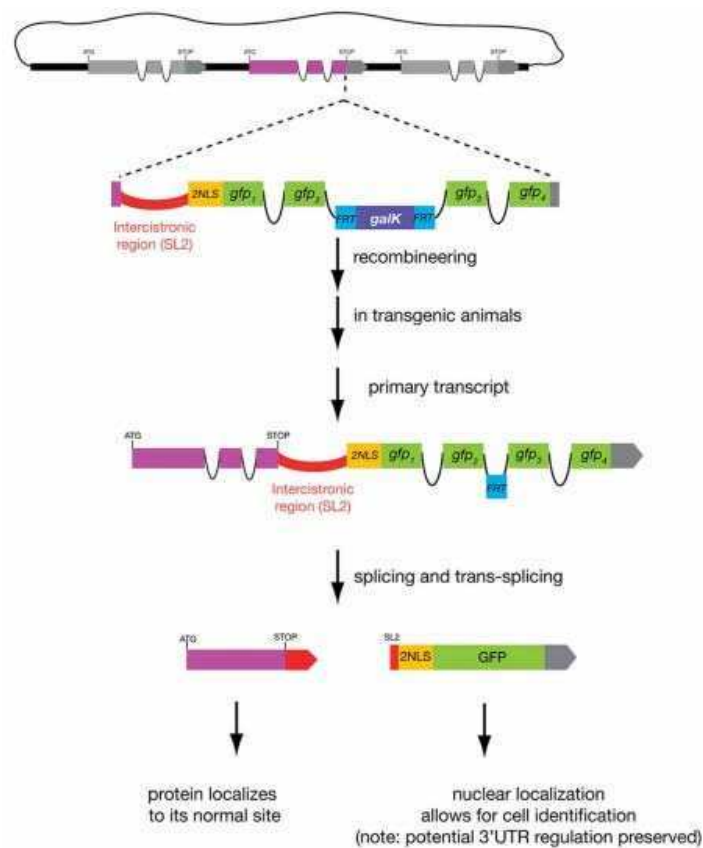


Fig. 15- Esquema de la técnica de recombinaison de fósidos para estudiar la expresión de la proteína de interés sin fusionar la proteína fluorescente. Se debe conservar el codón STOP y se utiliza una secuencia intercistrica SL2 y una señal de localización nuclear (NLS) que facilita el reconocimiento de las células del nematodo en la cual se expresa la proteína fluorescente.

Se transformaron las bacterias con su respectivo fragmento de PCR y se sembraron en MMgal + Cloranfenicol y se dejaron crecer las bacterias durante 10 d para obtener transformantes. Las placas fueron preparadas con Agar Britania (para evitar el crecimiento de bacterias que no poseen el cassette de GalK, ya que otros agar producen crecimiento de bacterias inadecuado al poseer sustancias que pueden ser utilizadas como fuente de carbono). Aquellas colonias que crecieron en MMgal + Chl fueron pasadas a Medio Mac Conkey y se seleccionaron aquellas rojas (las bacterias con actividad galactokinasa cambian el pH del medio y lo tornan rojo), por lo que se seleccionan aquellas colonias que poseen el cassette de GalK y por lo tanto la *gfp* o *mCherry*. Se estudió la presencia de las construcciones con los primers 3.3 Fosmid-150Fwd/galk pBaluRev y 9.8Fosmid-200FWD/galk pBaluRev. Una vez comprobado que los plásmidos contenían la secuencia correspondiente, se eliminó el cassette de galK creciendo las células en medio LB con arabinosa 10% a 32°C. Las colonias que crecieron en este medio fueron analizadas por

Colony PCR con los primers pBalu9GFPFwd/ pBalu9GFPRev y PBalu12mChoFwd/ pBalu12mChoRev para confirmar que hubiesen eliminado el cassette *Galk* correctamente (dando como producto un fragmento de 1880pb si contiene *galK* y un producto de 1257 pb si el mismo fue eliminado). Por último se transforman bacterias EPI300 con el DNA del fósido correspondiente.

Mediante esta técnica se generaron bacterias que poseen las siguientes construcciones:

Fósido WRM0610aF03: ORF F48E3.3 (*uggt-1*)STOP + SL2 + GFP

Fósido WRM02625cA09: ORF F26H9.8(*uggt-2*)STOP + SL2 + mCherry

Las construcciones fueron microinyectadas a 50–75 ng/μl en la gónada sincial de adultos jóvenes *lin-15* junto con 100 ng/μl del plásmido conteniendo el gen *lin-15* (los gusanos *lin-15* poseen un fenotipo multivulva que es revertido cuando los mismos son transformados con el plásmido conteniendo el gen *lin-15*). Se agradece al Dr. Diego Rayes por haber realizado las microinyecciones y al Dr. Mark Alkema por haber puesto a disposición su laboratorio en UMASS, Massachusetts. Se crecieron varios adultos conteniendo el marcador de co-transfección *lin-15* y se estudió en los mismos la expresión de GFP o mCherry. Los gusanos que dieron origen a líneas estables se visualizaron mediante microscopía confocal de la forma en que se describe en la sección “Microscopía Confocal”.

Secuenciación

Las diferentes muestras de DNA se obtuvieron por extracción con el KIT “Wizard Miniprep” (Promega) y se secuenciaron en un secuenciador automático ABI 377. Para el análisis de las secuencias se empleó el programa uber Genious 3.6.1.

Procedimientos con DNA

Preparación de DNA genómico de levaduras *S. pombe*

Cultivos en fase exponencial ($OD_{600} = 2$) se cosecharon por centrifugación a 6.000 xg durante 5 min y las células se resuspendieron en 0,2 ml de agua. Se agregaron 0,2 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y luego 0,2 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Las células se rompieron por agitación en vortex en presencia de 300 mg de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro, luego se agregaron 0,2 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) y se volvió a

agitar con vortex. La muestra se centrifugó a 10.000 xg y se recuperó la fase acuosa a la cual se le agregó 1 ml de etanol 100% para precipitar el DNA, se centrifugó, el pellet obtenido se resuspendió en 0,4 ml de buffer TE conteniendo 3 µg de RNasa A. La mezcla se incubó 5 min a 37°C y luego se agregó un volumen de cloroformo, se centrifugó a 10.000 xg durante 5 min y se conservó la fase acuosa. El DNA se precipitó agregando 1 ml de etanol 100% y 10 µl de NH₄Ac 4 M. Posteriormente se centrifugó el eppendorf, se lavó el pellet con etanol 70% y luego se resuspendió en 20 µl de agua libre de DNAsas.

Extracción de DNA plasmídico y de fósmidos

Plásmidos: La preparación de DNA plasmídico en bacterias se realizó mediante el método de lisis alcalina que se describe en la referencia 172.

Fósmidos: Para la extracción de DNA de fósmidos se realizó la lisis alcalina descrita anteriormente utilizando 4ml de P1, P2 y P3⁽¹⁷²⁾ (esta última fría), se incubó la reacción en hielo 5 min. y luego se centrifugó a 1000 xg. El sobrenadante fue transferido a un tubo de vidrio que fue centrifugado por 15 min a 15000 xg. Luego de esta primera centrifugación, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, se incubó el mismo 30 min a -20°C y por último se centrifugó a 15000 xg por 15 min. El sobrenadante remanente fue eliminado y luego resuspendido en 500 µl de buffer TE (en eppendorf). El DNA del fósmino obtenido fue sometido a un tratamiento con RNasa por 15 min y luego se agregaron 500 µl de NH₄OAc, se mezcló el tubo por inversión varias veces y se incubó en hielo 20 min. Luego, el tubo fue centrifugado a velocidad máxima y el sobrenadante que contiene el fósmino se colecta en un nuevo tubo. Posteriormente, se colocó 0.6 volumen de isopropanol y la reacción se incubó a -20°C por 20 min. El pellet de DNA obtenido luego de una centrifugación de 10 min en frío, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100 µl de agua libre de DNAsas.

Reacciones de PCR

Para los clonados, se utilizó la polimerasa KOD Hot Start DNA de Novagen (MERCK). La misma está constituida por una mezcla de un complejo de KOD DNA polimerasa de alta fidelidad junto con dos anticuerpos monoclonales que inhiben la DNA polimerasa y la actividad 3`-5` exonucleasa a temperatura ambiente. La KOD es una enzima de alta fidelidad, alta procesividad y rápida extensión que permite amplificar fragmentos de DNA de gran tamaño (12 y 20 Kbp).

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo:

Componente	Volumen	Concentración final
Buffer KOD Hot Start DNA	5 µl	1X
Polymerase 10X		
SO ₄ Mg 25 mM	4 µl	2 mM
Primer Forward (10 µM) *	2.5 µl	0.5 mM
Primer Reverse (10 µM) *	2.5 µl	0.5 mM
dNTPs (2 mM cada uno)	5 µl	0.2 mM c/u
KOD polimerasa	0.8 µl	0.016 U/µl
DNA molde	4-8 µl	
H ₂ O	csp	
TOTAL	50 µl	

*Los primers variaron de acuerdo a la reacción y al gen a amplificar:

El ciclado de la PCR se realizó de la siguiente manera: En una primera etapa, el templado fue desnaturalizado a 95°C por 5 min, proceso mediante el cual también se degradan los anticuerpos de la KOD. Dependiendo de la PCR se realizaron entre 30 y 33 ciclos. En una segunda etapa cuando comienza el ciclado propiamente dicho el proceso se realiza de la siguiente manera: Desnaturalización a 95°C por 50-60 s / hibridación a 50-56°C por 50-60 s / extensión a 70°C por 1-3 min. Luego de 30 ciclos se incubó por 2 min adicionales a 70°C y los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa 1% en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8). Los fragmentos de DNA se recuperaron del gel con el Kit de Quiagen.

Clonado al TOPO vector: Los fragmentos de PCR obtenidos de la forma en que se explicó anteriormente, presentaban extremos romos. Por tal motivo, se le agregaron Adeninas en los extremos romos mediante un "tailing" para poder clonaras al Topo vector (TOPO 2.1 Invitrogen). El procedimiento fue el siguiente: Se incubó una mezcla conteniendo 2µl de buffer TAQ 10X, 1.2 µl MgCl₂, 0.4 µl dATP, 16 µl de fragmento de DNA y 1µl de TAQ DNA polimerasa por 30 min a 72°C. Luego, los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pCR TOPO 2.1 colocando 4µl de templado del "tailing", 1µl de sales diluidas y 1µl de TOPO 2.1 y se lo incubó 30 min a T° ambiente. Se transformaron bacterias electrocompetentes *E. coli* STBL3, se recuperaron en LB y las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas LB AMP.

“Colony” PCR de *E. coli* y *S. pombe*: Se resuspendió una colonia aislada de bacteria o levadura *S. pombe* en 50 μ l de la mezcla de reacción de PCR (dNTPs 0,2 mM c/u, Buffer TAQ Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM y 1 μ M de cada oligonucleótido-primer). El ciclado se realizó de la misma manera que se explicó para las Reacciones de PCR pero se elevó el tiempo inicial de desnaturalización a 10 min. En el caso de las colonias de *S. pombe*, las mismas fueron incubadas previamente 5-10 min a 100°C en 50 μ l de NaOH 20 mM y se tomaron 2 μ l como templado para la PCR.

Worm PCR

Se colocaron entre 15 y 20 gusanos en 25 μ l de buffer de lisis de gusanos (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40 (IGEPAL), 0.45% Tween-20, 0.01% gelatina) y se le agregó 1 μ l de Proteinasa K 20 mg/ml. Se centrifugó por 15 s y se congelaron los gusanos en N₂ líquido para facilitar su ruptura. La mezcla se incubó a 65°C por 90 min y luego a 95°C por 15 min. Se utilizaron 3 μ l de la reacción para la realización de la PCR.

Métodos de RNA y Real Time PCR

Preparación de RNA de levaduras y RT-PCR

Se crecieron 5 ml de *S. pombe alg6/gpt1*- transformadas con las construcciones pREP3X-*uggt-1*, pREP3X-*uggt-2* o pREP3X-*gpt1+* en MMA hasta OD₆₀₀ 1. Las células utilizaron para preparar RNA total utilizando el KIT "Qiagen RNeasy extraction kit" como indica el protocolo del fabricante. Se trató 1 μ g de RNA total con RQ1 RNase free DNase (Promega) en buffer 5 mM MgCl₂ y 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, a 37 °C por 30 min y se inactivó la enzima incubando la mezcla 15 min a 75°C. El RNA obtenido se utilizó como templado para sintetizar cDNA con la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante fue utilizado como templado para una reacción de PCR (4 min a 94°C, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 53°C, 1 min a 72°C y 10 min a 72°C) usando "hot start Platinum Taq DNA polymerase" (Invitrogen). Los primers utilizados para la síntesis de cDNA fueron los siguientes: para *uggt-1* OPT: *uggt-1*FWDRT y *uggt-1*REVRT; para *uggt-2* OPT: *uggt-2*FWDRT y *uggt-2*REVRT; para *gpt1*: *gpt1*FWD y *gpt1*REV; para *act-1*: *act-1*FWD y *act-1*REV.

Preparación de RNA de *C. elegans*

Para la preparación de RNA se utilizaron diferentes cantidades de gusanos crecidos en placas de NGM: 6000 gusanos para estadio adulto, 8000 gusanos L4, 10000 gusanos para L2/L3 y 24000 gusanos para L1. Se cosecharon los gusanos y se realizaron 3 "lavados" con medio M9. Se preparó el RNA mediante el KIT " Qiagen RNeasy extraction kit" siguiendo el protocolo del fabricante de preparación de RNA de levaduras con pequeñas modificaciones para adaptarlo a *C. elegans*. Para ello se colocó la cantidad de gusanos indicada en cada caso en tubos con tapa a rosca conteniendo bolitas de vidrio estériles con buffer RLT (buffer de lisis de Quiagen) y 10 μ l de β -mercapto etanol. Los gusanos se sometieron a 3 ciclos de ruptura de 25 s c/u a máx. potencia en el homogenizador de tejidos "Precellys" (Bertin technologies) y se colocó 1 min en hielo entre cada ruptura. El lisado se transfirió a un nuevo tubo, se centrifugó 2 min a velocidad máxima para descartar el pellet de gusanos, se transfirió el sobrenadante que contiene el RNA a un nuevo tubo, se agregó 0.25ml. de etanol 75% y se mezcló con pipeta suavemente. La muestra fue transferida, incluyendo precipitados, a una columna de sílica y se centrifugó a 8000 xg durante 2 min. a temperatura ambiente. Se descartó el percolado y se realizaron dos lavados con 500 μ l de RPE (Quiagen) con etanol agregado, luego se centrifugó 1 min. para eliminar toda la humedad de la columna y por último se eluyó el RNA total en un tubo estéril libre de RNAsas. Se corrió el RNA en un gel de agarosa 1% en MOPS 1X (MOPS 5X: MgSO₄ 10mM, MOPS 0.5M, NaCl 2.5M) y se determinó la concentración de RNA en cada muestra utilizando un Nanodrop.

Preparación de cDNA

Se utilizó 1 μ g de RNA total como templado en todas las preparaciones de cDNA. El RNA fue tratado con 1 μ l de RQ1 DNAsa (Promega) en 5 mM MgCl₂ y 50 mM Tris-HCl a pH 8.0 por 30 min. y se inactivó la enzima incubando la mezcla a 75°C por 15 min. Se reservó 1 μ l de dicha reacción para utilizar posteriormente como control de la efectividad del tratamiento de DNAsa en una PCR. El resto de la reacción se utilizó para realizar la transcripción reversa (RT) con la enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para analizar la eficiencia de la síntesis del cDNA, realizó una PCR en la que se utilizó como templado 1 μ l de la reacción obtenida y los primers *act-4* FWD y *act-4* REV.

Análisis por Real Time PCR

Se realizó una dilución 1/10 del cDNA obtenido (aprox. 0.1µg) y se realizó la Real-time PCR (Stratagene MX300 sp), utilizando la polimerasa Hot start Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), SYBR Green y ROX (Invitrogen) como fluoróforos.

La mezcla de reacción es la siguiente:

Componentes	1X (µl)
Agua	8.3
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 50mM	1
dNTPs 10mM	0.5
ROX [1/10]	0.3
SyBR Green 1/1000	1
glicerol 30%	4.2
Taq Platinum	0.2
<hr/>	
X Reaccion	18ul
(1ul 10uM stock c/u) +	2 µl primers
	+ 5 µl cDNA
<hr/>	
Vf	25 µl

Se selecciona en el programa de Real Time: Comparative Quantitation, fluoróforos: ROX, SyBR. Programa: 1 plateau, 3 steps, dissociation-melting.

Se analizaron tres muestras biológicas independientes en cada experimento. Como control se utilizó el gen *ama-1*. Los primers utilizados para la reacción fueron (ver tabla 4):

Para *uggt-1*: 3.3 idt F4 y 3.3 idt R4

Para *uggt-2*: 9.8idtF2 y 9.8 idt R2

Para *hsp-4*: *hsp-4F* y *hsp-4R*

Para *ama-1*: *ama-1F* y *ama-1R*.

Análisis de expresión de proteínas

Análisis de la expresión de las proteínas expresadas por Western Blot

Se analizaron de 80 a 300 µg de proteínas microsomales de cada una de las cepas en geles de poliacrilamida 8%. La presencia de las proteínas UGGT-1c-Myc, UGGT-2c-Myc y las proteínas quiméricas fue revelada utilizando un anticuerpo monoclonal hecho en conejo que

reconoce la etiqueta c-Myc. Las proteínas microsomales fueron resuspendidas y solubilizadas en “cracking buffer” desnaturizante y reductor (glicerol 40%, Tris/HCl 240 mM pH 6.8, SDS 8%, azul de bromofenol 0.04%, beta-mercaptoetanol 5% y DTT) y solubilizadas mediante una incubación a 100°C durante 5 min. para completar su desnaturalización. Las muestras se corrieron en un gel separador 8% a 120 V durante 1 h y luego se transfirieron las proteínas en un sistema de transferencia seca 1 h a 95 mA. La membrana se bloqueó con leche descremada 5% durante 1 h a T° ambiente y luego se incubó O.N. con una dilución 1/1000 del anticuerpo anti c-Myc (Sigma) (producido en conejo). La membrana se lavó con TBS (Tris-Cl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM) y luego se incubó con Anti- IgG de conejo conjugado a preoxidasa (HRP) (Sigma) durante 2 h. Para el revelado de la reacción se utilizó el KIT de quimioluminiscencia de Pierce TM. El revelado se realizó de forma manual.

Preparación de células competentes y transformación

Transformación de bacterias *E. coli*

Preparación de *E. coli* electrocompetentes: A partir de un cultivo estacionario de *E. coli* en medio LB crecido a partir de una colonia única se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 1 l de medio LB y se incubó a 37°C durante aprox. 2 h. adicionales hasta una OD₆₀₀= 0.6 o 0.8. Luego se colocó el cultivo en hielo durante 10 min y se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6.000 xg durante 5 min. Las células se “lavarón” una vez con agua estéril y dos veces con glicerol 10% y luego se resuspendieron en 2 o 3 ml de glicerol 10% y se conservaron a -80°C en alícuotas de 100 µl.

Electroporación: Las células fueron electroporadas con aprox. 200 ng de DNA plasmídico, con electroporador de BioRAD a 1,5kV, 200 Ohm y 25 µF.

Transformación de levaduras *S. pombe*

Preparación de *S. pombe* competentes: Se crecieron células de *S. pombe* en YEA hasta alcanzar una OD₆₀₀= 1. Se cosecharon las células por centrifugación a 3.000 xg durante 5 min y se realizaron dos “lavados” con agua y otro con sorbitol 1 M a 4°C. Finalmente se resuspendieron las células en sorbitol 1 M en un volumen 100 veces menor al del cultivo original.

Electroporación: Se emplearon 50 µl de la suspensión celular que se incubaron con aprox. 1 µg de DNA y se electroporaron a 1,5kV, 200 Ohm y 25 µF en un electroporador

Biorad. Las células fueron recuperadas en 1 ml de Sorbitol 1M y se plaquearon en el medio selectivo adecuado.

Microscopía confocal, Nomarski y de fluorescencia

Para determinar el patrón de expresión de los genes *uggt-1* y *uggt-2* se utilizó microscopía de fluorescencia o confocal. Para la observación de los gusanos *uggt-2*^{-/-} se utilizó la técnica Nomarski. Los gusanos fueron montados en todos los casos en portaobjetos conteniendo una lámina de agarosa 2% y se colocó Azida de sodio 2% para anestesiarlos.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal LSM510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo apochromat 20X. La adquisición de imágenes se realizó mediante el software LSM (Carl Zeiss). Se utilizó el microscopio Olympus BX60 con un objetivo 20x, 40x o 100x para obtener las imágenes de Nomarski y de fluorescencia.

Ensayos de complementación en *S. pombe*

Células *S. pombe* *Sp61* o *S.pombe alg6 gpt1*⁻ transformadas con el vector pREP3X, pREP3X *uggt-1c-Myc*, pREP3X *uggt-2c-Myc* o pREP3X *gpt1*⁺ fueron crecidas en medio líquido a OD₆₀₀ 1 y luego se sembraron en las siguientes diluciones 1, 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 en placas de YEA. Las placas se incubaron a 25°C, 28°C y 37°C durante 15 días.

Ensayos de RNAi y Tunicamicina en *C. elegans*

Actividad de UGGT en gusanos sometidos a RNAi en medio líquido

Se crecieron hasta estadio adulto gusanos de la primera generación (P0) en placas NGM de RNAi sembradas con bacterias que expresan RNAs de los genes *uggt-1*, *uggt-2* o *gfp* hasta estadio adulto. Se sincronizaron como se explicó anteriormente y la F1 se colocó en placas de RNAi nuevamente y se la dejó crecer hasta estadio adulto. Se sincronizó la F1 y se creció la F2 en placas de RNAi (3 placas de 8000 gusanos) hasta el estadio L4 y se colocaron los mismos en 1 l. de medio líquido S basal conteniendo bacterias HT115(DE3) inducidas para que expresen RNAs contra los genes *uggt-1*, *uggt-2* o *gfp*. Se crecieron los gusanos en medio líquido durante 5 d a 20°C y 150 rpm. Se procesaron los gusanos y se prepararon microsomas como se explicó anteriormente.

Expresión de *uggt-1* y *uggt-2* durante el desarrollo

Se colocaron gusanos sincronizados en L1 en placas con NGM a 20°C. Se procesaron 3 placas conteniendo 10.000, 8.000 o 6.000 gusanos cada una luego de 24, 48 y 72 hs para preparar muestras de RNA de los estadíos L2/L3, L4 y adulto respectivamente. También se preparó RNA total a partir de 24.000 gusanos L1 que fue procesado inmediatamente. La expresión de *uggt-1* y *uggt-2* se determinó por Real-time PCR. Se analizaron tres muestras biológicas independientes en cada experimento y se repitió el experimento 3 veces.

RNAi y sobrevida

Se utilizó una población sincronizada de la cepa KP3948 y se la dejó crecer en placas de RNAi sembradas con bacterias que expresaban RNAds contra el gen *uggt-1*, *uggt-2* o *gfp*. Se obtuvo una F2 sincronizada como se explicó anteriormente y se utilizó la misma para estudiar el tiempo de sobrevida de los gusanos. Se comenzó el experimento en L4 y se transfirieron los gusanos todos los días a placas nuevas mientras ponían huevos y luego cada dos días. Se contó el número de gusanos vivos diariamente y se los consideró muertos cuando no presentaba el movimiento de "pumping" de la faringe al ser tocado con el "pick". Los experimentos de RNAi se realizaron como se describió anteriormente en la referencia 173. Se analizaron tres muestras biológicas independientes en cada experimento.

Expresión de *uggt-1* y *uggt-2* con tunicamicina (TN)

Se sincronizaron gusanos salvajes N2 (Bristol) en L1 y se sembraron en placas de NGM conteniendo 6000 gusanos cada una. Los gusanos se dejaron desarrollar hasta L2/L3 o hasta adultos a 20°C, se cosecharon con M9 y se resuspendieron en 5ml de M9 en ausencia de droga o con 5 µg/ml de TN. Los nematodos se incubaron 6 h a 20°C, se "lavarón" 2 veces con M9 para eliminar la TN y se preparó RNA como se indicó anteriormente. Los niveles de expresión de *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp-4* fueron determinados por Real-time PCR. Para el ensayo de activación de la UPR se utilizó este mismo protocolo con gusanos N2, *ire-1*, *pek-1* o *atf-6*.

Ensayo de sensibilidad a TN

Se colocaron gusanos KP3948 en estadio L1 sincronizados en placas de RNAi sembradas con bacterias que expresan RNAds de los genes *uggt-1*, *uggt-2* o *gfp* hasta adultos hermafroditas (P0). Adultos P0 con huevos se utilizaron para obtener una población de L1

sincronizada (F1). La misma se dejó crecer en placas de RNAi hasta adulto y se transfirieron los adultos hermafroditas a placas de RNAi conteniendo diferentes concentraciones de TN (0, 2.5, 5 o 10 µg/ml) durante 6 horas para que pongan huevos. Se removieron los adultos y se estudió el desarrollo de estos gusanos F2 *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* o *gfp(RNAi)* durante 5 días cada 24 h. Se determinó el porcentaje de huevos, L1, L2/L3, L4 y adultos. Para el ensayo de sensibilidad a TN con las cepas *ire-1*, *atf-6*, *pek-1* y KP3948 se repitió el mismo ensayo utilizando solamente TN 0 y 2.5 µg/ml.

Caracterización de los gusanos VC1961

Se realizó la retrocruza de la cepa VC1961 5 veces con la cepa N2 (salvaje) para eliminar del genoma del mutante otras posibles mutaciones que pudiese contener y así obtener únicamente la mutación *uggt-2* (ok2510). Como la mutación es letal y debe ser mantenida con un cromosoma balancer hT2 que contiene GFP que se expresa en faringe, la deleción se confirmó mediante una PCR utilizando los primers: 9.8 external left- 9.8 external right que produce un fragmento de 1143pb en el alelo salvaje y un fragmento de 359pb en el alelo mutante; y con los primers: 9.8 external left- 9.8 deleción REV que genera 603 pb en el gusano salvaje y no genera ningún producto de PCR en el mutante.

Gusanos N2 y VC1961 *uggt-2* (ok2510)/ *hT2* fueron sincronizados y se colocaron en pacas de NGM y se dejaron crecer hasta adultos hermafroditas. Los adultos fueron transferidos a placas con NGM durante 6h para que pongan huevos y luego fueron removidas. Se estudió el desarrollo de la F1 durante 5 días en intervalos de 24 h y se determinaron los porcentajes de huevos, L1, L2/L3, L4, adultos y adultos con huevos.

Se sincronizaron gusanos VC1961 y se dejaron 24 y 48 h en medio M9. Se observaron los nematodos L1 al microscopio para poder estudiar si presentaban defectos en la morfología del cuerpo.

RESULTADOS

Capítulo I

Caracterización bioquímica de las
dos putativas UDP-Glc:
glicoproteína glucosiltransferasas de
C. elegans

Análisis bioinformático sobre la secuencia de los genes *uggt-1* (F48E3.3) y *uggt-2* (F26H9.8)

Se realizó un análisis bioinformático a fin de estudiar la existencia de genes ortólogos a los genes que codifican para la UGGT en el genoma del nematodo. Para ello, se realizó una búsqueda utilizando el programa BLAST (utilizando el algoritmo megablast y la base de datos de nucleótidos) y se identificaron dos ORF: F48E3.3 (*uggt-1*) y F26H9.8 (*uggt-2*). Las secuencias se buscaron en la página www.wormbase.org donde se encuentra disponible toda la información recopilada sobre el genoma de *C. elegans*. Ambos genes son considerados ortólogos a los genes que codifican las UDP-glucosa:glicoproteína-glucosiltransferasas de diversos organismos.

El gen *uggt-1* de *C.elegans* se encuentra ubicado en el cromosoma X, posee 5293 pb y el mRNA maduro posee 4482 b. Este último codifica una proteína de 1493 aminoácidos.

Genetic position: X:-1.66 +/- 0.000 cM
Genomic position: X:7495640..7500939

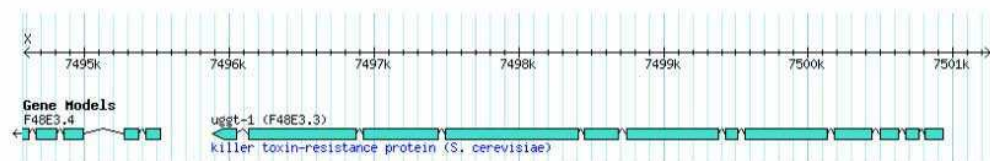


Fig. 16- Esquema del gen *uggt-1* ubicado en el cromosoma X

El gen *uggt-2* de *C.elegans* se encuentra localizado en el cromosoma I, posee 9477 pb y el mRNA maduro posee 4146 b. Posee un intrón largo en el cual se encuentra codificado, en la hebra contraria, el gen *hsp-70* que codifica para una proteína heat-shock de la familia de *hsp70*. El gen *uggt-2* codifica para una proteína de 1381 aminoácidos.

Genetic position: I:3.74 +/- 0.000 cM
Genomic position: I:9317728..9327204

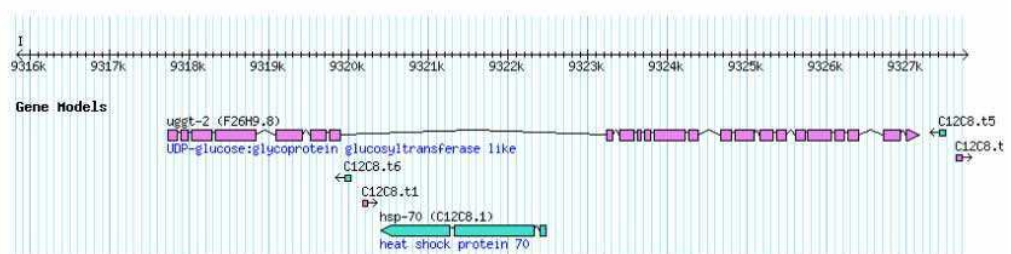


Fig. 17- Esquema del gen *uggt-2* ubicado en cromosoma I

Análisis de las secuencias

Para analizar en forma más detallada la relación entre ambas proteínas de *C. elegans* y su similitud con las UGGTs humanas, se realizó un análisis con el programa Clustal W.

