



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Estudio de las bases moleculares de las
enfermedades congénitas de glicosilación
humanas de tipo I y IIb usando levaduras de fisión
como modelo experimental”**

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

Lic. Giovanna Lucrecia Gallo

Directora de Tesis: Dra. Cecilia D'Alessio

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Wappner

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

Buenos Aires, 2018

Resumen

Estudio de las bases moleculares de las enfermedades congénitas de glicosilación humanas de tipo I y IIb usando levaduras de fisión como modelo experimental

Los desórdenes congénitos de glicosilación (CDG) son un grupo de enfermedades hereditarias humanas debidas a defectos en la glicosilación en las células. De ellas, más de 50 son debidas a defectos en la *N*-glicosilación. La *N*-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico (RE) consiste en la transferencia en bloque de un glicano $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde un derivado lipídico (Dol-PP-glicano) a las proteínas nacientes y es catalizada por la oligosacariltransferasa (OST). Los glicanos unidos a las proteínas (*N*-glicanos) facilitan su plegamiento ya que aportan grupos voluminosos hidrofílicos que mantienen en solución a los intermediarios de plegamiento. Posteriormente, los *N*-glicanos son modificados por glucosidasas, dando inicio al “control de calidad de plegamiento de glicoproteínas del RE” (QC). Las CDG pueden ser de tipo I y II. Las **CDG de tipo I** son causadas por defectos antes y durante la transferencia del glicano a las proteínas, donde la transferencia ineficiente por parte de la OST resulta en proteínas hipoglicosiladas. Las **CDG de tipo II** son debidas a defectos después de la transferencia del glicano, durante su remodelación, produciendo estructuras aberrantes.

Para estudiar la influencia de la estructura del glicano en la eficiencia de la transferencia a proteínas por la OST, en este trabajo se determinó el grado de hipoglicosilación de un conjunto de 16 levaduras de fisión *Schizosaccharomyces pombe* mutantes que sintetizan todas las combinaciones de Dol-PP-glicanos posibles en la membrana del RE, simulando los defectos que se producen en las CDG de tipo I. Mediante un biosensor que consiste en una GFP que pierde la fluorescencia cuando se glicosila, se determinó que la ausencia de los residuos de glucosa es más crítica que la de residuos de manosa en la estructura del glicano para su reconocimiento y transferencia por parte de la OST. La mutante que presentó el mayor grado de hipoglicosilación fue la que sintetiza $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Estos resultados fueron validados por un estudio glicoproteómico donde se analizaron proteínas endógenas de la pared de *S. pombe*. Además, se determinó que la estructura final de un glicano que se transfiere truncado permanece incompleta. Estos resultados brindan un marco para predecir la severidad de las CDG de tipo I.

Por otro lado, se reprodujeron en *S. pombe* los defectos genéticos de la CDG-IIb (también conocida como MOGS-CDG) debidos a mutaciones en la glucosidasa I (GI). Se observó que esta mutante crece muy lentamente y tiene un metabolismo y una capacidad replicativa muy bajos. Este fenotipo se suprimió mediante una mutación adicional en el gen *alg10* (no se agrega la glucosa más externa y se sintetiza $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Estos resultados indicarían que la acumulación de proteínas con *N*-glicanos triglicosilados, el sustrato de GI, sería la responsable del severo defecto observado en la CDG-IIb, si bien dicha acumulación no inhibió la actividad de la OST por producto. Por otro lado, el fenotipo observado en las mutantes no se debería tampoco a la imposibilidad de las glicoproteínas de ingresar al QC ni a una posible degradación limitada de sus glicoproteínas mal plegadas. Nuestro trabajo aporta nueva información para la comprensión de las bases moleculares de las CDG humanas de tipo I y IIb.

Palabras clave: *N*-glicosilación, levaduras, oligosacariltransferasa, glucosidasa I, desórdenes congénitos de glicosilación

Study of the molecular basis of human congenital disorders of glycosylation type I and IIb using fission yeast as experimental model

The congenital disorders of glycosylation (CDG) are a group of inherited human diseases produced by defects in glycosylation process within the cell. Among them, more than 50 are produced by defects in *N*-glycosylation. Protein *N*-glycosylation in the endoplasmic reticulum (ER) starts with the transfer *en block* of a glycan $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ from a dolicol derivative (Dol-PP) (Dol-PP-glycan) to nascent proteins by the oligosaccharyltransferase (OST). Glycans linked to proteins (*N*-glycans) facilitates its folding as it provides bulky hydrophilic groups that keep folding intermediates in solution. Then, *N*-glycans are modified by glucosidases, allowing glycoproteins entrance to the “ER quality control of glycoprotein folding” (QC). CDG can be of type I and type II. **Type I CDG** are caused by defects before and during glycan transfer to proteins: inefficient transfer by OST results in hypoglycosylated proteins. **Type II CDG** are due to defects after glycan transfer and during its remodeling, producing aberrant *N*-glycan structures.

To study the influence of glycan structure on the efficiency of its transfer to proteins by the OST, we determined the degree of hypoglycosylation produced in a set of 16 fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* mutants that synthesize all possible combinations of Dol-PP-glycan structures in the ER membrane, mimicking type I CDG defects. Using as a biosensor a mutated GFP that loses fluorescence when it is *N*-glycosylated, we determined that the absence of glucose residues is more critical than that of mannose residues in the glycan structure for its efficient transfer by OST. The mutant that showed the highest degree of hypoglycosylation was the one that synthesizes $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. These results were validated by a glycoproteomic analysis in which we analyzed the hypoglycosylation of endogenous cell wall glycoproteins of all *S. pombe* mutants. In addition, we determined that the final structure in the cell wall of a glycan that is transferred truncated remains incomplete. These results provide a framework to predict the severity of type I CDG.

On the other hand, we reproduced in *S. pombe* the genetic defects produced in CDG-IIb (also known as MOGS-CDG) due to mutations in glucosidase I (GI). The mutant grows very slowly and has a very low metabolism and replicative capacity. This phenotype was suppressed by an additional mutation in the *alg10* gene (this mutant lacks the glucosyltransferase that adds the outermost glucose and synthesizes $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). These results would indicate that the accumulation of the substrate of GI, i.e. proteins bearing triglycosylated *N*-glycans, would be responsible of the severe defect observed in the CDG-IIb, although this accumulation did not inhibit the activity of OST by product. Moreover, the observed phenotype in the mutants would not be due either to hindrance of glycoproteins to enter the QC, nor to a possible limited degradation of misfolded glycoproteins. Our work provides new information in the understanding of the molecular bases of human CDG type I and IIb.

Key words: *N*-glycosylation, yeast, oligosaccharyltransferase, glucosidase I, congenital disorders of glycosylation

**“Somos lo que hacemos, y sobre todo somos lo que hacemos para cambiar
lo que somos”**

Eduardo Galeano (1940-2015)

“Las conquistas científicas solo sirven si estas están al servicio del pueblo”

Ramón Carrillo (1906-1956)

Agradecimientos

A lo que en su momento fue el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación Argentina, al CONICET y la ANPCyT, por brindar el soporte económico y académico sobre el cual pude realizar esta Tesis.

A los argentinos y argentinas que con el pago de sus impuestos permiten que se desarrolle la ciencia en el país, más allá del contexto actual.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a la Universidad Nacional de Buenos Aires, por brindarme la posibilidad de realizar un doctorado en la más prestigiosa casa de estudios del país.

A la Fundación Instituto Leloir, por abrirme las puertas y ofrecerme todo lo necesario para realizar esta Tesis, desde el espacio físico y soporte económico hasta la calidez humana y el trato familiar. Gracias a todo el personal de apoyo, mantenimiento, contable y de biblioteca, en estos años recibí de ellos y ellas la mejor predisposición para hacer mi trabajo más fácil.

A mi directora y amiga Cecilia D'Alessio, por depositar una confianza infinita en mí, por estar presente en cada paso, por las discusiones académicas, por las charlas compartidas, por su predisposición a solucionar cualquier problema y atender cualquier inquietud. Por ser la persona que más creyó en mí.

Al Doctor Armando Parodi, por darme la posibilidad de compartir estos años con uno de los más grandes científicos que conozco, por ser un ejemplo de excelencia, ilustrarme con su inacabable conocimiento y entretenerme con sus inagotables anécdotas.

A los miembros de mi Comité de seguimiento de Tesis Paula Portela, Patricia Abdián y Pablo Wappner, por la predisposición, la discusión académica y las sugerencias.

A los miembros de mi jurado, por brindarme el honor de evaluar esta Tesis, y por su excelencia académica.

A mi filósofo favorito Carlitos Labriola, por ser una fuente inagotable de historias, charlas, imaginación y debates, por hacer de mis almuerzos los espacios más divertidos que encontré en estos años.

A mi hermanito Ramiro Orsi, por ser único en su especie, por estar absolutamente siempre a mi disposición para todo lo que necesité, por su infinito corazón y su gran sensibilidad. Por tantas risas compartidas.

A mis amigas Paula Couto, Soledad Labanda, Vanesa Mattera y mi amigo Christian Lorenzo, por las risas hasta doler la panza, los almuerzos de debates con los temas más desopilantes e impensados, y la contención constante.

A mi amiga Vanina Alzogaray, por las caminatas, las charlas, los consejos y la empatía.

A mi amigo Andrés Rossi, por la complicidad, el entendimiento y la comprensión.

A mi amiga y ejemplo de vida Laura Delgui, por ser una de las principales impulsoras de esto que hoy concluye, por su presencia constitutiva en mi vida, sus inacabables consejos, su honestidad y su cariño.

A los y las nuevos integrantes del laboratorio 302, en especial a Ayelén Valko, Emiliana Etcheagaray y Sofía Aramburu por generar un ambiente laboral entretenido y solidario, por el trabajo en equipo y los ratos compartidos.

A Néstor Kirchner y Cristina Fernández de Kirchner, por mostrarme que otro país es posible. Por la visión estratégica del desarrollo científico como soporte para la justicia social, la soberanía política y la independencia económica. Y, sobre todo, por confiar en los científicos y científicas más que nosotros mismos.

A la organización política La Cámpora, que fue una parte fundamental de mi vida durante estos años, por ser el motor que impulsa la utopía de la patria justa, libre y soberana, por demostrar que no todo se compra ni se vende, y que vale la pena vivir la vida desde una perspectiva colectiva.

A la unidad básica Luis "Polito Arcuschín", por ser el centro ejecutor de esa utopía, impulsada por las convicciones y los ideales de quienes formamos ese espacio, y por brindarme el lugar para aportar, humildemente y desde mi profesión, a la construcción de una sociedad mejor.

A mis amigas Natalia Mein, Verónica Chedufau y Victoria Chiabrando, por la lealtad, la incondicionalidad, la escucha, la espontaneidad, la autenticidad, la honestidad. Pensar en lo maravilloso de estos años de mi vida es imposible sin su presencia a mi lado.

A la número uno Chabela Mazzei, por ser ejemplo de lucha y convicción, por estar a la vanguardia para que todo funcione y que nada falte, nunca.

A mis conductores Alesia Hurtado y Manuel Saralegui, por su entrega absoluta, por ser mis ejemplos de lo inquebrantable, de lo innegociable, de que las convicciones pueden y deben ser una forma de vida, por enorgullecirme con su amistad.

A Manuel Magrone, por el afecto, el respeto, las ganas, la generosidad, los acuerdos, los cuidados, los ratos compartidos. Por emocionarme.

A mis primas Luciana Gallo y Sabrina Muñiz, por ser las hermanas que elegí, mis cómplices y las compañeras de hierro que transitan conmigo cada paso de mi vida.

A mis hermanas Daianna y Agustina, quienes hacen que transitar la vida en su compañía sea una experiencia insuperable, provocadoras de las risas más genuinas y de las calmas más intensas, las que con su sola presencia enriquecen mi vida, llenan mi mundo de paz y el más profundo amor.

A mi mamá Cristina y mi papá Gerardo, sin los cuales nada de esto hubiera sido posible, por su soporte, su compañía, sus consejos, su impulso, y, sobre todo, por su más absoluta incondicionalidad. Todo este trabajo está dedicado a ellos, por ser los grandes ejemplos que atravesaron mi vida y por todo el amor que sentimos mutuamente.

Índice

Resumen.....	2
Introducción	11
Síntesis de las proteínas de la vía secretoria.....	12
La <i>N</i> -glicosilación	13
Biosíntesis de las glicoproteínas.....	14
Procesamiento de los <i>N</i> -glicanos: control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE (QC).....	19
Modificaciones de los <i>N</i> -glicanos en el aparato de Golgi.....	24
Las enfermedades humanas congénitas de glicosilación (CDG)	27
Levaduras como modelo experimental para estudiar enfermedades genéticas humanas	31
Objetivos e hipótesis.....	33
Materiales y métodos.....	37
Materiales.....	38
Cepas y medios de cultivo.....	38
Procedimientos con ADN.....	41
Plásmidos, clonados y expresión de proteínas en <i>S. pombe</i>	43
Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	45
Transformación de levaduras <i>S. pombe</i>	46
Construcción de mutantes <i>S. pombe</i>	46
Ensayos de crecimiento, vitalidad y viabilidad de levaduras	48
Extracción de proteínas de <i>S. pombe</i>	49
Análisis glicoproteómico de glicoproteínas de pared celular por SWATH-MS.....	51
Marcación y análisis de glicanos sintetizados <i>in vivo</i> por <i>S. pombe</i>	51
Tratamiento con enzimas glicosidasas e inhibidores de la <i>N</i> -glicosilación	53
Inmunodetecciones	53
Microscopía	54

Citometría de flujo	54
Análisis estadístico	54
Resultados	55
Capítulo I.....	56
Estrategia experimental para detectar defectos de <i>N</i> -glicosilación en <i>S. pombe in vivo</i>	58
El biosensor GlyGFP se expresa en el RE, se <i>N</i> -glicosila y permite detectar hipoglicosilación de <i>S. pombe in vivo</i>	59
Efecto de la estructura del glicano en la eficiencia de la transferencia por la OST..	66
La ausencia creciente de Glc en el Dol-PP-glicano aumenta progresivamente la hipoglicosilación de proteínas	67
Capítulo II.....	75
La delección del gen que codifica para la GI produce severos defectos en <i>S. pombe</i>	76
El perfil de <i>N</i> -glicanos de la mutante $\Delta gls1-H$ no se corresponde con una mutación de GI	79
La mutación en el gen <i>alg10</i> mejora los defectos morfológicos y de crecimiento de las mutantes de <i>S. pombe</i> carentes de GI.....	82
El fenotipo enfermo de las mutantes $\Delta gls1-S$ no se debe a la imposibilidad de sus glicoproteínas de entrar en los ciclos de QC del RE.....	87
El crecimiento lento de $\Delta gls1-S$ no se debe a una hipoglicosilación de proteínas causada por inhibición de la OST por producto	89
La acumulación de glicoproteínas triglicosiladas en el RE produce una pérdida severa de vitalidad y viabilidad de las células.....	91
Conclusiones	96
Discusión	99
Bibliografía	107

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALG: genes involucrados en la biosíntesis del glicano sobre el Dolicol-PP

CDG: enfermedades congénitas de glicosilación

CNX: calnexina

CRT: calreticulina

DO: densidad óptica

Dol-P: dolicol monofosfato

Dol-PP: dolicol pirofosfato

Dol-PP-glicano: glicano unido a lípido dolicol pirofosfato

Endo H: endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa H

ERAD: degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico

GFP: Proteína fluorescente verde

GI: Glucosidasa I

GII: Glucosidasa II

Glc: Glucosa

GlcNAc: *N*-acetilglucosamina

GlyGFP: Proteína fluorescente verde con un sitio de *N*-glicosilación

GXY: oligosacárido de composición $\text{Glc}_x\text{Man}_y\text{GlcNAc}_z$

LmSTT3D: subunidad catalítica de la oligosacariltransferasa de *Leishmania major*

Man: Manosa

N-glicano: glicano unido a proteína

OST: Oligosacariltransferasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QC: control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico

RE: Retículo endoplásmico

UFC: unidades formadoras de colonias

UGGT: UDP-Glc glicoproteína glucosiltransferasa

YFP: proteína fluorescente amarilla

WT: Wild type (salvaje)

Introducción

La *N*-glicosilación de proteínas ha evolucionado desde un proceso involucrado en la síntesis de pared celular en arqueas y algunas bacterias, hasta ser la modificación proteica covalente más común en las células eucariotas (Helenius and Aebi, 2004). En este proceso universal y finamente regulado, azúcares individuales adquieren arreglos de manera única para formar el más expansivo y diverso tipo de modificación de proteínas y lípidos a lo largo de todas las especies (Bertozzi and Rabuka, 2009). Se estima que alrededor del 2% de todos los genes del genoma humano codifican para proteínas involucradas en varios aspectos de la *N*-glicosilación y que un tercio de las proteínas celulares están *N*-glicosiladas (Apweiler et al., 1999). Cada paso en este programa de modificación tiene significancia para el destino de las glicoproteínas nuevas sintetizadas y esto determina la homeostasis de las proteínas secretorias de la célula eucariota.

Síntesis de las proteínas de la vía secretoria

El retículo endoplásmico (RE) es una organela altamente especializada que cumple roles cruciales en varios procesos celulares, ya que es la encargada de la síntesis y plegamiento de todas las proteínas de la vía secretoria: proteínas destinadas a la membrana plasmática y a compartimentos endocíticos y exocíticos. Las proteínas que deben ser translocadas hacia el lumen del RE están etiquetadas con una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal, el péptido señal. Éste dirige a la proteína a la membrana del RE y a medida que se traduce pasa a través del translocón Sec61, un complejo heterotrimérico compuesto por las subunidades α , β y γ , donde la subunidad α es la que forma el canal propiamente dicho (Figura 1). Asociadas al translocón, un conjunto de proteínas accesorias como la proteína de membrana asociada a la cadena de translocación, el complejo asociado al translocón (TRAP), la peptidasa señal, el complejo de la oligosacaryltransferasa (OST) y varias chaperonas moleculares residentes del RE como BiP, Grp94, calnexina (CNX) y calreticulina (CRT), reciben al polipéptido naciente (Cali et al., 2008). Las cadenas polipeptídicas que emergen del poro del translocón lo hacen desplegadas, y a medida que van ingresando hacia el lumen del RE son expuestas a las chaperonas moleculares mencionadas y otras que asisten y llevan adelante el plegamiento hasta que asumen su conformación tridimensional final dictada, en gran medida, por su secuencia primaria.

El plegamiento correcto involucra la formación de estructuras secundarias, la ubicación de los residuos hidrofóbicos hacia el interior de la proteína, la formación de puentes disulfuro, el corte del péptido señal, la *N*- y *O*-glicosilación, la isomerización de prolina y la oligomerización, ocurriendo estos procesos tanto de manera co- como post-traduccional (Cali et al., 2008). De todas estas, la modificación más relevante es la *N*-

glicosilación: se estima que el 80% del total de las proteínas de la vía secretoria poseen *N*-glicanos (la nomenclatura *N*-glicano se refiere al glicano unido a proteínas) (Apweiler et al., 1999).

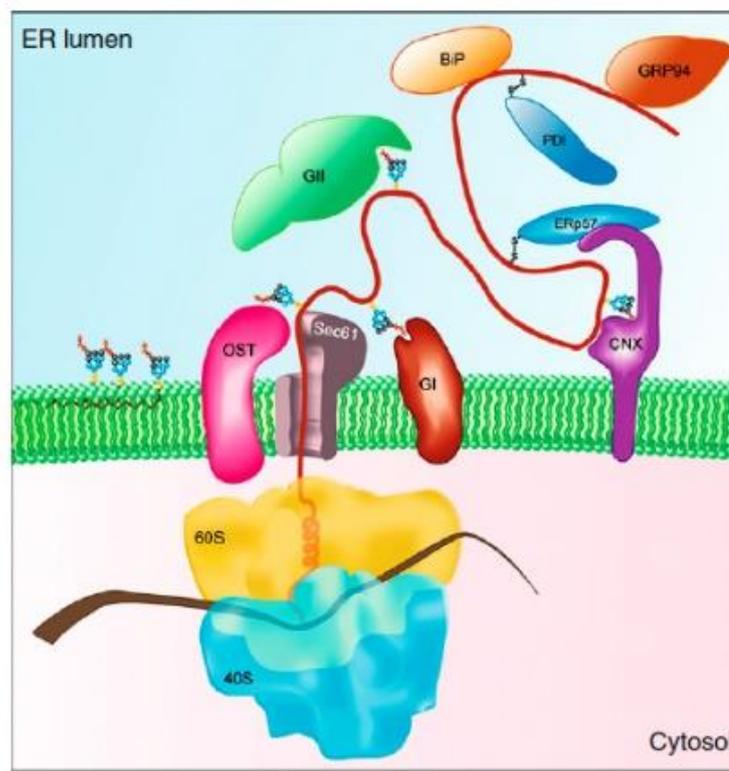


Figura 1. Translocación co-traduccional de proteínas al lumen del RE

Las cadenas polipeptídicas nacientes son transportadas co-traduccionalmente hacia el lumen del RE a través del complejo Sec61. A medida que emergen, se asocian con distintas chaperonas moleculares y enzimas del plegamiento residentes del RE (ERp57, GRP94, BiP, CNX y PDI: proteína disulfuro isomerasa) y son sustrato de diversas enzimas modificadoras. Los residuos de asparagina de las secuencias consenso de *N*-glicosilación son modificados por la OST con la adición covalente de un glicano pre-ensamblado sobre un DoI-PP. Las subunidades ribosomales grande y pequeña se indican como 60S y 40S, respectivamente. Figura extraída de (Cali et al., 2008).

La *N*-glicosilación

La *N*-glicosilación de proteínas es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución ya que ocurre en los tres dominios de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya (Aebi, 2013; Helenius and Aebi, 2004). La síntesis de glicoproteínas en procariontas muestra similitudes sorprendentes con el proceso en células eucariotas, evidenciando el origen evolutivo común. La conservación de este proceso encuentra su justificación en la función más importante que tiene: asegurar la eficiencia y fidelidad de la biosíntesis proteica.

Las funciones de los *N*-glicanos en las proteínas son múltiples y variadas, influyendo en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las mismas. Aumentan la solubilidad de

las proteínas, les confieren rigidez estructural, ajustan su carga y punto isoeléctrico, facilitan su orientación en relación a las membranas, las estabilizan evitando su desnaturalización y las protegen de proteasas. En el RE, asisten al plegamiento de las proteínas nuevas y sirven como puntos de control de calidad que determinan su destino (Parodi et al., 2015). Además, funcionan como ligandos en una multitud de procesos de reconocimiento como la adhesión y comunicación célula-célula, participan del tráfico intracelular de proteínas, modulan respuestas inmunitarias y median interacciones con patógenos (Helenius and Aebi, 2004). No se conoce otra modificación proteica covalente que esté tan ampliamente distribuida y que sea empleada para tantos propósitos diferentes.

Biosíntesis de las glicoproteínas

La biosíntesis de las glicoproteínas ocurre a lo largo de la vía secretoria. Comienza en el RE con la síntesis del polipéptido y el oligosacárido, y allí mismo ocurre el acoplamiento covalente entre ambos. Esta reacción consiste en la incorporación de un glicano de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3M9) desde un dador lipídico dolicol pirofosfato (Dol-PP), a los residuos de asparagina en la secuencia consenso N-X-S/T (X \neq P) de los péptidos que están siendo translocados hacia el lumen del RE (se utilizará la nomenclatura Dol-PP-glicano en referencia al glicano unido al dolicol) (Cali et al., 2008). La enzima encargada de la reacción de transferencia del glicano es la OST, un complejo multimérico que se encuentra en la membrana del RE, y la incorporación del glicano ocurre a los residuos de asparagina que se encuentran a una distancia de 12-14 residuos aminoacídicos de la cara interna de la membrana del RE (Kelleher and Gilmore, 2006).

La composición del oligosacárido G3M9 transferido durante la *N*-glicosilación en eucariotas se encuentra muy conservada y es exactamente la misma en animales, hongos y plantas (Helenius and Aebi, 2004). Sin embargo, esta estructura es modificada sustancialmente, primero en el RE por acción de glucosidasas y manosidasas y, luego de que las glicoproteínas han alcanzado su conformación nativa, continúan su camino por la vía secretoria hacia el complejo de Golgi donde los *N*-glicanos son sujetos a recortes y modificaciones posteriores resultando en la generación de *N*-glicanos altamente complejos y diversos (Stanley and Cummings, 2015). Así, la estructura G3M9 inicialmente transferida contrasta con la enorme diversidad de *N*-glicanos encontrada en las glicoproteínas maduras. Los protozoos tripanosomátidos constituyen una excepción a la conservación de la estructura G3M9, ya que son los únicos organismos que se conoce que transfieren oligosacáridos no glicosilados, cuya composición varía entre las estructuras $\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$ (M6-9), dependiendo de la especie (Parodi, 1993).

Síntesis de Dol-PP-glicano

Como se mencionó anteriormente, el oligosacárido transferido a las proteínas tiene la misma estructura G3M9 en prácticamente todos los eucariotas, compuesta por tres Glc, nueve manosas (Man) y dos *N*-acetilglucosaminas (GlcNAc) (Figura 2). Por simplicidad, se mencionarán únicamente las Glc y Man de la estructura del glicano y al lado se indicará su cantidad (GXMY).

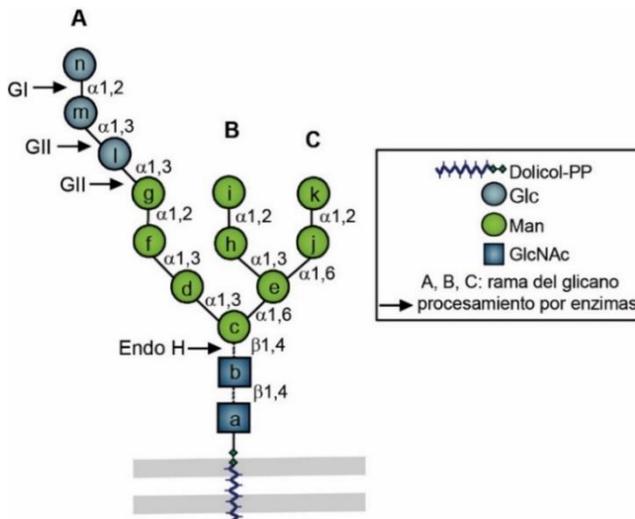


Figura 2. Estructura del oligosacárido transferido a las proteínas durante la *N*-glicosilación

Las letras (*a*, *b*, *c*,...) siguen el orden de adición de los monosacáridos durante la biosíntesis del Dol-PP-glicano. La rama A comprende los residuos *d*, *f*, *g* y *l-n*, la rama B los residuos *h* e *i* y la rama C los residuos *j* y *k*. Se indican los sitios de corte de GI y GII luego de la transferencia y el sitio de corte de la enzima endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa H (Endo H) utilizado para la purificación de *N*-glicanos. Los símbolos de monosacáridos siguen el sistema de Nomenclatura de Símbolos para Glicanos (Varki et al., 2015).