Las proteínas UGGT-1 y UGGT-2 de *C. elegans* poseen un porcentaje de identidad de secuencia de 40%. El extremo C-terminal, que correspondería al dominio catalítico ⁽⁸¹⁾, se encuentra altamente conservado (52% de identidad) mientras que no ocurre lo mismo con el extremo N-terminal (31% de identidad) que sería el encargado de reconocer los segmentos hidrofóbicos presentes en las proteínas mal plegadas. Resultados similares se han encontrado cuando se analizaron las UGGTs de humanos, donde el extremo C-terminal se encuentra más conservado (81% de identidad) que el N-terminal (49% de identidad) (Fig. 18). El porcentaje de identidad global entre HUGT-1 y HUGT-2 es mayor (54% de identidad) que en el caso de *C. elegans*.

El primer análisis que se realizó fue la comparación entre cada una de las secuencias de las proteínas de las CeUGGTs con las UGGTs de humanos. Se encontró que CeUGGT-1 presenta un 40% de identidad tanto con HUGT-1 como con HUGT-2 y CeUGGT-2 presenta un 35% de identidad con ambas proteínas de humanos. El porcentaje de identidad que presenta CeUGGT-1 con ambas proteínas de humanos es mayor que el que presenta CeUGGT-2, sin embargo los resultados obtenidos no permiten por sí solos definir la relación de homología que podría existir entre cada una de ellas con las UGGTs humanas.

	460	470	480	490	500	
HUGT1	LN-IQPSE-ADYAVDIRSPAISWVNNLEVDSRYNSWPSSLQELLRPTFP					487
HUGT2	LN-SHIWE-YTYVDIRHSSIMWINDLENDLLYITWPTSCQKLLKPVVPG					473
CeUGGT1	MD-TSDDEKTTYAVDHRREGYPFINNLDTKKRYQWGNVSKLMLQPYYPG					449
CeUGGT2	LVDLSSVKLSEHAFDYISIAEPVINDLES---TRSPYKSLMIMLQPFEPG					454
Clustal Consensus	:	:	***:	:	* **	176
	510	520	530	540	550	
HUGT1	VIRQIRKKNLHMVFTVDPAAHETAEELMNTAEMFLSNHIEPLRIGFIEVVND					537
HUGT2	SVPSIRRNFNHIVLEIDPAQEXTLDFIKLADVPVSHVEVLRIGFVFIINT					523
CeUGGT1	MIREIARNLFSLVFVDPSEGRKFLRIGQTFNSHDIDMRIGYIFAVLIQ					499
CeUGGT2	QIREIARNLFSLVFVDPSEGRKFLRIGQTFNSHDIDMRIGYIFAVLIQ					503
Clustal Consensus	: *	: * : : : : : **	:	* :	: * : * : : : :	:
	560	570	580	590	600	
HUGT1	SEDVDGMQDAGVAVLRAINYVAQEVDDYHAFQTLTHIYNKVRTG-EKVKV					586
HUGT2	DDEVGDGANDAGVALWRAFNYIAEEFDISEAFISIVHMYQVKKDKNILTV					573
CeUGGT1	DTKASGETDLGVALLNLFNFVSDSSNADALKVLNLFDDYRSK--DPTI					547
CeUGGT2	AKYG-----					507
Clustal Consensus						
	610	620	630	640	650	
HUGT1	EVVSVLEKKYPYEVNSILGIDSAYDRNRKEARCYEQTEVSPLEVVLF					636
HUGT2	DNVKSVLQNTFFPHANIWDILGIHISKYDEERKAGASFYKMTGIGPLPQRLY					623
CeUGGT1	EDIKEFFFAKFSDFSDVFGVNSDYDKGRKHGFEEVQKTGLNSAPKVLIL					597
CeUGGT2	KSLEAVDSMIVPPTKKVFWKSQDSLINALKKSREVAEAGITQLPLVLL					557
Clustal Consensus	: . : . :	:	.	* :	: * : * : *	208
	660	670	680	690	700	
HUGT1	NGMPFEREQDPELETTITMHRILETTFFQRAVYIGELPHDQDVVEIIM					686
HUGT2	NGEPEKHEEENIKELKMAVLQRMMDASVYLOREVEFLGTLNDRINAIDFLM					673
CeUGGT1	NGFILDDEEVRGDNIESETIMMEVMKISPKIQRAIMEGKLTDRMNVGNVVL					647
CeUGGT2	NGYPLDVTSIER--FESSLTQNTQKQTRLQLALLHGLIEDSVQIDRWF					605
Clustal Consensus	** :	: . :	: . : :	* :	* : . : :	224
	710	720	730	740	750	
HUGT1	NCPNVVPRINSRILTA--ERDYLDPTASNN-FFVDDYARFTILDSDQRTA					733
HUGT2	DRNNVVPRINTLILRT--NQYLNLISTSVTADVEDFSTFFELDSQKSA					721
CeUGGT1	EOKDVMPRINKRILSAPSKTYVEILGSMDCSKLKDVEN---LSDSPKAG					694
CeUGGT2	EK-----KTNPDIIQRLNQRITAFNNKEELNISPRSI					638
Clustal Consensus	::	:	::	:	* . . :	232
	760	770	780	790	800	
HUGT1	AVANSMNLTTRKGMSSKEIYDDSFIREVTFWIVSDEDSPESCRQLLYDAIK					783
HUGT2	VIAKNMYLITOD-----DESIISAVTIWIIDDDKPSRKLLFNALK					763
CeUGGT1	CLLQTTKYLCKA-----SADSILEVTLWVVDDEAASRRFIYNSLQ					736
CeUGGT2	QFLKNVHYFSEES-----DTVLANADVTLWIIDDEENPSNRLFATKAIR					682
Clustal Consensus	. . :	* :		** * : : * :	* * : : : :	
	810	820	830	840	850	
HUGT1	HQKSSNVVRISSMINNE-AKEISYENTQISRAIWAALQQTQTSNAAKNEITK					832
HUGT2	HMKTSVHSRLGIIYNP-TSKINEENTAIIRGILAAFLTQKNMFLRSFLGQ					812
CeUGGT1	ILKNSANSRVIIENPESVEKACESNSISYIRAALDFLPMQAKRILTK					786
CeUGGT2	SIASQKNNKIALIENPSSSRSDNPNCFN-----FENVGPNSDMTILSK					726
Clustal Consensus	. . :	: : : * ** :	:	:	:	
	860	870	880	890	900	
HUGT1	MAKEGAAEALAAGAD-IAEFSVGGMDFSLFKEVFESSKMDFILSHAVYCR					881
HUGT2	LAKKEIATAIYSGDK-IKTFLLEGMDKNAFEKKYNTVGVNIFRTHQLFCQ					861
CeUGGT1	LSNEEYAADFISGKITFDDLSVGGMDTAKFLADKKKLDCEIRLESQIVK					836
CeUGGT2	IES-----FCMKNINLSPLDIG-----					743
Clustal Consensus	: .	:	: : : :	:	:	269

Para la proteína UGGT-1 se encontraron los siguientes resultados:

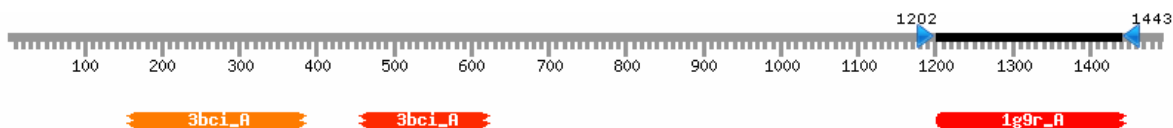


Fig. 19. Estructuras homólogas a la proteína UGGT-1 predichas por el programa HHPRED. En el extremo N-terminal, en naranja y rojo, se muestran dominios de estructura Trx-like del tipo DsbA like (código PDB 3gyK cadena A) con una inserción (subdominio α -hélice). En el extremo C-terminal (catalítico), se observa en rojo un dominio de estructura similar a la galactosiltransferasa de *neisseria meningitidis* (código PDB 1GA8) involucrada en la transferencia de nucleótidos azúcar.

Entre los aminoácidos 1202 y 1443 (que comprenden la zona del dominio catalítico) se encontró un dominio de estructura glicosiltransferasa (de estructura α/β) involucrada en la transferencia del nucleótido azúcar. Este dominio es homólogo al de *Neisseria meningitidis*. Prob: 99.5% E: 2.2 E-13. (Fig. 19)

Hacia el extremo N-terminal se encontraron dos dominios Trx-like (de formación de enlaces disulfuro tipo tiol-disulfide-oxidoreductasa), de proteínas involucradas en el plegamiento de proteínas. Este dominio Trx-like es similar al resuelto en *Staphylococcus aureus*. Prob= 89.6 y E-value= 0.99 (naranja) y Probab= 96.45 E-value= 0.084 (rojo). (Fig. 19 y 20)

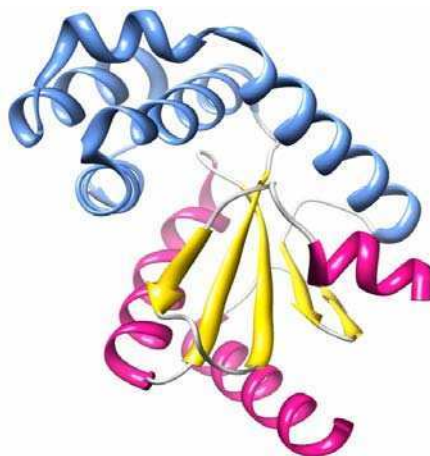


Fig. 20. Estructura 3D del dominio TRX-like (código PDB 3gyk, cadena A), coloreado según elementos de estructura: α hélices del dominio TRX-like en rosa, laminas β del mismo dominio en amarillo y una inserción en el mismo de estructura α -hélice en azul. Este dominio esta involucrado en reacciones de óxido reducción.

Por otro lado, decidimos realizar un análisis de alineamiento de secuencias mediante el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) en la página <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Este programa es útil porque además de encontrar dominios conservados, permite encontrar otras estructuras en las proteínas como péptido señal, regiones de baja complejidad, etc. Este programa combina las búsquedas tanto de BLAST como de Pfam. Pfam es una larga colección de familia de proteínas representadas por alineamientos múltiples de secuencias y Modelos ocultos de Markov (HMMs).

Este programa identificó un péptido señal en la proteína UGGT-1, no identificó regiones transmembrana (lo que concuerda con el hecho de que la UGGT es una proteína soluble de RE) y se encontraron regiones de desorden intrínseco (Fig. 21). Además, el programa distinguió un dominio que corresponde a la superfamilia de las difosfo-nucleótido azúcar transferasas (SCOP)⁽¹⁷⁴⁾ en el extremo C-terminal de CeUGGT-1, entre lo aminoácidos 1202-1469. Entre las glicosiltransferasas que presentan este dominio podríamos mencionar galactosiltransferasas, glicogeninas, manosiltransferasas, N-acetil-glucosaminiltransferasas, etc. Este dominio se relacionaría con el reconocimiento del nucleótido-azúcar específico (Fig. 21).

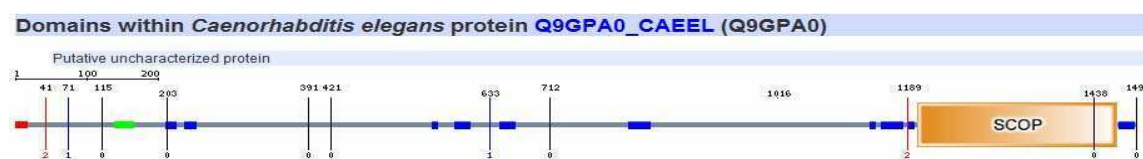


Fig. 21 – Proteína UGGT-1. Segmentos transmembrana predichos por el programa [TMHMM2](#) (■), regiones hélice-vuelta-hélice (coiled coil) determinadas por el programa [Coils2](#) (■), segmentos de baja complejidad determinados por el programa [SEG](#) (■). Péptido señal determinado por el programa [SignalP](#) (■). Las regiones desordenadas fueron detectadas por DisEMBL (■).

Se realizó el mismo análisis para la proteína CeUGGT-2:

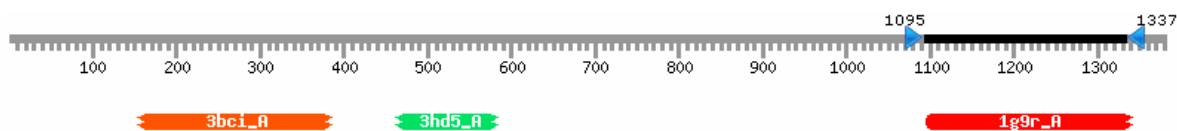


Fig. 22. Estructuras homólogas a la proteína CeUGGT-2 predichas por el servidor HHPRED. En el extremo N-terminal, en naranja y verde, se muestran dominios de estructura Trx-like del tipo DsbA like (código PDB 3gyK, cadena A) con una inserción (subdominio α -hélice). En el extremo C-terminal (catalítico), se observa en rojo un dominio de estructura similar a la galactosiltransferasa de *Neisseria meningitidis* (código PDB 1GA8) involucrada en la transferencia de nucleótidos azúcar.

Mediante el programa HHPRED se encontró un dominio de estructura glicosiltransferasa (de estructura α/β) entre los aminoácidos 1095 y 1337, involucrado en la transferencia del nucleótido azúcar. Este dominio, al igual que el encontrado en la proteína CeUGGT-1, es homólogo al de *Neisseria meningitidis*. Prob: 99.5% E: 2.2 E-13 (Fig. 22).

Hacia el extremo N-terminal se encontró el mismo dominio que para CeUGGT-1, un dominio Trx-like similar al de *Staphylococcus aureus*. Probab=93.04 E-value=0.48 (naranja). El dominio verde es un dominio tiol de intercambio de enlaces disulfuro de la proteína DSBA (PSII) de *Bordetella parapertussis*. Probab=64.19 E-value=0.84 (verde). (Fig. 22)

Mediante el programa SMART se detectó en la proteína CeUGGT-2 la presencia de un péptido señal, varias regiones de desorden intrínseco y no se han identificado posibles regiones transmembrana indicando que es una proteína soluble de RE (Fig. 23).

Además, se identificó el dominio conservado Glyco_transf 8 (Fig. 23). El dominio “Glicosil-transferasa 8 (Glyco_transf_8)” corresponde a una familia de enzimas que transfieren residuos azúcar a moléculas aceptoras. Los miembros de esta familia están involucrados en la biosíntesis de lipopolisacáridos y de glucógenos. Incluye entre otros miembros a la lipopolisacárido-galactosiltransferasa, lipopolisacárido-glucosiltransferasa y la glicogenin-glucosiltransferasa.

Domains within the query sequence of 1381 residues

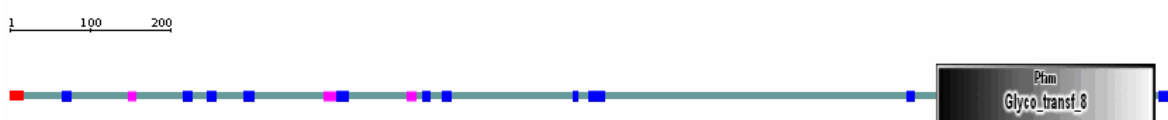


Fig. 23 – Proteína CeUGGT-2. Segmentos transmembrana predichos por el programa [TMHMM2](#) (■), regiones hélice-vuelta-hélice (coiled coil) determinadas por el programa [Coils2](#) (■), segmentos de baja complejidad determinados por el programa [SEG](#) (■). Péptido señal determinado por el programa [SignalP](#) (■). Las regiones desordenadas fueron detectadas por DisEMBL (■).

Según los resultados obtenidos en esta sección, ambas proteínas podrían poseer actividad de UGGT ya que ambas poseen el dominio de reconocimiento y transferencia del nucleótido azúcar. Ambas proteínas presentan un péptido señal por lo que son translocadas al RE y ninguna posee dominios transmembrana por lo que serían proteínas solubles del RE. Además, ambas poseen la señal de retención/recuperación de RE del tipo XDEL en su extremo C-terminal. CeUGGT-1 y CeUGGT-2 son proteínas con dominios similares y no

podemos adjudicar ninguna función diferencial a las mismas a través del análisis con estos programas. Los dominios TRX-like presentes en el extremo N-terminal podrían ser utilizados para el reconocimiento de proteínas mal plegadas, como sucede en el caso de PDI que posee una actividad chaperona con proteínas que no poseen enlaces disulfuro⁽¹⁷⁵⁾ o bien podrían sugerir alguna otra función relacionada a la acción de formación de enlaces disulfuro. Sin embargo, los valores E de estos dominios TRX-like son muy bajos por lo que los mismos podrían no estar presentes en dichas proteínas.

Estos resultados en conjunto, indicarían que ambas proteínas podrían ser glucosiltransferasas. Sin embargo, los dominios encontrados podrían sugerir alguna otra actividad relacionada con la transferencia de azúcares (como la transferencia de galactosa, manosa, etc) o bien la transferencia de glucosa a otro aceptor endógeno que no sean los sustratos ya conocidos de UGGT.

Actividad bioquímica de UGGT en *C. elegans*

Para determinar si *C. elegans* poseía actividad de UGGT, se procedió a realizar un ensayo de actividad enzimática mediante un ensayo *in vitro* utilizando microsomas de gusanos N2 (WT).



Se determinaron las condiciones óptimas de ensayo, utilizando distintas concentraciones de proteínas microsomales de gusanos N2 (fracción enriquecida en RE utilizada como fuente de enzima), Tiroglobulina desnaturalizada (TG DES) o Tiroglobulina nativa (TG NAT) y UDP-[¹⁴C]Glc como dador de glucosa. La TG DES se utiliza como aceptor ya que posee un glicano de estructura M7-M9 y además se encuentra desnaturalizada exponiendo parches hidrofóbicos. La TG NAT si bien posee el N-glicano, no presenta regiones hidrofóbicas expuestas y por lo tanto no es reconocida por la UGGT. Como se mencionó en la introducción, la característica fundamental de esta enzima es que es capaz de diferenciar entre los estados de plegamiento de la proteína aceptor, por lo que se espera obtener mayores niveles de actividad para los ensayos con TG DES. Para ello se realizó el ensayo *in vitro* utilizando distintas concentraciones (0, 50, 100, 250, 400 y 800 µg) de proteínas microsomales totales. Los resultados obtenidos se muestran en la fig.24.

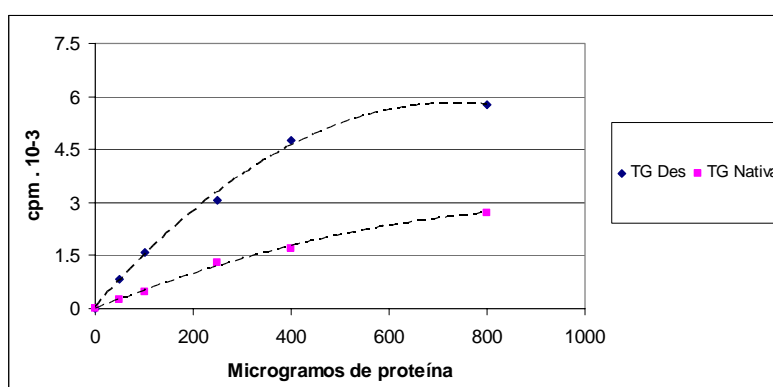


Fig. 24- Incorporación de glucosa radioactiva a TG DES y TG NAT (valores en cpm). Microsomas de gusanos N2 fueron incubados en una mezcla que contenía Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, DNJ 5mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 µCi, a 20 °C por 30 min. Las proteínas fueron precipitadas mediante el agregado de 1 ml de tricloroacético (TCA) 10% y se determinó la radioactividad incorporada.

Existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para TG DES y TG NAT. Esto sugiere que habría actividad de UGGT en *C. elegans* ya que es la única enzima conocida hasta el momento que utiliza UDP-Glc como sustrato y puede discernir entre ambos estados de plegamiento. Previamente, en el laboratorio se determinó que en las condiciones de ensayo no hay transferencia de glucosa mediante el Dol-PP-Glc a lípidos intermediarios por lo que la incorporación de la glucosa radioactiva a proteínas proviene solo del UDP-Glc⁽⁵⁵⁾. El incremento observado en los valores de TG NAT corresponde al aumento de aceptores endógenos presentes en los microsomas al aumentar la cantidad de proteínas totales.

C. elegans posee una UGGT activa

Para confirmar que *C. elegans* efectivamente posee actividad de UGGT se analizó la estructura de los oligosacáridos unidos a proteína y la presencia de glucosa en los mismos. Para ello se incubaron microsomas de gusanos salvajes N2 utilizando TG DES como aceptor y UDP-[¹⁴C]Glc como dador. Luego, se obtuvieron los oligosacáridos Endo-H sensibles como se indica en "Materiales y Métodos". Los mismos fueron analizados por cromatografía en papel utilizando oligosacáridos estándares de estructura conocida. Se realizó el mismo análisis utilizando microsomas de hígado de rata como control.

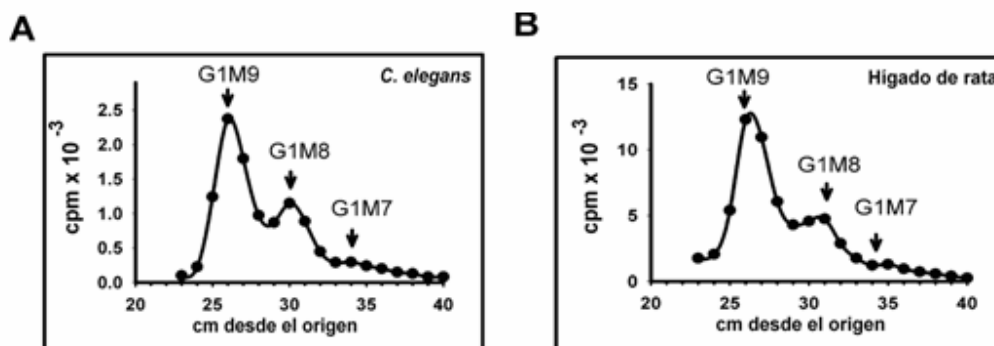


Fig. 25- Actividad de UGGT en *C. elegans*. Proteínas microsomales de (A) *C. elegans* (B) Hígado de rata fueron incubadas en una mezcla conteniendo buffer Tris-maleato 5 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, NMDNJ 5 mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μCi, a 24 °C (A) y 37 °C (B) por 60 min. Los glicanos obtenidos por tratamiento con Endo H fueron analizados por cromatografía en papel con solvente A. Estándares G1M9: Glc₁Man₉GlcNAc; G1M8: Glc₁Man₈GlcNAc and G1M7: Glc₁Man₇GlcNAc.

En la figura 25 se observan glicanos de estructura G1M9, G1M8 y G1M7 tanto en microsomas de *C. elegans* (Panel A) como de hígado de rata (Panel B), confirmando la

presencia de actividad de UGGT en *C. elegans*. Por otro lado, se observa que la actividad de la UGGT de hígado de rata sería mayor que la de *C. elegans*.

Caracterización de la actividad de UGGT de *C. elegans*

1) Dependencia de la actividad con distintos aceptores exógenos

Se estudió la actividad de UGGT utilizando distintos aceptores exógenos. Para ello se incubaron microsomas de gusanos N2 en presencia de UDP-[¹⁴C]Glc como dador y se estudió la incorporación de glucosa radioactiva a TG desnaturalizada (TG DES) o Aglutinina de soja (SBA) desnaturalizada como se indica en "Materiales y Métodos". Ambos aceptores comparten la característica de poseer un N-glicano libre de glucosas el cual puede ser reconocido por la UGGT, pero difieren en su peso molecular. La TG tiene un peso molecular de 660 kDa mientras que la SBA posee 340kDa.

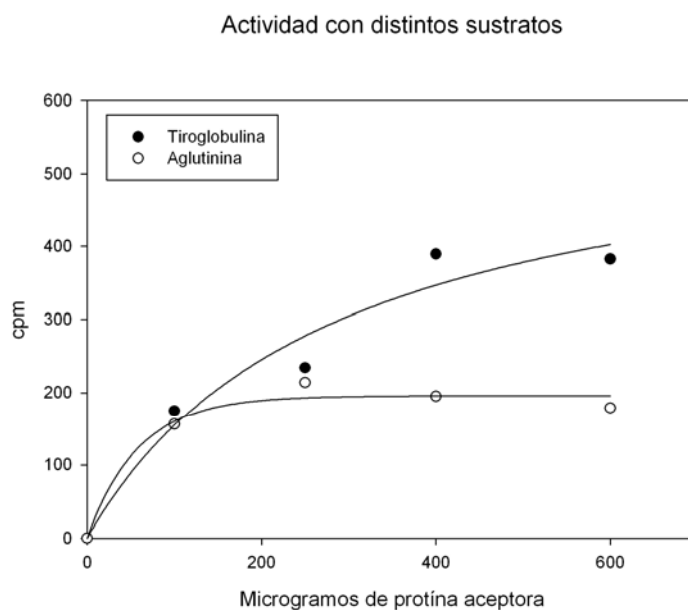


Fig. 26- Actividad de UGGT en *C. elegans* utilizando distintos aceptores. Microsomas de gusanos N2 fueron incubados en una mezcla que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, DNJ 5mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μ Ci, a 20 °C por 30 min con 0, 200, 400 y 600 μ g/ μ l de TG o SBA. La reacción fue detenida mediante el agregado de 1 ml de TCA 10% y se determinó la radioactividad incorporada a proteínas totales.

Se observaron mayores niveles de incorporación a TG DES que a SBA DES indicando que la UGGT reconoce de forma más efectiva dicho aceptor. Por dicho motivo en los siguientes ensayos se utilizó TG como proteína aceptora.

2) Dependencia del pH y de la presencia de cationes

Se analizó la dependencia de la actividad de UGGT con el pH y la presencia de cationes. Para ello se incubaron microsomas de gusanos salvajes N2 utilizando TG DES como aceptor y UDP-[¹⁴C]Glc como dador y se estudió la incorporación de glucosa radioactiva a TG DES como se indica en "Materiales y Métodos".

En el primer caso se estudió la dependencia del pH y para ello se utilizó la misma mezcla de reacción que en los experimentos anteriores pero se varió el buffer según lo indicado:

A) Buffer imidazol (pH 8, 8.5, 9 o 9.5) o Tris-Cl (pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8)

En el segundo caso se estudió la dependencia de la presencia de cationes y para ello se utilizó la misma mezcla de reacción que en los experimentos anteriores pero se modificó el tipo y la concentración de los cationes según lo indicado:

B) CaCl₂, MnCl₂ o MgCl₂ (0, 2.5, 5, 10 o 20 mM)

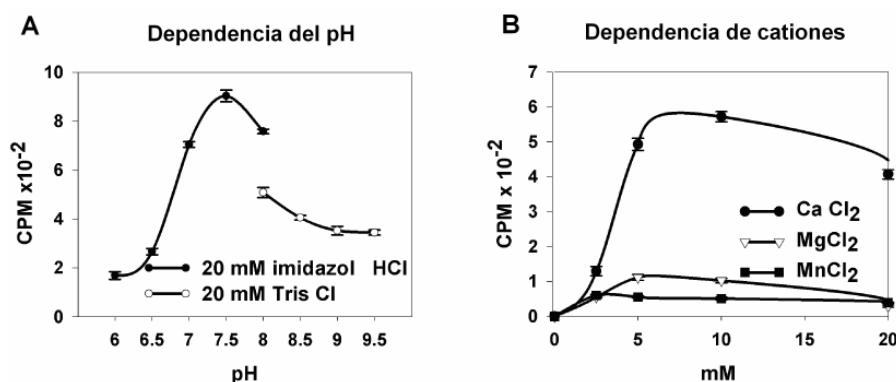


Fig. 27- Dependencia de la actividad de UGGT en *C. elegans* del pH (A) y de la presencia de cationes (B). Microsomas de gusanos N2 fueron incubados en una mezcla que contenía A) CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, NMDNJ 5mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μCi, a 20 °C por 30 min en una concentración 20 mM de los siguientes buffers -●-●- imidazol HCl; -○-○- Tris HCl a distinto pH. B) Tris-HCl 20 mM pH 7.5, Triton X-100 0.6%, DNJ 5mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μCi, a 20 °C por 30 min y -●-●-CaCl₂, -○-○-MgCl₂ y -▼-▼ MnCl₂ en las concentraciones indicadas. La reacción fue detenida mediante el agregado de 1 ml de TCA 10%. Se midió la radioactividad incorporada a las proteínas totales. Los valores mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estandar.

La actividad de UGGT depende exclusivamente del catión Ca⁺² ya que ni el Mn⁺² ni el Mg⁺² pudieron reemplazar dicho catión. La actividad óptima se encuentra entre 5 y 10 mM siendo dependiente de la concentración de dicho catión. Como se mencionó anteriormente, existen concentraciones milimolares de Ca⁺² en el RE, lo cual es consistente con esta observación. También confirmamos que esta enzima necesita un pH óptimo neutral para su actividad y una temperatura óptima de 24°C (no se muestra). Las características encontradas

para la CeUGGT son similares a las observadas para las UGGTs de otros organismos en cuanto a la dependencia del pH y la presencia de cationes.

El gen *uggt-1* codifica para una UGGT activa

A fin de identificar cuál de los dos genes (*uggt-1* o *uggt-2*) es responsable de la actividad de UGGT o si ambos eran responsables de la misma, se expresaron de forma heteróloga cada uno de los genes en una levadura mutante de *S. pombe alg6 gpt1-*. Esta levadura al carecer del gen *alg6* transfiere glicanos hipoglicosilados que carecen de glucosa y además carece del gen *gpt1* por lo que no posee la proteína UGGT (Ver Fig. 3). De esta forma se puede estudiar la incorporación de glucosa por acción exclusiva de la actividad de UGGT.

El clonado de los genes de *C. elegans* resultó un proceso muy complejo y demandó la utilización de diferentes estrategias hasta encontrar el sistema apropiado. Como primera estrategia, se intentó realizar el clonado en las versiones originales de estos genes en vectores tanto de bajo como de alto número de copias, pero todas ellas llevaron siempre a mutaciones en la secuencia a pesar de usar una enzima de alta fidelidad para la obtención de la secuencia de los genes, indicando que la expresión de la secuencia de DNA de *C. elegans* resultaba tóxica para las bacterias. En todos los casos se presentaron numerosas mutaciones puntuales, recombinaciones o se observó lisis celular. Como segunda estrategia, se intentó realizar el clonado *in vivo* en *S. cerevisiae* de forma de evitar la utilización de bacterias⁽¹⁷⁶⁾. Sin embargo, utilizando esta estrategia de clonado se obtenían clones que poseían mutaciones puntuales en la secuencia de los genes. Si bien en todos los casos las proteínas se expresaban, carecían de actividad (tesis de Licenciatura Lucila Buzzi).

Debido a que el uso de codones de *C. elegans* es muy diferente al de las levaduras decidimos sintetizar versiones optimizadas de los genes *uggt-1* y *uggt-2* para su expresión en *S. pombe*. La empresa Genescript fue la encargada de la síntesis de dichos clones, la cual realizó una optimización de los codones de los genes *uggt-1* y *uggt-2* para que se adecuen al uso de codones de *S. pombe* (ver materiales y métodos). Se decidió expresar las versiones optimizadas en la levadura *S. pombe* ya que el mecanismo de control de calidad de plegamiento es más parecido al de mamíferos que en el caso de *S. cerevisiae*. Ambos genes fueron clonados en el vector pREP3X (LEU2) y se transformaron células *S. pombe alg6 gpt1-* con dichas construcciones. Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* utilizando microsomas de *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con el vector pREP3X-*uggt-1*, pREP3X-

uggt-2, pREP3X-*gpt1+* o pREP3X (ver Materiales y Métodos). En dichos ensayos se utilizó NMDJ como inhibidor de la proteína GII, de manera que aquella glucosa que sea incorporada por la UGGT no sea removida por esta enzima (Ver Fig. 4 y 5). Luego se analizó la estructura de los glicanos Endo-H sensibles unidos a proteínas por cromatografía en papel (Materiales y Métodos).

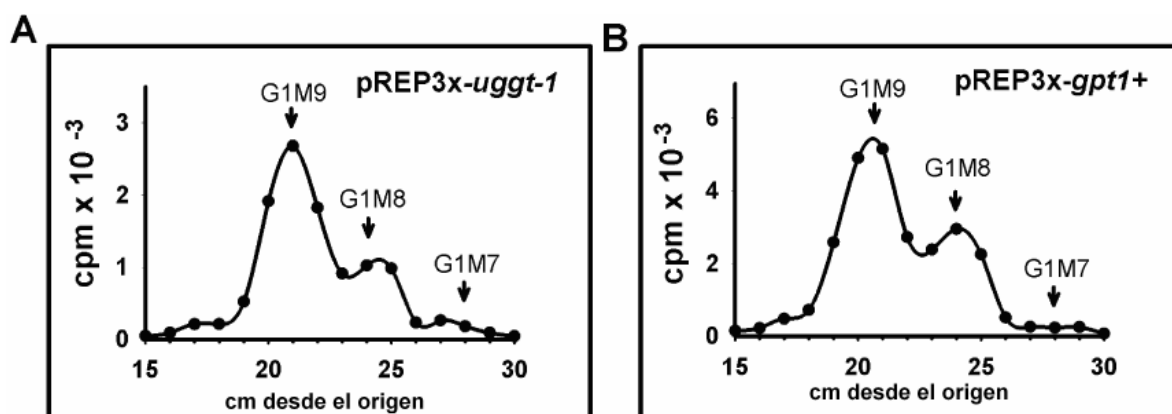


Fig. 28- *uggt-1* codifica para una UGGT activa. Ensayos in vitro. Proteínas microsomales de *S. pombe alg6 gpt1-* obtenidas a partir de células transformadas con pREP3X-*uggt-1* (A) o pREP3X-*gpt1+* (B) fueron incubadas con una mezcla de reacción conteniendo buffer Tris-maleato 5 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, NMDNJ 5 mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μCi (300 Ci/mol), a 24 °C por 30 min. Los glicanos obtenidos por tratamiento con Endo H fueron sujetos a una cromatografía en papel con solvente A.

Los microsomas derivados de levaduras *S.pombe* transformadas con pREP3X-*uggt-1* o pREP3X-*gpt1+* produjeron oligosacáridos que migraron en cromatografía en papel como los estándares de G1M9, G1M8 y G1M7 indicando la presencia de actividad de UGGT (Fig. 28 A y B). Sin embargo, los microsomas derivados de células transformadas con pREP3X y pREP3X-*uggt-2* no presentaron oligosacáridos Endo-H sensibles marcados con [¹⁴C]Glc. Por otro lado, se puede observar que la actividad de UGGT de *S.pombe* es mayor que la de CeUGGT-1. Estos resultados indicarían que sólo CeUGGT-1 presenta actividad de UGGT.

Como los resultados anteriores sugieren que no hay actividad de UGGT en la cepa *S. pombe alg6 gpt1-* pREP3X-*uggt-2*, decidimos confirmar que dicho resultado se debía efectivamente a la falta de actividad de la proteína CeUGGT-2 y no a un problema de expresión del gen *uggt-2*. Para ello realizamos un análisis mediante RT-PCR y detectamos que los niveles de mRNA de *uggt-2* son comparables a los niveles de expresión del mRNA de *uggt-1* y de *gpt1+* (Figura 29).



Fig. 29- Expresión de *uggt-1*, *uggt-2* y *gpt1+*. Se sintetizó cDNA utilizando RNA total de *S. pombe alg6 gpt1-* conteniendo el vector pREP3X-*gpt1+*, pREP3X-*uggt-1*, pREP3X-*uggt-2* o pREP3X como templado. Se realizó la RT-PCR con primers específicos para los mRNAs de *gpt-1*, *uggt-1*, *uggt-2* y β -actina.

Para confirmar que la proteína CeUGGT-2 carecía de actividad de UGGT, se realizó un ensayo de actividad *in vivo*. Para ello las células de *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X-*gpt1+*, pREP3X-*uggt-1* y pREP3X-*uggt-2* se incubaron en presencia de [¹⁴C]Glc y se analizaron los oligosacáridos EndoH sensibles unidos a proteínas sintetizados *in vivo* (Figura 30). Para realizar dicha marcación se incubaron las células con la marca radioactiva durante 30 min en presencia de NMDNJ y DTT (un compuesto que previene el pasaje de las glicoproteínas sintetizadas del RE al GA). Se obtuvieron los oligosacáridos Endo H sensibles y se analizaron por cromatografía en papel (Fig. 30 A, B, C).

Las células *S. pombe* transformadas con pREP3X-*gpt1+* y pREP3X-*uggt-1* produjeron oligosacáridos de estructura G1M9, M9, G1M8 y Man₈GlcNAc (M8) (Fig. 30 A y B). Sin embargo, las células transformadas con pREP3X-*uggt-2* solo produjeron compuestos que migraron como los estándares de M9 y M8 (Figura 30 C).

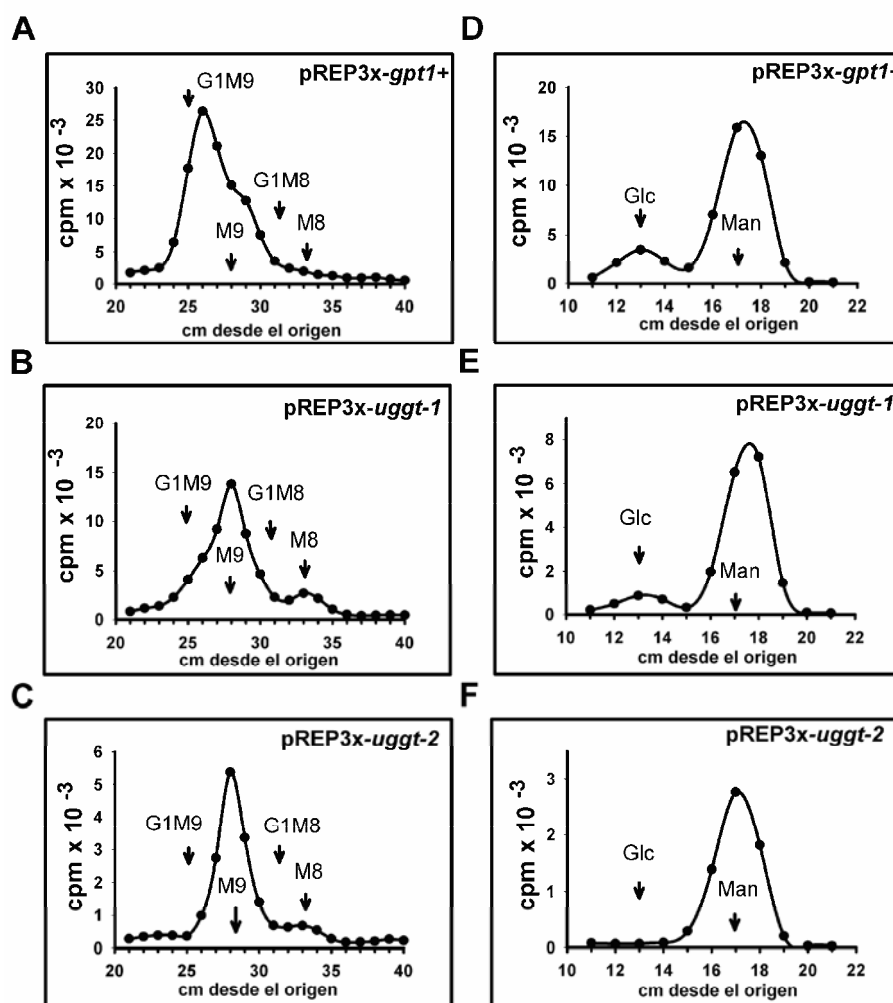


Fig. 30- *ugg1-1* codifica para una UGGT activa. Análisis *in vivo*. Las células *S. pombe alg6 gpt1-* fueron preincubadas por 60 min con NMDNJ, y los últimos 5 min en presencia de DTT 5mM. Luego se realizó un pulso por 30 min en Glc 5mM con [¹⁴C]Glc 150 μ Ci a 24°C. Los glicanos liberados por el tratamiento con Endo H fueron corridos en una cromatografía en papel con el solvente A. A-C) Estructura de los oligosacáridos unidos a proteínas de *S. pombe* transformadas con A) *gpt1* B) *ugg1-1* y c) *ugg1-2*. D-F) Hidrólisis ácida y cromatografía en papel con solvente B de los oligosacáridos que migraron entre 24 y 35 cm en los paneles A, B y C respectivamente. Estándares: G1M9, Glc₁Man₉GlcNAc; M9, Man₉GlcNAc; G1M8, Glc₁Man₈GlcNAc y M8 Man₈GlcNAc.

A fin de confirmar la presencia de glucosa en los oligosacáridos, se sometieron los glicanos que migraron entre G1M9 y G1M8 a una hidrólisis ácida y los compuestos obtenidos fueron analizados mediante una cromatografía en papel con solvente B de forma de determinar su composición química (Fig. 30 D, E, F). Solo las células transformadas con *ugg1-1* y *gpt1+* presentaron residuos de glucosa y manosa, mientras que las células

transformadas con *uggt-2* sólo presentaron residuos de manosa por lo que carecen de oligosacáridos glucosilados. Estos resultados confirman los obtenidos anteriormente e indicarían que CeUGGT-1 correspondería a la UGGT activa en *C. elegans* mientras que CeUGGT-2 carecería de dicha actividad.

Expresión de UGGT-1 y UGGT-2 en *S. pombe*

A fin de estudiar la expresión de las proteínas expresadas en levaduras, se produjeron anticuerpos contra las UGGTs de *C. elegans* (utilizando polipéptidos correspondientes al extremo C-terminal que fueron purificados de cepas bacterianas y luego inyectados en ratones). Se analizó la expresión de las proteínas UGGT-1 y UGGT-2 en ensayos de Western blot pero los mismos no detectaron la presencia de las mismas en microsomas de *C. elegans* ni de *S. pombe* transformadas con pREP3X-*uggt-1* o pREP3X-*uggt-2*.

Anteriormente, se habían producido anticuerpos contra la UGGT de rata ⁽⁸²⁾ y de *S. pombe* (Guerin et al.), sin embargo no fue posible realizar un anticuerpo contra la UGGT de *T. cruzi* en nuestro laboratorio. Si bien dichos anticuerpos fueron capaces de detectar la presencia de la UGGT, lo hacen en altas concentraciones de la misma. Analizamos la presencia de UGGT en microsomas de *C. elegans* y en microsomas de *S. pombe* transformadas con pREP3X-*uggt-1* o pREP3X-*uggt-2* en ensayos de Western Blot que fue revelado con los anticuerpos anti-UGGT de rata y de *S. pombe*. Sin embargo los mismos no reconocieron las UGGTs de *C. elegans*.

Por resultados previos, habíamos determinado que la presencia de una etiqueta de HA en el extremo C-terminal de la proteína CeUGGT-1 anulaba la actividad de UGGT (Tesis de licenciatura Lucila Buzzi). Por este motivo, las versiones optimizadas de los genes *uggt-1* y *uggt-2* clonadas en el vector pREP3X no poseían secuencias codificantes para etiquetas reconocidas por anticuerpos comerciales.

Para poder confirmar que efectivamente CeUGGT-2 carecía de actividad de UGGT resultaba necesario corroborar que la proteína se estuviese expresando correctamente. Para ello, se clonaron las versiones optimizadas de los genes *uggt-1* y *uggt-2* con una secuencia codificante para una etiqueta c-Myc río arriba de los genes, de forma de obtener dicha etiqueta en el extremo C-terminal de las proteínas (ver Materiales y Métodos). Se analizó la expresión de CeUGGT-1 y CeUGGT-2 en microsomas de *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X-*uggt-1* o pREP3X-*uggt-2* mediante Western Blot utilizando anticuerpos comerciales (Materiales y Métodos).

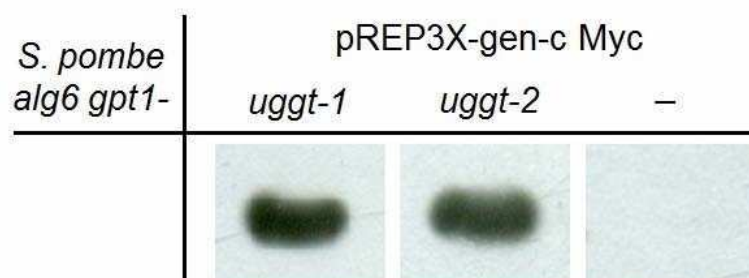


Fig. 31- Expresión de *uggt-1* y *uggt-2*. Se analizaron microsomas de células *S. pombe alg6 gpt1-* conteniendo el vector pREP3X-*uggt-1* c-Myc, pREP3X-*uggt-2* c-Myc o pREP3X mediante Western Blot con un anticuerpo primario anti c-Myc producido en conejo y un anticuerpo secundario Anti- IgG de conejo conjugado a HRP. CeUGGT-1 posee 1493 aminoácidos lo que da origen a una proteína de aprox. 168KDa, CeUGGT-2 posee 1381 aminoácidos por lo que la proteína posee aprox. 158KDa.

Los resultados obtenidos indican que tanto CeUGGT-1 como CeUGGT-2 se expresan correctamente, poseen el peso molecular adecuado y se encuentran presentes en los microsomas por lo que localizan en el RE.

Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* utilizando las células *S. pombe alg6 gpt1-* conteniendo el vector pREP3X-*uggt-1* o pREP3X-*uggt-2* y se demostró que CeUGGT-1 c-Myc posee actividad de UGGT mientras que CeUGGT-2 c-Myc no posee dicha actividad, indicando que el agregado de la etiqueta no modifica la actividad de UGGT-1 y que CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT (ver Fig. 33 más abajo). La actividad encontrada para CeUGGT-1 c-Myc no presenta diferencias significativas con respecto a la encontrada para CeUGGT-1.

Actividad de UGGT en gusanos interferidos con RNAi

Los resultados presentados hasta esta parte muestran que CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT. CeUGGT-1 posee actividad de UGGT siendo esta proteína entonces la única responsable de la actividad encontrada en *C.elegans*. Para confirmar este resultado decidimos analizar la actividad de UGGT en gusanos interferidos con RNAi. Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* utilizando microsomas de gusanos F2 KP3948 *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* y *gfp(RNAi)* como control (Materiales y Métodos).

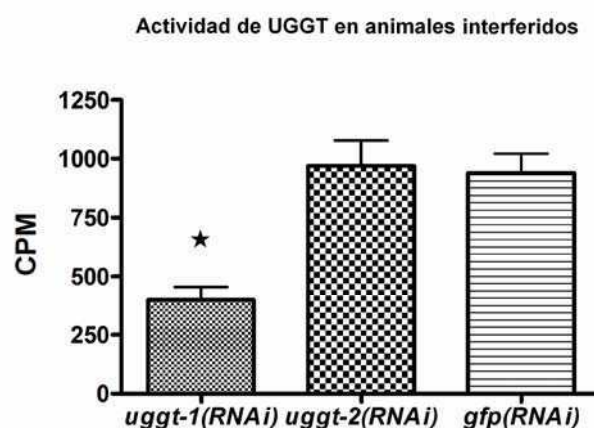


Fig. 32- La actividad de UGGT disminuye en gusanos *ugg-1(RNAi)* pero no en gusanos *ugg-2(RNAi)* (*RNAi*). Proteínas microsomales de gusanos F2 *ugg-1(RNAi)*, *ugg-2(RNAi)* y gusanos control *gfp(RNAi)* fueron incubados en una mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 5 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, NMDNJ 5mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μCi, a 20 °C por 30 min. Las reacciones se detuvieron con 1 mL de TCA 10% y se midió la radioactividad incorporada. Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estandar. * indica diferencias significativas.

Se observó una disminución de $57,69 \pm 4.3$ % en la actividad de UGGT en gusanos *ugg-1(RNAi)* con respecto a gusanos *gfp(RNAi)*. Estos datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de un factor y una prueba posterior de Bonferroni mostrando diferencias significativas entre el nivel de actividad de UGGT en gusanos *ugg-1(RNAi)* y *gfp(RNAi)* con un valor $P < 0.001$. No se encontraron diferencias significativas entre gusanos *ugg-2(RNAi)* y *gfp(RNAi)* $P > 0.05$. Estos resultados confirman que CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT.

Estudio de los dominios de las UGGTs de *C. elegans*

Como se mencionó en la introducción, el grupo de Kaufman había realizado proteínas quiméricas combinando los extremos N y C terminales de las UGGTs de humanos y comprobó que, si bien la proteína HUGT2 carecía de actividad de UGGT, su dominio C-terminal era activo. Por otro lado, el dominio N-terminal de HUGT-2 resultó inactivo⁽⁸²⁾.

Para poder determinar si el extremo C-terminal de CeUGGT-2 posee actividad de UGGT y si su extremo N-terminal es capaz de reconocer proteínas mal plegadas, realizamos proteínas quiméricas combinando la UGGT-2 de *C. elegans* con la UGGT de *S.pombe*. Se realizaron dos construcciones:

- 1) CeUGGT-2 N-terminal/ SpGpt1+ c-Myc C-terminal
- 2) SpGpt1+ N-terminal/ CeUGGT-2 c-Myc C-terminal

Se clonaron dichas construcciones en el vector pREP3x y se expresaron en células *S.pombe alg6 gpt1-*. Para confirmar que las proteínas quiméricas se estuviesen expresando correctamente, estudiamos su expresión mediante un ensayo de Western Blot con microsomas de células *S. pombe alg6 gpt1-* pREP3x *uggt-1 c-Myc*, pREP3x *uggt-2 c-Myc*, pREP3X *Spgpt1+N/uggt-2C c-Myc*, pREP3X *uggt-2N/Spgpt1+C c-Myc* y pREP3X como se indica en Materiales y Métodos.

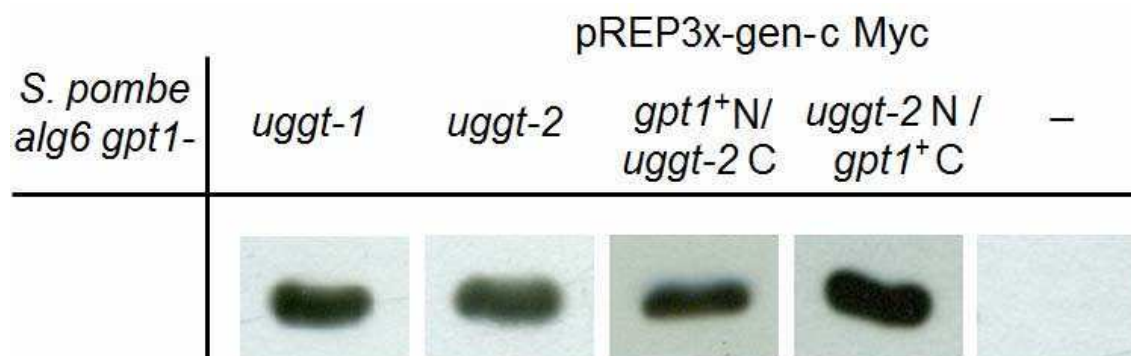


Fig. 33- Expresión de las proteínas quiméricas con una etiqueta c-Myc. Se analizaron microsomas de *S. pombe alg6 gpt1-* conteniendo el vector pREP3X-*uggt-1 c-Myc*, pREP3X-*uggt-2 c-Myc*, pREP3X *Spgpt1+N/uggt-2C c-Myc*, pREP3X *uggt-2N/Spgpt1+C c-Myc* o pREP3X mediante un ensayo de Western Blot con un anticuerpo primario anti c-Myc (producido en conejo) y un anticuerpo secundario Anti- IgG de conejo conjugado a HRP.

CeUGGT-1, CeUGGT-2, SpGpt1N/UGGT-2C, UGGT-2N/SpGpt1C se expresan correctamente, poseen el peso molecular adecuado y se encuentran presentes en los microsomas indicando que localizan en el RE.

Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* con células *S.pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X, pREP3X-*gpt1+*, pREP3X-*uggt-1 c-Myc*, pREP3X-*uggt-2 c-Myc*, pREP3X-*uggt-2N/Spgpt1+C c-Myc*, pREP3x *Spgpt1+N/uggt-2 C c-Myc*.

Quimeras

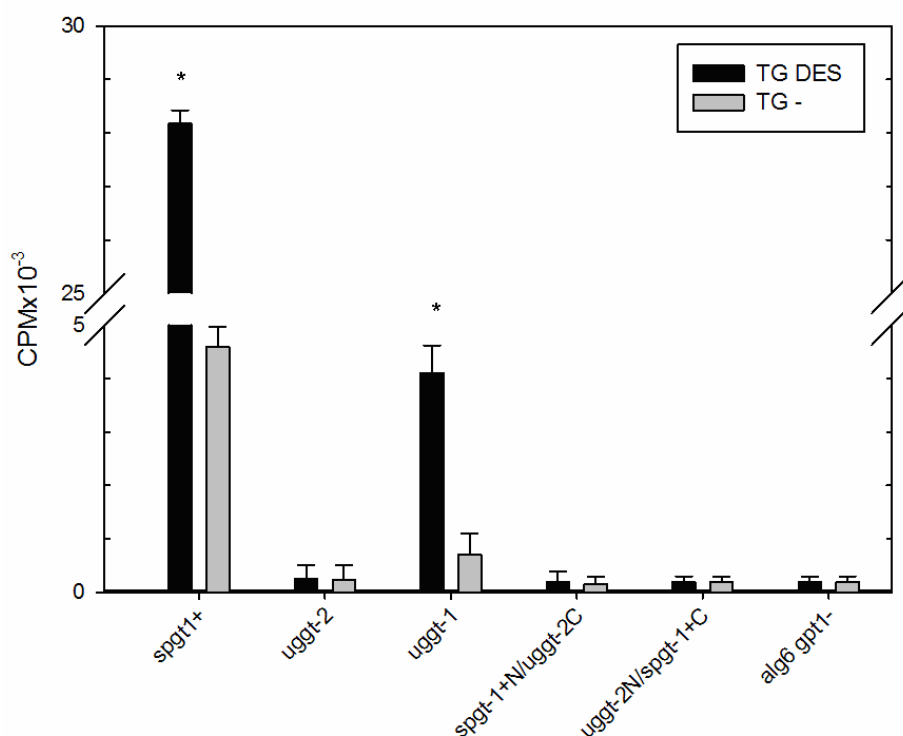


Fig. 34- El extremo C-terminal de CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT. Ensayos *in vitro*. Proteínas microsomales de células *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X-*gpt1+*, pREP3X-*uggt-1* c-MYC, pREP3X-*uggt-2* c-MYC, pREP3X, pREP3X-*uggt-2N/Spgpt1+C* c-MYC, pREP3X-*Spagpt1+N/uggt-2C* c-MYC fueron incubadas con una mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 5 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.6%, NMDNJ 5mM y UDP-[¹⁴C]Glc 3 μCi, a 20 °C por 30 min. Las reacciones se detuvieron con 1 mL de TCA 10% y se midió la radioactividad incorporada. Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar. * indica diferencias significativas.

Tanto la quimera *uggt-2N/Spagpt1+C* c-Myc como *Spagpt1+N/uggt-2C* c-Myc carecen de actividad de UGGT indicando que el extremo C-terminal de CeUGGT-2 es incapaz de glucosilar proteínas mas plegadas (Fig. 34). CeUGGT-1 c-Myc posee actividad de UGGT mientras que CeUGGT-2 c-Myc carece de actividad de UGGT al igual que se observó en los ensayos anteriores.

Ensayos de complementación funcional en levaduras

Las células *S. pombe* WT a temperaturas cercanas a los 37°C comienzan a presentar problemas en el plegamiento de las proteínas y crecen más lentamente que a temperaturas

de crecimiento óptimas (28-30°C). La cepa *S. pombe alg6 gpt1-* transfiere oligosacáridos de estructura M9, por lo que la eficiencia de la transferencia por la OST es menor provocando hipoglicosilación (no se ocupan todos los sitios consenso que se ocupan normalmente cuando el glicano transferido es G3M9). Esto provoca disminución de la solubilidad de las proteínas que carecen de algunos o todos los glicanos voluminosos e hidrofílicos que los mantienen en solución. Por otro lado, esta cepa de levaduras no posee UGGT por lo que los glicanos transferidos no pueden interactuar con CNX/CRT ya que las glicoproteínas nunca presentan oligosacáridos monoglucosilados. Esto provoca que se comiencen a acumular proteínas mal plegadas en el RE, por lo que las levaduras mutantes poseen problemas de crecimiento.

Para determinar si CeUGGT-1 en *S. pombe* funcionalmente reemplaza la UGGT, se realizó un ensayo de complementación funcional en mutantes *S. pombe alg6 gpt1-*. Se sembraron diluciones crecientes de *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X, pREP3X-*Ceuggt-1*, pREP3X-*Ceuggt-2* y pREP3X-*gpt1+* en fase exponencial y se comparó el crecimiento de la misma con la levadura sp61 (WT) en medio rico (YEA) a diferentes temperaturas (25°, 28° y 37°C). Se realizó el ensayo por triplicado.

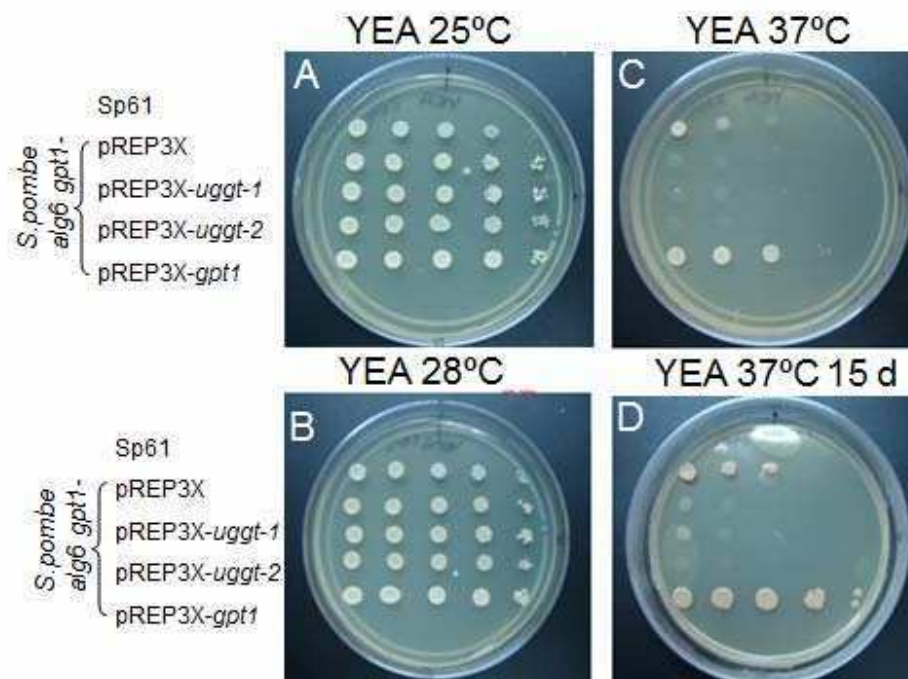


Fig. 35- Complementación funcional de *S. pombe alg6 gpt1-*. Se comparó el crecimiento de *S. pombe* WT (*sp61*) con la mutante *S. pombe alg6 gpt1-* transformadas con pREP3X, pREP3X-*Ceuggt-1*, pREP3X-*Ceuggt-2* o pREP3X-*gpt1+*. Se observa en la figura el crecimiento a 25°C (A), 28°C (B) y 37°C en el día 4 (C) y a 37°C en el día 15 (D) en medio rico YEA.

Como se observa en la Fig. 35 A y B, tanto a 25°C como a 28°C, todas las células son viables observándose crecimiento hasta en la mayor dilución.

A 37°C las levaduras se encuentran en un estado de estrés por acumulación de proteínas mal plegadas. En estas condiciones la UGGT es necesaria debido a que la inducción de chaperonas como BiP no alcanza a compensar dicha acumulación, que se encuentra aún más incrementada en la cepa *alg6 gpt1*- debido a la hipoglicosilación de sus proteínas. La complementación con UGGT revierte esta dificultad (Fig 35 C). De hecho a 37°C, las únicas células que pueden crecer son las que poseen UGGT incluso incubándolas durante mucho tiempo (Fig. 35 D) ya que esta proteína es fundamental para que las proteínas mal plegadas puedan interactuar con las lectinas-chaperonas presentes en el RE. Incluso se observa un mayor crecimiento de la mutante *S. pombe alg6 gpt1*- transformada con pREP3x*gpt1*+, que de la WT (sp61) ya que la primera posee una sobreexpresión de UGGT (Fig. 35 C y D). A 37°C las células que expresan los genes *Ceuggt-1* y *Ceuggt-2* no pueden crecer, indicando que a pesar de que CeUGGT-1 es activa, los bajos niveles de actividad de CeUGGT-1 no serían suficientes para complementar funcionalmente la falta de UGGT en *S. pombe* (Fig. 35 C).

Capítulo II

Estudio de la expresión de los genes *uggt-1* y *uggt-2* en *C. elegans*

uggt-1 y uggt-2 se expresan en distintos niveles durante el desarrollo

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que CeUGGT-1 es la responsable de la actividad de UGGT en *C. elegans*. *Ceuggt-2* podría ser un pseudogen y no ser transcrito o traducido *in vivo* o bien podría codificar para una proteína que desarrolle otra función biológica. Para confirmar que ambos genes se expresan en *C. elegans* se cuantificó la expresión de ambos por Real Time PCR utilizando el gen *ama-1* como referencia. Se utilizaron gusanos sincronizados en L1, L2/L3, L4 y adultos.