La estructura del Dol-PP-glicano es producto de una vía biosintética en la cual los monosacáridos son agregados de *a* uno a un derivado lipídico por glicosiltransferasas específicas codificadas por los genes *alg* (asparagine-linked glycosylation) (Aebi, 2013; Stanley et al., 2015). El proceso comienza en la cara citosólica de la membrana del RE por la transferencia de dos residuos de GlcNAc (residuos *a* y *b* en la Figura 2) a partir de UDP-GlcNAc a dolicol monofosfato (Dol-P). La GlcNAc-1-fosfotransferasa codificada por el gen *alg7* adiciona el primer residuo de GlcNAc y un complejo proteico codificado por los genes *alg13* y *alg14* transfiere el segundo. Luego, se incorporan cinco residuos de Man (residuos *c-g*, Figura 2) utilizando GDP-Man como sustrato. El primero es adicionado por la β 1,4-manosiltransferasa codificada por el gen *alg1*, los dos residuos de Man subsiguientes por la enzima codificada por *alg2* y los dos que siguen son incorporados a la estructura del oligosacárido por la transferasa producto del gen *alg11*. Los pasos subsiguientes en la biosíntesis del Dol-PP-glicano ocurren en la cara luminal del RE, para lo cual el Dol-PP-M5 transloca a través de la membrana de RE mediante la acción de la flipasa codificada por el gen *rft1*. Una vez en el lumen, se adicionan cuatro residuos de Man (residuos *h-k*) y tres de Glc (residuos *l-n*) por glicosiltransferasas dependientes de Dol-P-Man y Dol-P-Glc, respectivamente. Primero se forma la rama B del Dol-PP-glicano, siendo el primer residuo de Man adicionado por la α 1,3-manosiltransferasa codificada por

el gen *alg3* y el segundo unido por enlace α 1,2 por la manosiltransferasa producto del gen *alg9*. La rama C se sintetiza por la adición sucesiva de residuos de Man por las α 1,6-manosiltransferasa y la α 1,2-manosiltransferasa codificadas por *alg12* y *alg9*, respectivamente. Una vez sintetizada la estructura M9, la enzima codificada por el gen *alg6* inicia la glucosilación de la rama A transfiriendo el primer residuo de Glc. Luego, se adiciona el segundo residuo unido por enlace α 1,3 por la enzima producto del gen *alg8* y el paso final en la síntesis del oligosacárido es catalizado por la enzima codificada por *alg10* que adiciona un tercer residuo de Glc unido mediante enlace α 1,2 (Aebi, 2013; Burda and Aebi, 1999) (Figura 3).

La síntesis altamente ordenada y secuencial del Dol-PP-glicano asegura que sea casi exclusivamente esta estructura completamente ensamblada la que se transfiere a las proteínas. Los residuos de azúcares individuales llevan a cabo funciones específicas en el procesamiento de las glicoproteínas, las cuales serán discutidas más adelante y que podrían explicar el alto nivel de conservación y precisión de esta vía de ensamblado en células eucariotas.

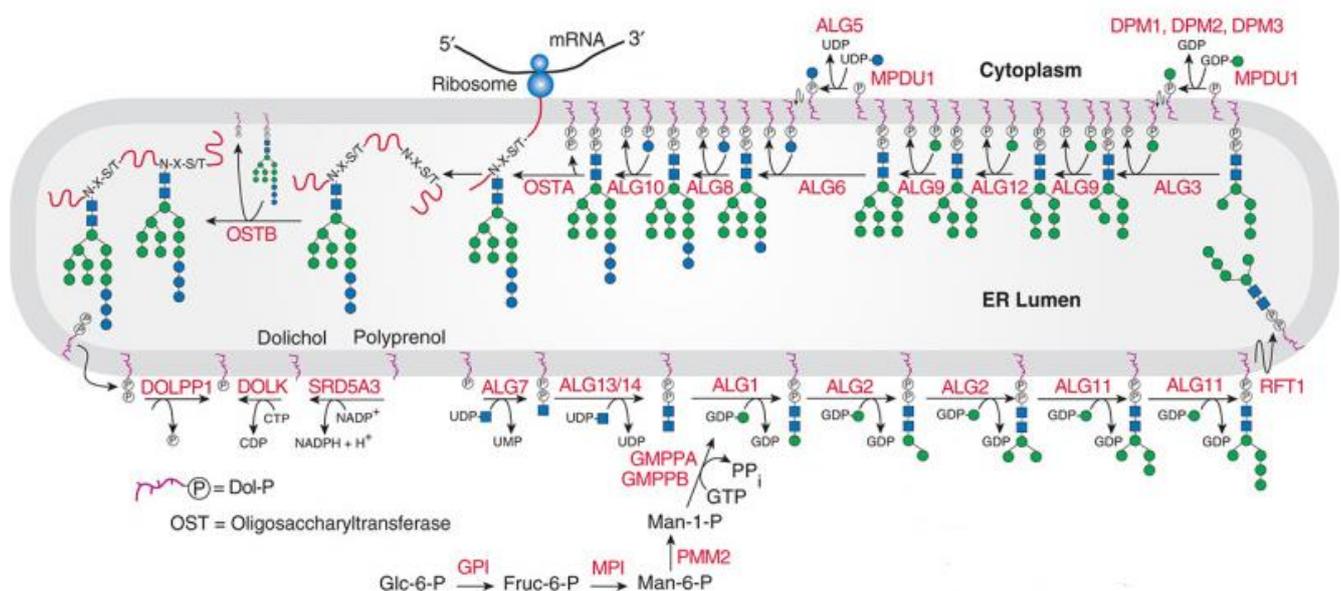


Figura 3. Síntesis de G3M9

Un Dol-P localizado en la cara citoplasmática de la membrana del RE recibe 2 GlcNAc a partir de UDP-GlcNAc y 5 Man a partir de GDP-Man. La estructura es translocada a través de la membrana del RE a la cara luminal. Seguidamente, se adicionan cuatro residuos de Man y tres de Glc a partir de Dol-P-Man y Dol-P-Glc, respectivamente. En rojo se indican los nombres de los genes *alg* que codifican para las glicosiltransferasas involucradas en la transferencia secuencial de los residuos monosacáridos. Una vez ensamblado, el oligosacárido es transferido a la cadena lateral de un residuo de asparagina en el sitio consenso N-X-S/T por la OST. OSTA y OSTB: OSTs cuya subunidad catalítica son STT3A y STT3B, respectivamente. Los nombres de las enzimas fueron tomados del Comité de Nomenclatura del Genoma Humano. Figura extraída de (Stanley et al., 2015).

La oligosacariltransferasa (OST)

La OST es la enzima central de la vía de *N*-glicosilación de proteínas. Es un complejo multiproteico asociado al translocón que escanea al polipéptido naciente a medida que entra en el lumen del RE en busca de secuencias consenso N-X-S/T para glicosilar. Su función es la de catalizar la transferencia de G3M9 en bloque desde el Dol-PP a la cadena lateral de los residuos de asparagina de los sitios consenso del polipéptido naciente. La cercanía espacial de la OST con el translocón y otras proteínas asociadas evidencia que la translocación hacia el RE y la *N*-glicosilación están acopladas estructuralmente (Pfeffer et al., 2014) (Figura 4).

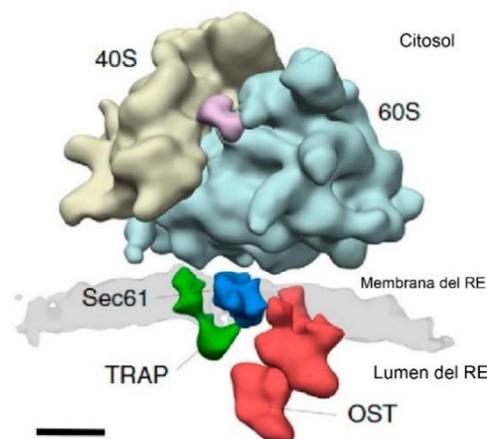


Figura 4. Cercanía espacial entre el complejo de translocación Sec61 y la OST en mamíferos

La imagen corresponde a un promedio de subtomogramas a 22 Å de resolución, obtenida a partir de microsomas pancreáticos caninos. Se observan los segmentos luminal y transmembrana de OST (rojo), Sec61 (azul) y TRAP (verde). Barra= 10 nm. La imagen fue modificada a partir de (Pfeffer et al., 2014; Wood et al., 2012).

En animales, plantas y hongos la enzima es un complejo heterooligomérico. En *Saccharomyces cerevisiae*, está compuesta por la subunidad catalítica STT3 (STT3A/STT3B), las subunidades OST5 (TMEM258) OST1 (riboforina I), OST4 (Ost4), OST3 (Tusc3), OST2 (Dad1), WBP1 (Ost48) y SWP1 (riboforina II), las cuales encuentran su homólogo en humanos (mostradas entre paréntesis) (Figura 5). Cinco de ellas, STT3, OST1, OST2, WBP1 y SWP1 son esenciales para la viabilidad en levaduras. Por el contrario, la OST de los protozoos tripanosomátidos está compuesta únicamente por la subunidad catalítica STT3 (Kelleher and Gilmore, 2006).

Como se mencionó, la STT3 es la subunidad catalítica de la OST y en levaduras existe una única variante. En mamíferos, en cambio, existen dos isoformas con roles parcialmente superpuestos. La STT3A que transfiere glicanos al polipéptido naciente co-traduccionalmente y la isoforma STT3B que modifica post-traduccionalmente los sitios aceptores que han sido salteados por la STT3A. De esta manera, ambas subunidades cooperan para maximizar la ocupancia de sitios de *N*-glicosilación en las glicoproteínas nuevas (Figura 3) (Shrimal et al., 2015).

Recientemente se obtuvo la estructura de la OST de *S. cerevisiae* por criomicroscopía electrónica (Bai et al., 2018; Wild et al., 2018), lo que aportó información muy valiosa sobre el complejo y el sitio de reconocimiento del sustrato. La parte embebida en la membrana de todo el complejo OST contiene un total de 28 hélices transmembrana, y cada subunidad tiene al menos un segmento transmembrana (Figura 5). El sitio activo de la subunidad catalítica STT3 se ubica lejos del centro del complejo, permitiendo el acceso sin obstáculos al polipéptido a medida que sale del translocón. El pirofosfato del dolicol se une a un surco expuesto a lípidos de la STT3, mientras que el oligosacárido se ubica en un bolsillo formado por la STT3 y las subunidades WBP1 y SWP1. La subunidad OST1 se encuentra muy próxima al bolsillo de unión al péptido de STT3 y podría interactuar con las proteínasceptoras e influir en su plegamiento. Los dominios luminales de OST1, SWP1 y WBP1 también podrían tener funciones estructurales al estabilizar la conformación de la subunidad STT3. Las subunidades OST2, OST4 y OST5, que contienen principalmente hélices transmembrana, tendrían una función de andamiaje y serían importantes para la estabilidad del complejo (Wild et al., 2018).

El residuo de Glc terminal del sustrato G3M9 es un determinante clave para el reconocimiento y transferencia eficientes del sustrato por la OST (Spiro, 2000), estudios *in vivo* muestran una clara preferencia por el oligosacárido completamente ensamblado y se ha propuesto un mecanismo regulatorio que incrementa la especificidad de sustrato de la OST (Karaoglu et al., 2001), sin embargo, se desconocen los detalles moleculares del reconocimiento del mismo. Trabajos previos del laboratorio han mostrado que dicho requerimiento reside en el complejo multimérico OST y no en la subunidad catalítica STT3 (Castro et al., 2006) y se ha sugerido que las subunidades WBP1 y SWP1 podrían contribuir a su reconocimiento al formar parte del bolsillo de unión (Wild et al., 2018). *In vitro*, la estructura oligosacáridica mínima aceptada por la OST es Dol-PP-GlcNAc₂ (Tai and Imperiali, 2001). La OST de los tripanosomátidos, que consiste únicamente en la subunidad catalítica STT3, en cambio, tiene un sitio de reconocimiento más relajado y reconoce de manera indistinta Dol-PP-glicanos de composición G0-3M5-9 (Parodi, 1993).

La eficiencia con que la OST transfiere un glicano a sitios consenso individuales es variable. Algunos sitios son ignorados, algunos glicosilados con eficiencia parcial y otros con eficiencia total. Numerosos factores afectan la eficiencia, incluyendo la composición de las subunidades del complejo OST, los aminoácidos en la propia secuencia consenso y adyacentes a él, la localización de éste en la cadena polipeptídica, la disponibilidad del precursor dolicol en el RE, la velocidad de translocación y la tasa de plegamiento proteico, entre otros (Kelleher and Gilmore, 2006).

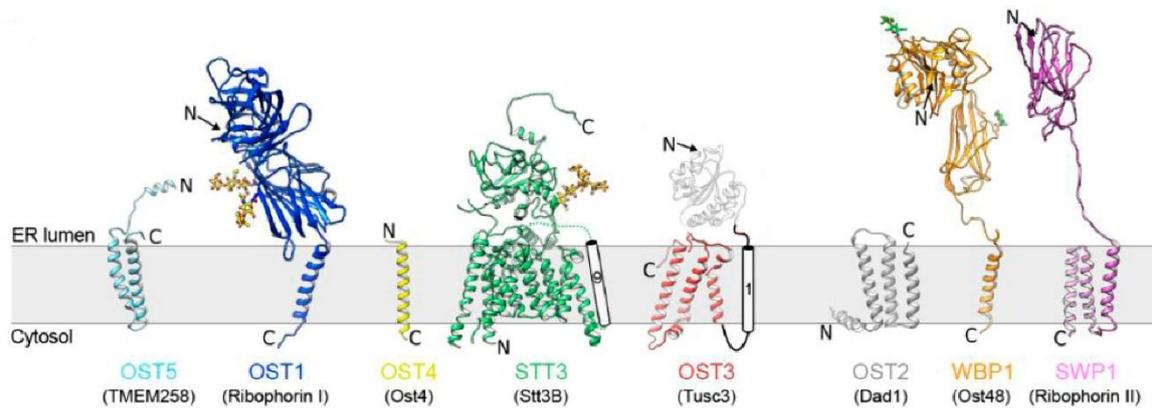


Figura 5. Estructura de la OST de levaduras

Representación de las estructuras de las subunidades de la OST de *S. cerevisiae*. Entre paréntesis se muestran los nombres de las subunidades correspondientes de humano. Figura extraída y modificada de (Wild et al., 2018)

Procesamiento de los *N*-glicanos: control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE (QC)

El plegamiento proteico comienza co-traduccionalmente durante la entrada del polipéptido a través del translocón y continúa luego de su disociación del ribosoma y del translocón en el lumen del RE. Una vez plegadas, las proteínas siguen su camino por la vía secretoria. Si no logran plegarse adecuadamente, quedan retenidas en el RE y son finalmente degradadas. La principal función de los *N*-glicanos en el RE es la de asistir al plegamiento proteico. Por un lado, la adición de *N*-glicanos *per se* provee grupos voluminosos hidrofílicos que incrementan la solubilidad de los intermediarios de plegamiento, evitan interacciones inespecíficas y modulan la estructura local. Por otro lado, mediante su remodelamiento, brindan información a la célula sobre el estado de plegamiento de la parte proteica.

El procesamiento de los *N*-glicanos comienza inmediatamente luego de su transferencia a las proteínas por la remoción del residuo de Glc más externo (*n*) por la glucosidasa I (GI) produciendo G2M9 y la del siguiente (*m*) por la glucosidasa II (GII), generando sucesivamente G1M9 y M9 (se indican los sitios de corte en la Figura 2). La remoción de las Glc por GI y GII determina la formación de estructuras monoglucosiladas que son reconocidas por CNX y CRT, lectinas-chaperonas no convencionales que se unen a los intermediarios de plegamiento a través de los *N*-glicanos. Esta unión aumenta la eficiencia del plegamiento ya que previene la agregación de los intermediarios, facilita la acción de la proteína disulfuro isomerasa ERp57 y retiene en el RE a aquellas proteínas que no han alcanzado su estructura nativa. Luego, la GII libera a la cadena

polipeptídica de la interacción con CNX y CRT removiendo el residuo de Glc remanente. Si la proteína aún no está correctamente plegada, el *N*-glicano será re-glucosilado por la UDP-glucosa glucosiltransferasa (UGGT), un sensor de plegamiento que incorpora un residuo de Glc exclusivamente a las proteínas que no han alcanzado su conformación nativa (Sousa et al., 1992; Trombetta et al., 1989). Ciclos de unión y desunión de las glicoproteínas a las lectinas, catalizados por las actividades contrarias de GII y UGGT, que quitan o agregan la Glc *m* del *N*-glicano G1M9, continúan hasta que la glicoproteína haya alcanzado el plegamiento apropiado (D'Alessio et al., 2010; Parodi et al., 2015). Este proceso es conocido como “control de calidad de plegamiento de proteínas” (QC). Los *N*-glicanos sirven así como señales codificadoras del estado de plegamiento (D'Alessio et al., 2010; Parodi et al., 2015).

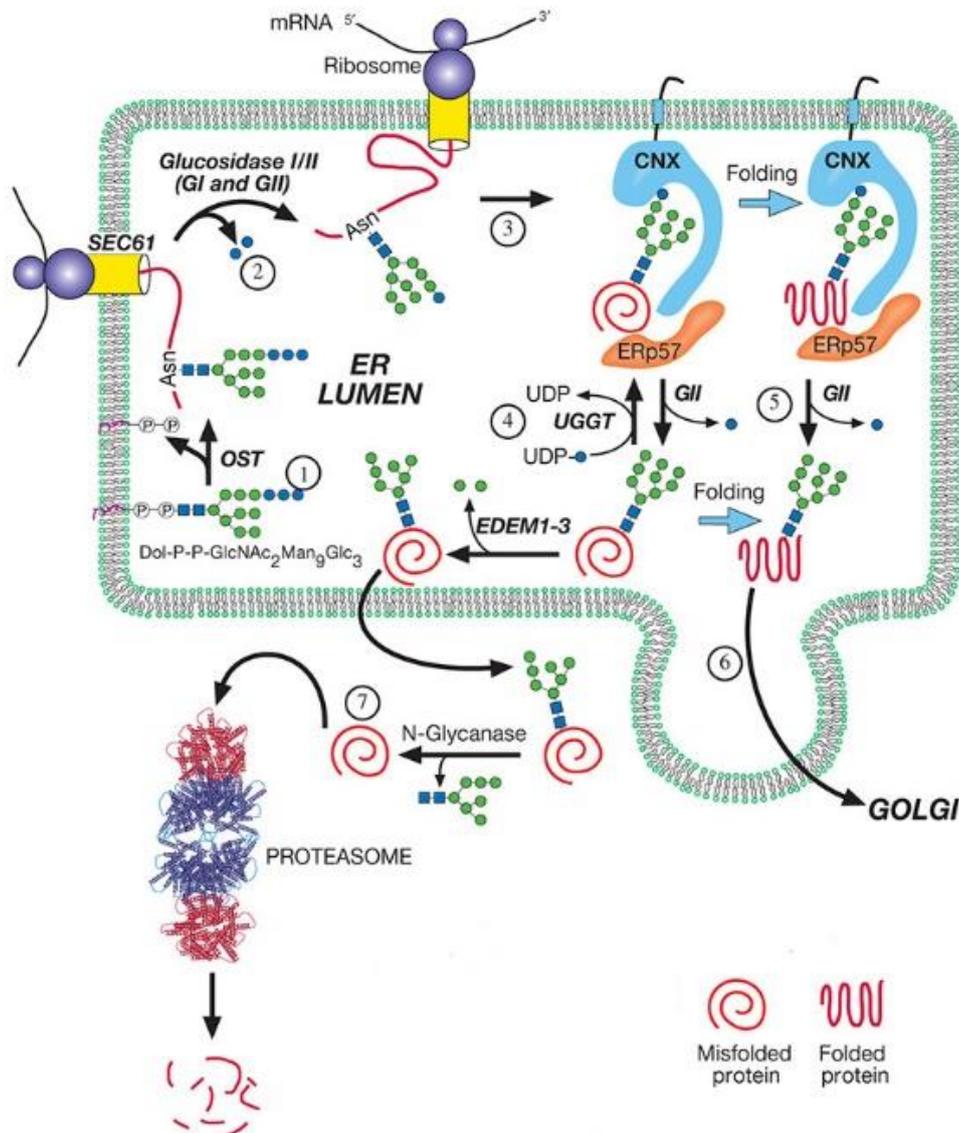


Figura 6. Control de calidad del plegamiento de glicoproteínas del RE

(1) Las proteínas que ingresan al RE son glicosiladas por la OST a medida que emergen del translocón Sec61. (2) Dos residuos de Glc se eliminan por la acción secuencial de GI y GII para generar especies monoglucosiladas G1M9 que son reconocidas por CNX (3), que facilita el plegamiento y la interacción con la disulfuro isomerasa ERp57. La GII remueve el residuo de Glc más interno y si la glicoproteína no está correctamente plegada (4) es reconocida por la UGGT que agrega nuevamente un residuo de Glc. (5) La GII hidroliza la Glc nuevamente y libera a la glicoproteína de los anclajes de CNX. (6) Las especies que han alcanzado su estructura nativa son transportadas al aparato de Golgi, (7) en cambio aquellas que permanecen en conformaciones mal plegadas son demanosiladas por manosidasas del RE y retrotranslocadas al citoplasma, donde son deglicosiladas y degradadas por los proteasomas. Figura extraída y modificada de (Parodi et al., 2015).

La Glucosidasa I (GI)

La GI cataliza el primer paso de la remodelación del N-glicano G3M9 en el RE una vez que ha sido transferido a las proteínas. La reacción involucra la hidrólisis del enlace α 1,2-glucosídico entre el residuo de Glc más externo (n) y el intermedio (m) en la rama A

del *N*-glicano (Figura 2). Esta reacción es inmediata y ocurre co-traduccionalmente con un tiempo medio inferior a 2 minutos mostrando que los sitios activos de OST y GI se encuentran en gran proximidad uno del otro. Tanto esta relación espacial cercana como la rapidez de acción de la GI apoyan la hipótesis de que el procesamiento por GI contribuiría a una mayor eficiencia de la *N*-glicosilación por desplazamiento del equilibrio de la reacción catalizada por la OST hacia el producto, que es el sustrato de GI (Roth and Zuber, 2017).

La GI es una proteína integral de membrana de tipo II de aproximadamente 82 kDa, miembro de la familia 63 de las glicosilhidrolasas. Es una α 1,2-exoglucosidasa compuesta por una cola citosólica N-terminal de 35 aminoácidos, un dominio transmembrana largo de 20 aminoácidos y un dominio catalítico C-terminal que se extiende hacia el lumen del RE (Faridmoayer and Scaman, 2007). La enzima nativa se encuentra como un tetrámero y es una glicoproteína que contiene *N*-glicanos de tipo alta Man. A pesar de catalizar un paso clave en la maduración de las glicoproteínas, es una de las enzimas procesadoras del *N*-glicano menos caracterizadas. Recientemente se resolvió la estructura de la GI de *S. cerevisiae* (Cwh41p) con una resolución de 2.04 Å, y se determinó que comparte un 24% de homología global con la GI de humano y un 34-59% en particular con el dominio C-terminal catalíticamente activo (Barker and Rose, 2013; Barker et al., 2011).

Cabe mencionar que mutaciones en la GI están asociadas a enfermedades humanas llamadas CDG-IIb, como se detallará más adelante.

La glucosidasa II (GII)

Luego del recorte de la Glc terminal por la GI, la enzima responsable de la remoción de los dos residuos de Glc más internos del *N*-glicano es la GII. La primera reacción consiste en la hidrólisis del enlace α 1,3-glucosídico entre los residuos de Glc *n* y *l*, ocurre con un tiempo medio de 5 minutos y produce G1M9. La segunda reacción implica la ruptura del enlace α 1,3-glucosídico entre el residuo de Glc más interno y el de Man *g* (Figura 2), ocurre más lentamente con un tiempo medio de 20 minutos y genera M9 (Roth and Zuber, 2017). Se cree estas cinéticas diferentes dan tiempo a los intermediarios de plegamiento que poseen *N*-glicanos monoglucosilados a ser reconocidos por CNX y CRT.

La GII es una glicosilhidrolasa soluble del RE que consiste en un heterodímero compuesto por las subunidades GII α y GII β unidas de forma no covalente. La subunidad GII α es la responsable de la actividad catalítica y no se le conoce señal de retención del RE. La subunidad GII β contiene una secuencia de retención XDEL de proteínas en el RE en el C-terminal y un dominio de homología al dominio lectina del receptor de Man-6-

fosfato, importante para la actividad catalítica de la subunidad GII α , lo que le confiere la característica de subunidad regulatoria (D'Alessio et al., 2010; Stigliano et al., 2009).

La UDP-Glc glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT)

La UGGT es una enzima bifuncional que combina las actividades de sensor de plegamiento de proteínas en su gran dominio N-terminal con la de glucosiltransferasa en su dominio catalítico C-terminal. Esta enzima reconoce la rama A de *N*-glicanos de composición M9 exclusivamente en el contexto de proteínas que no han adquirido su estructura nativa (Sousa et al., 1992; Trombetta et al., 1989) y transfiere un único residuo de Glc desde UDP-Glc al residuo de Man terminal I (Figura 2). La presencia de este residuo de Glc determina que la glicoproteína pueda interactuar con CNX y CRT y prolongar su permanencia en el RE para adquirir su forma nativa (D'Alessio et al., 2010; Roth and Zuber, 2017).

La UGGT es una proteína monomérica soluble del RE de 160 kDa que contiene una señal de retención de proteínas en el RE de tipo XDEL, miembro de la familia 24 de las glucosiltransferasas y se encuentra presente en la mayoría de los organismos eucariotas que transfieren oligosacáridos de alta Man, con la notable excepción de la levadura *S. cerevisiae* (Delic et al., 2013; Fernandez et al., 1994).

Degradación de proteínas asociada al RE (ERAD)

Si el plegamiento de una glicoproteína resulta irreversiblemente defectuoso, la permanencia prolongada de las mismas en el RE expone a los *N*-glicanos a las α 1,2-manosidasas ERManI y EDEM 1, 2 y 3 (Mnslp y Htm1p en *S. cerevisiae*, respectivamente) que remueven los residuos terminales de Man, disminuyendo la afinidad de CNX y CRT. A su vez, son reconocidas por las lectinas OS9.1 y OS9.2 (Yos9p en *S. cerevisiae*) y XTP3-B.1 y XTP3-B.2 que las retrotranslocan al citosol, donde son poli-ubiquitinadas y degradadas en los proteasomas en un proceso conocido como "degradación de proteínas asociada al RE" (ERAD) (Parodi et al., 2015; Roth and Zuber, 2017). La demanosilación es un proceso lento en comparación con las reacciones de deglucosilación, lo cual funciona como un "temporizador" para que solo las glicoproteínas mal plegadas, y no los intermediarios de plegamiento, sean direccionados hacia ERAD luego de una residencia relativamente prolongada en el RE. Por otro lado, el recorte adicional del residuo de Man de la rama A previene la reglucosilación por UGGT y entonces genera la salida definitiva de la glicoproteína del ciclo CNX/ CRT.