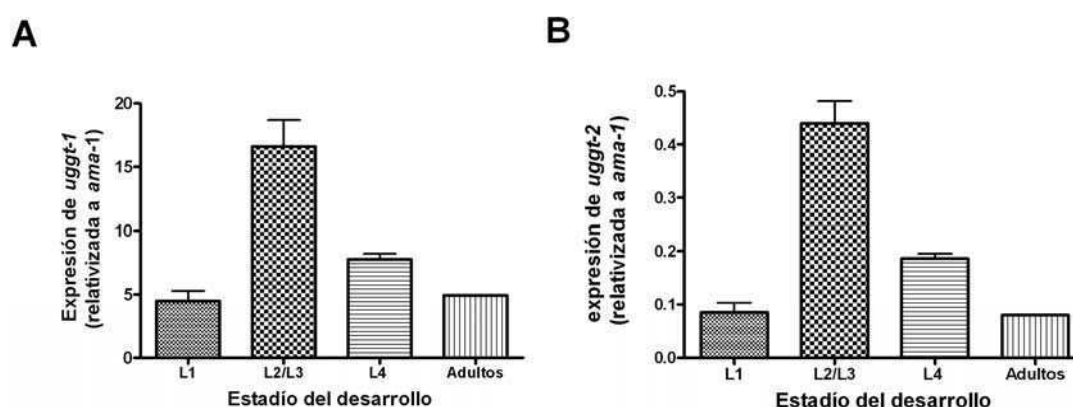


Fig. 36- Patrón de expresión de *uggt-1* y *uggt-2* durante el desarrollo. Los niveles de expresión del mRNA de *uggt-1*(A) y *uggt-2* (B) relativos a los del mRNA de *ama-1* fueron cuantificados por Real Time PCR. Los valores mostrados son el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar.

Los resultados muestran que ambos genes presentan el mismo patrón de expresión durante el desarrollo (Fig. 36). Ambos se expresan durante todo el ciclo de vida del nematodo observándose un máximo de expresión en el estadio de L2/L3. La expresión de *uggt-2* corresponde a lo sumo al 3% de la expresión de *uggt-1* en todos los estadios de desarrollo. El gen *uggt-1* es un gen de baja expresión (aprox. un 30% de la expresión de *ama-1*). Estos resultados indicarían que *Ceuggt-2* no es un pseudogen.

uggt-1 se expresa en sistema nervioso

Para analizar el patrón de expresión corporal de los genes *uggt-1* y *uggt-2* en *C. elegans* se realizaron construcciones que contenían los promotores de cada uno de estos genes en un vector de expresión de gusanos que contiene la secuencia codificante de la *gfp* (ver Materiales y Métodos). Se utilizaron los promotores seleccionados por el proyecto

“Promoterome”, que corresponde a la región de DNA comprendida entre el final del gen inmediatamente anterior y el inicio del gen de interés. El promotor de *uggt-1* posee aprox. 300 pb y el de *uggt-2* aprox. 2000pb (ver materiales y métodos). Estas construcciones, junto con un marcador de co-inyección *rol-6*, fueron microinyectadas en la gónada de gusanos adultos jóvenes N2 y se obtuvieron gusanos transgénicos en la progenie que contenían el plásmido. Se analizó la expresión de GFP por microscopía confocal.

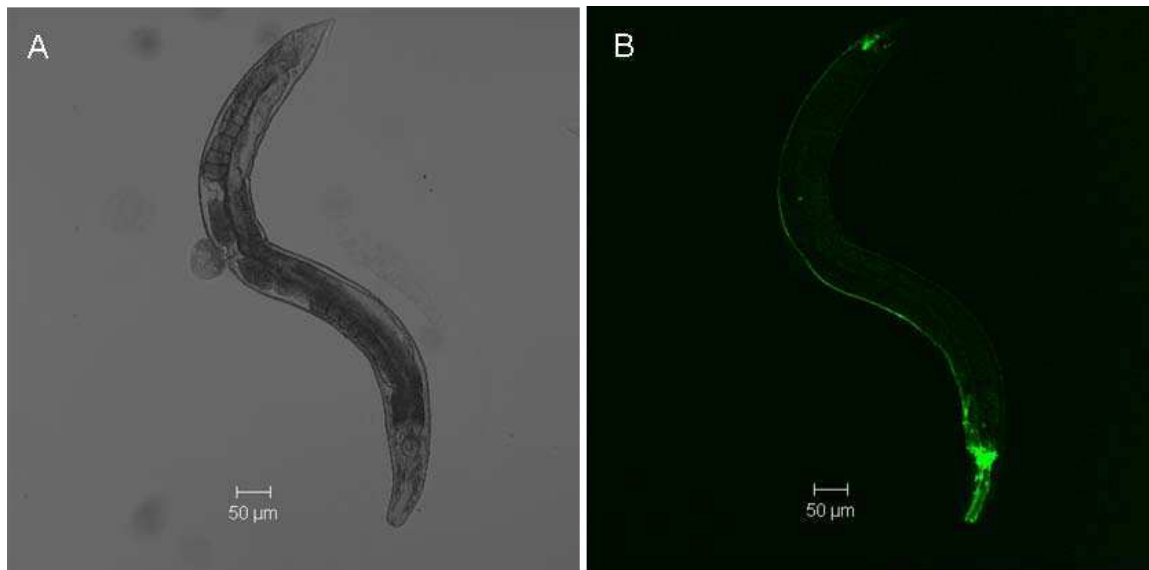


Fig. 37- UGGT-1 se expresa en células del sistema nervioso. Gusanos transgénicos N2 que expresan GFP bajo el control del promotor *uggt-1* fueron visualizados por microscopía confocal. A) Gusano adulto. Microscopía con luz de transmisión B) Expresión de *gfp* por Microscopía confocal en sistema nervioso.

Se detectó expresión de la construcción *Puggt-1::gfp* en células del sistema nervioso tanto de larvas como de gusanos adultos (Fig. 37). GFP se expresa en el anillo nervioso incluyendo las dendritas de las neuronas quimiosensoriales, en el cordón nervioso ventral y en la glándula anal.

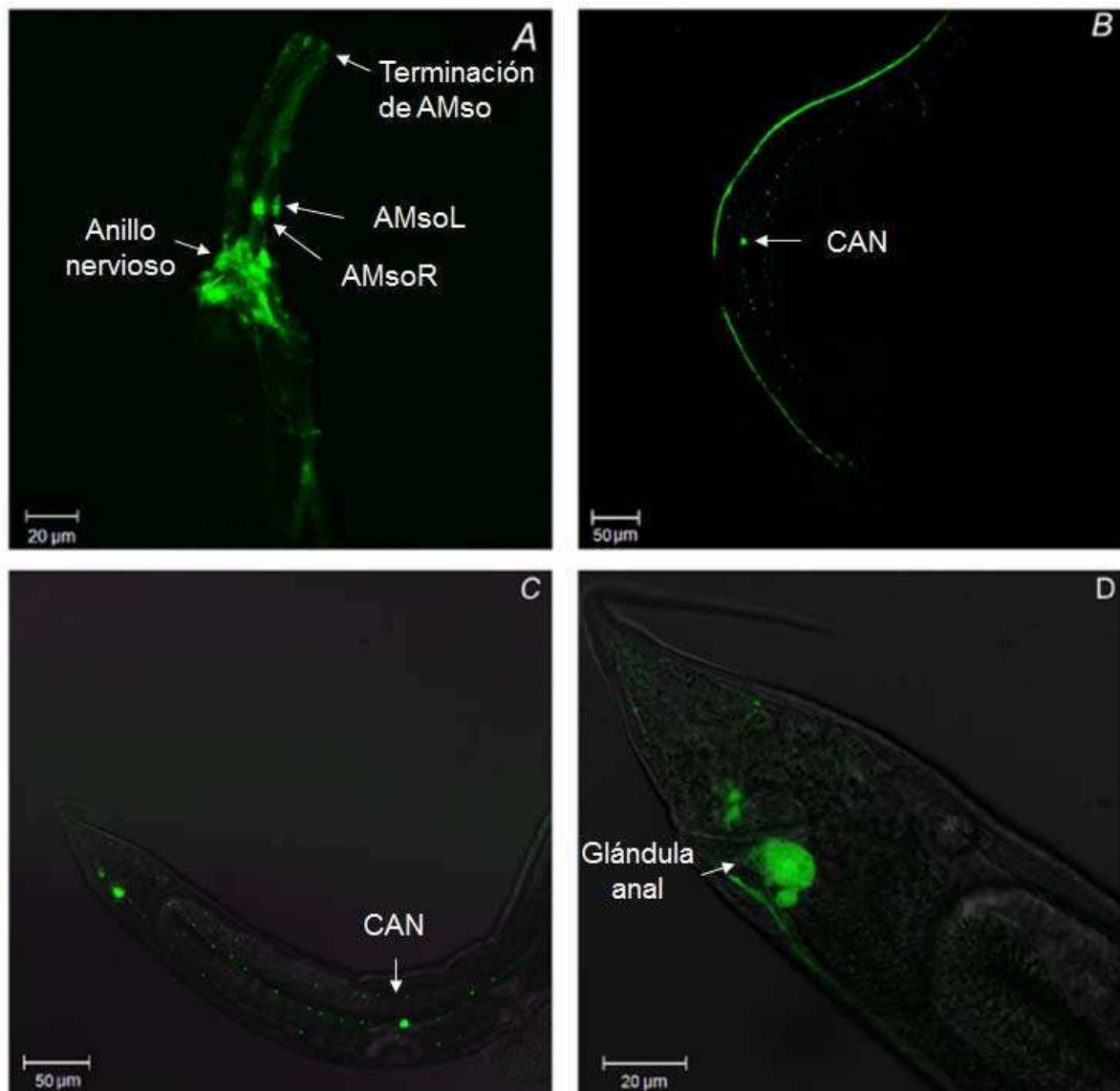


Fig. 38- El gen *uggt-1* se expresa en células del sistema nervioso. Gusanos transgénicos N2 que expresan GFP bajo el control del promotor *uggt-1* fueron visualizados por microscopía confocal. A) "Amphid neurons", Célula "Amphid Socket" (AMso) y anillo nervioso, B y C) Neurona CAN, neuronas del cordón ventral y en las comisuras que contactan con el cordón dorsal D) Glándula anal en la zona caudal.

Específicamente se observa expresión de GFP en las neuronas quimiosensoriales llamadas "Amphid neurons" (Fig 38 A), células ciliadas ubicadas en la parte lateral de la cabeza que se encuentran abiertas hacia el exterior en la base de los labios y constituyen los principales órganos quimiosensoriales de los nematodos. Entre ellas, se observó expresión en la células "Amphid Socket" derecha e izquierda (AMsoR y AMsoL respectivamente) que

proyectan sus dendritas hacia los labios y forman un poro con forma de dona en la base de la boca. También se detectó expresión de GFP en el anillo nervioso (Fig 38 A).

Por otro lado, se observó expresión en las neuronas del cordón ventral y en las proyecciones neuronales que contactan con el cordón dorsal, así como también en la neurona CAN (Fig.38 B, C). La neurona CAN se encuentra a la altura del cuerpo medio, sobre los laterales, a lo largo del canal excretor. No se conoce su función pero se han observado uniones del tipo "gap" entre las mismas y las células excretoras y es esencial para la supervivencia del nematodo. Las uniones del tipo "gap" corresponden a las uniones estrechas que comunican las membranas de dos células conjuntas otorgándoles polaridad. Se observó también expresión de GFP en la glándula anal localizada en la zona caudal (Fig 38 D).

Los resultados obtenidos indican que *uggt-1* se expresa en sistema nervioso, sin embargo, no se puede descartar que este gen se exprese también en otros tejidos y que no haya sido posible detectar su expresión debido a que utilizamos como promotor una región muy pequeña (300pb). Esta región de 300pb podría no corresponder al promotor completo y carecer de secuencias fundamentales para su expresión. Otra posible explicación es que se requiera para la correcta expresión del gen de secuencias presentes en los intrones del mismo o en el 3`UTR. Dichas regiones son utilizadas para la regulación de la expresión génica en *C. elegans* y se encuentran ausentes en la construcción utilizada.

No se encontraron gusanos transgénicos para la construcción *Puggt-2::gfp*. Una posibilidad es que como la expresión endógena del gen *uggt-2* es muy baja resulte difícil la detección de la proteína fluorescente a partir de este promotor. Otra posibilidad es que, al igual que ocurriría en el caso anterior, las construcciones utilizadas en esta estrategia podrían no representar el promotor completo por ser construcciones reporteras, con lo cual carecen de los intrones del gen utilizados en la regulación de la expresión génica en *C. elegans*. Tampoco se encuentra presente la secuencia 3`UTR del gen en dicha construcción que también juega un rol muy importante en la regulación de la expresión. Además, otras secuencias regulatorias que se encuentren más alejadas del gen y no inmediatamente río arriba del ATG podrían ser necesarias, como ocurre en el caso de los promotores complejos.

Expresión de UGGT por el sistema de recombinación de fósmidos

Debido a que utilizando la metodología anterior no resultó posible detectar la expresión de *uggt-2*, que se observó expresión de *uggt-1* sólo en sistema nervioso y que

podría existir la posibilidad de que sea necesario un promotor de mayor tamaño o de secuencias regulatorias para poder estudiar la expresión de los genes, decidimos realizar construcciones utilizando una técnica llamada “Técnica de Recombinación de Fósidos” (Fosmid Recombineering Technique) (ver Materiales y Métodos). Esta técnica permite utilizar un fragmento de DNA de gran tamaño (fósido) e insertar una proteína fluorescente río arriba del gen de interés para poder determinar su expresión y de esta forma poseer el promotor completo y todas las regiones regulatorias.

Para determinar el patrón de expresión de UGGT-1 y UGGT-2 en *C. elegans*, hicimos dos construcciones utilizando una secuencia intercistronica llamada SL2, de manera que la proteína fluorescente se exprese bajo el control del mismo promotor del gen de interés pero sin encontrarse fusionada a la UGGT. Esto es muy útil en el caso de proteínas de RE, donde a veces el agregado de una proteína de fusión puede afectar su plegamiento y llevarla a degradación. Hicimos las siguientes construcciones:

- A) *uggt-1* + SL2 + NLS-*gfp*
- B) *uggt-2* + SL2 + NLS-*mCherry*

Señal de localización nuclear (NLS). Es una secuencia aminoacídica que funciona como una señal de importación nuclear.

Estas construcciones junto con un marcador de co-inyección *lin-15* fueron microinyectadas en la gónada de gusanos adultos jóvenes mutantes para *lin-15* (poseen fenotipo multivulva que es revertido con el marcador de co-inyección) y se obtuvieron gusanos transgénicos en la progenie que contenían el fósido. Se analizó la expresión de GFP y mCherry por microscopía confocal y de fluorescencia. Tanto GFP como mCherry poseen una señal de localización nuclear (NLS) para observar la expresión de las proteínas en los núcleos de las células y así facilitar el reconocimiento de las mismas. Se analizaron gusanos en distintos estadíos: huevos, larvas y adultos.

UGGT-1

Huevos

Se analizó la expresión de GFP en estadíos embrionarios. No observamos expresión de UGGT-1 en embriones tempranos (no se muestra). Se detectó expresión de GFP en huevos de estadío “3-fold” en intestino y faringe, aunque la expresión es muy baja (Fig. 39).

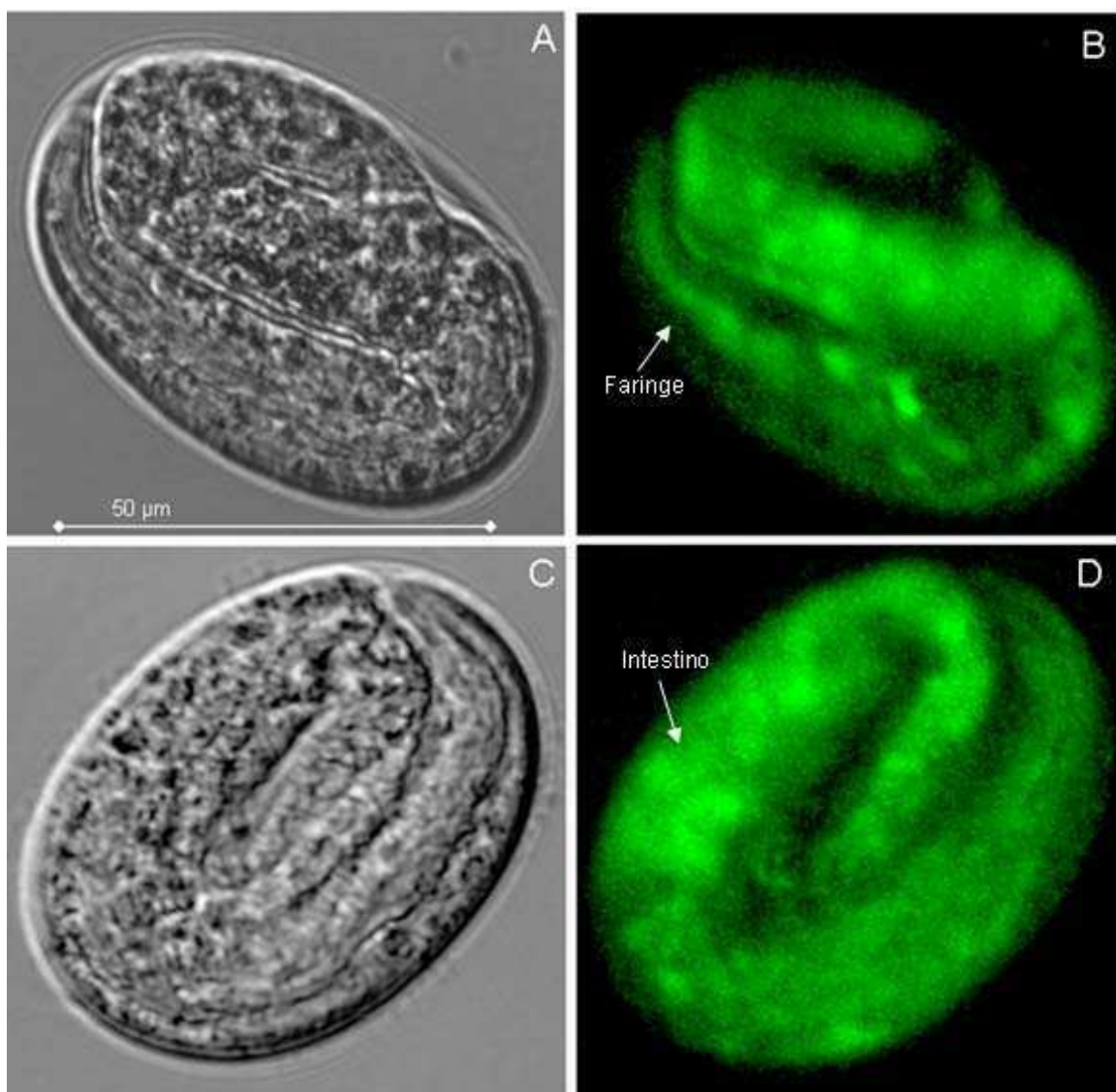


Fig. 39- Expresión de *Puggt-1::GFP* en huevos de estadio "3-fold". Gusanos transgénicos *lin-15* que expresan GFP bajo el control del promotor *uggt-1* fueron visualizados por microscopía confocal. A y C) Microscopía confocal con luz de transmisión B y D) Expresión de GFP por microscopía confocal. Se observa expresión en intestino y faringe.

Larvas

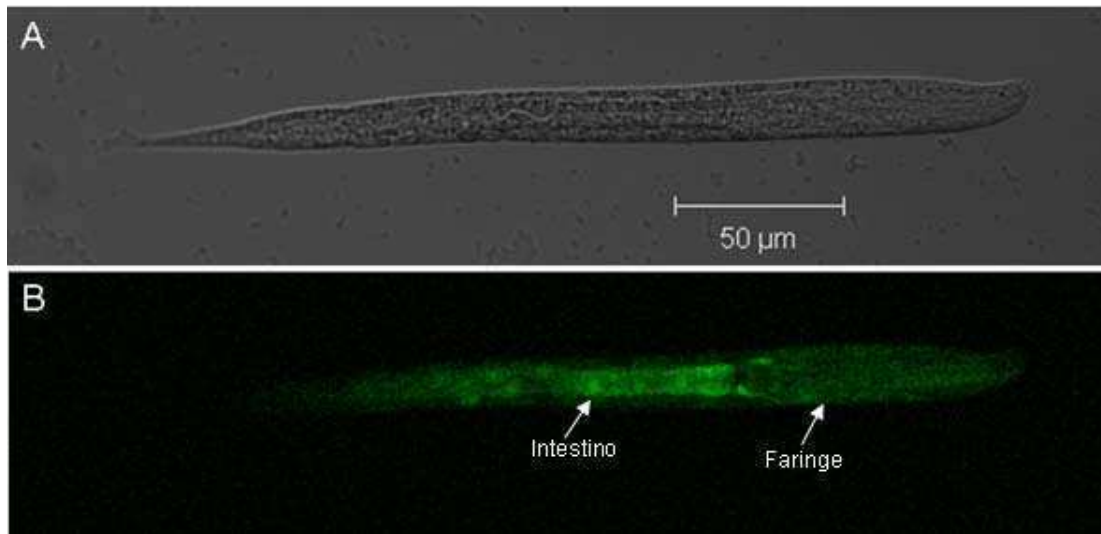


Fig. 40- Expresión de *Puggt-1::GFP* en L1. A) L1 con microscopía confocal con luz de transmisión B) Expresión de GFP por microscopía confocal. Expresión de GFP en L1 en intestino y faringe.

Se detectó expresión de *Puggt-1::GFP* en L1. Se puede observar su expresión en intestino y levemente en la faringe (Fig. 40).

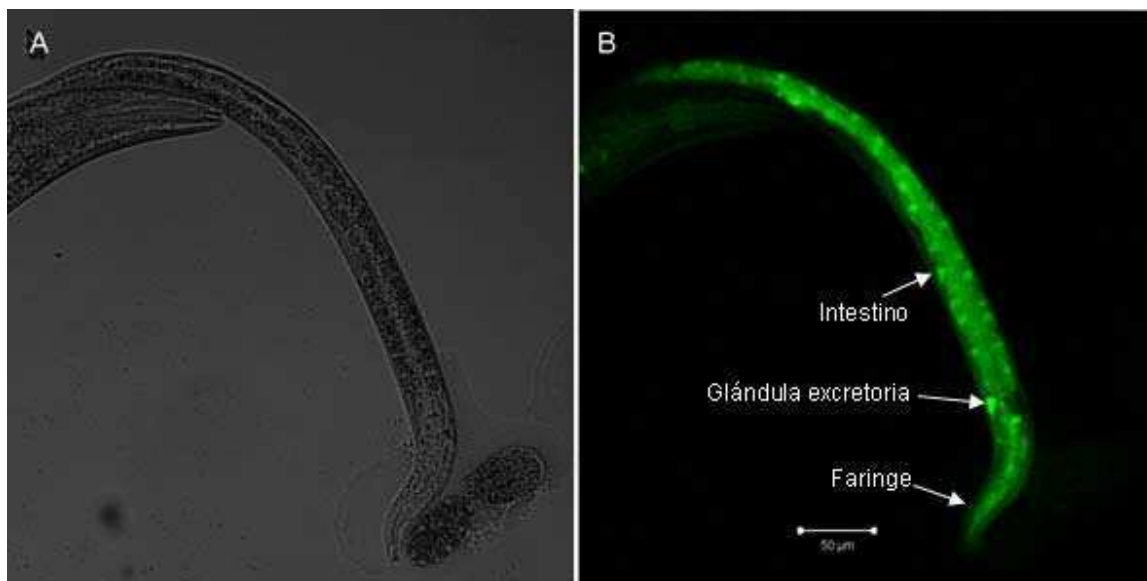


Fig. 41- Expresión de *Puggt-1::GFP* en L2/L3. A) Microscopía confocal con luz de transmisión B) Expresión de GFP por microscopía confocal. Se observa expresión de GFP en intestino, faringe y glándula excretoria.

Se detectó expresión de *Puggt-1::GFP* en larvas en estadio L2/L3. Se puede observar su expresión en células del intestino (puntos redondeados más intensos), faringe y glándula excretoria (Fig. 41).

Adultos

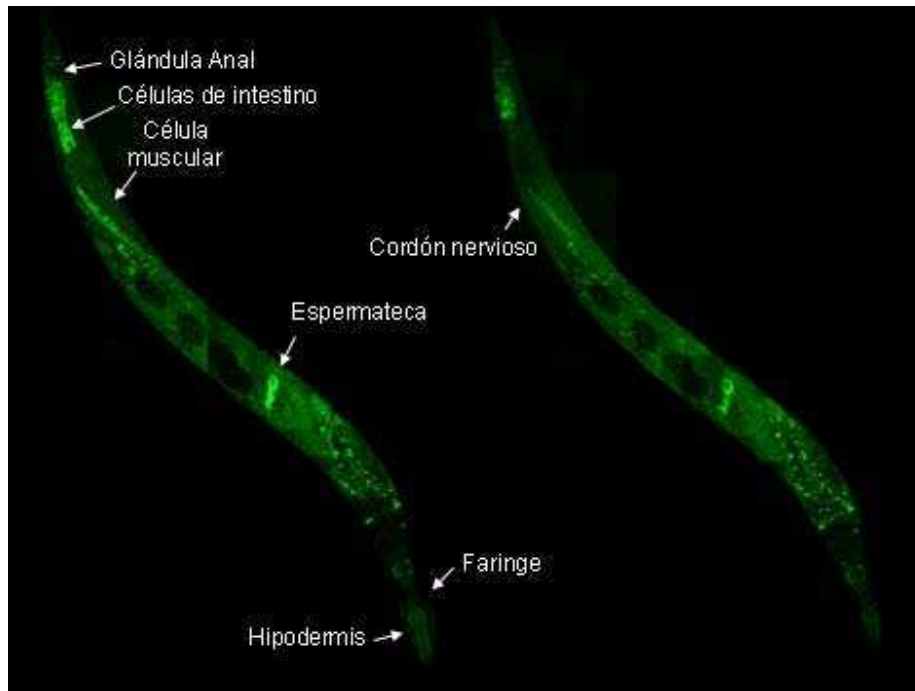


Fig. 42- Expresión de *Puggt-1::GFP* en Adultos (composición de fotos por microscopía confocal). Se observa expresión en células musculares, hipodermis, intestino, faringe, sistema nervioso y sistema reproductor.

Se detectó expresión de *Puggt-1::GFP* en gusanos adultos. La GFP se observó en células musculares, hipodermis, intestino, faringe, sistema nervioso y sistema reproductor (Fig. 42). Los gusanos transgénicos que se obtienen son genéticamente "mosaicos" ya que el fósido no se encuentra integrado en el genoma de *C. elegans* y, por lo tanto la construcción se segrega al azar en las sucesivas divisiones. De esta forma, en el mismo organismo se pueden observar células que expresan GFP, por ejemplo en intestino, y otras células intestinales que no expresan GFP. Para poder determinar el patrón de expresión hay que observar distintas líneas de gusanos y superponer la información obtenida.

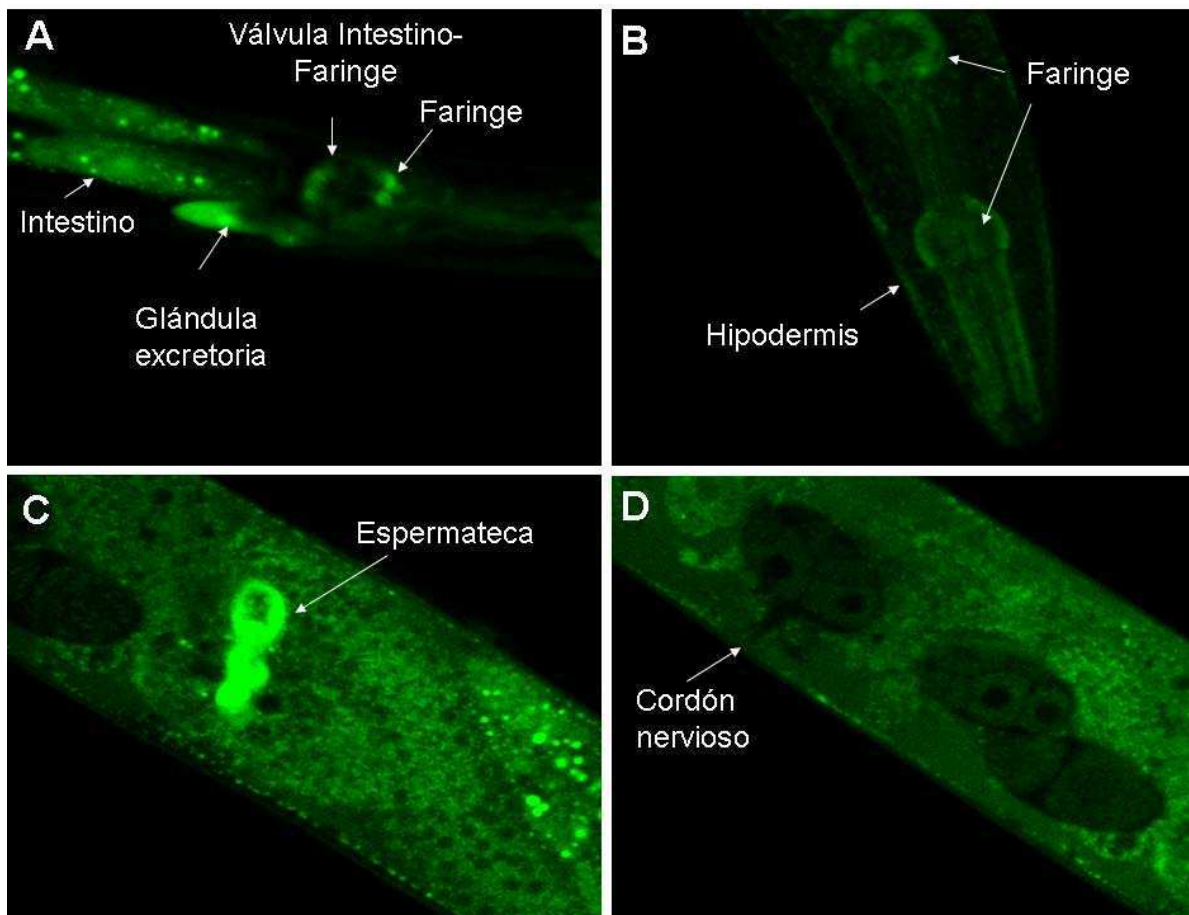


Fig. 43- Expresión de *Puggt-1::GFP* en gusanos adultos mediante microscopía confocal. A) Se observó expresión en faringe, válvula intestino-faringe, glándula excretoria e intestino B) Se observa expresión en faringe y también en hipodermis. cf) Expresión de GFP en espermateca d) Expresión de GFP en cordón nervioso ventral.

Se observa expresión de GFP en faringe, válvula intestino-faríngea, glándula excretoria e intestino. Por otro lado, se observa expresión de GFP en hipodermis (Fig. 43 A y B). Por otro lado, se observa expresión de GFP en la espermateca y en el cordón nervioso ventral (Fig. 43 C). La expresión de GFP en la línea germinal es muy difícil de observar debido a que existe silenciamiento de DNA transgénico en estadios tempranos⁽¹⁷⁷⁾. Este silenciamiento se debe a la combinación de diferentes mecanismos. En embriones tempranos, la expresión de ciertos genes como *pie-1* inhiben la transcripción de genes del embrión por parte de la RNA polimerasa II⁽¹⁷⁸⁾ y en embriones tardíos, otros mecanismos regulatorios permiten la expresión de ciertos genes embrionarios y se bloquean la de otros genes de manera de mantener la identidad de la célula germinal. Existen mecanismos específicos para silenciar DNA foráneo^(179,180). Por estos motivos probablemente, se observa sólo expresión de GFP en espermateca pero no en gónada.

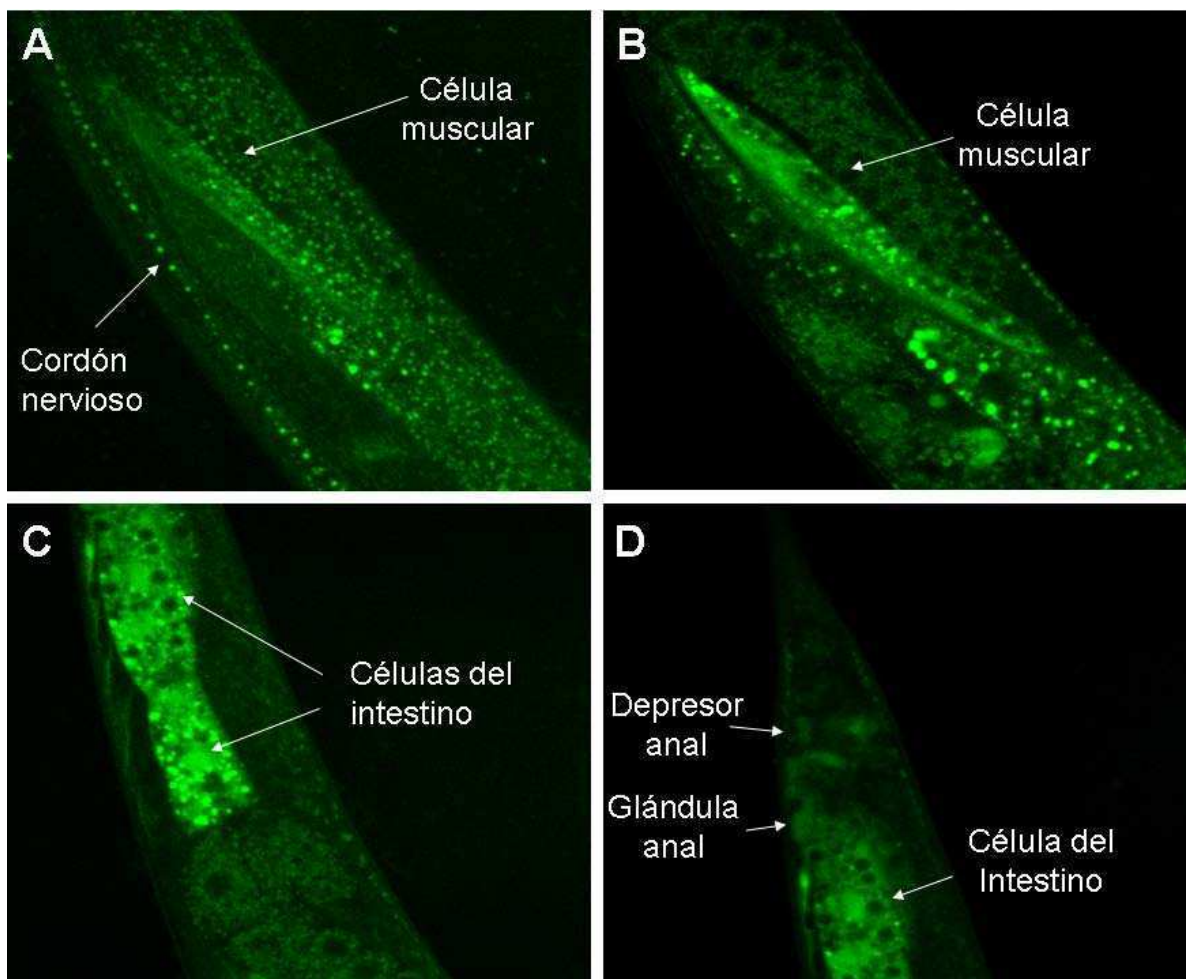


Fig. 44- Expresión de *Puggt-1::GFP* en gusanos adultos mediante microscopía confocal. A) Expresión en cordón nervioso y célula muscular B) Expresión de GFP en célula muscular C) Expresión de GFP en células del intestino D) Expresión de GFP en célula del intestino, glándula anal y depresor anal.

En la Fig. 44 A y B, se observa expresión de GFP en células musculares y en el cordón nervioso ventral. Existe un grado de autofluorescencia muy alto en el nematodo, por lo que otros tejidos que se observan de un color verde tenue en realidad no poseen expresión de GFP. Además en el intestino del nematodo se acumula una sustancia llamada lipofuscina que es autofluorescente ⁽¹⁸¹⁾, por lo que es muy importante para detectar su expresión observar la localización nuclear de GFP. Por otro lado, se observa expresión de GFP en células del intestino, en el depresor anal y en la glándula anal en la región caudal (Fig. 44 C y D). El depresor anal es un músculo sexualmente dimórfico, posee una forma de H y participa en la defecación en los hermafroditas y larvas macho mientras que en los machos adultos altera su forma y funciona como un músculo para protraer la espícula. Cabe

recordar que, el hecho de que ciertas células del intestino posean expresión y otras en el mismo nematodo no la posean es debido a que el nematodo es un mosaico donde el fósido se encuentra en ciertas células y en otras no.

Estos resultados indican que UGGT-1 se expresa ubicuamente en *C. elegans*. No solo en sistema nervioso, sino en sistema muscular, reproductor, alimentario, excretor y en la hipodermis. El resultado obtenido es el esperado ya que la expresión de UGGT-1 en otros organismos es ubicua por participar en el plegamiento de glicoproteínas que es un mecanismo altamente conservado. Es de esperar que se exprese en todas las células y tejidos ya que si bien existen proteínas que no requieren de la misma para su plegamiento, existen otras cuyo plegamiento es estrictamente dependiente de la misma. En humanos por ejemplo ambos homólogos se expresan en distintos tejidos como cerebro, corazón, músculo esquelético, etc ⁽⁸²⁾. Además en la base de datos "NEXTDB" (The nematode expression pattern database) se ha encontrado expresión ubicua del gen por hibridación *in situ* ⁽¹⁸²⁾.

No se encontró expresión para CeUGGT-2 mediante la técnica de recombinación de fósidos. Se intentó inyectar el fósido a distintas concentraciones, se encontraron gusanos transgénicos que restauraron el fenotipo de *lin-15* pero no fue posible detectar la expresión de la proteína fluorescente en ningún estadio. Esto puede deberse a que la expresión del gen CeUGGT-2 sea muy baja y no llegue a detectarse la expresión de mCherry adecuadamente. Otra posibilidad es que la inyección del fósido esté resultando tóxica y las células que lo contienen lo eliminen o bien mueran por lo que no se detecta su expresión. Como *Ceuggt-2* es un gen que posee niveles de expresión muy bajos (Fig. 36), el agregado del fósido introduciría múltiples copias del gen por lo que podría resultar tóxico para la célula. La regulación génica permite a la célula poseer adaptabilidad en distintos procesos biológicos como diferenciación, morfogénesis, ciclo celular, etc. Tanto los niveles de expresión génica, el momento en el que se expresa un gen y el lugar donde actúa la proteína codificada por el mismo son variables que modifican el destino celular. En general proteínas con niveles tan bajos de expresión pueden estar relacionadas a la regulación de procesos biológicos que involucran cascadas de señalización y la modificación en los niveles de estas proteínas podría causar efectos deletéreos para las células.

Capítulo III

Expresión de *uggt-1* y *uggt-2* en
condiciones de estrés de RE

uggt-1 se induce en condiciones de estrés de RE

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT, sin embargo se expresa durante todo el ciclo de vida del nematodo con un pico de expresión en L2/L3. Una posibilidad interesante, es que a pesar de que Ce UGGT-2 carezca de actividad de UGGT, pueda estar involucrada en el plegamiento de proteínas de alguna manera. Uno de los procesos que se ponen en juego para compensar el estrés generado por acumulación de proteínas mal plegadas, es el incremento en la expresión de algunas de las proteínas involucradas en la UPR ⁽¹⁸³⁾. En condiciones en las que se produce la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE se observa un aumento en la transcripción de los genes que codifican para chaperonas ⁽¹⁸⁴⁾. A fin de analizar si ambos genes se encuentran involucrados en la respuesta a estrés, preparamos RNA de gusanos sincronizados en estadio adulto que fueron tratados o no con 5 µg/ml de TN durante 6 h a 20°C. La TN es un compuesto que inhibe la transferencia de la N-acetilglucosamina por lo que bloquea el primer paso de la biosíntesis del Dol-P-P-oligosacárido. Esto inhibe el proceso de glicosilación provocando hipoglicosilación y como consecuencia se acumulan proteínas mal plegadas. Se determinaron los niveles de expresión de *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp-4* (ortólogo a la proteína BiP de mamíferos que se induce con estrés de RE ^(185,186)) por Real-Time PCR (Fig. 45). Se utilizó el gen *ama-1* como referencia.

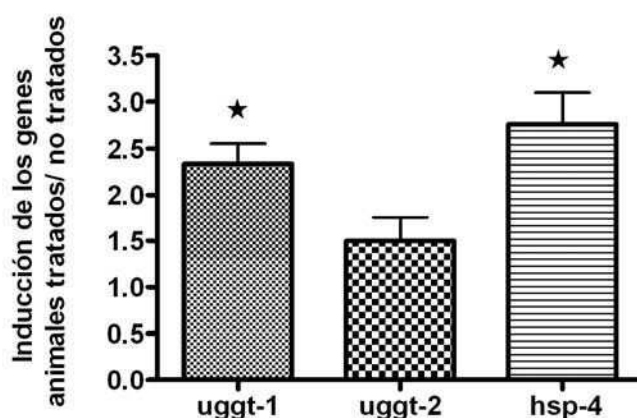


Fig. 45- Solo *uggt-1* aumenta su expresión en condiciones de estrés de RE. Se aisló RNA total de gusanos tratados y no tratados con 5 µg/ml TN y los niveles de expresión de *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp4* fueron cuantificados por Real-Time PCR utilizando el gen *ama-1* como referencia. Los niveles relativos de expresión representan el cociente: Expresión en gusanos tratados con TN/ expresión en gusanos no tratados. Los valores obtenidos para las muestras sin tratar fueron considerados como 1. Los valores mostrados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas.

La Fig. 45 muestra un aumento de 2.3 y 2.7 veces en los niveles de expresión de *uggt-1* y *hsp-4* respectivamente, mientras que el aumento de *uggt-2* es de 1.5 veces. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una prueba T de dos colas para una muestra. Se encontraron diferencias significativas con un valor P de 0.02 para *uggt-1* y 0.03 para *hsp-4*. El aumento observado para *uggt-2* no representa diferencias significativas (P= 0.18).

Debido a que el máximo de expresión observado para ambos genes se encontró en los estadíos de L2/L3, se decidió preparar RNA total de gusanos en estos estadíos en caso de que los bajos niveles de expresión en adultos no permitan detectar el aumento en la expresión de los genes. Se preparó RNA total de gusanos sincronizados en L2/L3 tratados o no con 5 µg/ml de TN durante 6 h a 20 °C. Se determinaron los niveles de *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp-4* por Real-time PCR (Fig. 46).

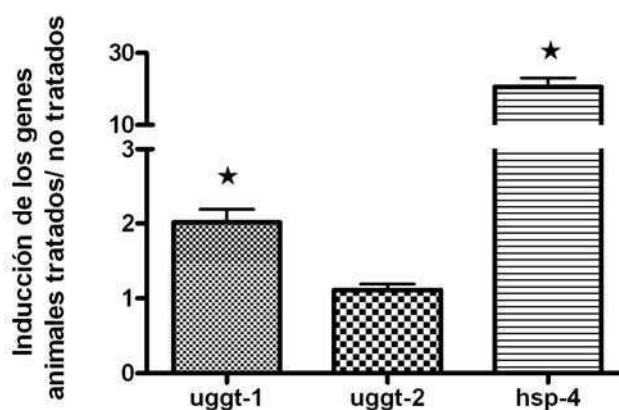


Fig. 46- *uggt-1* aumenta su expresión en condiciones de estrés de RE en los estadíos L2/L3. Se preparó RNA total de gusanos L2/L3 tratados y sin tratar con 5 µg/ml de TN y se analizó el nivel de expresión de *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp4* mediante Real-time PCR utilizando el gen *ama-1* como referencia. La expresión relativa representa el cociente: Expresión de RNA en gusanos tratados/ Expresión de RNA en gusanos no tratados. Los valores obtenidos para las muestras sin tratar fueron consideradas como 1. Los valores mostrados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar. * indica diferencias significativas.

La Fig. 46 muestra un aumento en los niveles de expresión de 2.01 para *uggt-1* y de 20.64 para *hsp-4*. No se observó aumento para *uggt-2*. Estos resultados se analizaron con una prueba T de dos colas para una muestra y se encontraron diferencias significativas con un valor P=0.0034 para *uggt-1* y P<0.0001 para *hsp-4*. El valor encontrado para *uggt-2* no representa diferencias significativas (P=0.602). Los altos valores de inducción de *hsp-4* ya habían sido observados en *C.elegans* ⁽¹¹³⁾. Estos resultados indican que solo CeUGGT-1 aumenta su expresión en condiciones de estrés de RE generadas por tratamiento con TN.

Por otro lado, analizamos los gusanos que expresaban *Puggt-1::gfp* en condiciones de estrés (5 µg /ml de TN por 6 h) y en condiciones normales (20°C). No pudimos detectar un incremento en la expresión de GFP ni en el sistema nervioso ni en otros tejidos con ninguno de los gusanos transgénicos (ni en la construcción *Puggt-1(300pb)::gfp* ni en el transgénico transformado con el fósido *uggt-1::SL2-NLS-gfp*). Esto puede deberse a que el aumento de expresión observado sea leve debido a que el gen se expresa poco y el aumento de dos veces no pueda ser detectado mediante este procedimiento. Anteriormente, Carusso et al. observaron resultados similares para el patrón de expresión de GFP conteniendo una construcción promotor *uggt-1::gfp*. No fue posible observar un aumento de expresión en gusanos transgénicos conteniendo *uggt-1::gfp* ni *cnx::gfp* bajo condiciones de estrés con TN⁽¹³²⁾. Este resultado puede deberse a que existe una diferencia en la sensibilidad de la Real Time PCR con respecto a la microscopía. Además en el primer caso se está observando el aumento en todo el gusano mientras que en el segundo caso solo se observaría un aumento en los tejidos que están expresando la GFP que como se mencionó anteriormente no representa el total de los tejidos donde se expresa.

Activación de la UPR

Como se mencionó en la Introducción, tres proteínas sensan el estrés de RE y activan la Respuesta a Proteínas mal plegadas (UPR): IRE-1, PEK-1 y ATF-6. IRE-1 al digerir el mRNA *xbp-1* genera la proteína XBP-1 activa (Ver "UPR" en la introducción).

Existen tres elementos en "cis" capaces de unir los elementos ATF-6, XBP-1 o ambos llamados "Elementos de respuesta a estrés de Retículo I" (ERSE-I), ERSE-II o "Elementos de respuesta a proteínas mal plegadas" (UPRE). La transcripción de este último depende exclusivamente de XBP-1⁽¹⁸⁷⁾.

Identificamos un elemento UPRE potencial GC-TGACGT-CG en las posiciones -120 a -130 del promotor *uggt-1*. El mismo elemento se encuentra presente en los promotores de *hsp-3* y *hsp-4*. No encontramos secuencias UPRE, ERSE-I o ERSE-II en el promotor de *uggt-2*. El aumento en los niveles de expresión de *uggt-1* ante condiciones de estrés de RE y la presencia de un elemento UPRE en el promotor del mismo, sugieren que CeUGGT-1 aumenta su expresión en condiciones de estrés mediante la vía de *ire-1* en la UPR. Para confirmar esta hipótesis, preparamos RNA total de gusanos N2 (WT), *ire-1*, *atf-6* o *pek-1* (mutantes de la UPR) sincronizados en estadio adulto tratados o sin tratar con 5 µg/ml de

TN. Los niveles de mRNA de *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp-4* fueron analizados por Real time PCR (Fig. 47).

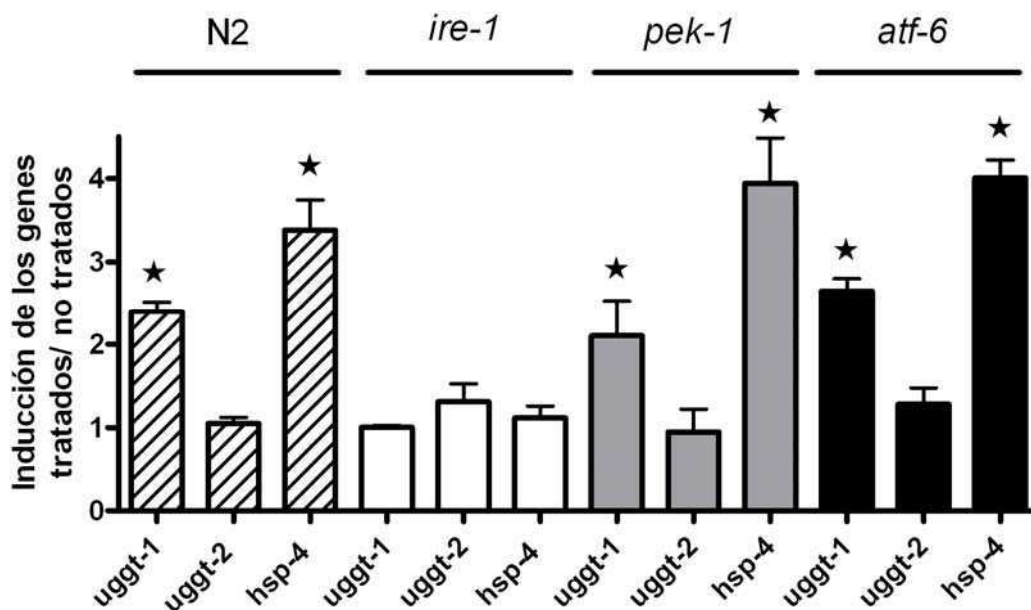


Fig. 47- La expresión de *uggt-1* es regulada por la vía de *ire-1* en la UPR. Se extrajo RNA total de gusanos adultos WT, *ire-1*, *atf-6* y *pek-1* tratados o sin tratar con 5 μ g/ml de TN y se determinó el nivel de expresión de los genes *uggt-1*, *uggt-2* y *hsp-4* por Real time PCR utilizando el gen *ama-1* como referencia. La inducción mostrada en la figura corresponde a: mRNA en gusanos tratados con TN/mRNA de gusanos sin tratar. Los valores obtenidos para las muestras sin tratar se consideraron 1. Las barras de error corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas.

El análisis reveló un aumento de 2.41, 1.04, 2.34 y 2.44 veces en la expresión de *uggt-1* en gusanos WT, *ire-1*, *pek-1* y *atf-6* respectivamente. Estos resultados fueron analizados mediante una prueba T de dos colas para una muestra y se encontraron diferencias significativas con un valor P de 0.0072, 0.017 y 0.015 en gusanos WT, *pek-1* y *atf-6*. Sin embargo el valor de 1.04 encontrado en gusanos *ire-1* no representa diferencias significativas (P= 0.12). Se analizaron también los niveles de expresión de *uggt-2* y no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de gusanos tratados y sin tratar en gusanos WT, *ire-1*, *pek-1* y *atf-6* (P= 0.3050, 0.737, 0.492 y 0.078 respectivamente).

Estos resultados indican que, en las condiciones ensayadas, el aumento en la expresión de *uggt-1* se suprime en ausencia de *ire-1*, y no es afectada por la ausencia ni de *atf-6* ni de *pek-1*. Por lo tanto, *ire-1* sería la encargada de realizar la transducción de la señal que generaría un aumento en la expresión del gen *uggt-1* en condiciones de estrés de RE.

UGGT-1 y UGGT-2: Rol en la expectativa de vida y desarrollo de *C. elegans*

A fin de estudiar el efecto producido por la ausencia de la expresión de las proteínas codificadas por los genes *uggt-1* y *uggt-2*, se realizaron experimentos de RNAi en individuos de la segunda generación (F2) de la cepa de *C. elegans lin-15;eri-1* que es hipersensible al RNAi, incluyendo el sistema nervioso⁽¹⁸⁸⁾. Se analizaron gusanos de la F2 ya que al existir un sistema de replicación del RNAi, se incrementa el efecto producido por el mismo en la segunda generación. Esto se utiliza cuando no se observan efectos que fenotípicos identificables en la P0 y F1 o cuando los mismos son muy leves.

Gusanos F2 sincronizados en L4 *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* y *gfp(RNAi)* (como control) fueron colocados en placas de RNAi y se estudió la supervivencia de los gusanos contando el número de gusanos vivos cada 24h hasta el día en que muere el último gusano.

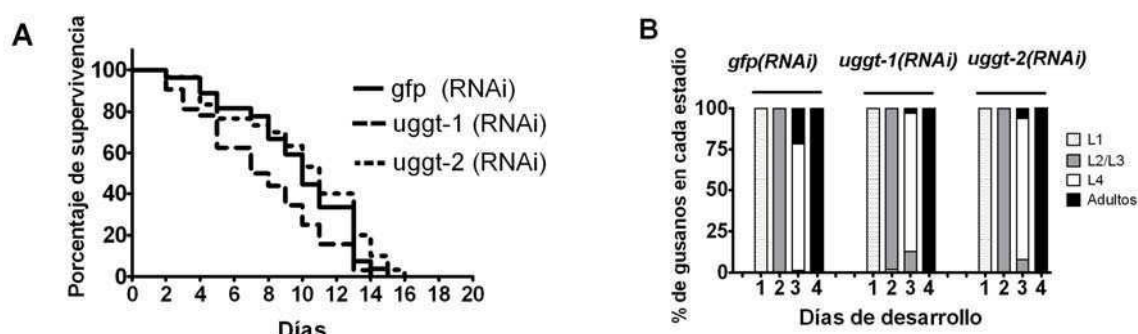


Fig 48. La falta de CeUGGT-1 causa una disminución en la sobrevivencia y la falta tanto de CeUGGT-1 como de CeUGGT-2 causa un retraso en el desarrollo. (A) Gusanos F2 *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* y control *gfp (RNAi)* fueron alimentados en placas de RNAi y monitoreados cada 24 h durante 16 d. Se realizó un análisis de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante un test de rango logarítmico. El día cero corresponde al estadio L4. (B) Estudio del desarrollo a estadios larvales progresivos. Gusanos F1 adultos con huevos *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* y control *gfp (RNAi)* fueron transferidos a placas de RNAi para que pongan huevos durante 6 h y luego fueron removidos. Se analizó el estadio de los gusanos F2 durante 5 d cada 24 h y se determinó el porcentaje de gusanos en L1, L2/L3, L4 y adultos. Estos estudios se realizaron en tres cohortes independientes ($n > 60$) y se realizaron por triplicado. El resultado mostrado en (A) es representativo de tres experimentos y en (B) representan el promedio de tres experimentos.

Se observó que los gusanos *uggt-1(RNAi)* y no los *uggt-2(RNAi)* presentaban una menor supervivencia que los gusanos control *gfp(RNAi)*. La vida media fue de 7.5 para *uggt-1(RNAi)* y 10 días tanto para *uggt-2(RNAi)* como para *gfp(RNAi)* (Fig.48 A). Las diferencias

fueron analizadas mediante un análisis de rango logarítmico mostrando diferencias significativas en la curva de supervivencia entre *uggt-1(RNAi)* y el control ($P < 0.05$). No se observaron diferencias significativas para *uggt-2(RNAi)* (Fig.48 A).

En cuanto al desarrollo de los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* se observó un leve retraso en el pasaje a estadios larvales progresivos con respecto a los gusanos control. En el día 3, el número de gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2 (RNAi)* que llegaron a adultos fue comparado con el número de gusanos adultos de *gfp(RNAi)* mediante una ANOVA de un factor y un post-test de Bonferroni. Se observaron diferencias significativas tanto para *uggt-1(RNAi)* como para *uggt-2(RNAi)* con respecto al control ($P < 0.01$) (Fig. 48 B). Estos resultados indican que tanto *uggt-1* como *uggt-2* son importantes para el desarrollo del nematodo a estadios larvales progresivos. El retraso se observa justo después del estadio L2/L3, en el cual ocurre el pico de expresión de ambos genes, indicando que en dichos estadios la expresión de los genes es fundamental para el pasaje a estadios larvales progresivos.

***uggt-2* es un gen esencial**

Dado que en “Wormbase” estaba reportado que el consorcio de mutantes de *C. elegans* (*C. elegans* Gene Knockout Consortium) había logrado producir un nematodo mutante para el gen *uggt-2* (línea VC1961) pero que la mutante nula de dicho gen generaba letalidad, decidimos estudiar dicha cepa para determinar que efectivamente el gen *uggt-2* fuera esencial. La cepa VC1961 es heterocigota para la deleción ok2510 del gen *uggt-2* y posee una deleción de 783 pb en la región correspondiente al segundo, tercero y cuarto exón (Fig. 49). La cepa VC1961 *uggt-2(ok2510)/+* se encuentra balanceada con un cromosoma balanceador *hT2 (I; III)*, que contiene una traslocación entre el cromosoma I y III. Además posee un gen de expresión en faringe marcado con GFP que funciona como marcador de segregación.

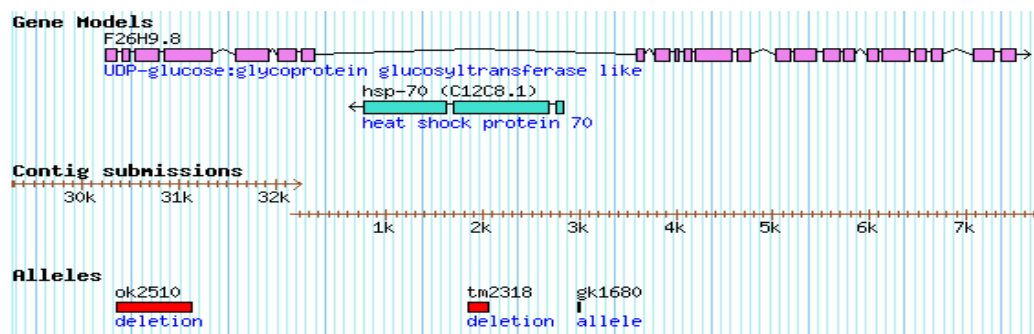


Fig. 49- Delección ok2510 del gen *uggt-2*. Esta delección se encuentra presente en la cepa VC1961 en heterocigosis. (www.wormbase.org.ar)

Primero, realizamos retrocruzas de la cepa VC1961 con la cepa N2 (WT) cinco veces, de manera de eliminar por recombinación otras mutaciones que pudieran existir en el genoma del nematodo y de esta forma obtener una línea *uggt-2*^{-/-} sin otras posibles mutaciones en el genoma. Luego de las cruzas se analizaron los nematodos siendo todos heterocigotos para la mutación *uggt-2* (*ok2510*). No fue posible obtener la línea mutante homocigota del gen *uggt-2* indicando que efectivamente el gen *uggt-2* es un gen esencial.

Los gusanos heterocigotas *uggt-2* (*ok2510*)/+ presentan un retraso en el desarrollo

Se caracterizó el mutante *uggt-2* (*ok2510*) /+ y para ello se dejó poner huevos a los gusanos VC1961 (P0) durante 6 h y luego se los removió de las placas. Se estudió el desarrollo de la F1 durante 5 d por intervalos de 24 h. Se contó el porcentaje de huevos arrestados y el porcentaje de gusanos en estadio L1, L2/L3, L4, adultos y adultos con huevos (Fig. 50).

Aproximadamente el 50% de los huevos de la cepa VC1961 se encontraban arrestados y no podían progresar a L1 (Fig. 50 A). Todos los gusanos adultos eran positivos para GFP. Debido a que *hT2[qIs48]* en homocigosis es letal y que el gen *uggt-2* (*ok2510*) en homocigosis es letal, todos los gusanos que expresan GFP son heterocigotas para el gen *uggt-2* (*ok 2510*). (Fig. 50A)

Por otro lado, se analizaron los huevos que eclosionaron y maduraron a estadios larvales progresivos. Como se observa en la Fig. 50 B, el desarrollo de los gusanos *uggt-2* (*ok2510*)/+ presenta un retraso con respecto a los gusanos N2. Se analizó el porcentaje de adultos en el día 4 mediante una prueba T de dos colas para una muestra y se encontraron diferencias significativas entre el número de adultos de el mutante VC1961 y el WT (P= 0.018).