Modificaciones de los *N*-glicanos en el aparato de Golgi

Una vez que las glicoproteínas se han plegado correctamente y oligomerizado, continúan su tránsito por la vía secretoria hacia el complejo de Golgi. Mientras que los pasos involucrados en la biosíntesis de Dol-PP-glicanos, *N*-glicosilación y procesamiento en el RE están evolutivamente conservados, la remodelación de las estructuras en el aparato de Golgi ha divergido considerablemente a lo largo de las especies (Helenius and Aebi, 2004; Stanley and Cummings, 2015). Las estructuras que allí se generan pueden clasificarse en tres categorías (Figura 7). Los *N*-glicanos de tipo alta Man incorporan residuos de Man a la estructura tal como fue exportada del RE, y se encuentran en eucariotas inferiores como levaduras y en algunas proteínas especializadas de mamíferos. Los *N*-glicanos de tipo complejo, que se encuentran en los mamíferos, se forman a partir del recorte en el cis-Golgi de la mayoría de los residuos de Man derivados del RE por manosidasas específicas, luego en compartimentos intermedios se adicionan residuos de GlcNAc y durante el pasaje a través del trans-Golgi se incorporan residuos de galactosa (Gal), ácido siálico (NeuAc) y fucosa (Fuc). Los *N*-glicanos híbridos, como su nombre lo indica, son aquellos en que algunas ramas retienen las características de alta Man mientras que otras son modificadas hacia productos complejos (Ungar, 2009).

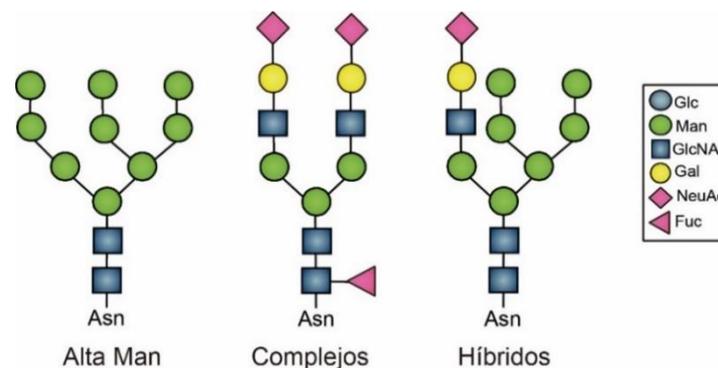


Figura 7. Estructuras de *N*-glicanos complejos

Los *N*-glicanos de glicoproteínas eucariotas pueden agruparse en tres categorías generales: alta Man, aquellos que incorporan unidades de Man durante su tránsito por el aparato de Golgi, complejos, donde la estructura original es extensivamente modificada por el recorte de monosacáridos e incorporación de otros como Gal, NeuAc y Fuc, e híbridos, aquellos donde se combinan ramas de alta Man y complejas. Cada *N*-glicano contiene el núcleo común Man₃GlcNAc₂ que deriva del glicano transferido durante la *N*-glicosilación (Stanley et al., 2015).

Las enzimas responsables de estas modificaciones son una serie de glicosiltransferasas y glicosidasas del aparato de Golgi que utilizan como sustratos nucleótidos-azúcares que se transportan desde el citosol al complejo de Golgi por transportadores específicos (Bredeson et al., 2017). Las mismas deben llevar a cabo la compleja tarea de actuar sobre los glicoconjugados en el lugar y momento correcto, para

lo cual el complejo de Golgi está provisto de compartimentos de membrana especializados donde estas enzimas residen y funcionan, lo que permite que las reacciones puedan operar secuencialmente (Zhang and Wang, 2016) (Figura 8). Además, muchas de ellas son expresadas específicamente en determinados tipos celulares, restringiendo las posibilidades de reacciones de las glicosiltransferasas en una célula dada, dando como resultado proteínas con *N*-glicanos específicos y característicos de cada tipo celular y especie.

La modificación extensiva a la que está sujeta cada *N*-glicano le permite a la célula regular finamente las propiedades biológicas de las glicoproteínas y generarle su microheterogeneidad tan característica. La naturaleza semi-independiente de los *N*-glicanos también permite a los tipos celulares y células en diferentes estadios de diferenciación y transformación imprimir en su grupo específico de glicoproteínas sus propias características bioquímicas, y entonces darle a la superficie expuesta de una célula o tejido una “identidad glicoproteómica”. Esto permite, por ejemplo, el reconocimiento propio entre células en un ambiente multicelular, lo que es central durante el desarrollo y diferenciación, en condiciones fisiológicas y de enfermedades.

Por otro lado, los *N*-glicanos actúan como señales de reconocimiento que direccionan a las proteínas a su sitio de residencia, como es el caso de, por ejemplo, la señal de Man-6-fosfato, reconocida por receptores específicos del trans-Golgi que dirigen a las proteínas que la poseen al lisosoma como destino final (Figura 8).

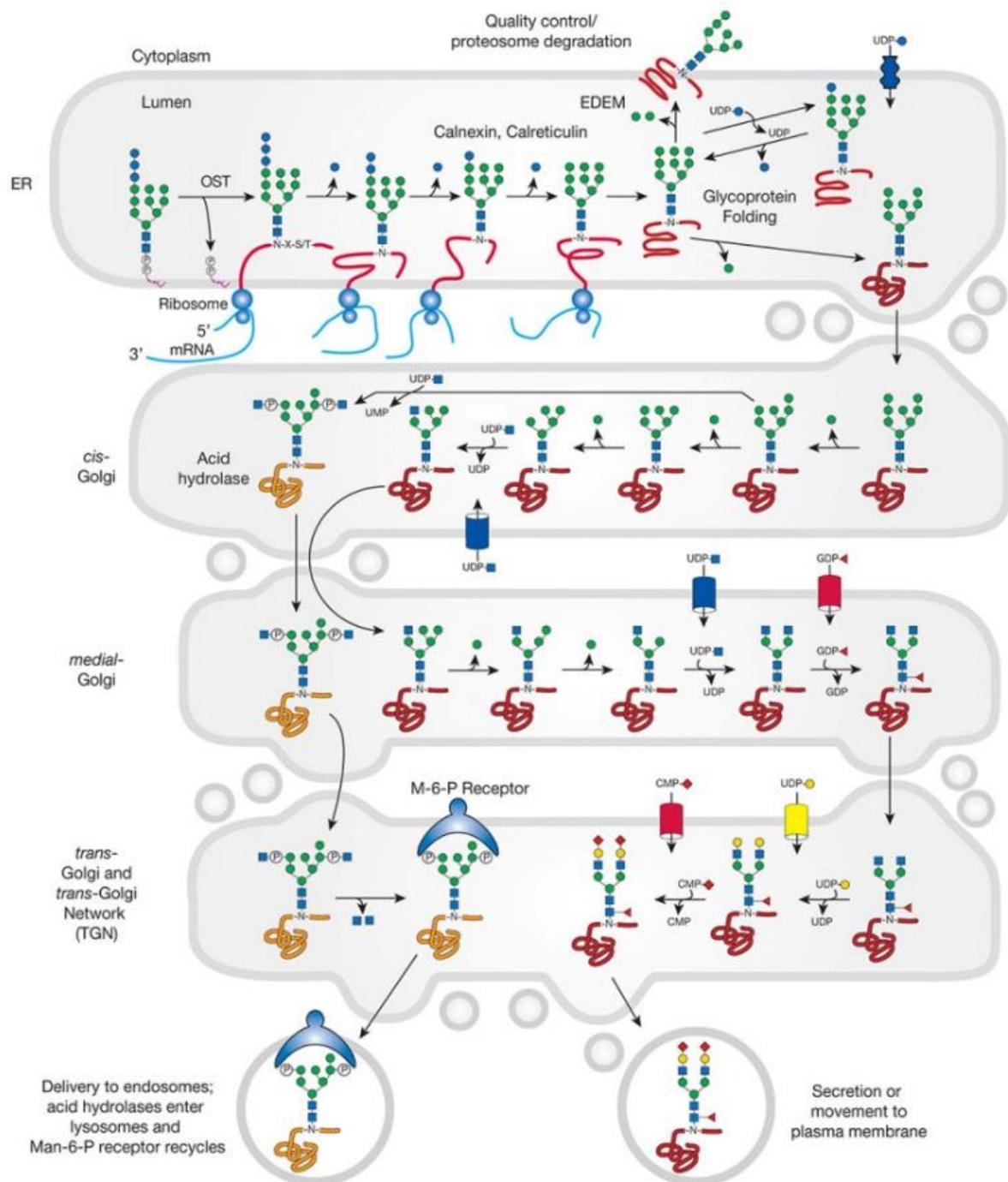


Figura 8. Procesamiento y maduración de *N*-glicanos en el aparato de Golgi de mamíferos

Una vez que atraviesan el QC en el RE, las glicoproteínas que han adquirido su estructura nativa continúan su camino hacia el complejo de Golgi, donde los *N*-glicanos son extensivamente modificados. En el cis-Golgi, diferentes manosidasas eliminan los residuos de Man de la mayoría de las glicoproteínas, hasta llegar a la estructura Man₅GlcNAc₂. Luego, en los compartimentos intermedios y en el trans-Golgi ocurre la extensión del *N*-glicano, lo que involucra la acción de numerosas glicosiltransferasas que adicionan Gal, NeuAc y Fuc, generando ramificaciones adicionales y resultando en la generación de *N*-glicanos altamente complejos y diversos. Figura extraída y modificada de (Stanley et al., 2015).

Las enfermedades humanas congénitas de glicosilación (CDG)

Dada la cantidad de pasos involucrados en el complejo proceso de glicosilación, no es sorprendente que diferentes modificaciones en las enzimas responsables de este proceso hayan sido identificadas en varias enfermedades, que van desde los desórdenes congénitos de glicosilación (CDG), diferentes tipos de cáncer como colon, ovario y mama, a otras patologías como cirrosis, hepatitis y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. Las CDG son un grupo de más de 100 síndromes humanos hereditarios, de los cuales la mayoría se descubrió en los últimos 10 años y este número sigue creciendo año a año, impulsado en gran medida por la incorporación de nuevas tecnologías, en especial la secuenciación de próxima generación (Figura 9) (Jaeken and Peanne, 2017; Ng and Freeze, 2018). Los defectos pueden encontrarse en las vías de *N*-glicosilación, *O*-glicosilación, glicosilación de glicolípidos, glicosaminoglicanos y anclajes de glicosilfosfatidilinositol y defectos en múltiples vías de glicosilación. De todas ellas, alrededor del 70% se producen por deficiencias en la *N*-glicosilación (Figura 9). La mayoría de estos trastornos sigue un patrón de herencia autosómico recesivo, sin embargo, las técnicas de secuenciación completa del exoma han determinado que ciertas mutaciones somáticas también pueden resultar en CDG (Ng and Freeze, 2018). Las características clínicas y bioquímicas de las CDG son altamente heterogéneas y generalmente involucran varios sistemas de órganos, especialmente el sistema nervioso, gastrointestinal, hepático, oftalmológico e inmunológico, evidenciando que sus funciones dependen fuertemente de una *N*-glicosilación normal. Los pacientes presentan crecimiento retardado y múltiples síntomas neurológicos que incluyen deterioro cognitivo, epilepsia, hipotonía, ataxia, entre otros. Si bien el grado de gravedad es muy amplio y hay pacientes adultos con manifestaciones clínicas muy leves, alrededor del 20% no sobrepasa el quinto año de vida (Cylwik et al., 2013).

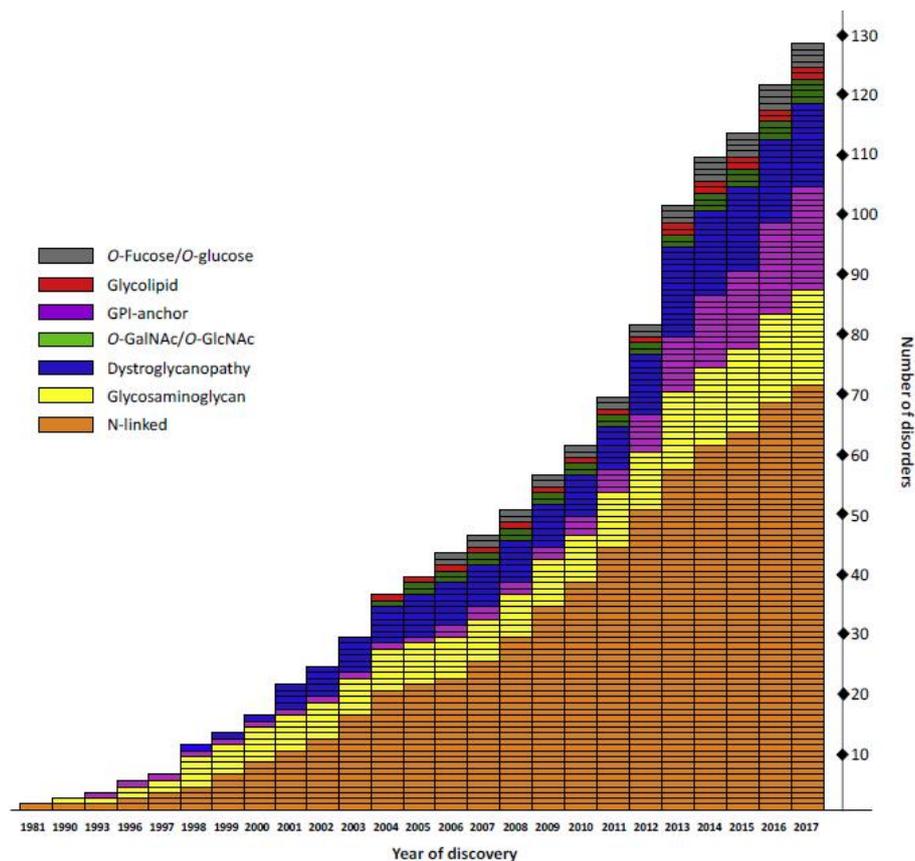


Figura 9. Progresión histórica de la identificación de nuevas CDG

Se muestra la distribución de las CDG según la vía de glicosilación a la que afectan y el año en que fueron identificadas. Se observa que año a año se descubren nuevos desórdenes y que la mayoría corresponde a los relacionados con la *N*-glicosilación. Datos actualizados hasta el final de 2017. Figura extraída de (Ng and Freeze, 2018)

CDG de tipo I

Las CDG se clasifican en tipo I y tipo II. Las CDG de tipo I son causadas por defectos en la biosíntesis del Dol-PP-glicano o durante la transferencia del glicano a las proteínas, lo que trae como consecuencia la ausencia de unidades enteras de *N*-glicanos en sitios normalmente ocupados, es decir, la hipoglicosilación de glicoproteínas, si bien la estructura de los *N*-glicanos remanentes en las glicoproteínas maduras suele ser normal. Una deficiencia en cualquiera de los pasos requeridos para la biosíntesis del Dol-PP-glicano producirá una estructura del mismo incompleta y debido a que la OST prefiere Dol-PP-glicanos de tamaño completo, estas alteraciones resultan en la hipoglicosilación de múltiples glicoproteínas. Se han reportado CDG por mutaciones en prácticamente todos los genes *alg*, como CDG-Ic por mutaciones en el gen *alg6* (Burda et al., 1998; Imbach et al., 1999), CDG-Ih por mutaciones en *alg8* (Chantret et al., 2003), CDG-Ij por mutaciones en *alg3* (Korner et al., 1999), CDG-II por mutaciones en *alg9* (Frank et al., 2004), CDG-Ig por mutaciones en *alg12* (Grubenmann et al., 2002), entre otras. Estas

patologías tienen como característica común la presencia de Dol-PP-glicanos incompletos en los fibroblastos de los pacientes, si bien también se observan estructuras remanentes más grandes e incluso G3M9, demostrando que las enzimas conservan algo de actividad residual. Las mutaciones suelen ser puntuales y encontrarse en los dos alelos, sin embargo, mutaciones en heterocigosis pueden ser suficientes para generar la patología, como en el caso de CDG-II (Frank et al., 2004).

La conservación de este proceso entre levaduras y humanos provee un modelo útil de estudio, ya que varios de los Dol-PP-glicanos intermedios que se acumulan en las CDG de pacientes se corresponden con intermedios observados en cepas de levaduras mutantes en la biosíntesis del Dol-PP-glicano. Además, la estrecha homología entre los genes de ambas especies permite a los ortólogos humanos normales rescatar la *N*-glicosilación defectuosa en cepas de levadura mutantes, mientras que los ortólogos mutantes de pacientes no lo hacen, lo que proporciona información valiosa sobre el posible defecto humano (Freeze et al., 2015).

CDG de tipo II

Las CDG de tipo II son causadas por defectos en el procesamiento posterior de los *N*-glicanos una vez transferidos a las proteínas, por lo tanto, la ocupación de los sitios de *N*-glicosilación es normal, pero la estructura de los *N*-glicanos en las glicoproteínas maduras está alterada (Freeze et al., 2015). Los trastornos afectan al procesamiento de *N*-glicanos en el RE y la maduración de los mismos en el aparato del Golgi. En particular, la CDG-IIb, también conocida como MOGS-CDG, es producida por mutaciones en la GI, enzima responsable del primer paso en el procesamiento del *N*-glicano una vez transferido a la proteína (Kim et al., 2018). Los pacientes presentan hipotonía generalizada, hepatomegalia, hipoventilación, problemas de alimentación y convulsiones. Además, en estos pacientes se vio aumentada la actividad de la endo- α 1,2-manosidasa, una enzima del aparato de Golgi que cliva el *N*-glicano G3M9 entre las Man *f* y *g* (Figura 2) y libera G3M, que se acumula en la orina. La porción del *N*-glicano M8 que queda unida a la proteína puede ser procesada correctamente, de hecho, el 80% de los *N*-glicanos de los pacientes muestran estructuras similares a las normales. Esto, sin embargo, no alivia su fenotipo (De Praeter et al., 2000; Volker et al., 2002). También se han observado pacientes con fenotipo inmunológico caracterizado por hipogamaglobulinemia severa, y se ha sugerido que las alteraciones en la *N*-glicosilación de estos pacientes podría modificar la susceptibilidad a infecciones con virus que dependen de la glicosilación de proteínas para completar su ciclo infeccioso (Sadat et al., 2014).

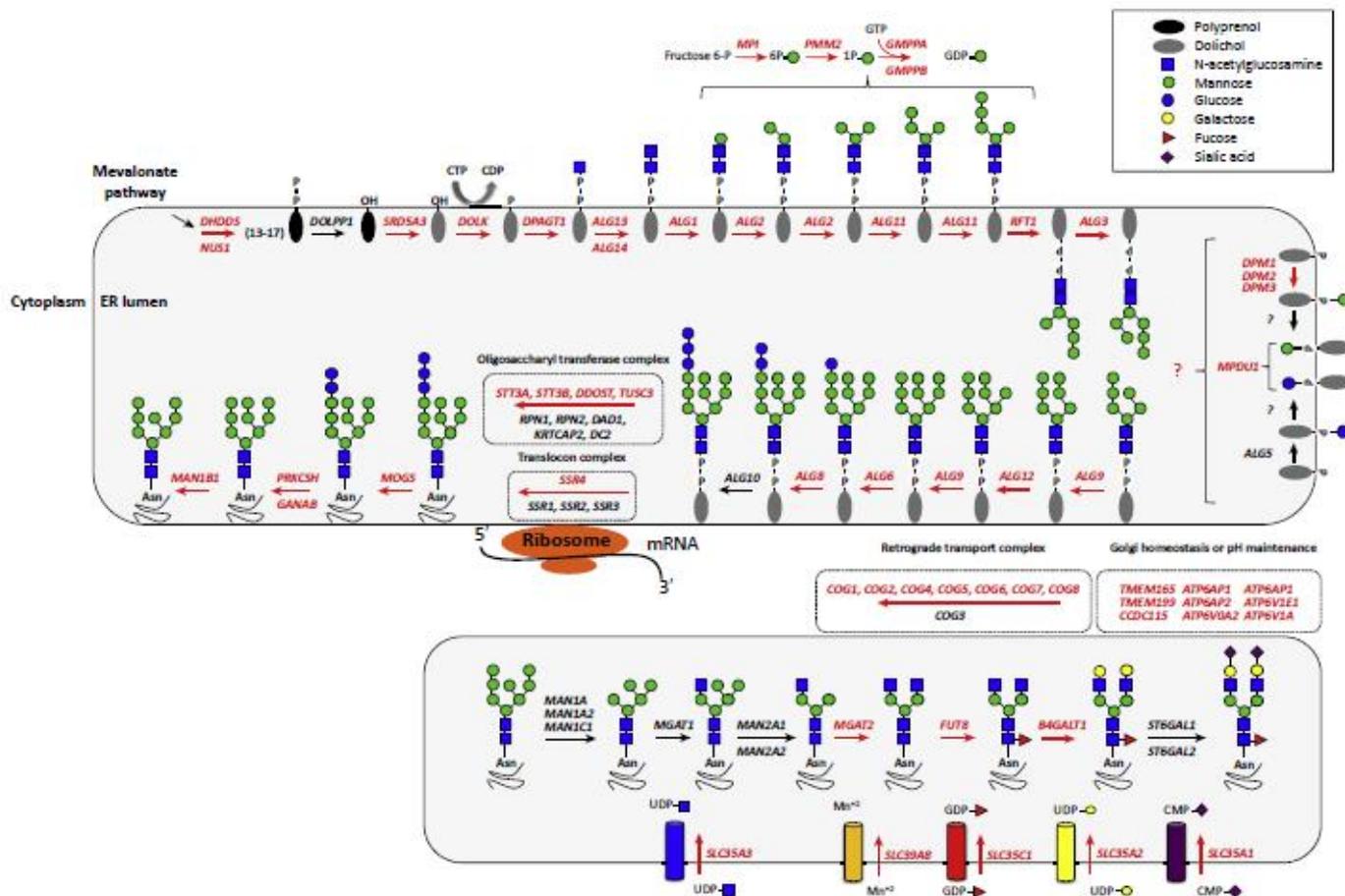


Figura 10. Localización en la vía secretoria de los genes cuyos defectos generan CDG descriptas

Se muestran en rojo los genes conocidos que generan trastornos de N-glicosilación. Los defectos que ocurren antes de la transferencia del glicano por la OST dan lugar a CDG de tipo I, mientras que los que ocurren luego de la transferencia del glicano a las proteínas, dan lugar a CDG de tipo II. Figura extraída de (Ng and Freeze, 2018)

Diagnóstico y tratamiento de las CDG

El isoelectroenfoque de transferrina sérica es la técnica más ampliamente utilizada como prueba de detección de CDG. Sin embargo, no todas las CDG se detectan por este método, ya que alrededor del 25% puede mostrar un perfil de transferrina normal, como es el caso de la CDG-IIb. Actualmente se están incorporando técnicas de "glicómica clínica", que van desde electroforesis en gel hasta espectrometría de masas tanto para glicanos libres como para glicoproteínas intactas que permiten, junto a las técnicas de genómica, el diagnóstico e identificación de CDG con precisión (Abu Bakar et al., 2018). Si bien la estrategia de suplementación dietaria con monosacáridos u otras moléculas ha tenido éxito en algunos casos, existen relativamente pocas opciones de tratamiento para las CDG. Actualmente, se están investigando otras estrategias como el uso de chaperonas farmacológicas, terapia génica y trasplante de órganos, entre otras (Brasil et al., 2018).

Levaduras como modelo experimental para estudiar enfermedades genéticas humanas

La relevancia de la *N*-glicosilación se puede comprender considerando su origen evolutivo. Así como la mayoría de las funciones del RE, la síntesis de Dol-PP-glicanos tuvo su origen en procesos homólogos en la membrana plasmática de bacterias y arqueas (Burda and Aebi, 1999; Helenius and Aebi, 2004). La síntesis de las glicoproteínas procariotas muestra tan sorprendentes similitudes con el proceso en células eucariotas que no deja lugar a duda de su origen común.

En un estudio reciente, se analizaron los glicoproteomas de los principales organismos modelo *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Danio rerio*, que representativamente abarcan el dominio eucariota de la vida y están separados evolutivamente entre sí por más de un millón de años. En este estudio, se encontró que todos los glicoproteomas eucariotas conservan características invariables como los patrones de reconocimiento de secuencias consenso, las restricciones estructurales y topológicas y la localización subcelular (Zielinska et al., 2012). Este hallazgo va en línea con el hecho de que el núcleo que subyace a la maquinaria de *N*-glicosilación consiste en pocas proteínas altamente conservadas en todas las especies eucariotas.

De los organismos modelo mencionados, *S. pombe* viene siendo utilizada de manera creciente desde la segunda mitad del siglo pasado como organismo modelo para la investigación de procesos moleculares y celulares eucariotas (Hagan, 2016). Esto ha sido impulsado principalmente por el desarrollo de nuevas metodologías para las modificaciones genéticas y por el hecho de que varios de los procesos celulares conservados en *S. pombe* y en otros eucariotas han sido perdidos o adaptados en el modelo de la levadura de gemación, más comúnmente utilizado, *S. cerevisiae*. De hecho, se cree que el género *Schizosaccharomyces* divergió de *Saccharomyces* hace cientos de millones de años atrás y que, a nivel molecular, está tan cercanamente relacionada con los humanos como lo está *Saccharomyces* (Hedges, 2002). Actualmente hay más de 300 laboratorios alrededor del mundo que trabajan con la levadura de fisión como modelo, con más de 400 publicaciones cada año (Hagan, 2016). Se conoce el genoma completo de *S. pombe* y la cantidad de información nueva acerca de esta levadura se ha incrementado significativamente durante los últimos 10 años, impulsando el continuo desarrollo de protocolos nuevos. Actualmente existen varias fuentes de información disponibles, entre las que se puede mencionar Pombase (<http://www.pombase.org/>), colecciones de delección de genes en todo el genoma

(<http://us.bioneer.com/products/spombe/spombeoverview.aspx>), una biblioteca de plásmidos de todos los marcos abiertos de lectura (ORFs) de *S. pombe* marcados con proteína fluorescente amarilla (YFP) accesible para clonados por tecnología Gateway (<http://www.riken.jp/SPD>), y varias páginas web de laboratorios que proveen recursos útiles, como el laboratorio de la Dra. Susan Forsburg de la Universidad del Sur de California (<http://www-bcf.usc.edu/forsburg/>). Existe incluso un foro denominado “Pombelist” de discusión en línea (<http://listserver.ebi.ac.uk/mailman/listinfo/pombelist>).

Además, este modelo posee las ventajas adicionales de ser un organismo de fácil manipulación genética, económico y de utilización, mantención y crecimiento asequibles. En particular, en el mecanismo de *N*-glicosilación están conservados, con respecto a mamíferos, todos los pasos de la biosíntesis del Dol-PP-glicano (genes *alg*), la estructura G3M9 del glicano que se transfiere y su reacción de transferencia catalizada por la OST, y los pasos iniciales del procesamiento de glicoproteínas por las glucosidasas GI y GII. En este punto, se diferencia de *S. cerevisiae* porque la misma no posee UGGT (Delic et al., 2013; Fernandez et al., 1994), lo que no le permite realizar los ciclos de QC. Por otro lado, *S. pombe* tiene la particularidad de poder sintetizar la rama A del Dol-PP-glicano a pesar de no tener completa la síntesis de las ramas B o C, lo cual no ocurre en *S. cerevisiae* y, por lo tanto, permite estudiar a las Glc y Man que componen la estructura del Dol-PP-glicano de manera independiente unas de otras (Stigliano et al., 2011). Por todo esto, *S. pombe* resulta un excelente modelo experimental para reproducir las modificaciones genéticas observadas en las CDG y estudiar sus bases moleculares.