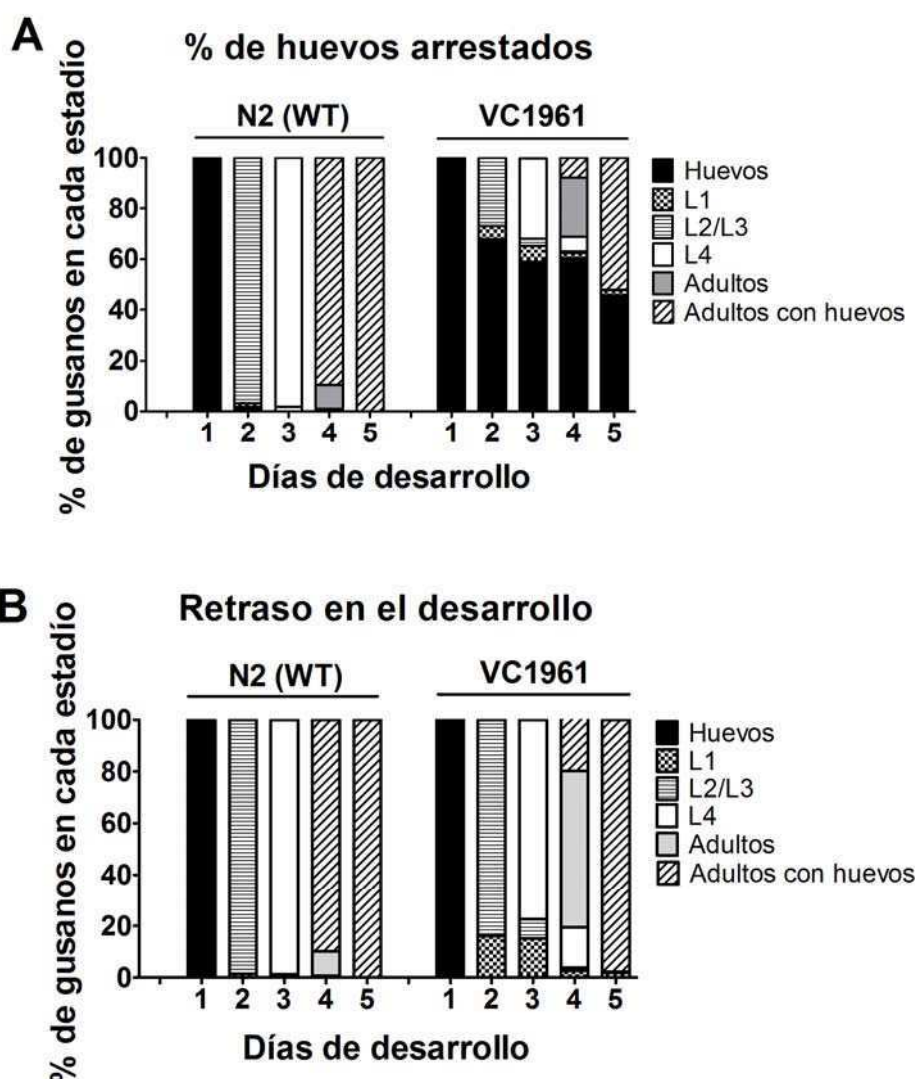


Fig. 50. *uggt-2* es un gen esencial. Gusanos hermafroditas heterocigotas *uggt-2 (ok2510)/+* (VC1961) y N2 (WT) fueron puestos en placas durante 6 h para que pongan huevos y luego fueron removidos. Se analizó el desarrollo de los gusanos durante 5 d en intervalos de 24 h y se determinaron los porcentajes de huevos, L1, L2/L3, L4, adultos jóvenes y adultos con huevos. A) Desarrollo de los gusanos incluyendo en porcentaje de huevos arrestados B) Porcentaje de L1, L2/L3, L4, adultos y adultos con huevos determinados de aquellos huevos que eclosionaron. Estos estudios se realizaron para tres cohortes independientes ($n > 200$) y los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

Estos resultados demuestran que la expresión de CeUGGT-1 en el gusano *uggt-2 (ok2510)/-* no puede reemplazar la función de CeUGGT-2 sugiriendo una actividad biológica diferente de CeUGGT-1. Por otro lado, el nivel de expresión de *uggt-2* encontrado en

gusanos *uggt-2* (*ok2510*)/+ produce un retraso similar al observado en gusanos KP3948 *uggt-2* (*RNAi*) (Fig. 48 B).

Debido al alto nivel de identidad de los genes *uggt-1* y *uggt-2*, no puede descartarse la posibilidad de que el RNAi para un gen pueda afectar la expresión del otro gen. El porcentaje de similitud entre los genes *uggt-1* y *uggt-2* es del 52%. Como se mencionó anteriormente, algunos autores afirman que en *C. elegans* el RNAi es extremadamente específico y solo las secuencias de mRNA que son idénticas son las secuencias blanco. Las secuencias que se encuentran altamente relacionadas o poseen gran porcentaje de identidad no serían secuencias blanco ⁽¹⁶⁰⁾, sin embargo hay opiniones muy variadas al respecto. Además, los resultados mostrados anteriormente (Fig. 48 B) que muestran que existe un efecto fenotípico similar entre los gusanos *uggt-2*(*RNAi*) y los heterocigotas *uggt-2* (*ok2510*)/+ y que no se redujo la actividad de CeUGGT-1 en *uggt-2*(*RNAi*) (Fig. 32), refuerzan la idea de que los efectos biológicos observados son específicos de cada gen y no se ven influenciados, al menos en gran medida, por el gen homólogo.

Al igual que se observó en los experimentos de supervivencia de *uggt-2* (*RNAi*) los gusanos VC1961 heterocigotas no presentaron diferencias significativas en la curva de supervivencia con respecto a los gusanos N2. Tampoco se observaron diferencias significativas en experimentos de retraso en el desarrollo entre la cepa VC1961 y gusanos *uggt-2(ok2510)/+* + tratados con RNAi contra el gen *uggt-2* (Datos no mostrados).

Estudio de la cepa VC1961 al microscopio

Para poder determinar fenotipos identificables en los gusanos *uggt-2* *-/-* decidimos observar al microscopio aquellos embriones que no expresaban GFP. Para ello, se sincronizaron gusanos adultos VC1961 y se dejaron desarrollar los huevos en M9 durante 48 h. Luego se observaron al microscopio Olympus BX60 mediante la técnica Nomarski.

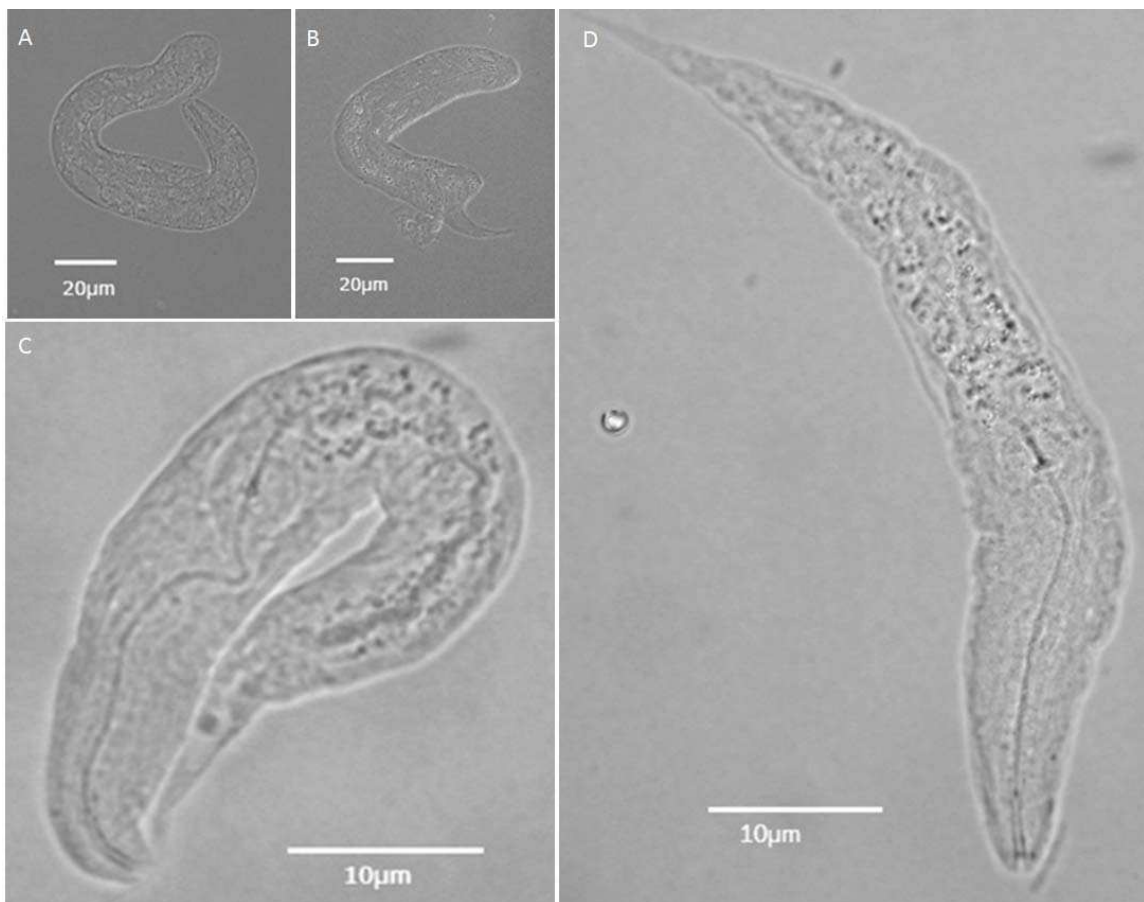


Fig. 51- Gusano VC1961 *uggt-2* $-/-$. Microscopio Olympus BX60, aumento 20x/0.75 (A y B) aumento 100x/1.30 (C y D).

Sorprendentemente observamos un pequeño porcentaje de gusanos L1 arrestados que no podían desarrollarse correctamente. Los gusanos poseen mayor grosor en el cuerpo y son más cortos que los gusanos L1 heterocigotas presentando aprox. el tamaño de un huevo “3-fold” (Fig. 51 y 52). Observamos en el borde del cuerpo ciertos pliegues que podrían indicar que poseen problemas en la cutícula (Fig. 51 D). La gran cantidad de vacuolas hace sospechar que la formación del intestino sería deficiente (Fig 51 A y B). Se observaron también defectos en el desarrollo de la cola (Fig. 51 A y B).

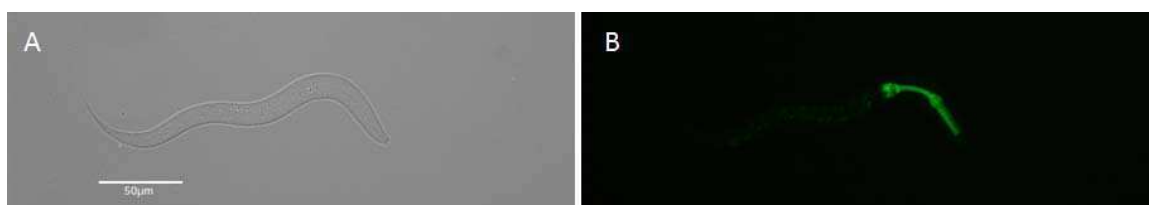


Fig. 52- Gusanos VC1961 heterocigotas. Microscopio Olympus BX60, aumento 20x/0.75. A) Microscopía Nomarski B) Microscopía de fluorescencia. Los gusanos heterocigotas poseen expresión de GFP en la faringe ya que poseen el cromosoma balanceador. Estos gusanos presentan un desarrollo adecuado en L1 con un tamaño esperado.

UGGT-1 y UGGT-2 juegan un rol protector ante condiciones de estrés

Debido a que los resultados obtenidos hasta el momento evidenciaban alteraciones fenotípicas en gusanos *uggt-1(RNAi)* como el retraso en el desarrollo y disminución de la sobrevivencia en condiciones normales, y habiendo confirmado que *uggt-1* se induce con TN; decidimos estudiar los efectos biológicos de la ausencia de ambos genes en condiciones en las cuales se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. Para ello realizamos experimentos de RNAi en gusanos F2 *lin-15;eri-1* sometidos a distintas concentraciones de TN (0, 2.5, 5 y 10 µg/ml). Gusanos adultos F1 con huevos *uggt-1(RNAi)*, *uggt-2(RNAi)* y *gfp(RNAi)* fueron puestos en placas durante 6 h, luego fueron removidos y se analizó el desarrollo de los gusanos F2. Se contó el número de huevos, L1, L2/L3, L4 y adultos durante 5 d cada 24 h. (Fig. 53).

Previamente se había reportado que los gusanos N2 (WT) no se veían afectados en concentraciones menores a 5 µg/ml de TN (Shen, Ellis et al. 2001; Lee, Singaravelu et al. 2007). Sin embargo, nosotros encontramos un retraso en el desarrollo en gusanos KP3948 inclusive a concentraciones de 2.5 µg/ml, y este retraso aumentó con las concentraciones crecientes de TN (Fig. 53 A).

Los resultados observados muestran un retraso mayor para *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* con respecto a los gusanos *gfp(RNAi)*. Este retraso se vuelve muy evidente a concentraciones mayores de TN. Por ejemplo, a 5 µg/ml en el día 4 hay un 90% de gusanos *gfp(RNAi)* alcanzaron la adultez, mientras que 96% de *uggt-1(RNAi)* y 82% de gusanos *uggt-2(RNAi)* permanecieron en estadio L2/L3 (Fig. 53). Este dato fue analizado utilizando un ANOVA de un factor y una posterior prueba de Bonferroni mostrando diferencias significativas entre los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* que alcanzaron la adultez con respecto a los gusanos control *gfp(RNAi)* ($P < 0.001$ y 0.01 respectivamente). El efecto se vuelve muy evidente a concentraciones de 10 µg/ml de TN. A esta concentración el 80% de los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* se arrestaron en L2/L3 y aquellos que maduraron a L4 se veían enfermos y algunos poseían un tamaño menor (Fig. 53).

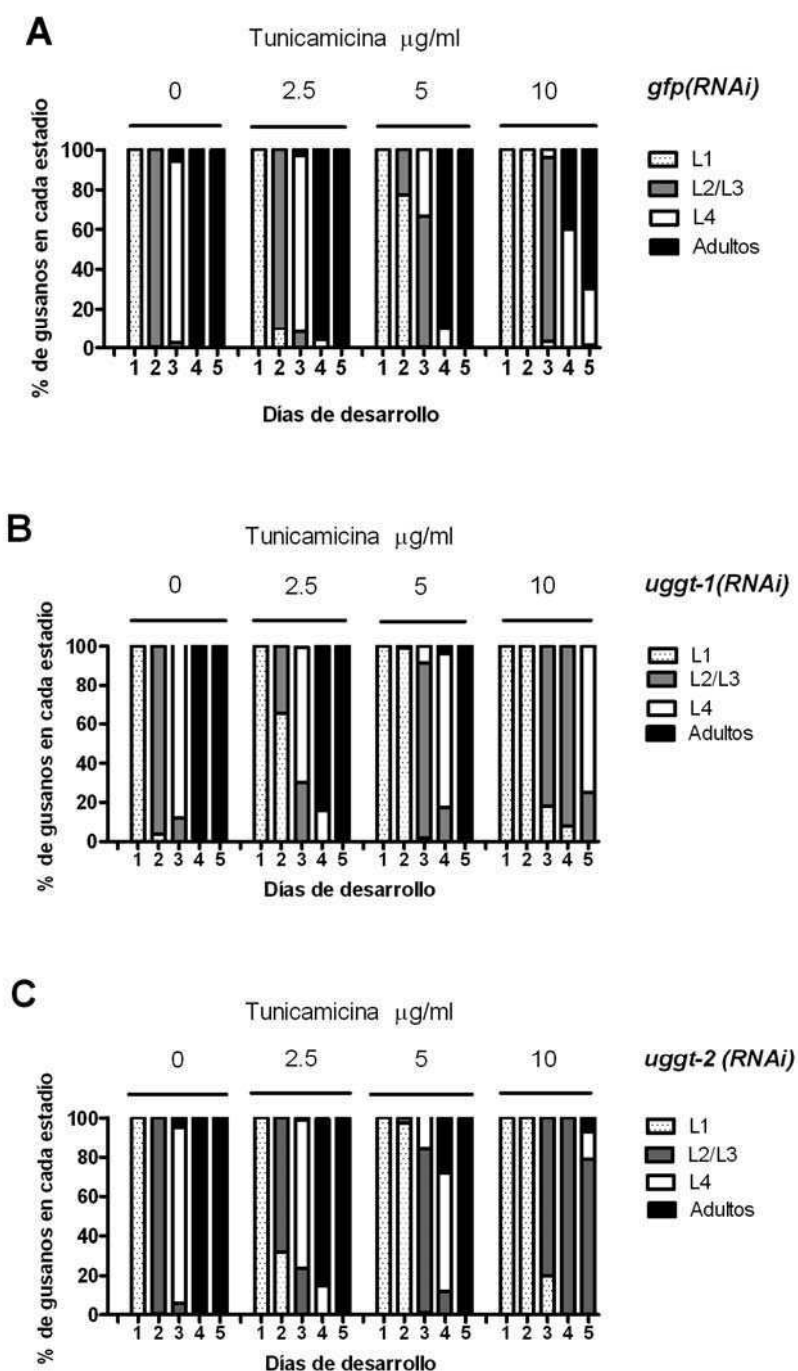


Fig. 53. Ensayo de sensibilidad a TN. El desarrollo de gusanos F2 control *gfp(RNAi)* (A), *uggt-1(RNAi)* (B) y *uggt-2(RNAi)* (C) fue estudiado bajo diferentes concentraciones de TN (0, 2.5, 5 o 10 $\mu\text{g/ml}$). Se pusieron adultos con huevos a durante 6h en placas para que pongan huevos y luego se analizó el estadio de los gusanos durante 5 d en intervalos de 24 h y se determinó el porcentaje de L1, L2/L3, L4 y adultos en cada estadio. Los estudios se realizaron para tres cohortes independientes ($n > 100$) y los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

A concentraciones de 10 µg/ml de TN ninguno de los gusanos *uggt-1(RNAi)* y sólo el 6% de *uggt-2(RNAi)* alcanzaron la adultez mientras que el 70% de los gusanos *gfp(RNAi)* llegaron a estadio adulto. Estos datos fueron analizados con los mismas pruebas estadísticas anteriores, presentando diferencias significativas entre los grupos tratados y el control de *gfp(RNAi)* (Prueba de Bonferroni $P < 0.001$).

Además encontramos diferencias en el porcentaje de sobrevivencia de gusanos interferidos con RNAi a 10 µg/ml de TN ya que el 48% de los gusanos *gfp(RNAi)* permanecieron con vida en el día 5, mientras que sólo un 6 % de gusanos *uggt-1(RNAi)* y un 8% de gusanos *uggt-2(RNAi)* permanecieron con vida en este día. El análisis estadístico se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon las curvas de supervivencia mediante una prueba de rango logarítmico. Las curvas de supervivencia de gusanos tratados presentaron diferencias significativas con respecto a la curva de los gusanos control ($P < 0.002$).

Estos resultados indican que CeUGGT-1 y CeUGGT-2 protegen a los gusanos ante una disrupción de la homeostasis del RE y la acumulación de proteínas mal plegadas. Durante el desarrollo a los distintos estadios larvarios la organogénesis se encuentra prácticamente terminada, sin embargo los gusanos deben aumentar de tamaño produciendo gran cantidad de proteínas lo cual produce en consecuencia un aumento de la síntesis de proteínas involucradas en la UPR^(113,114). Además, en el desarrollo, ocurren eventos como la muda que demandan un aumento en la síntesis proteica para producir la nueva cutícula⁽¹⁸⁹⁾. La maquinaria de plegamiento por lo tanto se ve exigida ya que debe manejar el aumento de la concentración proteica en el RE por lo que necesita de la expresión de chaperonas y proteínas que asisten al plegamiento⁽²⁰⁰⁾. En estas circunstancias, la expresión de UGGT-1 es muy importante ya que de otra forma se acumularían proteínas irreversiblemente mal plegadas llevando a apoptosis y muerte celular⁽¹⁹⁰⁾. Habría otras proteínas como CNX, CRT y BiP que deberían estar aumentadas para poder manejar el estrés fisiológico^(103,127,191). El arresto observado en los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* en L2/L3, coincidente con el pico de expresión de ambos genes (Fig. 36), podría sugerir una participación tanto de CeUGGT-1 como de CeUGGT-2 en salvaguardar la homeostasis del RE ante el estrés fisiológico que se produce en los gusanos durante el desarrollo⁽¹⁹²⁾. En *C. elegans*, luego del estadio L1, el nematodo puede seguir su desarrollo a L2/L3 o bien puede entrar en el estadio "dauer" si las condiciones del medio son desfavorables⁽¹⁹³⁾. Dado que los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* no ingresan al estadio de "dauer" y siguen su desarrollo a L2/L3 permaneciendo más tiempo en dicho estadio, podría suceder que la maquinaria de síntesis

de proteínas se active de forma de comenzar a desarrollar los órganos reproductores necesarios para la puesta de huevos y el nematodo no pueda lidiar con la cantidad de proteínas que ingresan al RE. Es en el estadio de L4 donde se termina de desarrollar la vulva para que el nematodo pueda ingresar a la etapa reproductiva y es justamente en este momento que sucede el arresto, retardando el pasaje a L4. Por lo tanto los genes *uggt-1* y *uggt-2* estarían involucrados en mantener la homeostasis del retículo en condiciones donde se presentan gran cantidad de proteínas mal plegadas (aumentadas por TN), impidiendo el desarrollo adecuado de los nematodos.

UGGT-2 es relevante para aliviar el estrés de RE en ausencia de la proteína IRE-1 en la vía de la Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

Debido a que se demostró en el experimento anterior que un nivel de estrés basal (incluso con 2.5 µg/ml) aumenta los efectos de retraso en el desarrollo de los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* se decidió estudiar este proceso en gusanos que poseen una respuesta bloqueada a la UPR a través de mutantes en los genes *ire-1*, *atf-6* y *pek-1*. Existe normalmente un nivel de estrés basal durante el crecimiento, diferenciación y durante ciertas respuestas fisiológicas. Interacciones genéticas entre *ire-1*, *pek-1* y *atf-6* regulan la UPR del nematodo y son requeridas tanto para el crecimiento como la supervivencia. Defectos en la señalización de *ire-1/xbp-1* en presencia de una mutación tanto con *pek-1* como *atf-6* producen un arresto en L2, lo que indica que la UPR sería muy importante durante el desarrollo ⁽¹¹³⁾.

En los gusanos mutantes de los genes *ire-1*, *atf-6* y *pek-1*, se pondrían de manifiesto el papel que juegan las proteínas CeUGGT-1 y CeUGGT-2 en condiciones donde falta alguna de las vías de respuesta a la UPR y en la cual los gusanos carecen de alternativas para compensar el estrés generado por la acumulación de proteínas mal plegadas.

Realizamos experimentos de RNAi en gusanos F2 mutantes para *ire-1*, *atf-6* o *pek-1* en ausencia o en presencia de 2.5 µg/ml de TN para simular un estrés de retículo basal similar al que encuentran los gusanos durante el desarrollo. Se colocaron gusanos hermafroditas durante 6 h para que pongan huevos, luego fueron retirados y se estudió el desarrollo de los gusanos durante 5 días en intervalos de 24 h.

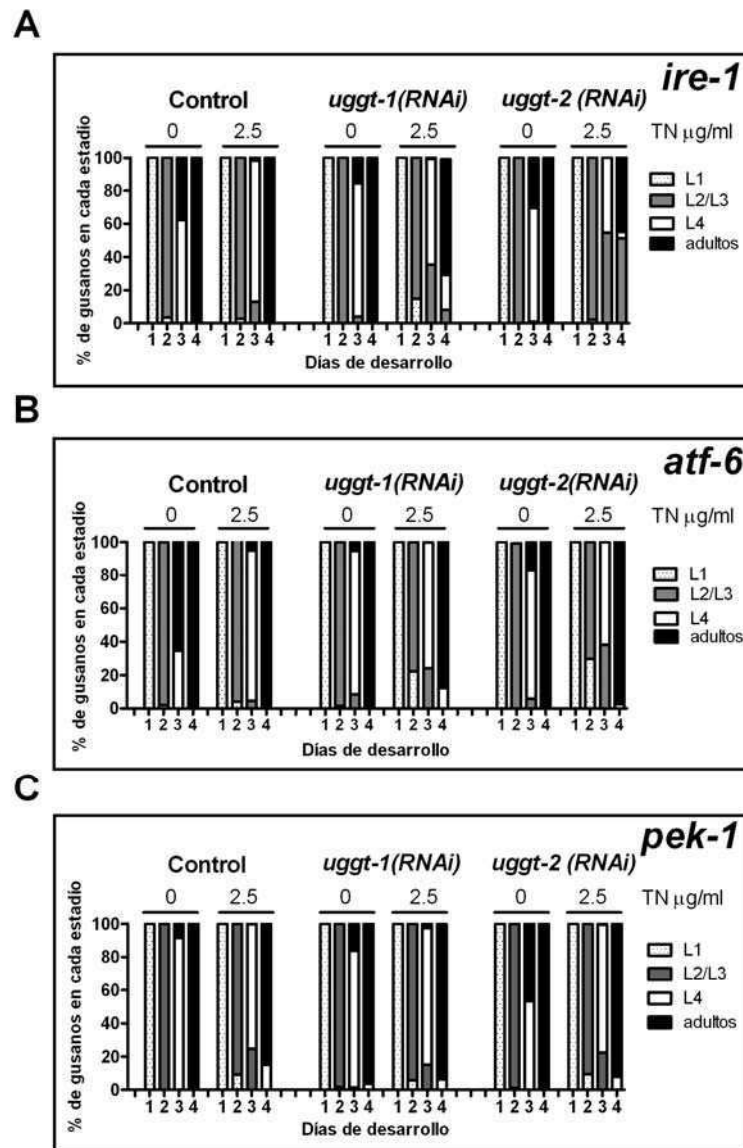


Fig. 54. CeUGGT-2 juega un rol en aliviar el estrés de RE producido durante el desarrollo. Gusanos F2 control *gfp(RNAi)*, *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* de las cepas *ire-1* (A), *atf-6* (B) y *pek-1* (C) fueron analizados bajo 0 y 2.5 µg/ml de TN. Se colocaron adultos en placas durante 6 h para que pongan huevos, luego fueron removidos y se determinó el porcentaje de L1, L2/L3, L4 y adultos durante 5 d en intervalos de 24 h. Estos estudios se realizaron en tres cohortes independientes (n >100) y los valores representan el promedio de tres experimentos independientes.

En la figura 54 se observa que en la cepa *ire-1*, *uggt-1(RNAi)* presenta un retraso con respecto a los gusanos control *gfp(RNAi)* similar al encontrado con la cepa *lin-15;eri-1*.

Sin embargo, encontramos diferencias para el gen *uggt-2*. Más del 50% de los gusanos *uggt-2(RNAi)* se arretan en L2/L3 en el día 4 sin poder pasar a estadios superiores, mientras que

todos los gusanos control se desarrollaron al estadio adulto en este día. Este resultado se analizó con una ANOVA de un factor y una prueba de Bonferroni determinando diferencias significativas entre el control *ire-1 gfp(RNAi)* y los gusanos *ire-1 ugg2(RNAi)* (P value < 0.01).

Los gusanos *ire-1 ugg2(RNAi)* comenzaron a lucir muy enfermos para el día 4 y un 45% de ellos murió, mientras que el control poseía un 86% de gusanos vivos. Las curvas de supervivencia mencionadas fueron analizadas y se encontraron diferencias significativas entre *ugg2(RNAi)* y los gusanos control (P < 0.0001). Los gusanos *ire-1 ugg2(RNAi)* que aún permanecieron vivos para el día 4 lucían muy enfermos, presentando un color más pálido y moviéndose poco. Este defecto fue observado sólo para los gusanos *ire-1 ugg2(RNAi)*, mientras que en los gusanos KP3948 *ugg2(RNAi)* o los gusanos VC1961 heterocigotas para la mutación del gen *ugg2*, no se observaron dichos defectos.

No se observaron estas diferencias para *atf-6* o *pek-1*, donde el retraso es similar al observado en el experimento anterior. Estos resultados indicarían que CeUGGT-2 es particularmente relevante para aliviar el estrés de RE durante el desarrollo en gusanos que poseen la vía de *ire-1* mutada.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

CeUGGT-1 es el sensor del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en *C. elegans* mientras que CeUGGT-2 carece de actividad de UGGT

El modelo de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas aceptado actualmente consta de cuatro componentes principales que participan del ciclo de CNX/CRT: la UGGT que funciona como el sensor del estado de plegamiento de las glicoproteínas y cataliza la transferencia de una glucosa a proteínas que aún no han alcanzado su estructura nativa, la enzima GII encargada de deglucosilar los glicanos y las lectinas chaperonas CNX/CRT, a las cuales se asocia la proteína oxidoreductasa ERp57, que asisten el plegamiento de las proteínas que no han alcanzado su estructura tridimensional correcta^(194,56). El genoma de *C. elegans* codifica para proteínas homólogas a todos los participantes del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas presente en mamíferos, pero no todas ellas habían sido caracterizadas al inicio de esta tesis, como en el caso particular de la UGGT.

Existen solamente en Eutelostomi y en algunos miembros del género *Caenorhabditis* (filum Nematoda) dos genes que codifican para posibles UGGTs (*uggt-1* y *uggt-2*), mientras que los genomas de otros organismos poseen sólo un gen que codifica para UGGTs como es el caso de *S. pombe*, *T. cruzi*, *Drosophila*, etc. Con la información disponible sobre las secuencias que se disponen hasta el momento los resultados parecerían indicar que estos dos genes parecen haber surgido en dos eventos de duplicación independientes en el caso de Eutelostomi y en el caso de *Caenorhabditis*, sin embargo no se dispone de evidencia suficiente para confirmar esta hipótesis ya que el registro de los grupos intermedios es incompleto. Como se mencionó en la introducción, el estudio de la UGGT se ha llevado a cabo en gran medida en organismos unicelulares, sin embargo en organismos multicelulares se conoce muy poco sobre la importancia de esta proteína. Los ratones que carecen de UGGT presentan un fenotipo letal embrionario, por lo que la acción y relevancia biológica de esta proteína en dicho organismo adulto se desconoce. El hecho de que *C. elegans* posea dos genes que codifican para UGGTs es muy útil ya que por un lado, permite estudiar la función de la UGGT en un organismo multicelular versátil con un ciclo de vida corto y un genoma compacto en el cual se pueden realizar gran cantidad de estudios genéticos, bioquímicos, de silenciamiento génico, etc. Por otro lado, nos permite poder estudiar la función de UGGT-2.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, caracterizamos la UGGT de *C. elegans*, demostramos la existencia de actividad UGGT en el nematodo (Fig. 25). La enzima responsable de dicha actividad, CeUGGT-1, posee características bioquímicas similares a las que presentan las UGGTs de otros organismos. En particular se analizó el pH óptimo y el requerimiento de cationes (Fig. 27) ^(74,55,73). Además, realizamos experimentos de expresión heteróloga, en los cuales expresamos el ORF F48E3.3 y F26H9.8 (llamados en esta tesis *uggt-1* y *uggt-2* respectivamente) en células mutantes *S. pombe alg6 gpt1-*, que carecen de UGGT y transfieren Man₉GlcNAc₂, y comprobamos que solo la proteína CeUGGT-1 posee actividad de UGGT, siendo esta la única responsable de la actividad encontrada en *C.elegans* (Fig. 28 y 30). *S. pombe alg6 gpt1-* es incapaz de crecer en condiciones de estrés a 37°C ⁽⁸⁷⁾. Sin embargo, dicho fenotipo es anulado si se expresa el gen *gpt1+* en el un plásmido de expresión de levaduras como *pREP3X*. Se realizó un experimento de complementación funcional y se analizó la capacidad de crecimiento a 37°C de la levadura *S. pombe alg6 gpt1-* transformada con *pREP3X ugg-1*, *pREP3X ugg-2* y *pREP3X Spgpt1+*. Se observó que CeUGGT-1, a pesar de poseer actividad de UGGT, es incapaz de complementar funcionalmente el fenotipo mutante de la levadura *S. pombe alg6 gpt1-*. Estos resultados coinciden con los resultados de las Fig. 25 y 28 que mostraban que en ensayos de medición de la actividad de *C.elegans* y de células de levaduras *alg6 gpt1-* que expresan dichos genes, la actividad proveniente de CeUGGT-1 sería menor a la actividad de rata o *S. pombe*.

Hasta el presente se desconoce la función de la proteína codificada por el gen *uggt-2* en mamíferos ⁽⁸²⁾. Para poder estudiar la proteína UGGT-2 de *C. elegans* se expresó de forma heteróloga el gen *uggt-2* utilizando el mismo diseño experimental que para CeUGGT-1 (una optimización de codones para *S. pombe* que permitió una frecuencia de utilización de codones de 86% para *uggt-1* y 87% para *uggt-2*). Los niveles de expresión de los mensajeros de los genes que codifican para CeUGGT-1 y CeUGGT-2 son similares (Fig. 29). Ambas proteínas se expresan correctamente y con el peso molecular adecuado en la fracción de RE, sin embargo no fuimos capaces de detectar actividad de UGGT en levaduras transformadas con *pREP3X-uggt-2* tanto *in vitro* como *in vivo* (Fig 28 y 30).

Los resultados encontrados parecerían indicar que la única proteína con actividad de UGGT en *C.elegans* es UGGT-1. El experimento que permitiría corroborar estos resultados consistiría en medir actividad de UGGT en gusanos mutantes donde se haya delecionado el gen que codifica para UGGT-1. Sin embargo, como no se disponen de mutantes para *uggt-1*, medimos actividad de UGGT en microsomas de gusanos *uggt-2(RNAi)*, *uggt-1(RNAi)* y

gfp(RNAi). Encontramos niveles de actividad similares en microsomas de gusanos *uggt-2(RNAi)* y en los gusanos control tratados con *gfp(RNAi)* mientras que los gusanos *uggt-1(RNAi)* presentaron una reducción del 60% en los niveles de actividad de UGGT con respecto al control (Fig. 32). Estos resultados indicarían que el gen responsable de la actividad e UGGT es *uggt-1*.

Como mencionamos anteriormente CeUGGT-1 y CeUGGT-2 poseen un 40% de identidad y ambos poseen dominios similares en el extremo C-terminal que se encuentra altamente conservado tanto entre las UGGTs de *C. elegans* (62% de similitud) como con las UGGTs de otros organismos (55-90% de similitud). En humanos, como en el resto de los vertebrados, existen dos genes homólogos que codifican para putativas UGGTs: *HUGT-1* y *HUGT-2*. Las proteínas codificadas por estos genes presentan un 55% de identidad. Tanto *HUGT-1* como *HUGT-2* localizan en el RE, pero solo el primero posee actividad de UGGT y aumenta su expresión ante condiciones de estrés de RE ⁽⁸²⁾. La UGGT es una enzima que presenta dos dominios estructurales, un dominio C-terminal catalítico y otro N-terminal ⁽⁸¹⁾. En humanos se determinó que si bien *HUGT-2* carece de actividad de UGGT, su dominio C-terminal es activo, mientras que su extremo N-terminal es incapaz de reconocer los determinantes presentes en las proteínas mal plegadas ^(82,86). El hecho de que CeUGGT-2 carezca de actividad de UGGT pero que posea un alto porcentaje de similitud podría implicar que su extremo C-terminal aún participe en el reconocimiento de UDP-Glc y transferencia de glucosa a proteínas mal plegadas como en el caso de humanos. Para analizar esta posibilidad, construimos proteínas quiméricas combinando los extremos N y C terminales de CeUGGT-2 con los extremos de la UGGT de *S. pombe* y medimos actividad de UGGT *in vitro*. Las quimeras fueron construídas de manera tal de conservar intactos los dominios estructurales al realizar la fusión de ambos dominios y además se tuvieron en cuenta para su construcción los dominios hallados por el programa HHPRED y SMART (Fig. 19,21-23). El sistema de expresión utilizado para CeUGGT-1 y CeUGGT-2 son células de levaduras, mientras que para *HUGT-1* y *HUGT-2* son células de mamíferos. Las proteínas quiméricas se expresan correctamente en la fracción de RE (microsomas) y poseen el peso molecular adecuado (Fig. 31). Sin embargo, ninguna proteína quimérica generó una UGGT activa indicando que el extremo C-terminal de UGGT-2, a diferencia de lo que ocurre en humanos, sería incapaz de transferir glucosa a proteínas mal plegadas.

Este resultado puede deberse a que, como mencionamos anteriormente, las UGGTs de *C. elegans* y de humanos parecen haber surgido en dos eventos independientes y en cada caso la proteína se haya especializado para desarrollar una actividad distinta por lo

cual no se conservó la actividad catalítica en ambos casos. En este escenario, CeUGGT-1 y HUGT-1 serían proteínas homólogas que cumplen la misma función de sensor mientras que CeUGGT-2 y HUGT-2 no lo serían. Sin embargo, en los experimentos realizados con las UGGTs de humanos, la quimera activa que combinaba el extremo N terminal de HUGT-1 con el C-terminal de HUGT-2, conservó sólo un 46% de actividad con respecto a la HUGT-1⁽⁸⁶⁾. Por este motivo, es posible que la quimera obtenida combinando CeUGGT-2 y la UGGT de *S. pombe*, haya resultado en un nivel de actividad muy bajo y no haya sido posible detectarlo en los ensayos *in vitro*. También existen ciertas similitudes entre HUGT-2 y CeUGGT-2. Ambas localizan en el RE y no aumentan su expresión en condiciones de estrés. Ambas poseen porcentajes de expresión muy bajos como muestran los registros de expresión de "The gene expression atlas - European Bioinformatics Institute". Por lo tanto, otro escenario posible, que no puede dejar de considerarse es que ambas hayan surgido de la misma duplicación original y que ambas desempeñen la misma función pero que la conservación de la actividad no haya sido relevante para la función que cumplen actualmente.

CeUGGT-2 realizaría una nueva función biológica en el RE de la cual se discutirá más adelante.

CeUGGT-1 posee una expresión ubicua en *C.elegans*. Tanto CeUGGT-1 como CeUGGT-2 se expresan durante todo el ciclo de vida del nematodo con un pico de expresión en L2/L3

Se analizó el patrón de expresión corporal de CeUGGT-1 mediante la construcción de líneas de gusanos transgénicos en los cuales se microinyectó un fósforo conteniendo el gen *uggt-1* con la secuencia de la *gfp* río arriba del gen. CeUGGT-1 se expresa en todos los tejidos del nematodo: células musculares, intestino, hipodermis, faringe, sistema nervioso y sistema reproductor (Fig. 42). También se observó expresión en huevos, larvas y gusanos adultos. Dado que la construcción utilizada genera una estructura extracromosomal, que no fue integrada al genoma, los gusanos transgénicos presentaron mosaicismos en cuanto a la expresión del mencionado reportero. A partir de la observación de varios gusanos es que se puede determinar la expresión de la proteína^(195,196). El patrón de expresión encontrado para CeUGGT-1 es similar al encontrado para CRT que se expresa en varios tejidos incluidos intestino, útero, faringe y pared muscular⁽¹⁹⁷⁾. También es consistente con el resultado encontrado por "The Nematode Expression Pattern Database (NEXTDB 4.0) por el

laboratorio de Kohara que realizó un proyecto a gran escala de hibridación *in situ*, en el cual han observado que el gen *uggt-1* se expresa en todas las células y estadios del nematodo ⁽¹⁸²⁾.

En experimentos anteriores, habíamos observado la expresión de CeUGGT-1 en sistema nervioso solamente (Fig. 37 y 38). En estos experimentos se utilizó un promotor de 300 pb el cual fue clonado al plásmido pPD95_75 río abajo de la *gfp*. Esta elección fue basada en el proyecto Promoterome ⁽¹⁶⁹⁾, y probablemente esta región sea sólo un fragmento del promotor *uggt-1* que dirigiría la expresión en sistema nervioso. Este patrón de expresión ya había sido observado anteriormente para otras proteínas del control de calidad como CNX que además se expresa en células H excretorias y en la espermateca ⁽¹²⁶⁾. Este fragmento de promotor dirige específicamente la expresión de UGGT-1 en neuronas probablemente para manejar el pronunciado incremento en la síntesis de glicoproteínas de membrana tanto durante la diferenciación como durante el crecimiento. Ya ha sido previamente reportado en mamíferos que las neuronas deben manejar una alta tasa de síntesis de glicoproteínas que genera un nivel de UPR fisiológico durante el desarrollo ⁽¹⁹⁷⁾.

Lamentablemente, tanto en los experimentos donde utilizamos el sistema de fósmidos como en los experimentos en los que utilizamos el promotor elegido por el proyecto Promoterome clonado al plásmido pPD95_75 (2Kpb), no hemos podido observar expresión de CeUGGT-2. En el caso del promotor de *uggt-2* de 2 Kpb, el hecho de no haber observado expresión puede deberse a que dicho fragmento no corresponda al promotor completo y por lo tanto no sea suficiente para observar expresión del gen. También puede deberse a que el promotor del gen *uggt-2* sea complejo por lo que podría poseer secuencias regulatorias que se encuentran varios Kpb alejadas del gen u otros factores específicos o bien, que necesite de algunos de los intrones o del 3'UTR de *uggt-2* para su expresión ⁽¹⁹⁸⁾. El 3'UTR en muchos casos es fundamental para la correcta expresión de un gen en *C. elegans* ^(199,179). Otra posibilidad es que, como se observó en los experimentos de Real time, el nivel de expresión sea muy bajo y por lo tanto los niveles de detección no sean los adecuados para la visualización por este sistema.

Por otro lado, se microinyectaron gusanos *lin-15* con el fósido que contenía al gen *uggt-2-SL2-mCherry* junto con el marcador de co-inyección *lin-15* y se seleccionaron aquellos nematodos transgénicos que revirtieron el fenotipo multivulva. En ninguno de estos nematodos se pudo observar expresión de mCherry. Este efecto, al igual que en el caso anterior, podría deberse a que los bajos niveles de expresión observados para *uggt-2* (3% de *uggt-1*) (Fig. 36) no permitan observar la expresión de mCherry correctamente. Otra

posibilidad es que el mismo gen *uggt-2*, al poseer un nivel de expresión tan bajo, si se introducen otras copias del mismo aumentando su expresión, produzca un efecto tóxico y se altere la homeostasis de la célula. También este efecto puede deberse a otros genes que se encuentren contenidos en el fósido que puedan resultar tóxicos al aumentar el número de copia de los mismos. Si este fuera el problema se podría utilizar en experimentos futuros un fósido que contenga un número menor de genes.

Otro enfoque que abordamos para analizar la expresión de estos genes fue el estudio de la expresión por Real Time. No existe un método de fraccionamiento sencillo que nos permita estudiar órganos o tejidos en el nematodo. Mediante Real Time PCR hemos podido detectar expresión de *uggt-1* y *uggt-2* durante todo el ciclo de vida del nematodo con un máximo de expresión en L2/L3 (Fig. 36). Estos resultados nos indicaron que si bien la proteína UGGT-2 carece de actividad, *uggt-2* se expresa. Cabe mencionar que, “The Nematode Expression Pattern Database (NEXTDB 4.0) del laboratorio de Kohara no ha podido detectar expresión del gen *uggt-2* de *C. elegans* por hibridación *in situ* tampoco ⁽¹⁸²⁾.”

Se realizaron experimentos de silenciamiento génico con RNAi contra los genes *uggt-1* y *uggt-2* y se observó que la falta de ambos genes produce un retraso en el desarrollo por lo que los gusanos permanecen más tiempo en cada estadio larvario antes de pasar al siguiente probablemente intentando manejar un nivel de estrés endógeno que surge de una mayor demanda de proteínas que se deben sintetizar en algunos momentos específicos del desarrollo. Por este motivo, el pico de expresión observado en L2/L3 para *uggt-1* y *uggt-2* por Real Time PCR, es coincidente con el hecho de que se observa en el día 3 de desarrollo que un 12.5% de gusanos *uggt-1(RNAi)* se encuentran en L2/L3, un 6% de gusanos *uggt-2(RNAi)* se encuentran en L2/L3 mientras que los gusanos control *gfp(RNAi)* no poseen gusanos en dichos estadios siendo ya todos L4 y adultos (Fig 48 B).

También se estudió el desarrollo en gusanos mutantes VC1961. El pico de expresión en L2/L3 coincide con el hecho de que los gusanos homocigotos para la delección *uggt-2* se arrestan en estadios embrionarios o en estadio de L1 ya que no pueden continuar su desarrollo a L2/L3 cuando se requiere un nivel de expresión elevado de este gen. Estos resultados se relacionan con el hecho de que la expresión de muchas proteínas que se inducen para restaurar la homeostasis del RE en condiciones de estrés por factores externos, también son requeridas para el normal desarrollo de *C. elegans* aún en ausencia de estrés ⁽²⁰⁰⁾.

El retraso en el desarrollo observado por RNAi se incrementa en condiciones de estrés de RE, donde la expresión de ambos genes en L2/L3 resultaría imprescindible. Un

20% de los gusanos *uggt-1(RNAi)* tratados con 10 µg/ml de TN (que inhibe la glicosilación generando la síntesis de proteínas hipoglicosiladas y la consecuente acumulación de proteínas mal plegadas), permaneció arrestado en L2/L3 en el día 5 y el 80% restante en L4, mientras que el control *gfp (RNAi)* no presentaba gusanos arrestados en L2/L3 y solo un 25% permaneció en L4 mientras que el resto ya se encontraba en estadio adulto (Fig. 53). En el caso de *uggt-2(RNAi)* tratados con 10 µg/ml de TN en el día 5, un 80% de los gusanos se encontraba en estadios de L2/L3 y no ha podido pasar a estadios superiores (Fig. 53).

Además, *C. elegans*, luego del estadio L1 puede seguir su desarrollo a L2/L3 o bien puede entrar en el estadio “dauer” si las condiciones del medio son desfavorables ⁽²⁰¹⁾. Los gusanos que continúan su desarrollo a L2/L3, deben aumentar su tamaño y cambiar la cutícula además de comenzar a desarrollar la vulva para ingresar a la etapa reproductiva lo cual implicaría una alta síntesis proteica. Dado que los gusanos *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* no sienten condiciones desfavorables en el medio y no ingresan al estadio de “dauer”, siguen su desarrollo a L2/L3. Sin embargo, permanecen más tiempo en dicho estadio ya que la maquinaria de síntesis de proteínas se activaría de forma de producir gran cantidad de proteínas y el RE no podría garantizar el correcto plegamiento de las mismas generando condiciones de estrés. Aquellos nematodos que pueden continuar el desarrollo mediante un mecanismo compensatorio aliviando el estrés de RE, logran continuar al estadio L4. Sin embargo, este mecanismo compensatorio no es suficiente ya que en el estadio L4 se observa también retraso probablemente debido a que en dicho estadio también hay alta síntesis proteica ya que el nematodo termina de desarrollar la vulva para ingresar a la etapa reproductiva.

Estos resultados evidencian que el pico de expresión de ambos genes es coincidente con la necesidad de los mismos durante el desarrollo para poder sobrellevar el estrés “fisiológico” producido por la alta síntesis proteica durante los estadios larvarios.

CeUGGT-1 y CeUGGT-2 cumplirían distintas funciones biológicas

Mediante los distintos experimentos que hemos realizado, se ha demostrado que ambos homólogos de *C. elegans* cumplirían distintas funciones biológicas. Un primer hecho a considerar es que la proteína codificada por el gen *uggt-1* es la responsable de la actividad de UGGT en *C. elegans* mientras que la proteína codificada por el gen *uggt-2* carece de dicha actividad. Por otro lado, se observa en forma análoga a lo que ocurre en humanos, la inducción de la expresión del gen *uggt-1* en condiciones de estrés de RE y no la de *uggt-2* (Fig.45) ⁽⁸²⁾. *uggt-1* se induce por estrés de RE debido a la inhibición de la N-glicosilación en

presencia de TN a través de la vía de IRE-1 ya que posee un elemento UPRE en la secuencia del promotor. Esto ya había sido observado para CRT-1 que también se induce con TN a través de la vía de *ire-1*. *uggt-2* carece de secuencias UPRE, ERSE-I o ERSE-II. La vía de *Ire-1* en *C. elegans* es la responsable de la inducción de la mayor parte de los genes de la UPR canónicos, incluidas chaperonas del RE y componentes de ERAD⁽¹¹⁴⁾.

Por otro lado, los fenotipos encontrados en gusanos sometidos a silenciamiento génico por RNAi para *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* son diferentes. Mientras que en el análisis de supervivencia los gusanos *uggt-1(RNAi)* muestran una diferencia significativa con respecto al control *gfp(RNAi)*, los niveles de supervivencia de *uggt-2(RNAi)* son similares a los del control (Fig. 48). Esto indica que una vez alcanzado el estadio adulto, la ausencia de la proteína UGGT-1 genera que se incrementen los procesos que llevan al envejecimiento. En cuanto al retraso en el desarrollo, si bien tanto *uggt-1(RNAi)* como *uggt-2(RNAi)* presentan un retraso en el desarrollo, el nivel de retraso observado para *uggt-1(RNAi)* y *uggt-2(RNAi)* es diferente (Fig. 48, 53 y 54). El retraso en el desarrollo también se observa para gusanos heterocigotas *uggt-2 +/-*, observándose los mismos efectos que en *uggt-2(RNAi)* dados por la disminución de la expresión del gen (Fig. 50B). Además en gusanos mutantes *uggt-2 -/-* se observa un arresto en estadios embrionarios y en L1 tempranas, indicando que el gen *uggt-2* es un gen esencial (Fig. 50A). El gen *uggt-2* se encuentra delecionado afectando los exones 2, 3 y 4. La deleción tm2318 que afecta el gen *hsp-70*, codificado en el intrón largo del gen *uggt-2*, no es letal para el nematodo, indicando que la deleción ok2510 es específica del gen *uggt-2* (Fig. 49). El hecho de que UGGT-1 no sea capaz de reemplazar la pérdida de función de UGGT-2 en el gusano homocigota para la deleción del gen *uggt-2* refuerza la idea que estas proteínas tienen distintas actividades biológicas. Se obtuvo una cepa mutante del gen *uggt-1* en *C. elegans* en el laboratorio de la Dra. Mónica Driscoll. Esta mutación no es esencial como se muestra en la tesis doctoral de Yury Nuñez Lopez⁽²⁰²⁾. De manera similar a *C. elegans*, el mutante de *S. pombe* que no posee UGGT es viable, sin embargo ratones *uggt-1 (-/-)* presentan un fenotipo letal embrionario en E13, este fenotipo es variable y algunos ratones sobreviven hasta su nacimiento⁽⁸⁹⁾. La presencia de HUGT-2 tampoco puede reemplazar la función de la HUGT-1 en estos ratones. Los gusanos *uggt-2 -/-* arrestados en L1, poseen un tamaño similar al de los huevos, indicando que el arresto de los mismos se produce en un estadio L1 muy temprano. El desarrollo se encuentra interrumpido y se observaron gusanos con problemas en el desarrollo del intestino y en la cutícula ya que se observan bordes irregulares y pliegues en el borde exterior del cuerpo (Fig. 51).

En *C. elegans* se observó que la penetrancia de otros genes que participan en el mecanismo de síntesis de glicoproteínas es similar al encontrado para el gen *uggt-2*. Por ejemplo, la mutación del gen *alg10* es letal en el nematodo, sin embargo algunos gusanos nacen presentando arresto larval y menor tamaño. De la misma manera, otros genes como *pdi-2* y *cnx-1* son importantes para el correcto desarrollo del embrión. En mamíferos también se observaron fenotipos similares para genes que codifican proteínas de la síntesis de glicoproteínas y del control de calidad. Ratones mutantes *grp78*^{-/-} son letales, sin embargo los ratones *grp78*^{+/-} son viables. Aquellos ratones mutantes *cnx*^{-/-} mueren a los dos días de desarrollo presentando problemas motores y un menor tamaño, situación similar a la que ocurre en los nematodos *uggt-2*^{-/-}.

CeUGGT-2 es necesaria además para el desarrollo en condiciones de estrés, al igual que CeUGGT-1. En condiciones de estrés de RE severas, como la observada en 10 µg/ml de TN, un 20% de los gusanos *uggt-1(RNAi)* y un 80% de los gusanos *uggt-2(RNAi)* permanecen en estadios de L2/L3 y el porcentaje restante en L4, mientras que en el control no hay gusanos en L2/L3, el 80% de los gusanos se encuentran en estadio adulto y el 20% solamente en L4 (Fig. 53). Esta observación es coincidente con el pico de expresión observado en L2/L3 tanto para *uggt-1* como para *uggt-2* (Fig. 36).

Sin embargo, descubrimos que los gusanos *ire-1 uggt-2 (RNAi)* que carecen de la proteína involucrada en la vía de señalización por la que se estimula la *uggt-1*, en presencia de concentraciones de TN muy bajas (2.5 µg/ml), presentaron un nivel de retraso mucho mayor al encontrado en gusanos KP3948 *uggt-2 (RNAi)*. Los gusanos *uggt-2(RNAi)* lucían muy enfermos y pálidos y 45% de ellos murieron para el día 4 (Fig.54). Del porcentaje de gusanos *ire-1 uggt-2 (RNAi)* restantes que sobrevivieron, un 50% arrestó su crecimiento en L2/L3 en el día 4. Este efecto no fue observado para *uggt-1(RNAi)* ni para *gfp(RNAi)*. Este resultado confirma que ambas proteínas homólogas jugarían roles diferentes. La función diferencial de CeUGGT-2 se vuelve evidente en células que no pueden mantener la homeostasis del RE ante condiciones de estrés. Como los gusanos *ire-1* no pueden transducir la señal que produce la síntesis de proteínas que alivian el estrés de RE, la homeostasis del RE no puede ser reestablecida y por lo tanto se produce un arresto de los gusanos en estadios larvales o se producen defectos graves que llevan a la muerte de los gusanos durante el desarrollo. Los gusanos *ire-1*^{-/-} son viables, sin embargo son sensibles a estrés de RE, por lo tanto *uggt-2* debería causar estrés produciendo la muerte de los gusanos *ire-1* mutantes (Fig. 54). En este contexto existirían dos vías para manejar el estrés de RE, una dada por la vía de IRE-1 que aumenta la expresión de UGGT-1 y otro a través de

UGGT-2. Por este motivo, en gusanos *uggt-2(RNAi)* que carecen de la posibilidad de aliviar el estrés a través de UGGT-1, el efecto es mayor y mueren. Bajo las mismas condiciones la falta de CeUGGT-1 produce los mismos efectos observados en gusanos que poseen los tres transductores de la UPR, confirmando efectos de ambos homólogos diferentes. Se podría decir que CeUGGT-2 podría estar involucrado en aliviar el estrés de RE que las células deben afrontar durante el desarrollo mediante un mecanismo diferente. El hecho de que el mutante de *cnx/crt* pero no los mutantes de *uggt-2 -/-* sean viables indica que el rol biológico de CeUGGT-2 no depende de las lectinas chaperonas como las UGGTS canónicas.

La función de CeUGGT-2 está relacionada a aliviar el estrés de RE. Esta función podría estar dada por el reconocimiento de otro nucleótido azúcar que no sea UDP-Glc, o bien podría reconocer otro tipo de sustrato como lípidos. Otra posibilidad es que al ser un gen que se exprese poco, esté involucrada en algún evento de señalización y sus niveles de expresión sean fundamentales para dicha función. *C. elegans* provee un modelo genético excelente para el estudio de la función del homólogo de UGGT que carece de actividad (CeUGGT-2) y constituye un sistema apropiado para el estudio del rol de las glucosiltransferasas en enfermedades relacionadas al plegamiento.

Conclusiones

1) *C. elegans* posee dos genes con características similares a las UGGTs de distintos organismos. Ambos genes poseen un 40% de identidad entre ellos y su extremo C-terminal se encuentra altamente conservado al igual que ocurre con otras UGGTs (55-90%). CeUGGT-1 posee un porcentaje de identidad mayor con las UGGTs de humanos que CeUGGT-2 (40% y 35% respectivamente).

2) CeUGGT-1 y CeUGGT-2 poseen dominios conservados en el extremo C-terminal que están involucrados en la transferencia de glucosa desde el nucleótido azúcar. En el extremo N-terminal existen ciertas zonas de estructura TRX-like de formación de enlaces disulfuro que estarían involucradas en el reconocimiento de las proteínas mal plegadas.

3) *C. elegans* posee actividad de UGGT, la cual es dependiente de la concentración de Ca^{+2} y de un pH óptimo neutral al igual que otras UGGTs conocidas. Su temperatura óptima es 24°C. Además, la TG DES es mejor aceptor que la SBA DES.

4) El gen *uggt-1* codifica para la UGGT activa mientras que el gen *uggt-2* carece de actividad de UGGT. Los niveles de mRNA de ambos genes son similares y las proteínas CeUGGT-1 y CeUGGT-2 poseen el peso molecular adecuado y se encuentran presentes en la fracción enriquecida en RE.

5) El extremo C-terminal de CeUGGT-2 sería inactivo, y por lo tanto habría perdido la capacidad de transferir glucosa a proteínas mal plegadas.

6) Los niveles de actividad de CeUGGT-1 serían menores a los de *S. pombe spgt1+* y la UGGT de hígado de rata por lo que CeUGGT-1 no puede complementar funcionalmente el mutante *S.pombe alg6 gpt1-*.

7) CeUGGT-1 y CeUGGT-2 se expresan en todos los estadios del nematodo con un pico de expresión en L2/L3. El gen *uggt-1* se expresa aprox. un 30% con respecto al gen *ama-1*. El gen *uggt-2* posee niveles de expresión menores a los de *uggt-1* (3%).

8) CeUGGT-1 se expresa en células musculares, intestino, hipodermis, faringe, sistema nervioso y sistema reproductor. Existe una porción del promotor del gen *uggt-1* que posee elementos UPRE y que deriva la expresión en sistema nervioso. En ambos casos la expresión puede observarse en huevos, larvas y estadio adulto.

9) *uggt-1* se induce en condiciones de estrés de RE mientras que *uggt-2* no lo hace ya sea en estadio adulto o en L2/L3 donde los niveles de expresión son mayores.

10) El promotor de *uggt-1* posee un elemento UPRE. No se encontraron elementos UPRE, ERSE-I o ERSE-II en el promotor de *uggt-2*. La transcripción de *uggt-1* estaría regulada por la vía de señalización de *ire-1* en condiciones de estrés que desencadenan la UPR.

11) La falta de CeUGGT-1 produce una reducción en la supervivencia. La falta de CeUGGT-1 y CeUGGT-2 producen un retraso en el desarrollo que se ve aumentado en condiciones de estrés de RE.

12) *uggt-2* es un gen esencial. La mayor parte de los gusanos se arrestan en estadios larvarios y algunos en el estadio de L1. Los gusanos heterocigotos, presentan un retraso en el desarrollo, al igual que se observó en el caso de la disminución de la expresión de *uggt-2* por RNAi. Los gusanos L1 arrestados poseen un tamaño menor, poseen pliegues en el cuerpo indicando posibles problemas en la cutícula y parecen presentar problemas en el intestino.

13) CeUGGT-2 es relevante para aliviar el estrés de RE en ausencia de la proteína IRE-1 en condiciones de estrés de RE.

REFERENCIAS

Referencias

- 1 Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, et al.(2003). "Global analysis of protein expression in yeast". *Nature* 425:737–741.
- 2 Von Heijne, G.; Gavel, Y. (Jul 1988). "Topogenic signals in integral membrane proteins.". *Eur J Biochem* 174 (4): 671–8.
- 3 Johnson, A.E. y Van Waes, M.A. (1999). "The translocon: a dynamic Gateway at the ER membrane". *Ann. Rev. Cell Dev Biol.* 15, 799-842
- 4 Connolly, T. y Gilmore, R. (1986). "Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein". *J. Cell Biol.* 103, 36-44.
- 5 Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2000) "Molecular Cell Biology, 4th edition". New York: W. H. Freeman. ISBN-10: 0-7167-3136-3
- 6 Townsley FM, Wilson DW, Pelham HR (1993). "Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport". *EMBO J* 12: 2821–2829
- 7 Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Soling HD (2001). "KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET". *Dev Cell* 1: 139–153.
- 8 Pelham, H.R.B. (1988). "Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment". *EMBO J.* 4, 913–918.
- 9 Scheel AA, Pelham HR (1996) "Purification and characterization of the human KDEL receptor". *Biochemistry* 35: 10203–10209.
- 10 Cali, T., Vanoni, O. y Molinari, M. (2008). "The endoplasmic reticulum: crossroads for newly synthesized polypeptides chains". *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 83, 135-179
- 11 Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum" *Science.* 257(5076):1496-502.
- 12 Misselwitz B, Staack O, Rapoport TA. (1998) "J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences". *Mol Cell* 2:593–603
- 13 Zhao X, Braun AP, Braun JE. (2008) "Biological roles of neural J proteins" *Cell Mol Life Sci.* 65(15):2385-96.
- 14 Brodsky JL (1996) "Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal". *Trends Biochem Sci.* 21(4):122-6.
- 15 Anfinsen CB. (1973). "Principles that Govern the Folding of Protein Chains". *Science.* 181 (4096): 223–230.
- 16 Van den Berg, B. Wain, R. Dobson, CM, Ellis RJ (2000). "Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell" *EMBO J.* 19(15): 3870-5.
- 17 Melnick J, Dul JL, Argon Y. (1994) "Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum". *Nature* 370:373–5.
- 18 Hammond C, Helenius A (1994). "Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin". *Science* 266:456–8.
- 19 Kim PS, Arvan P. (1995) "Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 128:29–38.
- 20 Molinari M, Helenius A. (2000) "Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum". *Science* 288:331–3.
- 21 Sorger, P. K.; Pelham, H. R. B. (1987) "The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90" *J. molec. Biol.* 194, 341–344
- 22 Meunier I, Usherwood yYK, Chung KT, Hendershot IM, (2002) a subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins.