Objetivos e hipótesis

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es comprender las bases moleculares de las enfermedades congénitas de glicosilación de tipo I y tipo IIb, entendiendo de manera detallada el rol y la relevancia de los genes afectados en dichas enfermedades, las consecuencias de la falta de actividad enzimática de estos genes, y la relevancia de la estructura del glicano como molécula central en este proceso. A continuación, se detallan las hipótesis de trabajo y los objetivos específicos propuestos para abordar cada problema planteado. Se utilizará como modelo experimental a la levadura de fisión *S. pombe* debido a que, como se explicó, tiene un alto grado de conservación de la maquinaria de *N*-glicosilación con mamíferos (Helenius and Aebi, 2004), posee todos los componentes del control de calidad del plegamiento de glicoproteínas y tiene conservados los pasos iniciales del procesamiento de *N*-glicanos posterior a su transferencia a proteínas. Además, como también se mencionó, es un microorganismo versátil para la manipulación genética y la realización de experimentos bioquímicos (Hagan, 2016).

Capítulo I

Estudio de las bases moleculares de las CDG de tipo I: influencia de la estructura del glicano en la eficiencia de su transferencia a proteínas

Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo establece que el contenido de Glc y de Man del glicano influye en la eficiencia de su reconocimiento y transferencia a las proteínas *in vivo* por parte de la OST, produciendo mayor hipoglicosilación a medida que disminuye el contenido de Glc y de Man.

Objetivos específicos

- ✓ *Reproducir en levaduras *S. pombe* las CDG de tipo I debidas a defectos en la biosíntesis del Dol-PP-glicano transferido durante la N-glicosilación*

Utilizar 16 levaduras *S. pombe* mutantes con combinaciones de mutaciones en los genes *alg* que participan en la biosíntesis del Dol-PP-glicano de manera que sinteticen formas intermedias que contengan entre 0 y 3 Glc y entre 0 y 9 Man (G0-3M5-9).

- ✓ *Determinar la influencia de la estructura del glicano en la eficiencia de la transferencia por la OST in vivo*

Si bien es conocido que la OST tiene un requerimiento estricto por la estructura del glicano completa para reconocerlo y transferirlo con eficiencia y que la tercer Glc de la rama A del glicano sería clave (Karaoglu, Gilmore 2001), no se conoce con precisión la relevancia de cada residuo de Glc ni de Man en este proceso. Para la realización de este objetivo, se utilizará una herramienta molecular previamente desarrollada en el laboratorio que consiste en la adaptación a *S. pombe* de una variante de GFP con un sitio de N-glicosilación cuya ocupación por un N-glicano produce la pérdida de fluorescencia (GlyGFP) (Herrera Aguilar, 2014) (Losfeld, Soncin et al. 2012). En particular, se propuso:

- Optimizar el uso del biosensor GlyGFP para medir hipoglicosilación de *S. pombe* de manera sensible y homogénea
- Expresar el biosensor GlyGFP en todas las mutantes de levadura que reproducen las CDG de tipo I
- Cuantificar con precisión la hipoglicosilación que producen sobre el biosensor desarrollado la transferencia de formas intermedias del glicano *in vivo*
- Determinar el grado de ocupación de los sitios de N-glicosilación de proteínas de pared de *S. pombe* endógenas, utilizando una aproximación glicoproteómica

Capítulo II

Estudio de las bases moleculares de la CDG-IIb: efectos producidos por la delección de la GI

Hipótesis

Como hipótesis de trabajo se propone que la severidad de la enfermedad CDG-IIb podría deberse a una toxicidad asociada a la acumulación de su sustrato G3M9 como consecuencia de la falta de actividad catalítica de la GI. Como consecuencia, las proteínas que acumulan *N*-glicanos triglucosilados no podrían ingresar a los ciclos de QC, o bien no podrían ser degradadas por ERAD. Por otro lado, la acumulación de G3M9 podría inhibir al complejo OST, ya que es su producto de reacción, generando hipoglicosilación de proteínas.

Objetivos específicos

- ✓ *Reproducir en la levadura S. pombe la CDG-IIb debida a defectos en la enzima GI y caracterizarla*
 - Durante la realización de este objetivo se obtuvo, además de la mutante carente de GI, una mutante supresora, lo cual derivó, en consecuencia, en caracterizar a dicha mutante de supresión de GI
- ✓ *Estudiar los efectos de la acumulación de G3M9 en mutantes S. pombe carentes de GI*
 - Evaluar si la acumulación de *N*-glicanos triglucosilados sobre las glicoproteínas podría impedir que las mismas ingresen a los ciclos de QC o que sean degradadas por la vía de ERAD
 - Estudiar el grado de hipoglicosilación de mutantes carentes de GI

Materiales y métodos

Materiales

Las drogas utilizadas para preparar los medios de cultivo en general fueron de Britania. El antibiótico geneticina y la puromicina fueron de InVivo Gen, la nourseotricina de Werner BioAgents, la ampicilina fue de Applichem y la kanamicina de Calbiochem. La Zimoliasa 100T fue de Sunrise y la tunicamicina de Santa Cruz Biotechnologies. La Endo H, la Ribonucleasa A (RNAsa A), el colorante disodium 2',4',5',7'-tetrabromo-4,5,6,7-tetrachlorofluorescein (Phloxin B), la tiamina, los inhibidores de proteasas, el ditioneitol (DTT), la proteasa P-5147, los aminoácidos, los suplementos para medios de cultivo, las bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y las drogas de uso general fueron de Sigma.

Las enzimas utilizadas en procedimientos de ADN recombinante y la seroalbúmina bovina (BSA) fueron de New England Biolabs. La clonasa Gateway BP y LR fueron de Invitrogen. Para las reacciones de PCR la Taq y los dNTPs que se utilizaron fueron de Invitrogen, la KOD de Merk y los oligonucleótidos fueron sintetizados en GenBiotech o en MacroGen. El kit de purificación de plásmidos fue de Promega y el de purificación de productos de PCR QIAquick fue de Qiagen.

El anticuerpo anti-GFP fue de Molecular Probes y el anti-HA de Roche. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) anti-conejo y anti-rata fueron de Sigma. El sustrato quimioluminiscente West Pico Super Signal fue de Thermo Scientific. El reactivo Protein Assay para cuantificación de proteínas por el método de Bradford fue de Biorad.

La [¹⁴C]Glc (300 Ci/mol) fue de Perkin Elmer Life Sciences. La *N*-metil-1-deoxinojirimicina (NM-DNJ) fue de Toronto Biochemicals.

Cepas y medios de cultivo

Las cepas de bacterias *Escherichia coli* utilizadas para procedimientos de clonado fueron DH5α (*fhuA2*, Δ (*argF-lacZ*) U169, *poa*, *glnV44*, Φ 80, Δ (*lacZ*)M15, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17*) y JA226 (*hsdR*, *hsdM*, *trpE5*, *fecA1*, *LeuB6*, *Zopll*, *thil*, *recBC*, *strR*). Las bacterias se crecieron a 37°C en medio LB (NaCl 0.5%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%) con ampicilina 200 mg/l o kanamicina 35 mg/l según correspondió. En todos los casos los medios sólidos se hicieron con agar 2%.

Las cepas de *S. pombe* empleadas en este trabajo se detallan en la tabla 1. Las levaduras se crecieron a 28°C en medio rico YEA (extracto de levadura 0.5%, Glc 3%, adenina 75 mg/l) o en medio mínimo EMM (ftalato de potasio 0.3%, Na₂HPO₄ 0.22%, NH₄Cl 0.5%, Glc 2%, con agregado de sales, minerales y vitaminas) (Hagan, 2016). Los medios mínimos fueron suplementados con adenina 75 mg/l, uracilo 75 mg/l y leucina

250 mg/l cuando fue necesario. Los cruzamientos se realizaron en medio sólido ME (extracto de malta 3%, pH= 5.5 suplementado con adenina, uracilo y leucina como se indicó). Para la selección del marcador *KanMX* se utilizó geneticina 150 mg/l y para la selección del marcador *NatMX* se utilizó nourseotricina 100 mg/l, ambas en medio YEA. Para la marcación *in vivo* de *S. pombe* se utilizó el medio YNB (base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos 1%, NH₄SO₄ 0.5%).

Cepa (Nombre coloquial)	Genotipo	Origen
ADm Wild type (WT)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18</i>	(D'Alessio et al., 1999)
ADp (WT)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18</i>	(D'Alessio et al., 1999)
SPBC1734.12C ($\Delta alg12$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg12::KanMX</i>	Bioneer
SPAC1834.05 ($\Delta alg9$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg9::KanMX</i>	Bioneer
ADpA3 ($\Delta alg3$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg3::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SPAC56F8.06c ($\Delta alg10$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg10::KanMX</i>	Bioneer
SpA10A12-2B ($\Delta alg10/\Delta alg12$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg10::KanMX, \Delta alg12::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SpA10A9-7C ($\Delta alg10/\Delta alg9$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg10::NatMX, \Delta alg9::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SpA10A3-7A ($\Delta alg10/\Delta alg3$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg10::NatMX, \Delta alg3::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SPAC17C9.07 ($\Delta alg8$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg8::KanMX</i>	Bioneer
Spalg8-k(3d) ($\Delta alg8$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg8::KanMX</i>	Este trabajo
SpA8A12-10C ($\Delta alg8/\Delta alg12$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg8::KanMX, \Delta alg12::KanMX</i>	Este trabajo
SpA8A9-2D ($\Delta alg8/\Delta alg9$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg8::KanMX, \Delta alg9::KanMX</i>	Este trabajo
SpA8A3-8A ($\Delta alg8/\Delta alg3$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg8::KanMX, \Delta alg3::KanMX</i>	Este trabajo
Sp61A ($\Delta alg6$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1, \Delta alg6::ura4⁺</i>	(Stigliano et al., 2011)
SpA6A12-3D ($\Delta alg6/\Delta alg12$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg6::ura4⁺, \Delta alg12::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SpA6A9-5C ($\Delta alg6/\Delta alg9$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta alg6::ura4⁺, \Delta alg9::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SpA6A3-8C ($\Delta alg6/\Delta alg3$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta alg6::ura4⁺, \Delta alg3::KanMX</i>	(Stigliano et al., 2011)
SpAC6610.09 diploide ($\Delta gls1::KanMX/+$)	<i>h⁺/h⁺, leu1-32/leu1-32, ade6-M210/ade6-M216, ura4-D18/ura4-D18, \Delta gls1::KanMX/+</i>	Bioneer
$\Delta gls1::NatMX/+$ diploide	<i>h⁺/h⁺, leu1-32/leu1-32, ade6-M216/ade6-M216, ura4-D18/ura4-D18, \Delta gls1::NatMX/+</i>	Este trabajo
$\Delta GI-210m-1A$ ($\Delta gls1-S'$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta gls1::NatMX</i>	Este trabajo
$\Delta GI-10A$ ($\Delta gls1-S$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta gls1::NatMX</i>	Este trabajo
$\Delta GI-10D$ ($\Delta gls1-H$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M216, ura4-D18, \Delta gls1::NatMX</i>	Este trabajo
GIA10-18 ($\Delta gls1/\Delta alg10$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta gls1::NatMX, \Delta alg10::KanMX</i>	Este trabajo
Sp61II α ($\Delta glsII\alpha$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1, \Delta gls2\alpha::ura4⁺</i>	(Soussilane et al., 2009)
SpAC227.11c ($\Delta yos9$)	<i>h⁺, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, \Delta yos9::KanMX</i>	Bioneer

Tabla 1. Cepas de levaduras *S. pombe* utilizadas en este trabajo

Procedimientos con ADN

Extracción de ADN plasmídico

Se cosecharon 3 a 5 ml de un cultivo de *E. coli* por centrifugación y se resuspendió el pellet en 200 µl de solución P1 (Tris 25 mM pH= 8.0, EDTA 10 mM pH= 8.0). Se agregaron 300 µl de solución P2 (NaOH 2.0 N, SDS 1%) y 300 µl de solución P3 (KAcO 3 M pH= 4.8) mezclando por inversión en cada caso e incubando en hielo durante 5 minutos, y se centrifugó a 15000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se incubó el sobrenadante con 5 µl de RNAsa A 10 mg/ml a 37°C durante 10 minutos. Se realizó una extracción con cloroformo y se precipitó el ADN de la fase acuosa superior con 700µl de isopropanol durante 25 minutos a -20°C. Se centrifugó a máxima velocidad durante 25 minutos a 4°C, se lavó el pellet con etanol 70% y se resuspendió el ADN en 25 µl de agua milli Q.

Preparación de ADN genómico de levaduras *S. pombe*

Para la extracción de ADN de levaduras, cultivos en fase exponencial ($DO_{600nm} = 2.0$) crecidos en el medio adecuado se cosecharon por centrifugación a 6000 xg durante 5 minutos y las células se resuspendieron en 0.2 ml de agua. Se agregó 0.2 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH= 8.0, 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). Se rompieron las células por agitación en vórtex en presencia de 300 mg de bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y luego se agregó 0.2 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH= 8.0, EDTA 1 mM). La muestra se centrifugó a 10000 xg y se recuperó la fase acuosa. Se agregó 1 ml de etanol 100% para precipitar el ADN, se centrifugó, se resuspendió el pellet en 0.4 ml de buffer TE conteniendo 3 µg de RNAsa A y se incubó 5 minutos a 37°C. Se agregó un volumen de cloroformo, se centrifugó a 10000 xg durante 5 minutos y se conservó la fase acuosa. Se precipitó el ADN agregando 10 µl de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol 100%. Se centrifugó, se lavó el pellet con etanol 70% y luego se resuspendió en 20 µl de agua libre de DNAsas.

Reacciones de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizaron como templados ADN genómico de levaduras, plásmidos o colonias de bacterias o levaduras. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0.2 mM cada uno, buffer de reacción (Tris-HCl 10 mM pH= 8.8, KCl 50 mM, Tritón X-100 0.1%), MgSO₄ 2 mM y 0.4 µM de cada oligonucleótido (tabla 2). Para las verificaciones generales se utilizó la polimerasa Taq de *Thermus aquaticus* (Invitrogen), mientras que para amplificaciones para expresión o secuenciación se utilizó la polimerasa KOD (MERK) por su mayor fidelidad. El templado fue desnaturalizado a 95°C durante 5 minutos y se llevaron a cabo

35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión. La temperatura de hibridación fue entre 50°C y 56°C según el caso y la de extensión 72°C. Luego de 35 ciclos se incubó durante 10 minutos adicionales a 72°C y se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa 1% en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH= 8.0) teñidos con bromuro de etidio. Cuando fue necesario, los fragmentos amplificados fueron secuenciados.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
Spalg8 5'NCs	5'-TCACTGGGAGGACATTCAAC-3'
W-Sp alg12s	5'-GATGAAGCGGGATGACTTCT-3'
Sp alg9 3'NCa	5'-CCACAGCCTTTTCTTTCTTC-3'
alg3-5'NCs	5'-TACGACTTTTTGGTTAGGCG-3'
Z-alg3-a	5'-ATCAATCTGTCAATCCCCTGAG-3'
pREP For	5'-AGGAAGAGGAATCCTGGC-3'
pREP Rev b	5'-TATGCAGCTTGAATGGGCTTC-3'
GFP rev-EcoRI	5'-CTGACGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATG-3'
B2A	5'-GCATTTTCATTACGCTCATCG-3'
MD1	5'-CGGATCCCCGGGTTAATTAAGGCG-3'
MD2	5'-GAATTCGAGCTCGTTTAAACACTGGATGGCGGCGTTAGTATCG-3'
ClonNAT fw	5'-CTTCGTGGTCGTCTCGTAC-3'
ClonNAT rev	5'-CGAGACGACCACGAAGC-3'
KanMX fw	5'-CCTATGGAAGTGCCTCGGTG-3'
KanMX rev 2	5'-CGCTACCTTTGCCATGTTTCAG-3'
gls1 5'NC B	5'-GCTCCAAATGTTTTACGCAG-3'
gls1 3'NC B	5'-AAATACGAAACGCAGTTCGC-3'
MT1	5'-AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG-3'
MP	5'-ACGGTAGTCATCGGTCTTCC 3'
MM	5'-TACGTTCAGTAGACGTAGTG-3'
Spalg10 5'NC s	5'-CCAAACTTCCTGCCAACAAC-3'
Spalg10 3'NC a	5'-ACCAAACCTTCCTGCCAACAAC-3'
alg10 fw	5'-CTGGCTTGTAGGCGTAATTG-3'
Sp alg10 rev	5'-CTTCAGCTAAGTGGGGATTG-3'
attB1-STT3D fw	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGGATGGGCAAGCG GAAGGG-3'
attB2+stop STT3D rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGCGTAATCTG GAACGTC -3'
pDONR201s	5'-TTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
pDONR201a	5'-CATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
LmSTT3D fw B	5'-GTCTTCAGCGTGATGGCTG-3'
LmSTT3D fw C	5'-TGAGCTTCTTCAGTTCGAG-3'
GI Fw E592A	5'-GCTCTTCATGTTGATTTACTCAG-3'

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

"Colony" PCR de *E. coli* y *S. pombe*

Se resuspendió una colonia de *E. coli* aislada en 25 µl de la mezcla de reacción de PCR. Para el caso de *S. pombe*, las colonias se incubaron 10 minutos a 100°C en 40 µl de NaOH 10 mM y se tomó 1.5 µl como templado para la PCR.

Amplificación del gen *alg10+*

A partir de ADN genómico se amplificó la secuencia del gen *alg10* con una polimerasa KOD (Merk) de alta fidelidad en dos partes, utilizando los pares de oligonucleótidos:

Clonado y expresión del biosensor GlyGFP y GFP

A partir de los plásmidos pcDNA3.1-RE-GlyGFP y pCDNA3.1-RE-GFP (gentilmente enviados por el Dr. Hudson Freeze, Sanford-Burnham Medical Research Institute, USA) (Losfeld et al., 2012), se amplificó la secuencia de GlyGFP y GFP conteniendo la GFP con y sin sitio de *N*-glicosilación (introducido por mutación puntual en el sitio N147T), respectivamente. El plásmido pDONOR201-GII β (realizado previamente en el laboratorio) fue utilizado como templado para amplificar el péptido señal de *S. pombe* y la señal de retención en el RE mediante oligonucleótidos específicos por PCR inversa. Luego, por digestión con enzimas de restricción y ligación se obtuvieron los plásmidos pDONR201-RE-GlyGFP y pDONR201-RE-GFP, con GlyGFP y GFP flanqueadas por un péptido señal N-terminal y una señal de retención VDEL de RE C-terminal específicos para *S. pombe* (Herrera Aguilar, 2014). Dichos vectores fueron luego utilizados como dadores de las construcciones en recombinaciones Gateway al plásmido pDUAL-YFH1c-*ccdb2*, capaz de integrarse en el locus del gen *leu1* restaurando la capacidad de biosintetizar leucina de mutantes *leu1-32* e integrando al genoma una única copia del gen de interés. La recombinación Gateway fue verificada por PCR con los oligonucleótidos pREP For y GFP rev-EcoRI. Los plásmidos resultantes pDUAL-GlyGFP y pDUAL-GFP fueron linealizados con Not I e integrados al genoma de *S. pombe* como se describe en (Matsuyama et al., 2004) y la integración de las secuencias fue corroborada por prototrofia a leucina y por PCR con los oligonucleótidos pREP For y GFP rev-EcoRI (tabla 2). La expresión de las proteínas fue monitoreada por microscopía de fluorescencia e inmunodetección.

El plásmido pDONR201-GII β stop se utilizó como donador al plásmido pDUAL-YFH1c-*ccdb2* para expresar la proteína GII β con codón de stop conocido de manera episomal en el RE de *S. pombe*. El vector resultante pDUAL-YFH1c-GII β stop se utilizó para transformar levaduras y se corroboró la transformación por prototrofia a uracilo y por PCR con los oligonucleótidos pREP For y B2A (tabla 2).

Clonado y expresión de Gl

El vector pDONR201-28/H08 (gen *gls1⁺* de *S. pombe*) (Matsuyama et al., 2006), obtenido del banco de Riken fue el dador del gen *gls1⁺* para el vector de expresión de destino pREP41-*ccdb2* mediante recombinaciones Gateway. Con el plásmido resultante pREP41-*gls1⁺* se transformaron levaduras y se verificó la transformación por PCR con los oligonucleótidos Gl Fw E592A y pREP Rev b (tabla 2). La expresión de la proteína fue verificada por inmunodetección.

Clonado y expresión de LmSTT3D

El vector pR5425-LmSTT3D (gentilmente enviado por el Dr. Markus Aebi, Instituto de Microbiología, Zurich, Suiza) (Nasab et al., 2008), se utilizó como templado para levantar la secuencia de STT3D de *Leishmania major* (LmSTT3D) fusionada a un tag de hemaglutinina (HA) por PCR, con los oligonucleótidos attB1-STT3D fw y attB2+stop STT3D rev (tabla 2), que poseen en ambos extremos los sitios *attB* para recombinación por Gateway. El fragmento obtenido se introdujo en el vector pDONR201-ccdb por recombinación con la BP clonasa (Invitrogen). La construcción se amplificó en bacterias *E. coli* DH5 α y se verificó por “colony” PCR con los oligonucleótidos attB1-STT3D fw y pDONR201a (tabla 2). El vector resultante pDONR201-LmSTT3D fue el dador de LmSTT3D al vector de destino pREP1-ccdb2 mediante la reacción de LR clonasa. Se transformaron levaduras y la incorporación del vector como episoma pREP1-LmSTT3D fue corroborada por prototofia a leucina y por PCR con los oligonucleótidos LmSTT3D fw C y pREP Rev b. La expresión de la proteína fue evaluada por inmunodetección.

Regulación de la expresión de proteínas

Los plásmidos utilizados, tanto integrativos como episomales, dirigen la expresión de los genes clonados por el promotor *nmt1* (no message in thiamine). Cuando fue necesario regular la expresión de los genes, los cultivos de levaduras fueron crecidos en concentraciones crecientes de tiamina, un represor del promotor *nmt1*, hasta fase exponencial $DO_{600nm} = 2.0$ y analizados por citometría de flujo o inmunodetección.

Otros plásmidos utilizados

El plásmido pCR2.1-Nat (gentilmente provisto por el Dr. Takashi Toda, London Research Institute, Reino Unido), se utilizó como templado para obtener el casete de resistencia a nourseotricina cuando fue necesario realizar intercambios de marcador de selección (Sato et al., 2005).

El plásmido pON177 (Bioneer) que codifica para el factor de tipo de apareamiento *h* se utilizó para inducir esporulación de cepas diploide heterocigotas *h⁺/h⁺*.

Transformación de bacterias *E. coli*

Se creció un cultivo *E. coli* en LB durante 16 horas a 37°C y 250 rpm. Se diluyó 1: 100 en 1000 ml de LB y se incubó a 37°C durante 2 horas hasta llegar a $DO_{600nm} = 0.5-0.6$. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces resuspendiendo las bacterias en agua milli Q fría y centrifugando a 8000 xg durante 10 minutos cada vez. Las bacterias se resuspendieron en glicerol 10%, se centrifugaron a 8000 xg durante 10 minutos y se resuspendieron en un volumen de

glicerol 10% 100 veces menor al original. Se congelaron y conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 50 μl . Para la transformación, se incubó una alícuota de células competentes con 200 ng de ADN y se dio un pulso de 2.5k V, 200 Ohm y 25 μF en electroporador (Biorad). Se recuperaron las células durante 30 minutos a 37°C en 1 ml de LB y se sembraron en el medio selectivo adecuado. Las colonias transformadas fueron verificadas por “colony” PCR.

Transformación de levaduras *S. pombe*

Preparación de S. pombe electrocompetentes y transformación

Se crecieron células de *S. pombe* en EMM suplementado con adenina, uracilo y leucina hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.8$, se cosecharon por centrifugación a 3000 xg y se realizaron dos lavados con agua y uno con sorbitol 1M a 4°C . Se resuspendió el pellet en sorbitol 1M en un volumen 100 veces menor al del cultivo original. Para la transformación, se incubaron 50 μl de la suspensión celular con 1 μg de ADN y se electroporó a 1.5 kV, 200 Ohm y 25 μF . Las células se resuspendieron en 1 ml de sorbitol 1M y se sembraron en el medio selectivo adecuado.

Preparación de S. pombe competentes químicas y transformación

Se crecieron células en medio YEA hasta $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.4$, se cosecharon y lavaron con buffer TE pH= 7.4. Se incubaron en buffer LiAc (acetato de litio 100 mM, EDTA 0.1 mM, Tris-HCl 10 mM pH= 7.5) durante 1 hora a 28°C y 250 rpm, se centrifugaron y resuspendieron en 4 ml de buffer LiAc más glicerol 10%, y se congelaron a -70°C para aumentarles la competencia. Para la transformación, las células se incubaron con 1 μg de ADN plasmídico, 5 μl de etanol y 250 μl de polietilenglicol 400 50% durante 1 hora a 28°C . Luego se dio un golpe térmico a 46°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se sembraron las células en el medio selectivo adecuado.

Todas las transformaciones fueron repicadas para obtener colonias aisladas al mismo medio selectivo y verificadas luego por PCR tanto a partir de “colony” como de ADN purificado.

Construcción de mutantes *S. pombe*

Las mutantes se construyeron utilizando técnicas genéticas estándares de conjugación, esporulación, disección de tétradas y análisis, de uso de rutina del laboratorio y previamente descritas (Hagan, 2016; Stigliano et al., 2011). A continuación, se detallan metodologías específicas para cada caso.

Construcción de mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos monoglucosilados

En el laboratorio se construyeron previamente mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados triglucosilados, diglucosilados y no glucosilados. Con el objetivo de obtener toda la combinación de estructuras de Dol-PP-glicanos posibles, se construyeron mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos monoglucosilados con 5, 6, 7 y 9 Man (G1M5-9).

Con el objetivo de obtener una cepa $\Delta alg8$ con tipo de apareamiento h^- , se cruzó la cepa SPAC17C9.07 ($\Delta alg8$) con una ADm (WT) (tabla 1) en medio ME sólido a 28°C durante 16 horas, para poder cruzarla con las cepas de interés con tipo de apareamiento h^+ . El cruzamiento se realizó en medio ME sólido a 28°C durante 16 horas y las colonias diploides fueron seleccionadas en medio EMM sin adenina. Luego, fueron esporuladas y tratadas con Zimoliasa 100T 2 mg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente para digerir las paredes de los ascos conteniendo las cuatro ascosporas y se realizó la disección de tétradas en medio YEA utilizando un microscopio con micromanipulador manual (Singer Instruments Co). Las esporas se dejaron germinar a 28°C durante 5 días en medio YEA. El genotipo de las esporas se determinó por resistencia a geneticina y por “colony” PCR con los oligonucleótidos Spalg8 5'NCs y KanMX Rev 2 (tabla 2) y el tipo de apareamiento se determinó también por PCR utilizando los oligonucleótidos MT1, MP y MM (tabla 2) (Hagan, 2016). La cepa que se obtuvo se denominó Spalg8-k(3d).

Luego, con el objetivo de obtener las dobles mutantes $\Delta alg8/\Delta alg12$, $\Delta alg8/\Delta alg9$ y $\Delta alg8/\Delta alg3$ (que sintetizan G1M7, G1M6 y G1M5, respectivamente), se cruzó a la cepa Spalg8-k(3d) con las cepas SPBC1734.12C ($\Delta alg12$), SPAC1834.05 ($\Delta alg9$) y ADpA3 ($\Delta alg3$) (tabla 1). Los cruzamientos se realizaron como se explicó anteriormente, se esporularon las colonias y se realizó la disección de tétradas. Los genotipos se verificaron por resistencia a geneticina y por “colony” PCR con los oligonucleótidos que se detallan a continuación: para $\Delta alg8$ Spalg8 5'NCs y KanMX Rev 2, para $\Delta alg12$ W-Sp alg12s y KanMX Rev 2, para $\Delta alg9$ KanMX fw y Sp alg9 3'NCa y para $\Delta alg3$ alg3-5'NCs y Z-alg3-a (tabla 2). La determinación del tipo de apareamiento h^+ o h^- de las dobles mutantes obtenidas fue determinado por PCR como se describió anteriormente. Las mutantes obtenidas se denominaron SpA8A12-10C, SpA8A9-2D y SpA8A3-8A (tabla 1).

Construcción de la cepa $\Delta gls1::NatMX$

Se partió de la cepa de *S. pombe* diploide heterocigota SpC6610.09 ($\Delta gls1::KanMX/+$) (tabla 1) a la cual se le intercambió el marcador de selección de geneticina por un casete de resistencia a nourseotricina de acuerdo con (Sato et al., 2005). Para ello, primero se obtuvo el marcador de resistencia a nourseotricina *NatMX* flanqueado por el promotor P_{TEF} y el terminador T_{TEF} a partir del plásmido pCR2.1-Nat como templado, mediante PCR

utilizando los oligonucleótidos MD1 y MD2 (tabla 2). Con el fragmento de ADN obtenido se transformó la mutante $\Delta gls1::KanMX/+$, se seleccionaron las colonias resistentes a nourseotricina y sensibles a geneticina y se verificó la recombinación homóloga mediante PCR con los oligonucleótidos *gls1* 5'NC B y ClonNAT rev (tabla 2). La cepa obtenida se denominó $\Delta gls1::NatMX/+$.

Para obtener la cepa haploide $\Delta gls1::NatMX$, se indujo la esporulación por transformación de $\Delta gls1::NatMX/+$ diploide con el plásmido pON177 de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se seleccionó por prototrofia a uracilo. Una vez esporuladas las colonias diploides, se realizó la disección de tétradas como se explicó anteriormente. Se germinaron las esporas en medio YEA a 28°C durante 5 días y se determinaron los genotipos por resistencia a antibióticos y “colony” PCR con los oligonucleótidos ClonNAT fw y *gls1* 3'NC B (tabla 2). Por disección de una misma tétrada se obtuvo una mutante haploide enferma, que se nombró $\Delta GI-10A$ ($\Delta gls1-S$, por sick) y una sana que se nombró $\Delta GI-10D$ ($\Delta gls1-H$, por healthy) (tabla 1).

Construcción de la doble mutante de *S. pombe* $\Delta gls1/\Delta alg10$

Para construir la doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$, la cepa haploide $\Delta GI-10A$ ($\Delta gls1-S$) fue cruzada con una cepa ADm (*WT*) (tabla 1) en medio ME sólido a 28°C durante 16 horas, para obtener la cepa $\Delta GI210m-1A$ con genotipo *h*, la que luego fue cruzada con una cepa SPAC56F8.06c ($\Delta alg10$) (tabla 1). Se obtuvieron levaduras diploides, se esporularon y se disecaron las tétradas. El genotipo de las esporas resultantes, resistentes tanto a geneticina como a nourseotricina, fue confirmado por PCR utilizando los pares de oligonucleótidos ClonNAT fw y *gls1* 3'NC B para $\Delta gls1::NatMX$ y Spalg10 5'NC s y KanMX rev 2 (tabla 2) para $\Delta alg10::KanMX$ y el tipo de apareamiento como se describió previamente. La mutante obtenida se denominó GIA10-18 (tabla 1).

Ensayos de crecimiento, vitalidad y viabilidad de levaduras

Crecimiento en medio sólido

Cultivos de levaduras fueron crecidos en el medio apropiado hasta fase estacionaria sin dejarlos envejecer y diluidos a $DO_{600nm} = 1.0$. A partir de allí se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron gotas de 5 μ l de cada dilución en placas del medio apropiado por triplicado y se incubaron a 28°C durante 72 horas. Se tomaron imágenes de las placas cada 24 horas con cámara de fotos Olympus C-610 durante 5 días.

Crecimiento en medio líquido

Se crecieron levaduras en medio YEA hasta fase estacionaria, las cuales sirvieron como pre-cultivos para inocular 50 ml de medio YEA a $DO_{600nm} = 0.2$ en erlenmeyers de 250 ml. Estos cultivos fueron incubados a 28°C y 250 rpm durante 5 días (120 horas) y cada 4 horas se determinó la DO_{600nm} . Todas las curvas se realizaron por triplicado.

Ensayos de vitalidad

La vitalidad de las células se monitoreó por la exclusión del colorante fluorescente Phloxin B. Este marcador se incorpora de manera pasiva a las células y es excretado solamente por células metabólicamente activas, por lo tanto, tiñe exclusivamente a las células muertas. Para cada punto de la curva de crecimiento 1.4×10^7 , células fueron incubadas en 1 ml final de medio YEA y con 5 µg/ml de Phloxin B durante 2 horas a 28°C y 250 rpm (Roux et al., 2006). Luego, 10000 células fueron analizadas por citometría de flujo con filtro FL2 como se explica más adelante. Como control positivo se utilizó un cultivo de células en fase exponencial muertas por calor durante 10 minutos a 100°C, y como control negativo un cultivo en fase exponencial no teñido.

Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad de cepas de *S. pombe* en los diferentes estadios de la curva de crecimiento se midió por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Para ello, se tomaron alícuotas para cada punto de la curva que fueron diluidas, sembradas en medio YEA e incubadas a 28°C durante 7 a 10 días (Roux et al., 2006). La proporción de las UFC en una población fue considerada como el porcentaje de viabilidad en un determinado punto de la curva.

Extracción de proteínas de *S. pombe*

Preparación de extractos proteicos totales

Los extractos proteicos totales de *S. pombe* se prepararon a partir de 20 ml de cultivo en fase exponencial a $DO_{600nm} = 2.0$. Los cultivos se cosecharon, lavaron con agua y resuspendieron en Tritón X-100 1%, Hepes 0.1 M pH= 7.2 y EDTA 5 mM en presencia de inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100µM, L-1-tosilamida-2-feniletil-clorometilcetona (TPCK) 10 µM, N α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) 10 µM, leupeptina 10 µM, pepstatina 10 µM y E64 10 µM). Las células se rompieron mediante 10 ciclos de vórtex por 1 minuto y hielo por 1 minuto con bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El lisado fue centrifugado a 20000 xg durante 20 minutos a 4°C y se obtuvo el sobrenadante. La determinación de la concentración proteica del extracto obtenido se realizó por el ensayo BioRad Protein Assay como describe el fabricante.

Preparación de fracciones microsomales enriquecidas en RE

La preparación de fracciones microsomales de *S. pombe* se realizó como se describe en (Stigliano et al., 2011). Brevemente, se cosecharon 250 ml de cultivo de *S. pombe* en fase exponencial por centrifugación a 3000 xg durante 5 minutos, se lavaron con NaN₃ 5 mM y el pellet se resuspendió en 2 ml/g de pellet de solución A (sacarosa 0.25 M, imidazol 20 mM, EDTA 5 mM pH= 8.0) en presencia de inhibidores de proteasas. Las células se rompieron mediante 10 ciclos de agitación por vórtex durante 1 minuto y 1 minuto en hielo en presencia de bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El homogenato obtenido se centrifugó a 4000 xg durante 10 minutos a 4°C, se conservó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en solución A más inhibidores de proteasas y se repitieron los ciclos de ruptura y centrifugación. Se juntaron ambos sobrenadantes y se ultracentrifugó a 100000 xg durante 1 hora a 4°C. Se resuspendió y homogeneizó el pellet conteniendo la fracción microsomal en solución A con “tip” de punta recortada para preservar la integridad de las membranas. La cuantificación de la concentración proteica se realizó por el ensayo BioRad Protein Assay.

Purificación de glicoproteínas de pared celular

Para obtener las glicoproteínas de pared de *S. pombe* se utilizó un protocolo modificado a partir de (de Groot et al., 2007). Se cosecharon 50 ml de cultivos a DO_{600nm}= 1.0 por centrifugación durante 5 minutos a 2300 xg, se lavaron con agua, congelaron a -20°C y resuspendieron en 300 µl de buffer I (Tris-HCl 50 mM pH= 7.5) en presencia de inhibidores de proteasas. Para romper las células, se realizaron 6 ciclos de congelado descongelado incubando alternativamente en etanol-hielo seco y agua a 22°C y luego se incubaron a 500 rpm durante 1 hora a 4°C en presencia de bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Por microscopía se monitoreó que >99.0% de las células estuvieran rotas antes de continuar. Se adicionó 1 ml de buffer I más inhibidores de proteasas y se trasvasó a un tubo plástico de baja adsorción Protein LoBind (Sigma) sin las bolitas de vidrio. Se obtuvo el pellet por centrifugación a 16000 xg y se lavó 5 veces mediante incubación en 1 ml de NaCl 1 M en presencia de inhibidores de proteasas durante 5 minutos a 30°C y centrifugación a 16000 xg durante 1 minuto. Para reducir a las cisteínas, se resuspendió el material celular en 1 ml de buffer II (Tris-HCl 50 mM pH= 8.0, SDS 0.2%, EDTA 100 mM, DTT 10 mM) previamente calentado y se lavó el pellet 4 veces incubando 5 minutos a 90°C y centrifugando como se explicó previamente. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer II y se incubó durante 1 hora a 500 rpm a 56°C. Para alquilar a las cisteínas, se adicionó acrilamida 25 mM y se incubó durante 1 hora a 30°C. Finalmente se lavó el pellet 6 veces con 1 ml de acetato de amonio 50 mM y se guardó a -80°C. Las muestras fueron liofilizadas y enviadas al laboratorio del Dr. Benjamin Schulz en la

Universidad de Queensland, Australia para el estudio glicoproteómico. Todas las muestras fueron obtenidas por triplicado.

Análisis glicoproteómico de glicoproteínas de pared celular por SWATH-MS

Las proteínas de pared celular de *S. pombe* fueron tratadas con Endo H y tripsina. Los péptidos fueron obtenidos con LC-ESI-MS/MS usando un sistema nanoLC y un espectrómetro de masa TripleTOF 5600 e identificados con los softwares Protein Pilot v5.0 y PeakView v.2.1.0.11041. Se utilizó la base de datos de proteínas de Uniprot (descargada el 29/01/2015) y se identificaron las proteínas componentes de pared celular. Los análisis por SWATH-MS se realizaron como se describe en (Xu et al., 2015). La macroheterogeneidad se determinó mediante la fracción de la suma de todas las formas no glicosiladas de un péptido en relación a la suma de las formas glicosiladas y no glicosiladas de ese péptido, o como la fracción de la suma de todas las formas no glicosiladas de un péptido en relación a la proteína en la que está contenido ese péptido. La microheterogeneidad se determinó como la fracción de una estructura dada de un *N*-glicano presente en un sitio en relación a la suma de todas las estructuras dadas de ese *N*-glicano en ese sitio. En el caso de los estudios de microheterogeneidad, se omitió el paso de deglicosilación de las glicoproteínas (Zacchi and Schulz, 2016).

Marcación y análisis de glicanos sintetizados *in vivo* por *S. pombe*

Marcación y análisis de N-glicanos

La obtención y purificación de *N*-glicanos marcados sensibles a Endo H se hizo como se describe en (Fernandez et al., 1994). Para ello, se cosecharon 250 ml de cultivo de *S. pombe* crecido hasta fase exponencial a $DO_{600nm} = 2.5$, se lavaron extensivamente con medio YNB 1% sin Glc y resuspendieron en 2 ml/g del mismo medio. 500 μ l de la suspensión fueron incubados, según fue necesario, con los inhibidores de glucosidasas NM-DNJ 5 mM y castanospermina (CST) 5 mM durante 40 minutos a 28°C y luego se adicionó DTT 5 mM durante 5 minutos. Las células se marcaron con un pulso de 15 minutos en Glc 5 mM con 150 μ Ci de [¹⁴C]Glc 300 Ci/mol a 28°C y la reacción se detuvo con ácido tricloroacético 10%. Los precipitados se resuspendieron en agua y se lavaron con agua: metanol: cloroformo en preparaciones crecientemente apolares y polares sucesivamente para separar los *N*-glicanos asociados a proteínas y se incubaron durante 16 horas a 37°C con proteasa P-5147 (punta de espátula) en buffer Tris-HCl 0.15 M pH= 8.0, CaCl₂ 5 mM. Se centrifugó a 4000 xg durante 5 minutos, se concentraron los sobrenadantes por calor y flujo de aire continuo y se desaló por pasaje a través de una columna Sephadex G-10. El pico eluido en el V_0 , donde se encuentran los glicopéptidos,

fue sometido a electroforesis en papel en ácido fórmico 10% durante 2.5 horas a 25 V/cm. El papel fue seccionado en tiras y la marca radioactiva fue medida con líquido de centelleo (tolueno, 2,5-difeniloxazol, 1,4-bis-(4-metil-5-fenil-2-oxazolil) benceno) en un contador Wallac 1214 RackBeta. Las fracciones conteniendo el pico radiactivo cargado positivamente se eluyeron del papel con agua. Se concentraron los eluidos por calor y flujo de aire continuo y se trataron con Endo H como se describe más adelante. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en papel como se describió anteriormente conservando esta vez el pico neutro y los glicanos fueron eluidos y luego separados por cromatografía en papel descendente usando papel Whatman y *n*-propanol: nitrometano: agua (5: 2: 4) e identificados por estándares corridos en paralelo. El papel fue seccionado en tiras que se contaron con líquido de centelleo en contador Wallac 1214 RackBeta. Para mayor resolución, los glicanos identificados se eluyeron del papel y se resolvieron por HPLC como se describe más adelante.

Marcación y análisis de Dol-PP-glicanos

Para el análisis de los glicanos unidos a lípido, se obtuvieron células como se describió para la purificación de *N*-glicanos y se marcaron mediante un pulso de 15 minutos en Glc 5 mM con 150 μ Ci de [14 C]Glc 300 Ci/mol en medio YNB 1% a 28°C en presencia de puromicina 50 μ g/ml y cicloheximida 75 μ g/ml. Se precipitaron las células con metanol y se obtuvo el pellet mediante 3 extracciones con cloroformo: metanol (3: 2). Se realizó un lavado del pellet con metanol y se resuspendió en 2 ml de agua. Se rompieron las células por agitación durante 10 minutos en presencia de bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Se centrifugó y se realizaron 4 lavados del pellet obtenido con agua. Se realizaron 5 extracciones de los Dol-PP-glicanos con cloroformo: metanol: agua (1: 1: 0.3), se secó el material obtenido y se hidrolizó durante 15 minutos en 1 ml de HCl 0.02 N para separar a los glicanos del lípido. Una vez frío el pellet, se adicionaron 3 ml de cloroformo y 2 ml de metanol y se centrifugó durante 3 minutos a 3000 xg. Se recuperó la fase superior conteniendo los glicanos sin el lípido, se secó y se analizó como se describió para los *N*-glicanos.

Resolución de glicanos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La resolución de las muestras de glicanos se llevó a cabo mediante una columna TSK-GEL Amido-80 de 4.6 mm x 25 cm (Tosoh Bioscience) con una fase móvil de agua: acetonitrilo en un gradiente lineal de 35: 65 a 55: 45 durante 67 minutos y un flujo de 0.75 ml/min a temperatura ambiente. Se recolectaron muestras de 1 ml que se evaporaron hasta un volumen de 0.1 ml, se les adicionó 500 μ l de Optiphase Hisafe (PerkinElmer) y se contaron en el contador Wallac 1214 RackBeta (Stigliano et al., 2011).

Tratamiento con enzimas glicosidasas e inhibidores de la *N*-glicosilación

Tratamiento con Endo H

La Endo H es una enzima que separa glicanos de alta mannosidad unidos a proteínas, cortando el *N*-glicano entre los residuos de GlcNAc *a* y *b* (Figura 2). Cuando fue necesario separar los *N*-glicanos presentes en las proteínas, la muestra de proteínas totales fue desnaturada y tratada con 10mU de Endo H en buffer trietilamina-acetato 50 mM pH= 5.5 durante 16 horas a 37°C.

Tratamiento con tunicamicina

La tunicamicina es un inhibidor de la síntesis de Dol-PP-glicanos, ya que inhibe a la enzima GlcNAc-1-fosfotransferasa alg7p, que cataliza la transferencia de GlcNAc desde UDP-GlcNAc a Dol-PP en el primer paso de biosíntesis de glicoproteínas (Figura 3). Cuando fue necesario inhibir la síntesis de Dol-PP-glicanos, las cepas fueron crecidas en presencia de tunicamicina entre 0.5 y 2 µg/ml durante 24-48 horas.

Inmunodetecciones

Las proteínas totales de *S. pombe* fueron resueltas en SDS-PAGE 10% y transferidas a membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (ImmobilonP, Millipore) a 100 mA durante 1.5 horas. Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBS (Tris-HCl 50 mM pH= 7.6, NaCl 300 mM) conteniendo leche descremada en polvo 3% p/v. Luego, fueron incubadas con anticuerpo primario en TBS con leche descremada en polvo 3% p/v durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente 16 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP (1: 5000), anticuerpo policlonal de conejo anti-CNX (1: 10000) (obtenido en el laboratorio como se describe en (Stigliano et al., 2009) y anticuerpo monoclonal de rata anti HA (1: 5000), según correspondió. Como anticuerpos secundarios se utilizaron sueros de cabra anti-conejo (1: 30000) o anti-rata (1: 2000) conjugados a HRP (Sigma), y se incubaron en TBS con leche descremada en polvo 3% p/v durante 3-4 horas a temperatura ambiente. Las bandas proteicas fueron detectadas por quimioluminiscencia con el sustrato West Pico SuperSignal (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante. La intensidad de las bandas obtenidas fue analizada y cuantificada mediante el software ImageJ. Cuando fue necesario hacer una nueva inmunodetección con membranas ya utilizadas, las mismas se trataron con buffer de *stripping* (60 mM Tris-HCl pH= 6.8, β-2-mercaptoetanol 7%, SDS 2%) durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se realizaron 5 lavados con TBS. Las membranas se bloquearon y se realizaron inmunodetecciones como se describió anteriormente.

Microscopía

Las células fueron observadas con el microscopio Olympus BX60 y objetivo de inmersión 100X. Las imágenes fueron tomadas con la cámara Olympus DP71 y procesadas con el software DP Controller versión 3.1.1.267 de Olympus.

Para las observaciones de células fluorescentes, las mismas fueron crecidas hasta fase exponencial a $DO_{600nm} = 2.0$ y se observaron los cultivos frescos. Como fuente de luz excitatoria se utilizó una lámpara de mercurio, para el canal verde se empleó un cubo con filtros de excitación/ emisión 485/ 528 y para el canal rojo un cubo con filtros 530/ 590.

Para medir el tamaño de las células, se tomaron imágenes de los cultivos en fase exponencial y se midió manualmente la longitud mediante software ImageJ. Se midieron al menos 180 células para cada mutante.

Citometría de flujo

Se crecieron levaduras hasta fase exponencial $DO_{600nm} = 2.0$ y se analizaron en un citómetro de flujo DB FACSCalibur (Becton Dickinson). La emisión del láser de argón fue a 488 nm, y los seteos de emisión fueron de 530/ 30 (filtro FL1) para el canal verde y 585/ 42 (filtro FL2) para el canal rojo. En todos los casos se consideró la intensidad promedio de fluorescencia.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0. En los casos en los que fue necesario comparar dos tratamientos o cepas se aplicó test de Student. Para comparar pares seleccionados de columnas, la significancia estadística fue calculada utilizando ANOVA de una cola y test de Bonferroni. Las curvas de crecimiento fueron realizadas y analizadas Qtiplot, y se les aplicó un ajuste de tipo logístico. En todos los casos las barras de error representan el desvío estándar. Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces.

Resultados

Capítulo I

**Estudio de las bases moleculares de la CDG de tipo I:
influencia de la estructura del glicano en la eficiencia de
su transferencia a proteínas**

En nuestro laboratorio se utiliza a la levadura de fisión *S. pombe* como modelo experimental para estudiar las CDG ya que, como se explicó anteriormente, conserva con humanos gran parte de la maquinaria de *N*-glicosilación por un lado y, por otro, se cuenta con una gran cantidad de herramientas para su manipulación genética. En el laboratorio se construyeron mutantes de *S. pombe* en los genes *alg* que sintetizan todas las combinaciones posibles de estructuras de Dol-PP-glicanos, con la metodología de genética de levaduras utilizada habitualmente (Hagan, 2016; Stigliano et al., 2011) (tabla 3). Para un análisis más claro, se las agrupó en 4 series:

Serie A: mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con 3 Glc y distinto contenido de Man: *WT*, $\Delta alg12$, $\Delta alg9$, $\Delta alg3$ (sintetizan G3M9, G3M7, G3M6 y G3M5, respectivamente).

Serie B: mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con 2 Glc y distinto contenido de Man: $\Delta alg10$, $\Delta alg10/\Delta alg12$, $\Delta alg10/\Delta alg9$, $\Delta alg10/\Delta alg3$ (sintetizan G2M9, G2M7, G2M6 y G2M5, respectivamente).

Serie C: mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con 1 Glc y distinto contenido de Man: $\Delta alg8$, $\Delta alg8/\Delta alg12$, $\Delta alg8/\Delta alg9$, $\Delta alg8/\Delta alg3$ (sintetizan G1M9, G1M7, G1M6 y G1M5, respectivamente).

Serie D: mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con distinto contenido de Man: $\Delta alg6$, $\Delta alg6/\Delta alg12$, $\Delta alg6/\Delta alg9$, $\Delta alg6/\Delta alg3$ (sintetizan M9, M7, M6 y M5, respectivamente).

SERIE A			SERIE B		
Mutante	Dol-PP-glicano sintetizado	Estructura	Mutante	Dol-PP-glicano sintetizado	Estructura
WT	G3M9		$\Delta alg10$	G2M9	
$\Delta alg12$	G3M7		$\Delta alg10/\Delta alg12$	G2M7	
$\Delta alg9$	G3M6		$\Delta alg10/\Delta alg9$	G2M6	
$\Delta alg3$	G3M5		$\Delta alg10/\Delta alg3$	G2M5	
SERIE C			SERIE D		
Mutante	Dol-PP-glicano sintetizado	Estructura	Mutante	Dol-PP-glicano sintetizado	Estructura
$\Delta alg8$	G1M9		$\Delta alg6$	M9	
$\Delta alg8/\Delta alg12$	G1M7		$\Delta alg6/\Delta alg12$	M7	
$\Delta alg8/\Delta alg9$	G1M6		$\Delta alg6/\Delta alg9$	M6	
$\Delta alg8/\Delta alg3$	G1M5		$\Delta alg6/\Delta alg3$	M5	

Tabla 3. Series de mutantes de *S. pombe* generadas y los correspondientes Dol-PP-glicanos sintetizados por cada una

Serie A: Dol-PP-glicanos triglucosilados, serie B: Dol-PP-glicanos diglucosilados, serie C: Dol-PP-glicanos monoglucosilados y serie D: Dol-PP-glicanos no glucosilados. Triángulo: Glc, círculo: Man, cuadrado: GlcNAc

Estrategia experimental para detectar defectos de *N*-glicosilación en *S. pombe in vivo*

Recientemente se ha diseñado y probado en el RE de células de mamífero una variante de GFP a la que se le incorporó un sitio de *N*-glicosilación N-X-S/T mediante una mutación puntual (N147T) que está localizada de manera tal que cuando este sitio es ocupado por un *N*-glicano, la proteína no emite su fluorescencia característica (Losfeld et al., 2012). A partir de esta herramienta, previamente en el laboratorio se diseñó una estrategia para adaptarla al modelo experimental de la levadura de fisión (Herrera Aguilar, 2014). Tanto al biosensor con la mutación como a una GFP WT, se les incorporó un péptido señal en el N-terminal para dirigirlos al RE de *S. pombe* y una señal de retención para proteínas solubles del RE del tipo VDEL en el C-terminal. Las construcciones obtenidas se denominaron GFP y GlyGFP (Figura 12).

El biosensor GlyGFP se expresará de manera selectiva en el RE de *S. pombe* y su fluorescencia dependerá de la capacidad de *N*-glicosilación de la célula. Cuanto mayor sea el defecto de *N*-glicosilación en una mutante que sintetiza y por lo tanto transfiere glicanos incompletos, mayor será la fluorescencia del biosensor. Expresado de manera sencilla, el sistema se “prende” cuando hay un problema en la *N*-glicosilación de proteínas. Como control se utilizó la GFP *WT*, que también se expresa en el RE de *S. pombe*, pero que fluoresce independientemente de la *N*-glicosilación.



Figura 12. Esquema de la construcción GlyGFP

La estrella rosa indica la mutación incorporada N147T. PS: péptido señal de la proteína GII β de *S. pombe*, VDEL: señal de retención/recuperación al RE de *S. pombe*.

El biosensor GlyGFP se expresa en el RE, se *N*-glicosila y permite detectar hipoglicosilación de *S. pombe in vivo*

El biosensor fluoresce más en una cepa que hipoglicosila que en una WT

Con el objetivo de desarrollar un sistema que permita monitorear y cuantificar la hipoglicosilación en *S. pombe in vivo* de manera precisa en mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados, se integró el biosensor al genoma de las levaduras para asegurar una única copia del gen por célula y obtener así una expresión estable y homogénea del mismo. Para ello, mediante el sistema Gateway se transfirieron las construcciones previamente desarrolladas GlyGFP y GFP desde el plásmido bacteriano pDONR201 al plásmido pDUAL-YFH1c, que tiene la capacidad de integrarse en el sitio *leu1-32* del genoma de *S. pombe* luego de ser linealizado con la enzima de restricción Not I (Matsuyama et al., 2004). Los plásmidos linealizados conteniendo GlyGFP y GFP se integraron en las cepas testigo *WT* y mutantes $\Delta alg6$ (que sintetiza el Dol-PP-glicano truncado M9 y se conoce que hipoglicosila sus proteínas (Fanchiotti et al., 1998)). Por microscopía de fluorescencia se observó a ambas proteínas como un halo perinuclear y subcortical mostrando la típica localización en el RE de *S. pombe* (Figura 13 A). La cuantificación de las imágenes de fluorescencia mediante software ImageJ mostró que en la mutante $\Delta alg6$ el biosensor fluoresce 1.4 veces más que en la *WT* ($p < 0.0001$) (Figura 13 B). Estos resultados mostraron que la fluorescencia del biosensor depende de la hipoglicosilación que se produce en la cepa en la que se esté expresando.