- Mol Biol Cell. 13(12):4456-69.
- 23** Kornfeld R; Kornfeld, S (1985) "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides" *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664
- 24** Huffaker TC y Robbins PW (1982). "Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation" *J. Biol. Chem.* 257, 3203-3210
- 25** Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. y Molinari, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* 35, 74-82.
- 26** Parodi AJ (2000) "Protein glucosylation and its role in protein folding" *Annu. Rev. Biochem.* 69, 69-95.
- 27** Parodi AJ (2000). "Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation". *Biochem. J.* 348, 1-13.
- 28** Varki A (1993) "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct" *Glycolbiology* 3., 97-130
- 29** Anelli, T. y Sitia, R. (2008). "Protein quality control in the secretory pathway". *EMBO J.* 27, 315-327.
- 30** Burda and Aebi (1999) "The dolichol pathway of N-linked glycosylation" *Biochim Biophys Acta.* 6;1426(2):239-57.
- 31** Huffaker and Robbins, 1983 "Yeast mutants deficient in protein glycosylation" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(24):7466-70
- 32** Helenius J, Aebi M (2002) "Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum". *Semin Cell Dev Biol.* 13(3):171-8.
- 33** Parodi AJ, Leloir LF. (1979) The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell. *Biochim Biophys Acta.* Apr 23;559(1):1-37.
- 34** Herscovics, A. (1999). "Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis". *Biochim. Biophys. Acta.* 1473, 96-107.
- 35** Lawless MW, Mankan AK, Gray SG & Norris S. (2008); "Endoplasmic reticulum stress--a double edged sword for Z alpha-1 antitrypsin deficiency hepatotoxicity" *Int J Biochem Cell Biol.*;40(8):1403-14.
- 36** Bernier V, Lagacé M, Bichet, M & Bouvier M ; (2004) "Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases" *Trends in Endocrinology & Metabolism* 15, 222.
- 37** D'Alessio, C., Caramelo, J. J. y Parodi, A. J. (2010). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 491-499.
- 38** Trombetta, E. S. y Parodi, A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 649-76.
- 39** Zhang K & Kaufman RJ (2004) "Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum" *J. Biol. Chem.*, 279, 25, 25935-25938
- 40** Schallus, T., Jaeckh, C., Fehér, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feii, T., Pieler, T. y Muhle-Goll, C. (2008). "Malectin: A novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation". *Mol. Biol. Cell.* 19, 3404-14.
- 41** Simmer, F., Moorman, C., van, A. M. D. L., Kuijk, E., van, P. V. E. D. B., Kamath, F. S., Fraser, A. G., Ahringer, J., & Plasterk, R. H. A. (2003). "Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions". *PLoS Biol*, 1, E12.
- 42** Wang X, Zhao Y, Wong K, Ehlers P, Kohara Y, Jones SJ, Marra MA, Holt RA, Moerman DG, Hansen D (2009). "Identification of genes expressed in the hermaphrodite germ line of *C. elegans* using SAGE". *BMC Genomics.* 10:213
- 43** Trombetta, E.S., Simons, J.F. y Helenius, A. (1996). "Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit". *J. Biol. Chem.* 271, 27509-16.

- 44 D'Alessio, C., Fernández, F., Trombetta, E.S. y Parodi, A.J. (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**, 25899–25905.
- 45 Parodi, A. J., Staneloni, R. J., Cantarella, A. I., Leloir, L. F., Behrens, N. H., Carminatti, H. y Levy, J. (1973). "Further studies on a glycolipid formed from dolichyl-D-glucosyl monophosphate". *Carbohydr. Res.* **26**, 393-400
- 46 Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A. J., Armstrong, J. y Rokeach, L. A. (1998). "Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*". *Biochemistry.* **37**, 17253–17261.
- 47 Fernández, F. S., Trombetta, S. E., Hellman, U. y Parodi, A. J. (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**, 30701–30706.
- 48 Trombetta, E.S., Fleming, K.G. y Helenius, A. (2001). "Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II". *Biochemistry.* **40**, 10717-22.
- 49 Munro, S. (2001). "The MRH domain suggests a shared ancestry for the mannose 6-phosphate receptors and other *N*-glycan-recognising proteins". *Curr. Biol.* **11**, 499–501.
- 50 Arendt, C.W. y Ostergaard, H.L. (2000). "Two distinct domains of the beta-subunit of glucosidase II interact with the catalytic alpha-subunit". *Glycobiology.* **10**, 487-92.
- 51 Pelletier, M. F., Marcil, A., Sevigny, G., Jakob, C. A., Tessier, D. C., Chevet, E., Menard, R., Bergeron, J. J. y Thomas, D. Y. (2000). "The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization *in vivo*". *Glycobiology.* **10**, 815–827
- 52 Stigliano ID, Caramelo JJ, Labriola CA, Parodi AJ, D'Alessio C. "Glucosidase II beta subunit modulates N-glycan trimming in fission yeasts and mammals". *Mol Biol Cell.* 2009 (17):3974-84.
- 53 Sikora, J., Urinovska, J., Majer, F., Poupetova, H., Hlavata, J., Kostrouchova, M., Ledvinova, J., & Hrebicek, M. (2010). "Bioinformatic and biochemical studies point to AAGR-1 as the ortholog of human acid alpha-glucosidase in *Caenorhabditis elegans*". *Mol Cell Biochem*, **341**, 51-63.
- 54 Kim, S. K., Lund, J., Kiraly, M., Duke, K., Jiang, M., Stuart, J. M., Eizinger, A., Wylie, B. N., & Davidson, G. S. (2001). "A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*". *Science*, **293**, 2087-92.
- 55 Trombetta, E. S., Bosch, M. y Parodi, A. J. (1989). "Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal and trypanosomatid protozoa microsomal membranes". *Biochemistry.* **28**, 8108-8116.
- 56 Caramelo JJ, Parodi AJ (2007) How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 732-742
- 57 Tessier, D. C., Dignard, D., Zapun, A., Radominska-Pandya, A., Parodi, A. J., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2000) "Cloning and characterization of mammalian UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase and the development of a specific substrate for this enzyme" *Glycobiology* **10**, 403–412
- 58 Fernandez F, D'Alessio C, Fanchiotti S, Parodi AJ. (1998) "A misfolded protein conformation is not a sufficient condition for *in vivo* glucosylation by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase" *EMBO J.* **17**(20):5877-86
- 59 Sousa, M., Ferrero-García, M. A. y Parodi, A. J. (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase". *Biochemistry.* **31**, 97-105.
- 60 Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ. (1993) "Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP" *Cell.* **Nov 19**;75(4):717-28.

- 61 Sousa M, Parodi AJ (1995) "The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase" *EMBO J.* 14(17):4196-203
- 62 Caramelo JJ, Castro OA, Alonso L, 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 Nat. Acad. SciUSA* 100 86-91
- 63 Caramelo JJ, Castro OA, de Prat-Gay G, Parodi AJ (2004) "The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates" *J. Biol. Chem* 279, 46280- 46285
- 64 Trombetta, E. S., and Helenius, A. (2000) "Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum" *J. Cell Biol.* 148, 1123–1129
- 65 Gardner TG, Kearse KP (1999) "Modification of the T cell antigen receptor (TCR) complex by UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. TCR folding is finalized convergent with formation of alpha beta delta epsilon gamma epsilon complexes". *J Biol Chem.* 274(20):14094-9.
- 66 Keith N, Parodi AJ, Caramelo JJ. (2005) "Glycoprotein tertiary and quaternary structures are monitored by the same quality control mechanism" *J Biol Chem.* 280(18):18138-41
- 67 Ritter C, Helenius A. (2000) "Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase" *Nat Struct Biol.* (4):278-80.
- 68 Labriola C, Cazzulo JJ, Parodi AJ (1999) "Trypanosoma cruzi calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins" *Mol Biol Cell.* (5):1381-94.
- 69 Labriola CA, Giraldo AM, Parodi AJ, Caramelo JJ (2011). "Functional cooperation between BiP and calreticulin in the folding maturation of a glycoprotein in Trypanosoma cruzi" *Mol Biochem Parasitol.* 175(2):112-7.
- 70 Pearse BR, Tamura T, Sunryd JC, Grabowski GA, Kaufman RJ, Hebert DN (2010) "The role of UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase 1 in the maturation of an obligate substrate prosaposin." *J Cell Biol.* 2010 189(5):829-41.
- 71 Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1995) "Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum" *Cell.* 81(3):425-33.
- 72 Wada I, Kai M, Imai S, Sakane F, Kanoh H. 1997 "Promotion of transferrin folding by cyclic interactions with calnexin and calreticulin" *EMBO J.* 16(17):5420-32.
- 73 Trombetta SE, Parodi AJ. (1992) "Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase" *J Biol Chem.* 267(13):9236-40.
- 74 Trombetta SE, Ganam SA, Parodi AJ. (1991) "The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum" *Glycobiology.* 2 :155-61
- 75 Fyfe L., Bygrave A Benedetti (1996) "What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum?" *Cell Calcium* Volume 19, Issue 6, P. 547–551
- 76 Parodi AJ, 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.
- 77 Parker CG, Fessler LI, Nelson RE, 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.
- 78 Taylor, S.C., Thibault, P., Tessier, D.C., Bergeron, J.J.M. y Thomas, D.Y. (2003). "Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP–glucose glycoprotein:glucosyltransferase". *EMBO Rep.* 4, 405-11.
- 79 Zuber C, Fan JY, Guhl B, Parodi A, Fessler JH, Parker C, Roth J. (2001) "Immunolocalization of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19):10710-5.

- 80** Conte I, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ (2003) "The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum". *Mol Biol Cell* 14: 3529–3540
- 81** Guerin, M. y Parodi A.J. (2003). "The UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase is organized in at least two tightly bound domains from yeast to mammals". *J. Biol. Chem.* 278, 20540-6.
- 82** Arnold, S.M., Fessler, L.I., Fessler, J.H. and Kaufman, R.J. (2000). "Two Homologues Encoding Human UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase Differ in mRNA Expression and Enzymatic Activity" *Biochemistry* 39, 2149–2163
- 83** Levinson JN, Shahinian S, Sdicu AM, Tessier DC, Bussey H (2002) "Functional, comparative and cell biological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Kre5p" *Yeast* (14):1243-59.
- 84** Banerjee S, Vishwanath P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW, Samuelson J. (2007) "The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(28):11676-81.
- 85** Fernandez F, Jannatipour M, Hellman U, Rokeach LA, 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: 705–713.
- 86** Arnold, S.M. and Kaufman, R.J. (2003) "The noncatalytic portion of human UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase I confers UDP-glucose binding and transferase function to the catalytic domain" *J. Biol. Chem.* 278, 43320–43328.
- 87** Fanchiotti S, Fernández F, D'Alessio C, 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.
- 88** Jin H, Yan Z, Nam KH, Li J. (2007) "Allele-specific suppression of a defective brassinosteroid receptor reveals a physiological role of UGGT in ER quality control" *Mol Cell.* Jun 22;26(6):821-30.
- 89** Molinari, M., Galli, C., Vanoni, O., Arnold, S.M. and Kaufman, R.J. (2005) "Persistent Glycoprotein misfolding activates the GlucosidaseII/UGT1-driven calnexin cycle to delay aggregation and loss of folding competence" *Mol. Cell* 20, 503–512.
- 90** Luo S, Mao C, Lee B, Lee A. (2006) "FRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development". *Mol Cell Biol*, 26:5688-5967
- 91** Garbi N, Tanaka S, Momburg F, Hammerling GJ. (2006) "Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57". *Nat Immunol* 7:93-102
- 92** Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. (1999) "Calreticulin is essential for cardiac development". *J Cell Biol* 144_857-868
- 93** Barnes JA, Smoak IW (1997). "Immunolocalization and heart levels of GRP94 in the mouse during post-implantation development". *Anat Embryol* 196:335-341
- 94** Mao C, Dong D, Little E, Luo S, Lee AS. (2004) "Transgenic mouse models for monitoring endoplasmic reticulum stress *in vivo*". *Nat Med*; 10:1013-1014.
- 95** Denzel A, Molinari M, Trigueros C, Martin JE, Velmurgan S, Brown S, Stamp G, Owen MJ. (2002) "Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression". *Mol Cell Biol*; 22:7398-7404
- 96** McCracken AA, Brodsky JL (1996). "Assembly of ER-associated protein degradation *in vitro*: dependence on cytosol, calnexin, and ATP". *J. Cell Biol* 132:291–298.
- 97** Vembar SS, Brodsky JL. (2008) "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation". *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 9:944–957.
- 98** Knittler MR, Dirks S, Haas IG. (1995) "Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*;92:1764–1768.

- 99 Schmitz A, Maintz M, Kehle T, Herzog V. (1995) "In vivo iodination of a misfolded proinsulin reveals colocalized signals for Bip binding and for degradation in the ER". *EMBO J*;14:1091–1098.
- 100 Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. (2003) "A time dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response". *Dev Cell*;4:265-271
- 101 Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P. (2003) "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle". *Science* 299:1397-1400
- 102 Nakatsukasa K, Huyer G, Michaelis S, Brodsky JL. (2008) "Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein". *Cell*;132:101–112
- 103 Sasagawa, Y., Yamanaka, K., & Ogura, T. (2007). "ER E3 ubiquitin ligase HRD-1 and its specific partner chaperone BiP play important roles in ERAD and developmental growth in *Caenorhabditis elegans*". *Genes Cells*, 12, 1063-73.
- 104 Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ (1999) "The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum" *Gene Expr.* 7(4,6) 293-300
- 105 Okita H, Umezawa A, Fukuma M, Ando T, Urano F, Sano M, Nakata Y, Mori T, Hata J (2000) "Acute myeloid leukemia possessing jumping translocation is related to highly elevated levels of EAT/mcl-1, a Bcl-2 related gene with anti-apoptotic functions" *Leuk Res*, 24(1), 73-7
- 106 Ma Y, Hendershot LM (2001) "The unfolding tale of the unfolded protein response" *Cell* 107, 827
- 107 Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D (1999) "Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response." *Cell Dev. Biol.* 18, 575
- 108 Cox, JS, Shamu, CE, and Walter, P (1993) "Transcriptional Induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase". *Cell* 73, 1197-1206
- 109 Mori, K., Ma, W, Gething, MJ, and Sambrook, J. (1993) "A transmembrane protein with cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from ER to nucleus". *Cell* 74, 743-756
- 110 Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 Mrna". *Nature* 415(6867):92-6.
- 111 Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) "ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs". *Mol Cell.* (6):1355-64.
- 112 Kaufman RJ et al (2002) "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation" *Nat. Rev. Mol. Biol.* 3, 411.
- 113 Shen X, Ellis, RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, and Kaufman RJ, (2001). "Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required in *C.elegans* development". *Cell* 107, 893-903
- 114 Shen X, Ellis RE, Sakaki K, and Kaufman RJ (2005) "Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*" *PLoS Genet* 1, 355-368
- 115 Hollie J and Weissman JS (2006). "Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response". *Science* 313, 104-107.
- 116 Mori Kazutoshi (2009). "Signalling pathways in the Unfolded Protein Response: Development from yeast to Mammals". *J Biochem* 146(6) 743-750
- 117 *WormBook* (2005) ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook doi/10.1895/wormbook.1.7.1, <http://www.wormbook.org>.
- 118 Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. (2002) *WormAtlas* <http://www.wormatlas.org>
- 119 Brenner S (1973) "The genetics of behaviour" *Br Med Bull.* (3):269-71.

- 120 Wood WB (1988) "Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*" *Dev Biol* 5:57-78.
- 121 Hodgkin J, Herman RK. (1998) "Changing styles in *C. elegans* genetics" *Trends Genet.* (9):352-7.
- 122 Blumenthal & Steward (1997) *RNA Processing and Gene Structure C. elegans II*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Chapter 6.
- 123 Cassada RC, Russell RL (1975) "The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*" *Dev Biol.* (2):326-42.
- 124 de Bono M. 2003. "Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment" *J Neurobiol.* 54(1):78-92.
- 125 Schachter H. (2004) "Protein glycosylation lessons from *Caenorhabditis elegans*" *Curr Opin Struct Biol.* (5):607-16.
- 126 Lee, W., Lee, T. H., Park, B. J., Chang, J. W., Yu, J. R., Koo, H. S., Park, H., Yoo, Y. J., & Ahnn, J. (2005). "Caenorhabditis elegans calnexin is N-glycosylated and required for stress response." *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1018-30.
- 127 Lee D, Singaravelu G, Park BJ, Ahnn J. (2007) "Differential requirement of unfolded protein response pathway for calreticulin expression in *Caenorhabditis elegans*" *J Mol Biol.* 372(2):331-40
- 128 Lee W, Kim KR, Singaravelu G, Park BJ, Kim DH, Ahnn J, Yoo YJ (2006) "Alternative chaperone machinery may compensate for calreticulin/calnexin deficiency in *Caenorhabditis elegans*" *Proteomics.* (4):1329-39.
- 129 Myllyharju J, Kukkola L, Winter AD, Page AP (2002) "The exoskeleton collagens in *Caenorhabditis elegans* are modified by prolyl 4-hydroxylases with unique combinations of subunits" *J Biol Chem.* 277(32):29187-96.
- 130 Winter AD, McCormack G, Page AP (2007) "Protein disulfide isomerase activity is essential for viability and extracellular matrix formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*". *Dev Biol.* 308(2):449-61
- 131 Heschl MF, Baillie DL. 1989 "Characterization of the hsp70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*". *DNA.* (4):233-43.
- 132 Caruso ME, Jenna S, Bouche-careilh M, Baillie DL, Boismenu D, Halawani D, Latterich M, Chevet E. (2008) "GTPase-mediated regulation of the unfolded protein response in *Caenorhabditis elegans* is dependent on the AAA+ ATPase CDC-48" *Mol Cell Biol.* (13):4261-74.
- 133 Shim J, Umemura T, Nothstein E, Rongo C (2004) "The unfolded protein response regulates glutamate receptor export from the endoplasmic reticulum". *Mol Biol Cell* (11):4818-28.
- 134 Ferrier A, Charron A, Sadozai Y, Switaj L, Szutenbach A, Smith PA. (2011) "Multiple phenotypes resulting from a mutagenesis screen for pharynx muscle mutations in *Caenorhabditis elegans*" *PLoS One.* 6(11):e26594.
- 135 Ceron J, Rual JF, Chandra A, Dupuy D, Vidal M, van den Heuvel S. (2007). "Large-scale RNAi screens identify novel genes that interact with the *C. elegans* retinoblastoma pathway as well as splicing-related components with synMuv B activity" *BMC Dev Biol.* Apr 6;7:30.
- 136 Rual, J. F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A. S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S. H., Hill, D. E., van, D. H. S., & Vidal, M. (2004). "Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library". *Genome Res*, 14, 2162-8.
- 137 Fernandez, A. G., Gunsalus, K. C., Huang, J., Chuang, L. S., Ying, N., Liang, H. L., Tang, C., Schetter, A. J., Zegar, C., Rual, J. F., Hill, D. E., Reinke, V., Vidal, M., & Piano, F. (2005). "New genes with roles in the *C. elegans* embryo revealed using RNAi of ovary-enriched ORFeome clones". *Genome Res*, 15, 250-9.
- 138 Partridge, F. A., Tearle, A. W., Gravato-Nobre, M. J., Schafer, W. R., & Hodgkin, J. (2008). "The *C. elegans* glycosyltransferase BUS-8 has two distinct and essential roles in epidermal morphogenesis". *Dev Biol*, 317, 549-59.

- 139 Frand, A. R., Russel, S., & Ruvkun, G. (2005). "Functional genomic analysis of *C. elegans* molting". *PLoS Biol*, 3, e312.
- 140 Petersen, C. I., McFarland, T. R., Stepanovic, S. Z., Yang, P., Reiner, D. J., Hayashi, K., George, A. L., Roden, D. M., Thomas, J. H., & Balsler, J. R. (2004). "In vivo identification of genes that modify ether-a-go-go-related gene activity in *Caenorhabditis elegans* may also affect human cardiac arrhythmia". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11773-8.
- 141 Sonnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A. M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Roder, M., Finell, J., Hantsch, H., Jones, S. J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K. C., Oegema, K., Gonczy, P., . . . Echeverri, C. J. (2005). "Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*". *Nature*, 434, 462-9.
- 142 Gottschalk, A., Almedom, R. B., Schedletzky, T., Anderson, S. D., Yates, J. R., & Schafer, W. R. (2005). "Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*". *EMBO J*, 24, 2566-78.
- 143 Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le, B. N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P., & Ahringer, J. (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi". *Nature*, 421, 231-7.
- 144 Wang, H., Spang, A., Sullivan, M.A., Hryhorenko, J., and Hagen, F.K. (2005). "The terminal phase of cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* early embryo requires protein glycosylation". *Mol. Biol. Cell* 16, 4202-4213.
- 145 Green, R. A., Kao, H. L., Audhya, A., Arur, S., Mayers, J. R., Fridolfsson, H. N., Schulman, M., Schloissnig, S., Niessen, S., Laband, K., Wang, S., Starr, D. A., Hyman, A. A., Schedl, T., Desai, A., Piano, F., Gunsalus, K. C., & Oegema, K. (2011). "A high-resolution *C. elegans* essential gene network based on phenotypic profiling of a complex tissue". *Cell*, 145, 470-82.
- 146 Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., & Ahringer, J. A. (2000). "Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference". *Nature*, 408, 325-30.
- 147 Piano, F., Schetter, A. J., Morton, D. G., Gunsalus, K. C., Reinke, V., Kim, S. K., & Kemphues, K. J. (2002). "Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*". *Curr Biol*, 12, 1959-64.
- 148 Skop, A. R., Liu, H., Yates, J., Meyer, B. J., & Heald, R. (2004). "Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms". *Science*, 305, 61-6.
- 149 Zahreddine, H., Zhang, H., Diogon, M., Nagamatsu, Y., & Labouesse, M. (2010). CRT-1/calreticulin and the E3 ligase EEL-1/HUWE1 control hemidesmosome maturation in *C. elegans* development. *Curr Biol*, 20, 322-7.
- 150 Park, B. J., Lee, D. G., Yu, J. R., Jung, S. K., Choi, K., Kim, Y. S., Lee, J. I., Kwon, J. Y., Singson, A., Song, W. K., Eom, S. H., Park, C. S., Kim, D. H., Bandyopadhyay, J., Ahnn, J., & Lee, J. H. (2001). "Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorhabditis elegans*". *Mol Biol Cell*, 12, 2835-45.
- 151 Kapulkin, V., Hiester, B. G., & Link, C. D. (2005). "Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*". *FEBS Lett*, 579, 3063-8.
- 152 Hamamichi, S., Rivas, R. N., Knight, A. L., Cao, S., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2008). "Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 728-33.
- 153 Jo, H., Shim, J., Lee, J. H., Lee, J., & Kim, J. B. (2009). "IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in *C. elegans*". *Cell Metab*, 9, 440-8.

- 154 Poteryaev, D., Squirrell, J. M., Campbell, J. M., White, J. G., & Spang, A. (2005). "Involvement of the actin cytoskeleton and homotypic membrane fusion in ER dynamics in *Caenorhabditis elegans*". *Mol Biol Cell*, 16, 2139-53.
- 155 Kraemer, B. C., Burgess, J. K., Chen, J. H., Thomas, J. H., & Schellenberg, G. D. (2006). "Molecular pathways that influence human tau-induced pathology in *Caenorhabditis elegans*". *Hum Mol Genet*, 15, 1483-96.
- 156 Chen, D., Thomas, E. L., & Kapahi, P. (2009). "HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*". *PLoS Genet*, 5, e1000486.
- 157 Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E. A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H. P., Goodman, A. G., Harant, H., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G., & Ron, D. (2006). "Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload". *Cell*, 126, 727-39.
- 158 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*" *Nature* 391(6669):806-11.
- 159 Montgomery MK, Xu S, Fire A. (1998) "RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*" *Proc Natl Acad Sci U S A.*;95(26):15502-7.
- 160 Peter van Roessel and Andrea H Brand (2004) "Spreading silence with Sid" *Genome Biol.* 5(2): 208.
- 161 Tabara H, Grishok A, Mello CC 1998 RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence *Science*.282(5388):430-1..
- 162 Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. (2002) "Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1". *Science*. 295:2456–2459.
- 163 Feinberg EH, Hunter CP. (2003). "Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1" *Science*;301:1545–1547
- 164 Timmons L, Court DL, Fire A. (2001) "Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*". *Gene*. 263:103–112.
- 165 Theresa Stiernagle (2005). "Maintenance of *C. elegans*" *WormBook*
- 166 Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. y Wabrik, E. (1993). "Experiments with fission yeast: a laboratory manual", Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 167 Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P. (1991). "Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Methods Enzymol.* 194, 795–823
- 168 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.
- 169 Dupuy D, Li QR, Deplancke B, Boxem M, Hao T, Lamesch P, Sequerra R, Bosak S, Doucette-Stamm L, Hope IA, Hill DE, Walhout AJ, Vidal M (2004) . "A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome."
- 170 Mello C, Fire A. (1995) "DNA transformation". *Methods Cell Biol.* 48:451-82
- 171 Baris Tursun, Luisa Cochella, Inés Carrera, and Oliver Hobert (2009) "A Toolkit and Robust Pipeline for the Generation of Fosmid-Based Reporter Genes in *C. elegans*". *PLoS ONE.* 4(3): e4625.
- 172 Sambrook, J. y Russell, D.W.(2001). "Molecular cloning: a laboratory manual". 3ra ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 173 Timmons L, Fire A 1998 "Specific interference by ingested dsRNA" *Nature.* 395(6705):854.
- 174 Hubbard, TJ, Ailey B, Brenner SE, Murzin AG, Chothia C (1999) "SCOP: A structural classification of proteins database" *Nucleic Acids research* 27 (1):254-256
- 175 Wang CC, Song JL (1995) "Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of rhodanese" *Eur J Biochem* 231(2):312-316.

- 176 R. Valinger, G. Braus, P. Niederberger, M. Künzler, G. Paravicini, T. Schmidheini, R. Hütter (1989), "Cloning of the LEU2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo recombination" Volume 152, Issue 3, pp 263-268
- 177 Kelly WG, Xu S, Montgomery MK, Fire A (1997) "Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene" *Genetics* 146(1):227-38.
- 178 Mello CC, Schubert C, Draper B, Zhang W, Lobel R, Priess JR 1996. "The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos" *Nature* 382(6593):710-2.
- 179 Anderson, P., and Kimble, J. (1997). "mRNA and translation". In *C. Elegans II*, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, and J.R. Priess, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 185–208.
- 180 William G. Kelly and Andrew Fire (1998) "Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*" *Development* 125, 2451-2456
- 181 Clokey GV, Jacobson LA 1986 "The autofluorescent "lipofuscin granules" in the intestinal cells of *Caenorhabditis elegans* are secondary lysosomes" *Mech Ageing Dev.* 35(1):79-94
- 182 NEXTDB (The nematode expression pattern Database (2001) National Institute of Genetics, Japan. <http://nematode.lab.nig.ac.jp/> Kohara laboratory
- 183 Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama (2001) "The unfolded protein response and Alzheimer's disease" *MBiochim Biophys Acta.* 1536(2-3):85-96.
- 184 Pincus D, Chevalier MW, Aragón T, van Anken E, Vidal SE, El-Samad H, Walter P (2010) "BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response" *PLoS Biol.* 8(7): e1000415 Aug 19;158(4):639-46. Epub 2002 Aug 19.
- 185 Urano F, Calton M, Yoneda T, Yun C, Kiraly M, Clark SG, Ron D 2002 "A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response" *J Cell Biol.* 58(4):639-46
- 186 Bertucci A, Pocock RD, Randers-Pehrson G, Brenner DJ (2009) "Microbeam irradiation of the *C. elegans* nematode" *J Radiat Res.* 50 Suppl A:A49-54.
- 187 Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K (2004) "Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II". *J Biochem* 136: 343-350.
- 188 Samuelson AV, Carr CE, Ruvkun G. (2002) "Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants" *J Cell Biol.* 158(4):639-46.
- 189 Johnstone IL, Barry JD (1996) "Temporal reiteration of a precise gene expression pattern during nematode development" *EMBO J.* 15(14):3633-9.
- 190 Arsenovic PT, Maldonado AT, Colletuori VD, Bloss TA (2012) "Depletion of the *C. elegans* NAC engages the unfolded protein response, resulting in increased chaperone expression and apoptosis" *PLoS One.* 7(9):e44038.
- 191 Uccelletti D, O'Callaghan C, Berninsone P, Zemtseva I, Abeijon C, Hirschberg CB. (2004) "ire-1-dependent transcriptional up-regulation of a luminal uridine diphosphatase from *Caenorhabditis elegans*". *J Biol Chem.* 279(26):27390-8.
- 192 Walker GA, Thompson FJ, Brawley A, Scanlon T, Devaney E *FASEB J.* (2003) "Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in *Caenorhabditis elegans*" (13):1960-2.
- 193 Wang Y, Ezemaduka AN, Tang Y, Chang (2009) "Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of *C. elegans*: from genetics to biochemistry". *ZIUBMB Life* 61(6):607-12.
- 194 Roth J, Zuber C, Park S, Jang I, Lee Y, Kysela KG, Le Fourn V, Santimaria R, Guhl B, Cho JW. (2010) "Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control". *Mol Cells.* (6):497-506.
- 195 Herman, R.K. (1995). "Mosaic analysis". *Methods Cell Biol.* 48, 123–146
- 196 Yochem, J., and Herman, R.K. (2003). "Investigating *C. elegans* development through mosaic analysis". *Development* 130, 4761–4768.

-
- 197** Xu K, Tavernarakis N, Driscoll M (2001) "Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum". *Neuron* 31: 957-971.
- 198** Okkema, P. G. and Krause, M. (2005) "Transcriptional regulation" *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook
- 199** Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D., and Seydoux, G. (2008). "3'UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline". *Curr. Biol.* 18, 1476-1482.
- 200** Walker GA, Thompson FJ, Brawley A, Scanlon T, Devaney E (2003) "Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in *Caenorhabditis elegans*". *FASEB J* 17: 1960-1962.
- 201** Wang Y, Ezemaduka AN, Tang Y, Chang (2009) "Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of *C. elegans*: from genetics to biochemistry". *ZIUBMB Life* 61(6):607-12.
- 202** Yury Orlando Nuñez Lopez (2009) "UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT-1) and UPR genes modulate *C. elegans* necrotic cell death". A Dissertation Submitted to The Graduate School of New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey. Director: Monica Driscoll