Es importante tener en cuenta que el plásmido pDUAL-YFH1c, única herramienta disponible para la integración al genoma compatible con el sistema Gateway, posee una proteína YFP en su secuencia que podría interferir con la fluorescencia observada. Para corroborar que esto no estaba ocurriendo, se expresó en dicho vector una proteína no fluorescente (GII β) que posee un codón de stop en su C-terminal. Se transformó a la cepa *WT* con dicho plásmido y se observó mediante microscopía que no fluoresció, indicando que la YFP del plásmido pDUAL-YFH1c no se expresa y solo lo hacen las proteínas GlyGFP y GFP clonadas (datos no mostrados).

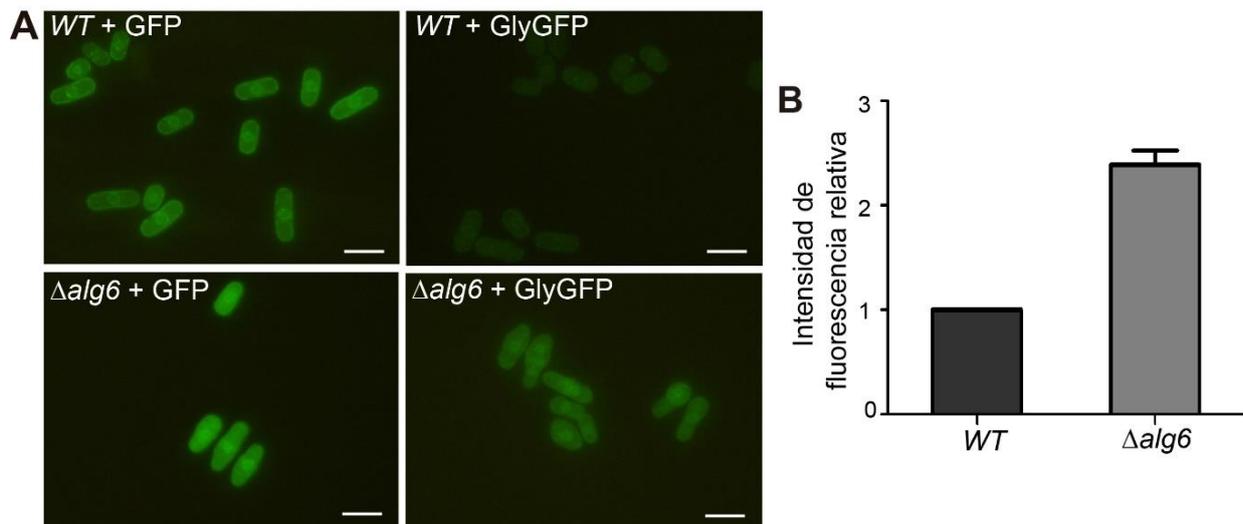


Figura 13. La fluorescencia del biosensor GlyGFP depende de la hipoglicosilación de la cepa

(A) Las cepas *WT* y $\Delta alg6$ fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y observadas en el microscopio Olympus BX60 con filtro FITC y objetivo de inmersión 100X. Las imágenes fueron tomadas con cámara Olympus DP71. Barra= 5 μm . (B) Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en cada célula que expresa GlyGFP con el software ImageJ. La significancia estadística fue calculada mediante test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la *WT* (***) $p < 0.0001$.

La inhibición de la N-glicosilación produce un aumento de fluorescencia del biosensor

En la Figura 13 A se observa que la cepa *WT* que expresa GlyGFP fluoresce con un nivel menor que la cepa $\Delta alg6$. Para verificar que este bajo nivel de fluorescencia se debe efectivamente a la incorporación de un *N*-glicano a GlyGFP, se trató a las células con tunicamicina, un inhibidor de la *N*-glicosilación. Los resultados mostraron un aumento de fluorescencia, dependiente de la concentración de tunicamicina hasta que ésta comenzó a ser tóxica para las células (Figura 14). De esta manera, se corroboró que la fluorescencia del biosensor GlyGFP depende de la capacidad de *N*-glicosilación de una determinada cepa.

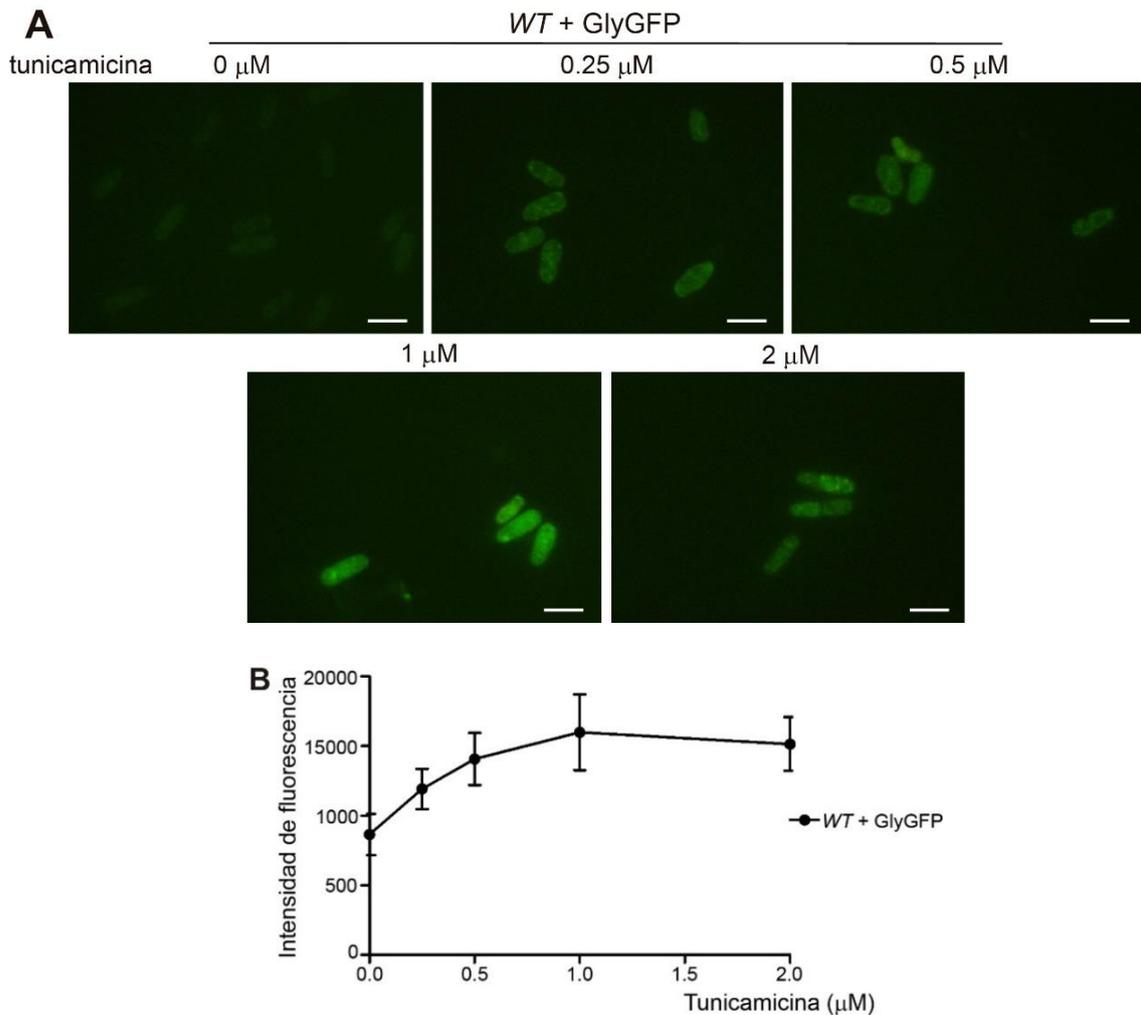


Figura 14. La fluorescencia de GlyGFP se incrementa al inhibir la *N*-glicosilación

(A) La cepa *S. pombe WT* que expresa el biosensor GlyGFP fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo en presencia de concentraciones crecientes de tunicamicina. Se observaron en el microscopio de fluorescencia y se tomaron imágenes como se describe en la Figura 13 A. Barra= 5 μm . (B) Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en cada célula por ImageJ. La tunicamicina comienza a ser tóxica para las células a partir de 1 μM .

La fluorescencia que se observa en las cepas de *S. pombe* que expresan GlyGFP corresponde al biosensor no glicosilado

Los resultados obtenidos hasta el momento mostraron que el biosensor GlyGFP localiza en el RE de *S. pombe* como un halo perinuclear (Figura 13 A) y que su fluorescencia aumentó con la inhibición de la *N*-glicosilación en la cepa *WT* (Figura 14). Sin embargo, podría ocurrir que parte de la fluorescencia observada corresponda a GlyGFP citosólico que no entró al RE y, en consecuencia, no fue expuesto a la maquinaria de *N*-glicosilación ni al corte de su péptido señal. Dado que un glicano y un péptido señal tienen el mismo peso molecular, por inmunodetección no se podría diferenciar si GlyGFP tiene uno o el otro (Figura 15 A). Sin embargo, el tratamiento de

una muestra proteica con Endo H remueve los *N*-glicanos presentes y permitiría diferenciar ambos casos. Para descartar la posibilidad de que el biosensor no esté entrando al RE y confirmar que la fluorescencia observada corresponde a GFP no glicosilada, se expresó el biosensor GlyGFP en las mutantes *WT*, $\Delta alg10$, $\Delta alg8$ y $\Delta alg6$ (que transfieren G3M9, G2M9, G1M9 y M9). Con el objetivo de remover el *N*-glicano incorporado a la proteína, se obtuvieron extractos proteicos de las cepas mencionadas y se trataron con Endo H. Por inmunodetección se observó que el biosensor GlyGFP se expresa como una doble banda, y no se detectó la banda superior en las muestras tratadas con Endo H (Figura 15 B). Estos resultados indican que la diferencia de tamaño entre la banda superior y la inferior corresponde a la presencia de un *N*-glicano en la GlyGFP (que fue removido por el tratamiento con Endo H). Corroboran, además, que el biosensor GlyGFP ingresó al RE y fue expuesto a las modificaciones post-traduccionales que allí ocurren. La fluorescencia observada en las cepas de *S. pombe* corresponde entonces al biosensor que es correctamente direccionado al RE, permanece allí y, dependiendo de la cepa que lo exprese, es o no glicosilado.

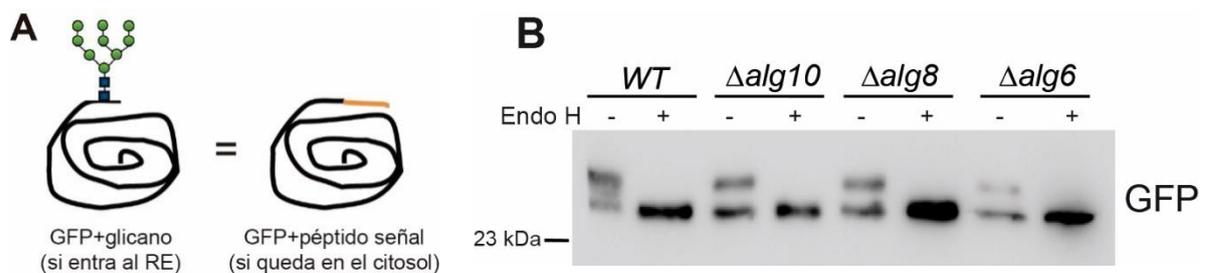


Figura 15. La diferencia de tamaño de las bandas de GlyGFP corresponde a la presencia de un *N*-glicano

(A) Se muestra que la GFP sin péptido señal más un *N*-glicano tienen el mismo peso molecular que GFP que retiene un péptido señal. (B) Las cepas indicadas fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y sometidas a extracción de proteínas totales. 20 μ g fueron tratados o no con 1 mU de Endo H durante 16 horas a 37°C. Luego, fueron resueltos en SDS-PAGE 10% y transferidos a una membrana de PVDF. Se identificó la GFP por inmunodetección, para lo cual se utilizó como anticuerpo primario anti-GFP en una dilución 1: 5000 hecho en conejo y como secundario anti-conejo conjugado a HRP en una dilución 1: 30000.

La hipoglicosilación que se produce en S. pombe puede ser cuantificada in vivo con el biosensor GlyGFP por citometría de flujo e inmunodetección

Una vez evaluado que el biosensor se expresa en el RE de *S. pombe* en niveles estables y homogéneos, y que su fluorescencia depende de la cepa en la que se expresa, se cuantificó la hipoglicosilación producida en las cepas testigo *WT* y $\Delta alg6$. Por citometría de flujo. Se midió la intensidad de fluorescencia de 30000 células (Figura 16 A) y se observó que el biosensor fluoresce 2.4 veces más en la cepa $\Delta alg6$ que en la cepa *WT* ($p < 0.0001$) (Figura 16 B). Esta diferencia fue superior a la observada por la

cuantificación de la fluorescencia de las imágenes microscopía (Figura 13 B), reflejando que la citometría de flujo es una técnica mucho más sensible.

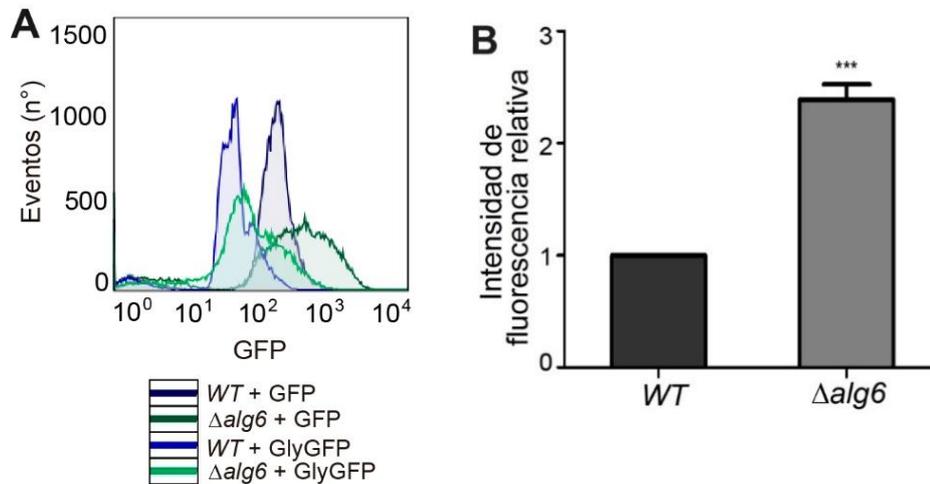


Figura 16. La citometría de flujo refleja las diferencias de fluorescencia del biosensor GlyGFP entre las cepas WT y $\Delta alg6$

(A) Las células fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y se observó el perfil de fluorescencia por citometría de flujo. (B) Se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de 30000 eventos. La significancia estadística fue calculada mediante test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (***) ($p < 0.0001$)

Por otro lado, se estudió y cuantificó la expresión de GlyGFP y GFP por inmunodetección. En la Figura 17 A se observa la doble banda que corresponde, como se mencionó anteriormente, a la proteína con y sin *N*-glicano. El cociente de intensidad de GFP no glicosilada/ GFP total es 2.12 veces superior para la cepa $\Delta alg6$ con respecto a la WT ($p < 0.0001$) (Figura 17 B), indicando que este sistema evidencia la hipoglicosilación de la cepa $\Delta alg6$ también por inmunodetección y de manera cuantificable. El control GFP se expresa como una única banda en ambas cepas, que se corresponde en migración con la banda inferior no glicosilada. De esta manera, se estableció un sistema que permite cuantificar el estado de hipoglicosilación de una mutante de *S. pombe* que sintetiza Dol-PP-glicanos truncados de manera precisa y sensible.

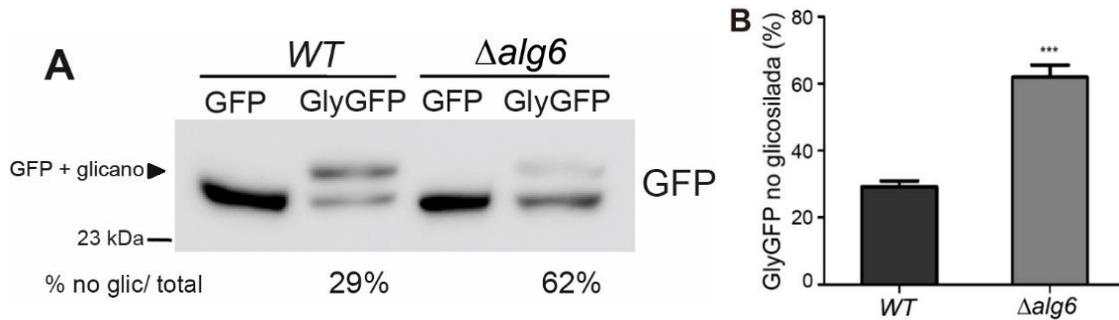


Figura 17. Inmunodetección de GFP glicosilada en células de *S. pombe*

(A) Las cepas *WT* y $\Delta alg6$ fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y sometidas a extracción de proteínas totales. Se identificó la GFP mediante inmunodetección como se describe en la Figura 15 B. (B) Se cuantificó la intensidad de bandas por ImageJ y se determinó el porcentaje de GlyGFP no glicosilada/ GlyGFP total. La significancia estadística fue calculada mediante test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la *WT* (***) $p < 0.0001$).

La expresión del biosensor GlyGFP no satura la maquinaria de N-glicosilación

El nivel basal de fluorescencia que se observa en la cepa *WT* (Figura 13 A) corresponde a un determinado porcentaje del biosensor que no se glicosila en condiciones normales. Este hecho podría deberse simplemente a que con la tasa de N-glicosilación normal de la cepa *WT* no todos los sitios consenso son glicosilados, o bien podría deberse a una saturación de la maquinaria de N-glicosilación debido a un nivel de expresión de GlyGFP elevado, a pesar de estar integrado al genoma en copia única y, en consecuencia, algunos sitios escaparían a la incorporación de un N-glicano por la OST. Si este fuera el caso, una regulación aún más fina en los niveles de expresión del biosensor podría lograr que se glicosile toda la proteína que se sintetiza y que la fluorescencia disminuya a cero en la cepa *WT*. Para evaluar esta hipótesis, se trató a la cepa *WT* y a la mutante $\Delta alg6$ con distintas concentraciones de tiamina, un represor del promotor *nmt1* bajo el cual se encuentra controlada la expresión de GlyGFP. La fluorescencia del biosensor observada por citometría de flujo disminuyó en la misma proporción en las cepas *WT* y $\Delta alg6$ con las concentraciones crecientes de tiamina (Figura 18 A-C) y se correspondió con la disminución del nivel total de proteína (Figura 18 D). Corroborando esto, el porcentaje de proteína no glicosilada observada por inmunodetección disminuyó en ambas cepas también con la misma tasa (Figura 18 E). Estos resultados indican que un gen en copia única bajo el promotor *nmt1* genera un nivel de expresión tal que no satura la capacidad de la OST de transferir glicanos a los sitios correspondientes. La fluorescencia basal de GlyGFP que se observó en la cepa *WT* correspondería a la tasa de N-glicosilación normal de esa cepa y, en el caso de la mutante $\Delta alg6$, la hipoglicosilación que se observa dependería exclusivamente de la mutación que genera la síntesis del Dol-PP-glicano incompleto M9.

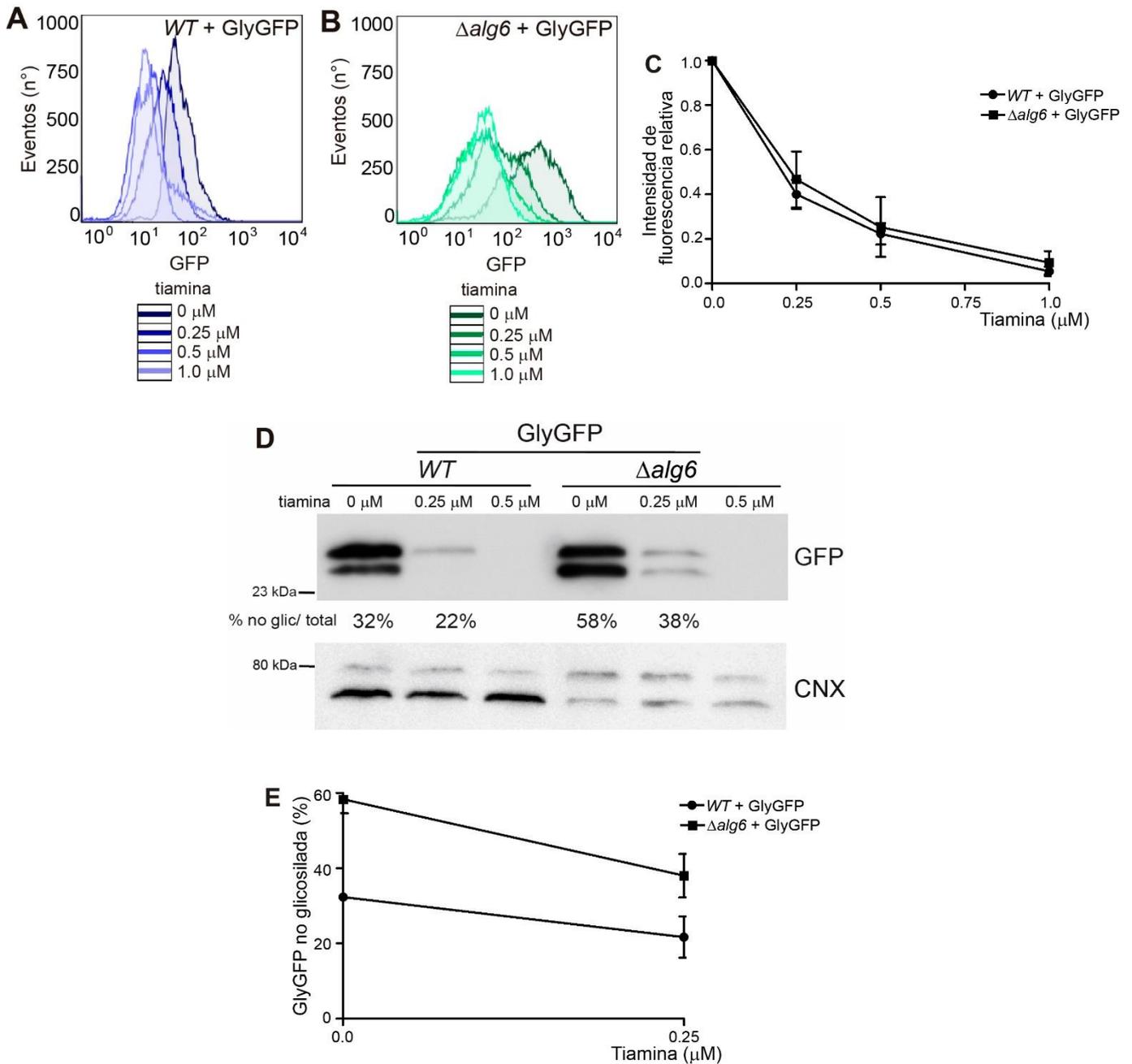


Figura 18. La fluorescencia basal de la cepa *WT* coincide con su tasa de *N*-glicosilación normal y muestra que la maquinaria de *N*-glicosilación no está saturada (A-B) Las células de las cepas *WT* y $\Delta alg6$ fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ en presencia de concentraciones crecientes de tiamina y se observó el perfil de fluorescencia por citometría de flujo. (C) Se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de 30000 eventos. (D) Las cepas sin tratar y tratadas con tiamina 0.25 y 0.5 μM fueron sometidas a extracción de proteínas totales, de las cuales 50 μg fueron resueltas en SDS-PAGE 10% y transferidas a una membrana de PVDF. Se inmunodetectó la GFP como se describe en la Figura 15 B. Como control de carga se identificó CNX con un anticuerpo primario anti-CNX en una dilución 1: 10000 hecho en conejo y anti-conejo conjugado a HRP en una dilución 1: 30000 como secundario. (E) Se cuantificó la intensidad de bandas por ImageJ y se determinó el porcentaje de GlyGFP no glicosilada/ GlyGFP total para las cepas sin tratar y tratadas con tiamina 0.25 μM .

Efecto de la estructura del glicano en la eficiencia de la transferencia por la OST

Las Glc son necesarias para el reconocimiento y transferencia del glicano por parte de la OST

Una vez realizada la puesta a punto del sistema y verificado que se cuenta con una herramienta capaz de medir hipoglicosilación en la levadura *S. pombe* de manera sensible y precisa mediante la fluorescencia en el RE del biosensor GlyGFP, el siguiente paso fue la expresión de GlyGFP y GFP en las 4 series de mutantes de *S. pombe* construidas en el laboratorio que sintetizan todas las combinaciones de Dol-PP-glicanos posibles (GXMY) (tabla 3). Es importante recordar que *S. pombe* es capaz de sintetizar la rama A del Dol-PP-glicano, donde se encuentran las Glc, a pesar de no tener completas las ramas B y C (Stigliano et al., 2011), lo cual permite estudiar la relevancia tanto de las Glc como de las Man como parte de la estructura del glicano para el reconocimiento y transferencia por la OST de manera independiente unas de otras. Se integraron el biosensor GlyGFP y GFP en el genoma de las 16 mutantes y por microscopía de fluorescencia se corroboró que ambas proteínas se expresaron en el RE de todas las mutantes (datos no mostrados). Por citometría de flujo se cuantificó la intensidad de fluorescencia para cada una de ellas y por inmunodetección se cuantificó la cantidad de proteína glicosilada y no glicosilada para cada mutante.

En la Figura 19 se puede observar que las mutantes que presentaron la intensidad de fluorescencia media más elevada son las que sintetizan Dol-PP-glicanos de estructura MY con ausencia total de Glc y distinto contenido de Man, es decir, las mutantes de la serie D ($p < 0.0001$). Las comparaciones de las mutantes que pertenecen a una misma serie, que sintetizan Dol-PP-glicanos con una misma cantidad de Glc y diferente contenido de Man, no mostraron diferencias significativas en el nivel de fluorescencia del biosensor GlyGFP entre ellas (serie A $p = 0.0309$, serie B $p = 0.1332$, serie C $p = 0.8796$ y serie D $p = 0.1711$). Este análisis de las mutantes dentro una misma serie mostró que no hay diferencias de reconocimiento por parte de la OST cuando el Dol-PP-glicano tiene distinto contenido de Man. Por otro lado, la comparación de las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con diferente contenido de Glc, pero con la misma cantidad de Man, por ejemplo, las primeras mutantes de cada serie que sintetizan G3M9, G2M9, G1M9 y M9 (GXM9), permitió observar que la cepa que sintetiza el Dol-PP-glicano sin Glc fluoresció significativamente más que el resto de las mutantes, que sintetizan Dol-PP-glicanos con al menos una Glc GXM9 ($p < 0.0001$). Esta observación se extiende al comparar entre sí a las mutantes de cada serie que sintetizan Dol-PP-glicanos con 7, 6 y 5 Man y distinto

contenido de Glc. La cepa que sintetiza el oligosacárido no glucosilado fue la que mostró el mayor nivel de fluorescencia del biosensor GlyGFP, muy por encima del nivel de fluorescencia de las demás mutantes analizadas (GXM7 $p < 0.0027$, GXM6 $p < 0.0018$ y GXM5 $p < 0.0001$).

Estos resultados indican que la presencia de las Glc en la estructura del glicano es mucho más importante que la de las Man para su reconocimiento y transferencia eficientes a las proteínas por parte de la OST.

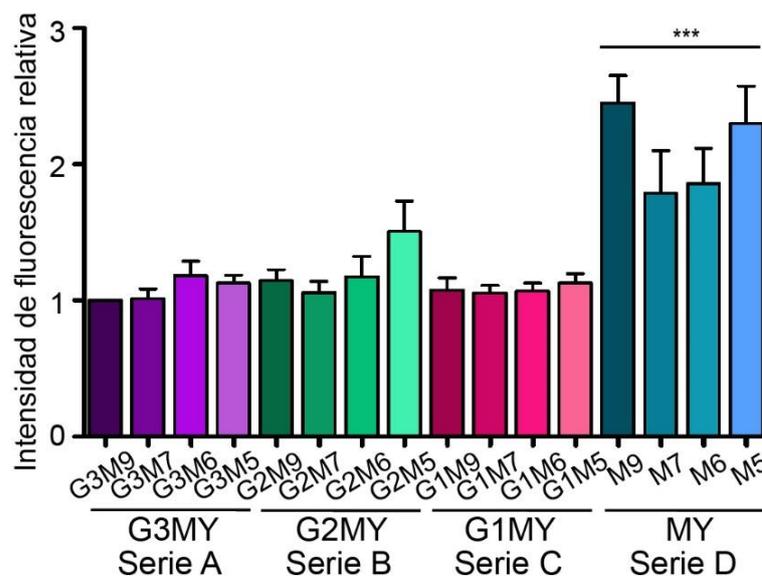


Figura 19. Cuantificación de la fluorescencia de GlyGFP en mutantes de *S. pombe* que sintetizan todas las combinaciones de estructuras de Dol-PP-glicanos

Las series de mutantes de *S. pombe* que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados de estructura G3MY, G2MY, G1MY y MY fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$, se observó el perfil de fluorescencia por citometría de flujo y se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de 30000 eventos. La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni para pares seleccionados de columnas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (***) $p < 0.0001$.

La ausencia creciente de Glc en el Dol-PP-glicano aumenta progresivamente la hipoglicosilación de proteínas

Para verificar los datos obtenidos por citometría de flujo, se evaluó el estado de glicosilación de GlyGFP por inmunodetección en todas las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados. Para ello, se obtuvieron extractos proteicos de todas las mutantes, se realizó una inmunodetección para detectar GFP y se cuantificó la proporción de proteína no glicosilada con respecto a la proteína total (Figura 20). Los resultados obtenidos son comparables con lo observado por citometría de flujo y mostraron que las mutantes de la serie que sintetizan Dol-PP-glicanos no glucosilados MY son las que presentaron el porcentaje de GlyGFP no glicosilada más alto ($p < 0.0001$). De la misma

manera, se compararon las mutantes de una misma serie para evaluar la relevancia de las Man independientemente de las Glc y no se observaron diferencias entre los porcentajes de proteína no glicosilada a medida que faltan más Man en la estructura del glicano (serie A $p > 0.05$, serie B $p = 0.9094$, serie C $p = 0.3572$ y serie D $p = 0.6095$). Sin embargo, a medida que la estructura del glicano contiene menor cantidad de Glc, independientemente del contenido de Man, aumenta el porcentaje de proteína no glicosilada. La serie B, que sintetiza Dol-PP-glicanos con 2 Glc y distinto contenido de Man, prácticamente no mostró diferencias significativas con respecto a la *WT* ($p > 0.05$, excepto G2M9 $p < 0.001$), sin embargo, las series C y D, que sintetizan Dol-PP-glicanos con una y ninguna Glc respectivamente, mostraron un porcentaje de GlyGFP no glicosilado significativamente superior al de la *WT* ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

Lo resultados hasta acá obtenidos confirman que la presencia de las Glc es más relevante que la de las Man en la estructura de G3M9 para ser reconocido de manera eficiente por la OST y luego transferido a la proteína naciente en la reacción de *N*-glicosilación.

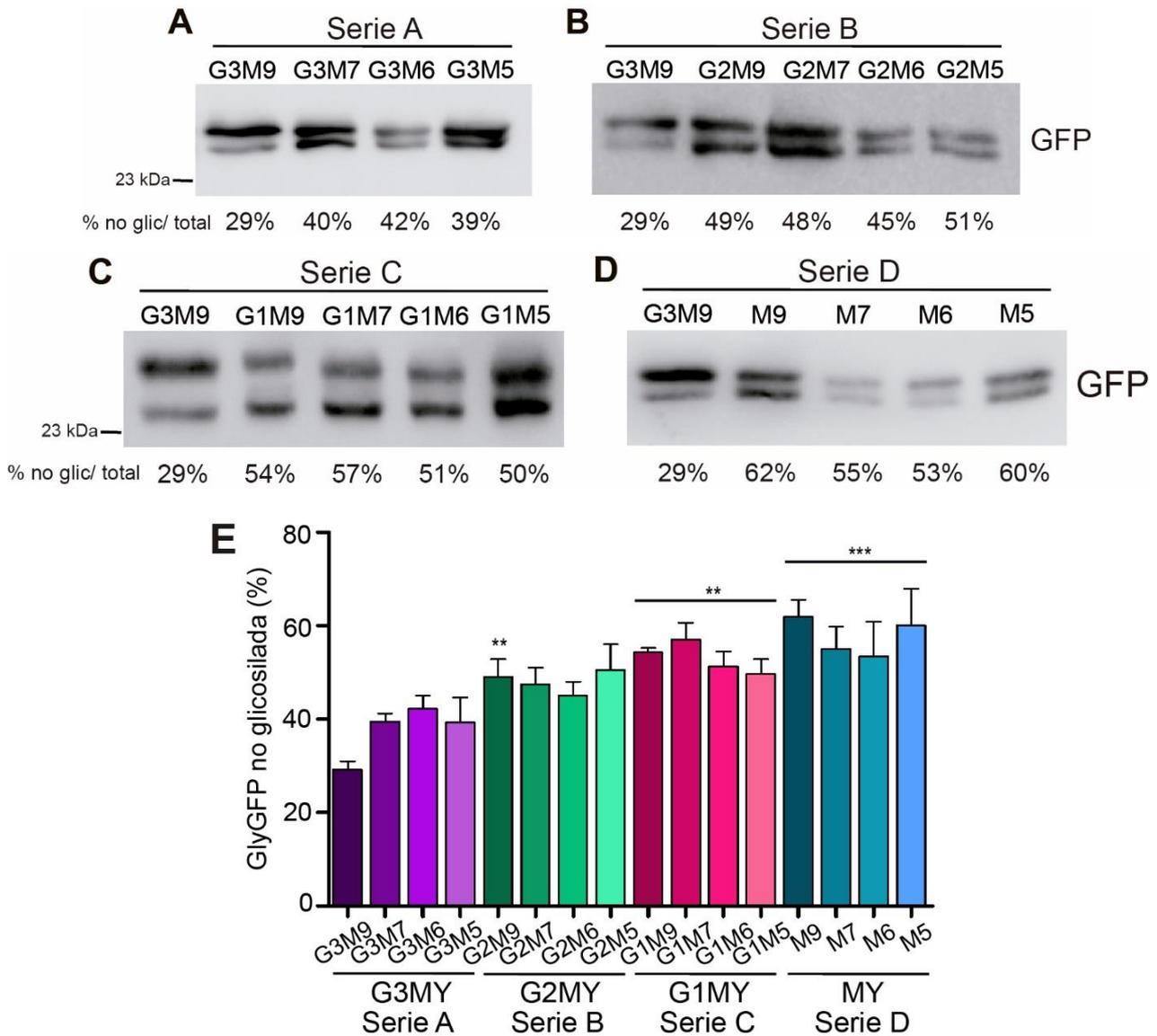


Figura 20. Cuantificación por inmunodetección de la hipoglicosilación en mutantes de *S. pombe* que sintetizan todas las combinaciones de Dol-PP-glicanos

(A-D) Las mutantes de *S. pombe* que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados de las series A a D fueron crecidas en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y sometidas a extracción de proteínas totales. Se inmunodetectó la GFP como se describe en la Figura 15 B. (E) Se cuantificó la intensidad de bandas por ImageJ y se determinó el porcentaje de GlyGFP no glicosilada/ GlyGFP total. La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni para pares seleccionados de columnas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (***) $p < 0.0001$ y ** $p < 0.001$).

Las glicoproteínas endógenas de la pared celular de S. pombe mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados están hipoglicosiladas

Los resultados obtenidos hasta acá muestran la capacidad de *N*-glicosilación de las diferentes mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados de una glicoproteína expresada de manera exógena, el biosensor GlyGFP. Con el objetivo de conocer la capacidad de transferencia de la OST de glicanos truncados a proteínas endógenas, se estudió el grado de ocupación de sitios de *N*-glicosilación de glicoproteínas de la pared celular de *S. pombe* mediante un abordaje glicoproteómico. Para ello, se utilizó la técnica de SWATH-MS, una metodología de alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad que permite la identificación y cuantificación automatizada del grado de *N*-glicosilación de varias secuencias consenso de diversas glicoproteínas en simultáneo de muestras biológicas complejas (Xu et al., 2015; Zacchi and Schulz, 2016). Se purificaron las proteínas de la pared celular de *S. pombe*, se removieron los *N*-glicanos con Endo H, se digirieron las muestras con tripsina y se separaron e identificaron los péptidos resultantes por LC-ESI-/MS-MS. Se identificaron siete proteínas como componentes de pared celular: Ecm33, Gas1, Gas2, Gas5, Aah1, Spapb1e7.04c, y Psu1 y se analizaron dos glicopéptidos de la proteína Ecm33: N92VSGAFNVNMIR y LSN203VTTTATFDGISNVFIGNLK (se indica subrayada la secuencia de *N*-glicosilación). Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Benjamin Schulz de la Universidad de Queensland, Australia.

En primer lugar y con el objetivo de determinar el grado de hipoglicosilación que produce una determinada mutante sobre los glicopéptidos de pared celular estudiados, se analizó la presencia o ausencia de unidades completas de *N*-glicanos en estos glicopéptidos, es decir, la macroheterogeneidad u ocupancia. Para esto, se determinaron los cocientes: péptido no glicosilado/ glicopéptidos totales y péptido no glicosilado/ proteínas en todas las series de mutantes de *S. pombe*. Los resultados obtenidos, reproducibles por ambos cocientes, mostraron que las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos no glucosilados con distinto contenido de Man son las que tienen el menor grado de ocupancia en el sitio N92VS, es decir, mostraron el mayor grado de hipoglicosilación de proteínas de pared celular endógenas ($p < 0.0001$) (Figura 21 A y B). Cabe destacar que las mutantes simples que sintetizan G2M9, G1M9 y M9 (las primeras mutantes de cada serie), mostraron grados de hipoglicosilación de proteínas de pared considerablemente más elevados que las dobles mutantes de la misma serie (G2M9 versus serie B $p = 0.0009$, G1M9 versus serie C $p = 0.0005$, M9 versus serie D $p < 0.0001$ para cociente péptido no glicosilado/ glicopéptidos totales). La mutante que sintetiza Dol-PP-glicanos no glucosilados de estructura M9 es, como ya se describió, la que presentó

el mayor grado de hipoglicosilación ($p < 0.0001$). Es importante mencionar que la mutante $\Delta alg8/\Delta alg12$ que sintetiza G1M7 mostró un indicio de contaminación durante el procesamiento de datos y por precaución fue retirada del análisis. Los resultados obtenidos para el glicopéptido que contiene el sitio N203VT fueron similares a los descritos para el sitio N92VS, si bien el grado de hipoglicosilación total fue menor (datos no mostrados). La reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de los cocientes péptido no glicosilado/ glicopéptidos totales y péptido no glicosilado/ proteína fue corroborada mediante la correlación de ambos cocientes (Figura 21 C). Estos datos corroboraron los resultados obtenidos previamente verificando que la presencia de los residuos de Glc es importante en la estructura del glicano para el correcto reconocimiento y transferencia por parte de la OST. Además, confirmaron que el biosensor GlyGFP refleja con fidelidad el estado de *N*-glicosilación de cada mutante, lo que valida el sistema de medición de hipoglicosilación desarrollado.

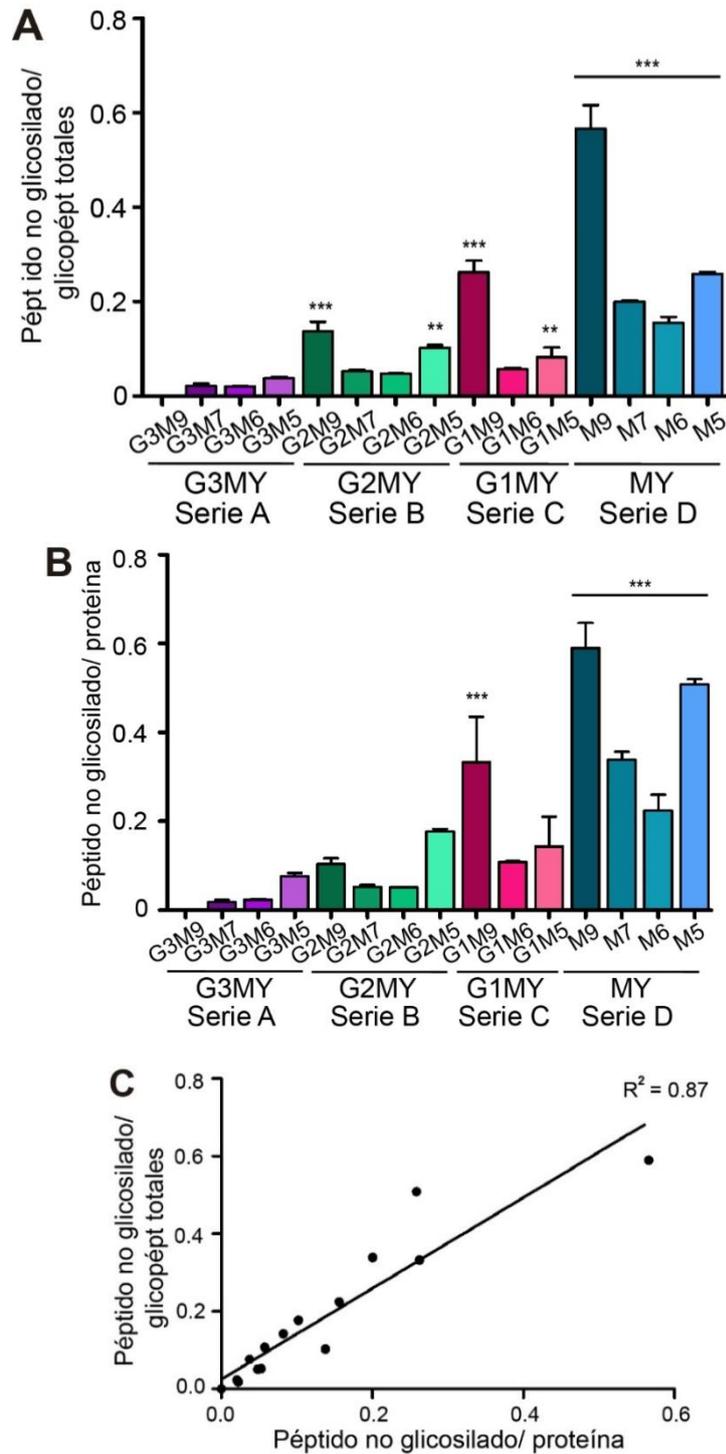


Figura 21. Los sitios no glicosilados aumentan en las glicoproteínas de pared de *S. pombe* a medida que faltan Glc en el Dol-PP-glicano

(A-B) Se purificaron las glicoproteínas de pared de *S. pombe* WT y las mutantes *alg* que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados, se cortaron los *N*-glicanos con Endo H y se digirieron las proteínas con tripsina. Se identificaron los péptidos por LS-ESI-MS/MS. Se analizó la ocupancia de los *N*-glicanos por SWATH-MS y se calculó el grado de hipoglicosilación del sitio N92VS de la proteína Ecm33 mediante el cociente péptidos no glicosilados/ glicopéptidos totales (A), o péptidos no glicosilados/ proteína total (B). La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni para pares seleccionados de columnas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (** $p < 0.0001$ y ** $p < 0.001$). (C) Se analizó la regresión entre ambos cocientes para verificar la correlación.

La síntesis incompleta de Dol-PP-glicanos altera su estructura final en las glicoproteínas de pared maduras

La estructura de los *N*-glicanos en las glicoproteínas maduras es fundamental para la actividad y estabilidad de las mismas (Helenius and Aebi, 2004). Para evaluar si los defectos en la síntesis de Dol-PP-glicanos alteraron su estructura final, se estudió la microheterogeneidad, es decir, las diferencias de estructuras de los *N*-glicanos en un sitio específico de las glicoproteínas maduras de pared de las mutantes *alg*. En este caso, el procedimiento no incluyó la remoción de los *N*-glicanos con Endo H (Zacchi and Schulz, 2016). El análisis de microheterogeneidad para el péptido N203VT mostró un pico definido de 13 Man para la cepa *WT* y para las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con 9 Man y distinto contenido de Glc G2M9, G1M9 y M9 (las primeras mutantes de cada serie). Se observó una distribución más amplia de entre 10-12 Man para las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con 7 Man y distinto contenido de Glc (G3M7, G2M7 y M7), y las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos con 5-6 Man independientemente del contenido de Glc mostraron un pico definido de 9 Man (Figura 22). Si se compara la cantidad total de Man en las estructuras finales con la cantidad inicial presente en el Dol-PP-glicano sintetizado por cada mutante, se puede observar que el delta fue aproximadamente el mismo en todas las cepas. Estos resultados muestran que durante el procesamiento de *N*-glicanos en la vía secretoria las mutantes de *S. pombe* fueron capaces de extender las estructuras de los *N*-glicanos presentes en las proteínas incorporando la misma cantidad de Man en todos los casos, independientemente de la estructura sintetizada. En consiguiente, si bien estos resultados sugieren que el procesamiento de los *N*-glicanos no estuvo afectado y que a pesar de recibir como sustrato un *N*-glicano incompleto las distintas mutantes fueron capaces de incorporar las Man correspondientes durante la extensión, las estructuras finales de los *N*-glicanos sobre las proteínas mostraron microheterogeneidades como consecuencia de la síntesis incompleta de los mismos. Estos resultados sugieren que las consecuencias de las mutaciones en los genes *alg* se extienden no sólo a la dificultad de reconocimiento y transferencia de un glicano incompleto por parte de la OST, sino que las estructuras finales de los *N*-glicanos, al menos en las glicoproteínas de pared celular analizadas, quedan incompletas también.

Los resultados obtenidos para el sitio N92VS mostraron tendencias muy similares a lo observado para el sitio N203VT (datos no mostrados).

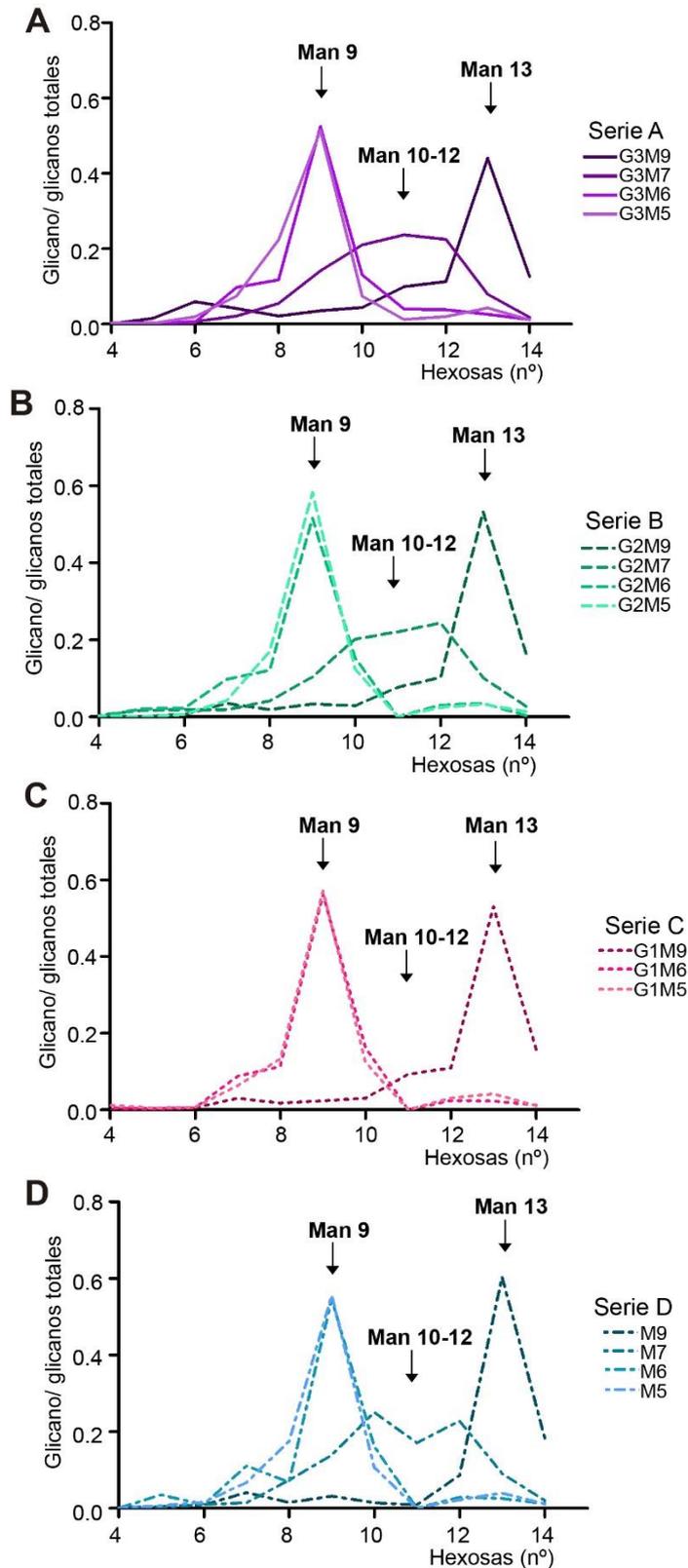


Figura 22. Las estructuras de los *N*-glicanos en las glicoproteínas de pared de *S. pombe* mutantes en genes *alg* muestran microheterogeneidades

Se purificaron las glicoproteínas de pared de *S. pombe* *WT* y mutantes *alg* que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados y se digirieron con tripsina. Se identificaron los péptidos por LS-ESI-MS/MS. Se analizó la microheterogeneidad entre las mutantes del *N*-glicano presente en el sitio de *N*-glicosilación N203VT de la proteína Ecm33 mediante SWATH-MS.

Capítulo II

**Estudio de las bases moleculares de la CDG-IIb:
efectos producidos por la deleción de la GI**

La delección del gen que codifica para la GI produce severos defectos en *S. pombe*

En el proyecto de mutantes de delección sistemática de todos los genes de *S. pombe* ha sido reportado que la delección del gen codificante para la GI produce un fenotipo inviable (Kim et al., 2010). Este hecho contrasta con lo reportado para *S. cerevisiae* ya que las mutantes que carecen de GI son viables (Jiang et al., 1996; Romero et al., 1997), pero de acuerdo con lo reportado para los pacientes diagnosticados con CDG-IIb debidas a mutaciones en la GI, donde los mismos presentan severas patologías y pronósticos de vida muy cortos (De Praeter et al., 2000; Kim et al., 2018). Con el objetivo de estudiar las bases moleculares de la CDG-IIb, en el laboratorio se pudo obtener una cepa de *S. pombe* haploide carente completamente del gen codificante para la GI ($\Delta gls1$) por meiosis y esporulación de una cepa diploide heterocigota para dicho gen ($\Delta gls1/+$) obtenida de una colección comercial (Kim et al., 2010) (Figura 23 A). Las mutantes $\Delta gls1$ tienen un fenotipo de crecimiento muy lento (Figura 23 B), pero que no es letal, contrariamente a lo que estaba reportado. Al crecerlas en medio YEA sólido se observó que las colonias de las mutantes son mucho más pequeñas que las de una cepa *WT* y que la cantidad de colonias fue mucho menor. Por otro lado, durante el proceso de meiosis y esporulación para la obtención de esta mutante, se obtuvo una segunda cepa de la misma tétrada que, si bien genéticamente también es knock out para GI, creció mucho mejor (Figura 23 B). Para diferenciarlas, se denominó a la mutante de crecimiento lento como $\Delta gls1-S$ (por sick) y a la mutante que crece mejor como $\Delta gls1-H$ (por healthy).

Para comparar y estudiar en detalle los parámetros de crecimiento de las mutantes $\Delta gls1$ obtenidas, se realizó la curva de crecimiento en medio YEA líquido de las cepas $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$ y se las comparó con una cepa *WT*. Se iniciaron las curvas a partir de cultivos a una $DO_{600nm} = 0.2$ que se incubaron a 28°C y 250 rpm y se monitorearon durante 5 días midiendo la DO_{600nm} cada 4 horas. Se puede observar que la curva de crecimiento de la mutante $\Delta gls1-S$ está completamente alterada con respecto a la cepa *WT* (Figura 23 C y tabla 4, ver más adelante). En primer lugar, la fase lag fue de alrededor de 32 horas, 8 veces más prolongada que la fase lag de la cepa *WT*, que fue de 4 horas ($p < 0.05$). La velocidad de duplicación en fase exponencial fue 4 veces menor para la mutante $\Delta gls1-S$ con respecto a la *WT* ($p < 0.05$) y, además, su máxima densidad de crecimiento en fase estacionaria fue de aproximadamente la mitad de la DO_{600nm} máxima a la que llega la cepa *WT* (4.9 versus 10.5) ($p < 0.05$) (tabla 4). La mutante $\Delta gls1-$

H, en cambio, mostró parámetros de crecimiento mucho mejores que los de la mutante $\Delta gls1-S$. Su fase lag duró un cuarto del tiempo que dura la fase lag de la mutante $\Delta gls1-S$ ($p < 0.05$), su velocidad de duplicación en fase logarítmica fue 1.7 veces más rápida, y finalmente llegó a una DO_{600nm} en fase estacionaria superior a la máxima DO_{600nm} de la mutante $\Delta gls1-S$. Estos parámetros, sin embargo, no alcanzaron los valores de la curva de la cepa *WT*, ya que la fase lag de la mutante $\Delta gls1-H$ duró el doble de tiempo, la velocidad de duplicación en fase logarítmica fue de aproximadamente la mitad y la DO_{600nm} máxima a la que llega fue de alrededor del 70% con respecto a la *WT*.

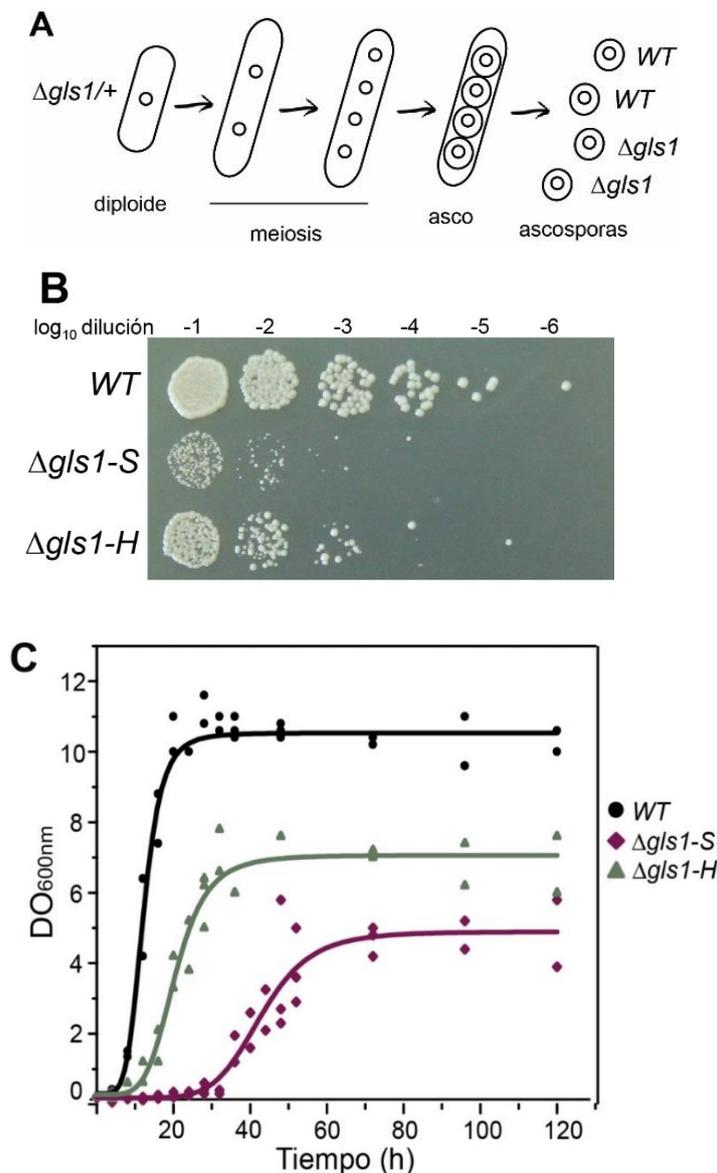


Figura 23. La delección del gen que codifica para la G1 produce un fenotipo severo de crecimiento en *S. pombe*

(A) Esquema que muestra la meiosis y esporulación de una cepa diploide heterocigota $\Delta gls1/+$ para dar lugar a 4 esporas haploides, dos *WT* y dos mutantes $\Delta gls1$. (B) Las cepas de *S. pombe* *WT* y mutantes $\Delta gls1$ fueron crecidas en medio YEA hasta saturación y diluidas a $DO_{600nm} = 1.0$. Se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron gotas de 5 μ l en medio YEA sólido y se incubaron a 28°C durante 72 horas. (C) Las mismas cepas fueron crecidas a saturación sin dejarlas envejecer y diluidas a $DO_{600nm} = 0.2$ en 50 ml de medio YEA líquido. Se incubó a 28°C en agitación a 250 rpm y se midió la DO_{600nm} cada 4 horas durante 5 días. Todas las curvas se realizaron por triplicado. El ajuste se realizó por ecuación logística.

El estudio de la morfología de la mutante $\Delta gls1-S$ por microscopía de transmisión mostró células redondeadas, pequeñas y con tendencia a agruparse. Las células $\Delta gls1-H$, en cambio, no presentaron defectos morfológicos evidentes y tienen forma de bastón y tamaño más similares a una célula *WT* (Figura 24 A). La medición de la longitud promedio de las células en fase exponencial mostró que las células $\Delta gls1-S$ son significativamente más pequeñas que las *WT* y que las $\Delta gls1-H$ ($p < 0.0001$), y que éstas últimas a su vez no alcanzan el tamaño de las células *WT* ($p < 0.001$) (Figura 24 B).

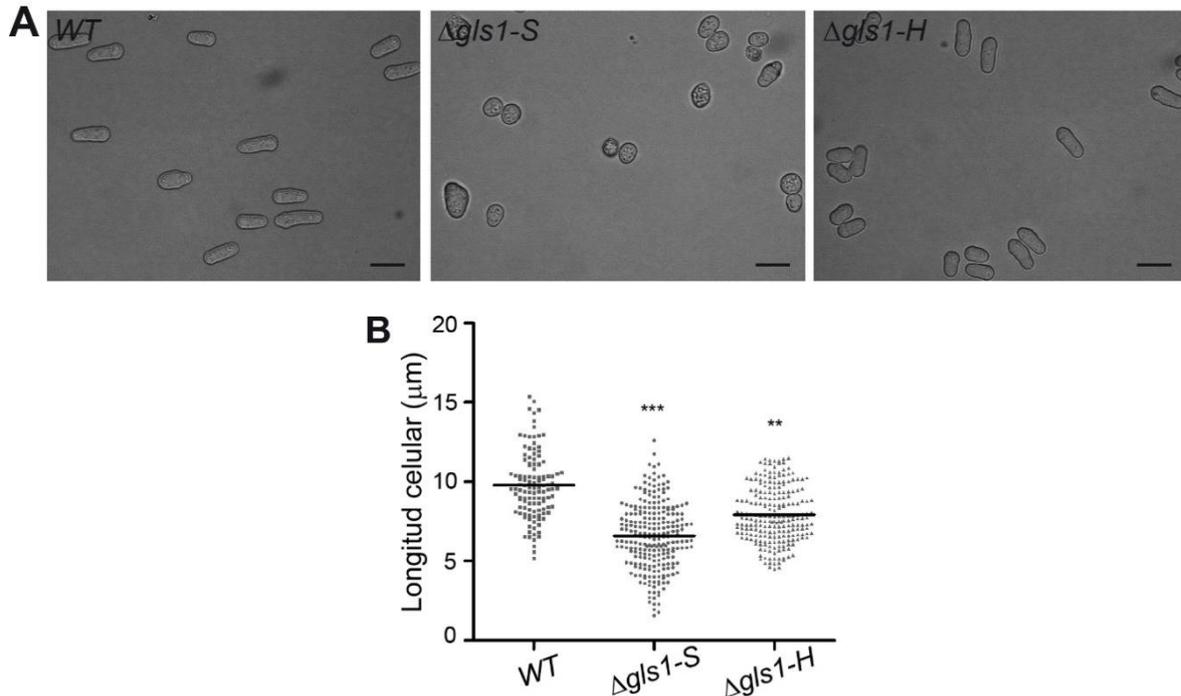


Figura 24. La mutante $\Delta gls1-S$ presenta aberraciones morfológicas

(A) Las células fueron crecidas en medio YEA líquido hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y se tomaron imágenes de los cultivos frescos por microscopía de transmisión en un microscopio Olympus BX60 y cámara Olympus DP71. Barra= 5 μm . (B) La medición del tamaño de al menos 180 células por cepa y la cuantificación se realizaron por software ImageJ. La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la *WT* (***) $p < 0.0001$ y ** $p < 0.001$).

Para demostrar que el fenotipo severo observado en la mutantes $\Delta gls1-S$ se debía a la ausencia de Gl, se complementó con el plásmido pREP41-*gls1*⁺ que contiene el gen que codifica para la Gl y se restauró el crecimiento normal, indicando que es la ausencia de dicho gen la responsable del defecto observado en esta mutante (Figura 25).



Figura 25. Complementación del fenotipo enfermo de la mutante $\Delta gls1-S$ por expresión del gen $gls1+$

La mutante $\Delta gls1-S$ fue transformada con vector pREP41 vacío o conteniendo el gen $gls1+$ que codifica para la GI y seleccionada en medio EMM suplementado con adenina y uracilo a 28°C durante 72 horas.

El perfil de *N*-glicanos de la mutante $\Delta gls1-H$ no se corresponde con una mutación de GI

Para poder comprender las diferencias fenotípicas observadas entre las mutantes $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$, el primer paso fue estudiar el perfil de *N*-glicanos unidos a proteínas presentes en estas mutantes, ya que GI es la primera enzima encargada de procesar el *N*-glicano una vez transferido a las proteínas en el RE. Se realizó una marcación *in vivo* de las células con [^{14}C]Glc durante 15 minutos en ausencia de inhibidores de glucosidasas y en presencia de DTT (para imposibilitar la salida de glicoproteínas del RE luego del procesamiento de *N*-glicanos). Luego, se purificaron los *N*-glicanos sensibles a Endo H y se resolvieron por HPLC. En la cepa *WT* se observó principalmente M9 en sus glicoproteínas, el cual aparece como consecuencia del rápido procesamiento de G3M9 a G2M9, G1M9 y finalmente a M9 por la acción sucesiva de GI y GII (Figura 26 A). En la mutante $\Delta gls1-S$, consistente con tener la GI delecionada, se observó únicamente la estructura G3M9 en las glicoproteínas (Figura 26 B). Sin embargo, el perfil de *N*-glicanos de la mutante $\Delta gls1-H$ mostró una mezcla de G3M9, G1M9 y M9 (Figura 26 C), sugiriendo que una parte de los *N*-glicanos en el RE de esta mutante estarían siendo procesados. La inhibición de las glucosidasas con NM-DNJ y CST disminuyó la proporción de M9 y aumentó la de G2M9, corroborando que la presencia de M9 proviene de la hidrólisis de *N*-glicanos mayores, principalmente G2M9 (Figura 26 D).

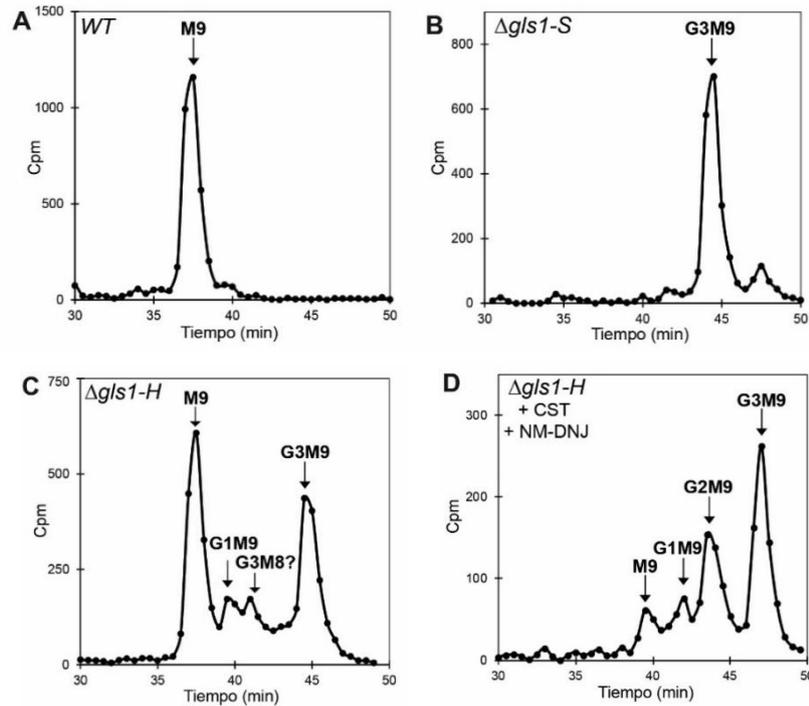


Figura 26. Perfil de *N*-glicanos en el RE de mutantes $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$

(A-D) Se marcaron cultivos en fase exponencial de *S. pombe* *WT*, $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$ crecidos en medio YEA *in vivo* con [14 C]Glc 300 Ci/mol durante 15 minutos a 28°C en presencia de DTT 5 mM para inhibir la salida de glicoproteínas del RE. Las células $\Delta gls1-H$ se marcaron además en presencia de inhibidores de glucosidasas NM-DNJ 5 mM y CST 5 mM (D). Se purificaron los *N*-glicanos marcados sensibles a Endo H y se resolvieron las muestras por HPLC. Se indican las posiciones de los estándares.

El perfil de glicanos unidos a lípido de la mutante $\Delta gls1-H$ sugiere la presencia de una mutación adicional en el gen *alg10*

La cepa $\Delta gls1-H$ produjo un perfil de *N*-glicanos más similar al producido por una cepa *WT* que a una mutante en el gen *gls1*, mostrando un pico de M9 que se produjo por el procesamiento de G2M9 por la GII (Figura 26 C y D). La presencia de G2M9 no puede ser explicada por una actividad parcial o residual de GI, ya que el knock out fue realizado deletionando un segmento largo de la secuencia codificante. Una hipótesis para explicar el perfil de *N*-glicanos observado en la mutante $\Delta gls1-H$ es que haya ocurrido en esta cepa una mutación adicional de la actividad de GI que saltee su ausencia, es decir, durante la síntesis del Dol-PP-glicano. Para evaluar esta hipótesis, se analizó el perfil de Dol-PP-glicanos producido *in vivo* antes de su transferencia a las proteínas, para lo cual los mismos fueron marcados con [14 C]Glc durante 15 minutos en presencia de puromicina y cicloheximida para inhibir la síntesis proteica y permite su acumulación. La cepa *WT* y mutante $\Delta gls1-S$ mostraron, de acuerdo a lo esperado, G3M9 como principal glicano (Figura 27 A y B). En la mutante $\Delta gls1-H$ se observó, sin embargo, el glicano de

composición G2M9 como estructura predominante (Figura 27 C). Este perfil es similar al producido por cepas mutantes en el gen *alg10*, que codifica para la glucosiltransferasa responsable de la adición de la Glc más externa (*n*) durante la síntesis del Dol-PP-glicano (Figuras 3 y 4) (Aebi, 2013). Estos resultados sugieren que el perfil de *N*-glicanos observado en las mutantes $\Delta gls1-H$ podría deberse a un defecto en la biosíntesis del Dol-PP-glicano. La presencia de G3M9 en las glicoproteínas de $\Delta gls1-H$ (Figura 26 C) podría explicarse por una actividad residual de la enzima *alg10p* que sintetizaría G3M9 en pequeñas cantidades (Figura 27 C) y que, una vez transferido a las proteínas, no podría ser procesado por la falta de Gl.

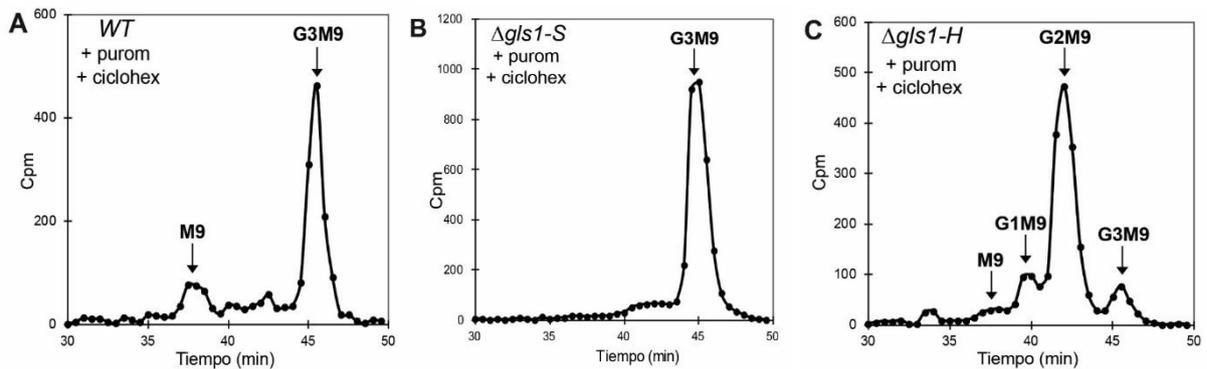


Figura 27. El perfil de glicanos unidos a Dol-PP de la mutante $\Delta gls1-H$ muestra principalmente G2M9

(A-C) Se marcaron cultivos de *S. pombe* WT, $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$ en fase exponencial crecidos en medio YEA *in vivo* con [^{14}C]Glc 300 Ci/mol durante 15 minutos a 28°C en presencia de puromicina 50 $\mu g/ml$ y cicloheximida 75 $\mu g/ml$ para inhibir la síntesis de proteínas. Se purificaron los Dol-PP-glicanos, se liberaron los glicanos del lípido por hidrólisis ácida suave y se resolvieron por HPLC. Se indican las posiciones de los estándares.

La mutante $\Delta gls1-H$ tiene una mutación adicional en el gen *alg10*

El hecho de que el perfil de Dol-PP-glicanos producido por la mutante $\Delta gls1-H$ contenga incrementada la cantidad de G2M9 y reducida la de G3M9 sugiere que en la cepa $\Delta gls1-H$ podría haber una mutación adicional en el gen *alg10* (Figura 2). La mutante $\Delta gls1-H$ sintetizaría G2M9 y este glicano sería transferido a las proteínas y reconocido por la GlI, que lo clivaría dando lugar a que continúe el procesamiento de *N*-glicanos en el RE. De esta manera, se provocaría un bypass en el defecto de Gl que suprimiría el fenotipo de crecimiento lento y los defectos morfológicos observados en la mutante $\Delta gls1-S$. Para corroborar esta hipótesis, se secuenció el gen *alg10* del genoma de las cepas $\Delta gls1-H$, $\Delta gls1-S$ y WT, incluidos los intrones y regiones 5' y 3' UTR. El gen se obtuvo de cada cepa por PCR utilizando la polimerasa KOD de alta fidelidad a partir de ADN purificado. En la secuencia del gen *alg10* completo de la cepa $\Delta gls1-H$ se encontró una inserción de

una timidina en la posición 477 a partir del codón de iniciación que no se observó en la secuencias del gen *alg10* obtenidas de la cepa *WT* ni de la mutante de crecimiento lento $\Delta gls1-S$, las cuales fueron idénticas, a su vez, a las secuencias anotadas en la base de datos de PomBase (McDowall et al., 2015; Wood et al., 2012) (Figura 28). La mutación de inserción en la cepa $\Delta gls1-H$ produjo un corrimiento en el marco de lectura que podría resultar en un codón de stop prematuro 70 pares de bases río abajo, produciendo una proteína trunca de 183 aminoácidos en lugar de la proteína completa de 445 aminoácidos. Como en la mutante $\Delta gls1-H$ se sintetiza una pequeña cantidad de G3M9 unido a Dol-PP (Figura 27 C), esta mutación no aboliría por completo la actividad producto del gen *alg10*. Estos resultados confirman que en la mutante $\Delta gls1-H$ con un fenotipo de crecimiento más aliviado se produjo una mutación adicional en el gen *alg10* de manera espontánea.

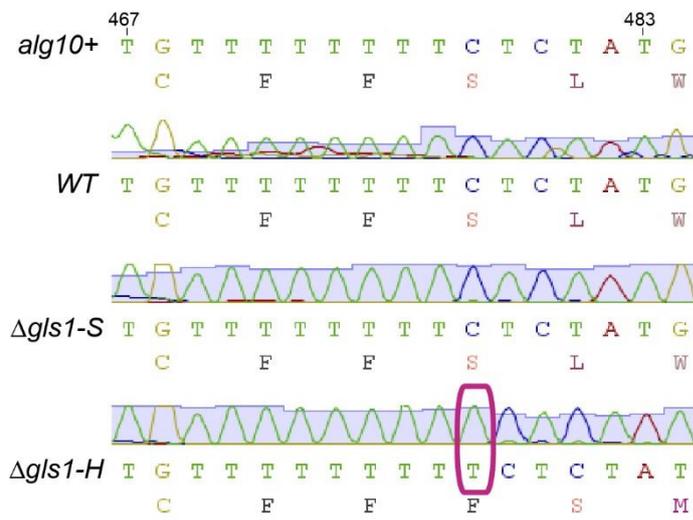


Figura 28. La mutante $\Delta gls1-H$ tiene una inserción en el gen *alg10*

A partir de ADN purificado de la cepa *WT* y las mutantes $\Delta gls1$ se obtuvo el gen *alg10* por PCR y se secuenció con los oligonucleótidos Spalg10 5'NC s, Spalg10 3'NC a, *alg10* fw y Sp *alg10* rev (tabla 3). Las secuencias fueron comparadas con la anotada en la base de datos de PomBase (McDowall et al., 2015). En el recuadro magenta se indica la inserción en la posición 477 del gen *alg10* de la mutante $\Delta gls1-H$.

La mutación en el gen *alg10* mejora los defectos morfológicos y de crecimiento de las mutantes de *S. pombe* carentes de Gl

Para verificar si la mutación encontrada en el gen *alg10* es la responsable de la supresión del defecto de crecimiento en la mutante $\Delta gls1-H$, se construyó una cepa *S. pombe* doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$ por cruzamiento genético a partir de la cepa parental $\Delta gls1-S$ y una cepa $\Delta alg10$ carente completamente del gen *alg10*. El genotipo de la doble mutante fue verificado por PCR (datos no mostrados). Una vez construida, se comparó el crecimiento de la doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$ con el de las mutantes $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$, y con una cepa *WT*. Como control, se adicionó una cepa $\Delta alg10$ para verificar que esta mutación no cause ningún efecto *per se* en el fenotipo. En medio YEA sólido se observó que el crecimiento de la doble mutante es similar al de la mutante $\Delta gls1-H$, comparable

con el de la cepa *WT* y mucho más aliviado que el de la mutante $\Delta gls1-S$ (Figura 29 A).

Luego, se estudiaron los parámetros de la curva de crecimiento en medio YEA líquido de la doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$ en comparación con las mutantes $\Delta gls1-S$, $\Delta gls1-H$, $\Delta alg10$ y la cepa *WT*. Se iniciaron las curvas a partir de cultivos a una $DO_{600nm} = 0.2$ que se monitorearon cada 4 horas durante 5 días. La doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$ mostró una curva de crecimiento comparable a la de la simple mutante $\Delta gls1-H$ con parámetros muy similares, y significativamente mejorados en comparación con la cepa $\Delta gls1-S$ (Figura 29 B y tabla 4). La duración de la fase lag es mucho más corta (8 horas versus 32 horas) ($p < 0.05$), la velocidad de duplicación en fase exponencial es 2.3 veces más rápida y alcanza una DO_{600nm} máxima superior (6.6 para $\Delta gls1/\Delta alg10$ y 4.9 para $\Delta gls1-S$). Sin embargo, estos valores no restauraron los de la curva de crecimiento de la cepa *WT*, siendo la duración de la fase lag del doble de tiempo para la mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$, la velocidad de duplicación en fase exponencial 1.7 veces menor y en fase estacionaria alcanzó el 65% de la DO_{600nm} máxima de la cepa *WT* ($p < 0.05$).

Por otro lado, la mutación en el gen *alg10* no afectó el crecimiento de la levadura *S. pombe* en medio YEA tanto sólido como líquido ya que no se observaron diferencias entre el crecimiento de la mutante $\Delta alg10$ con respecto a la cepa *WT*.

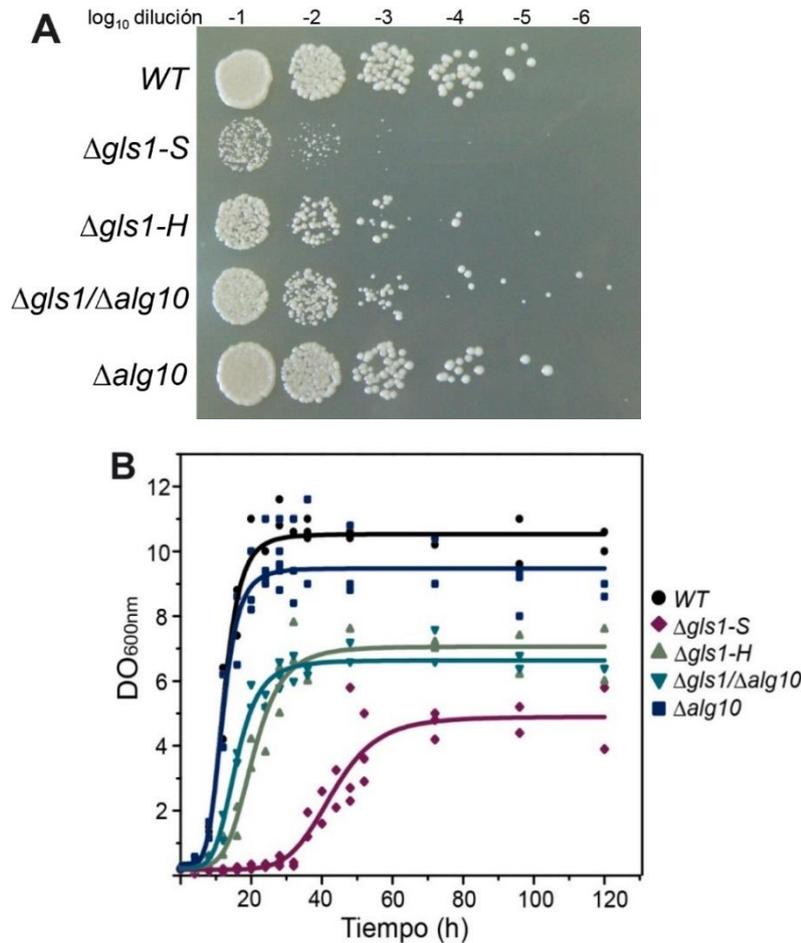


Figura 29. La mutación en el gen *alg10* suprime los defectos de crecimiento de las mutantes carentes de GI

(A) Las cepas de *S. pombe* WT y mutantes fueron crecidas en medio YEA hasta saturación y diluidas a $DO_{600nm} = 1.0$. Se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron gotas de 5 μ l en medio YEA sólido y se incubaron a 28°C durante 72 horas. (B) Las mismas cepas fueron crecidas en medio YEA líquido durante 5 días y monitoreadas cada 4 horas como se describe en la Figura 23 C. Todas curvas se realizaron por triplicado. El ajuste se realizó por ecuación logística. Los datos de la cepa WT y mutantes Δ *gls1-S* y Δ *gls1-H* son los mismos que los de la Figura 23 C.

Cepa	DO_{600nm} máxima	Duración fase lag (h)	Valor de la pendiente en fase exponencial	Tiempo $\frac{1}{2}$ (h)	R^2
WT	10.5 ± 0.2	4	0.75	12.2 ± 0.4	0.97
Δ <i>gls1-S</i>	4.9 ± 0.2	32	0.19	43.0 ± 1.3	0.93
Δ <i>gls1-H</i>	7.1 ± 0.2	8	0.33	20.5 ± 0.8	0.96
Δ <i>gls1/Δalg10</i>	6.6 ± 0.1	8	0.44	15.7 ± 0.5	0.98
Δ <i>alg10</i>	9.5 ± 0.2	4	0.80	11.9 ± 0.6	0.94

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de mutantes de *S. pombe* en medio YEA líquido
Se tabulan los parámetros calculados en la Figura 29 B.

En cuanto a sus características morfológicas, las células Δ *gls1/Δalg10* mostraron un aspecto normal con forma de bastón y su tamaño prácticamente no se diferenció de las Δ *gls1-H* (Figura 30 A). Al igual que éstas, son más largas que las Δ *gls1-S* ($p < 0.0001$) sin alcanzar el tamaño de las células WT ($p < 0.001$) (Figura 30 B). Estas observaciones indican que la morfología aberrante observada en las mutantes Δ *gls1-S* revierte a una mucho más saludable cuando aparece una mutación adicional en el gen *alg10*. Por otro lado, las células de la mutante Δ *alg10* no mostraron diferencias de forma y tamaño con las de la cepa WT.

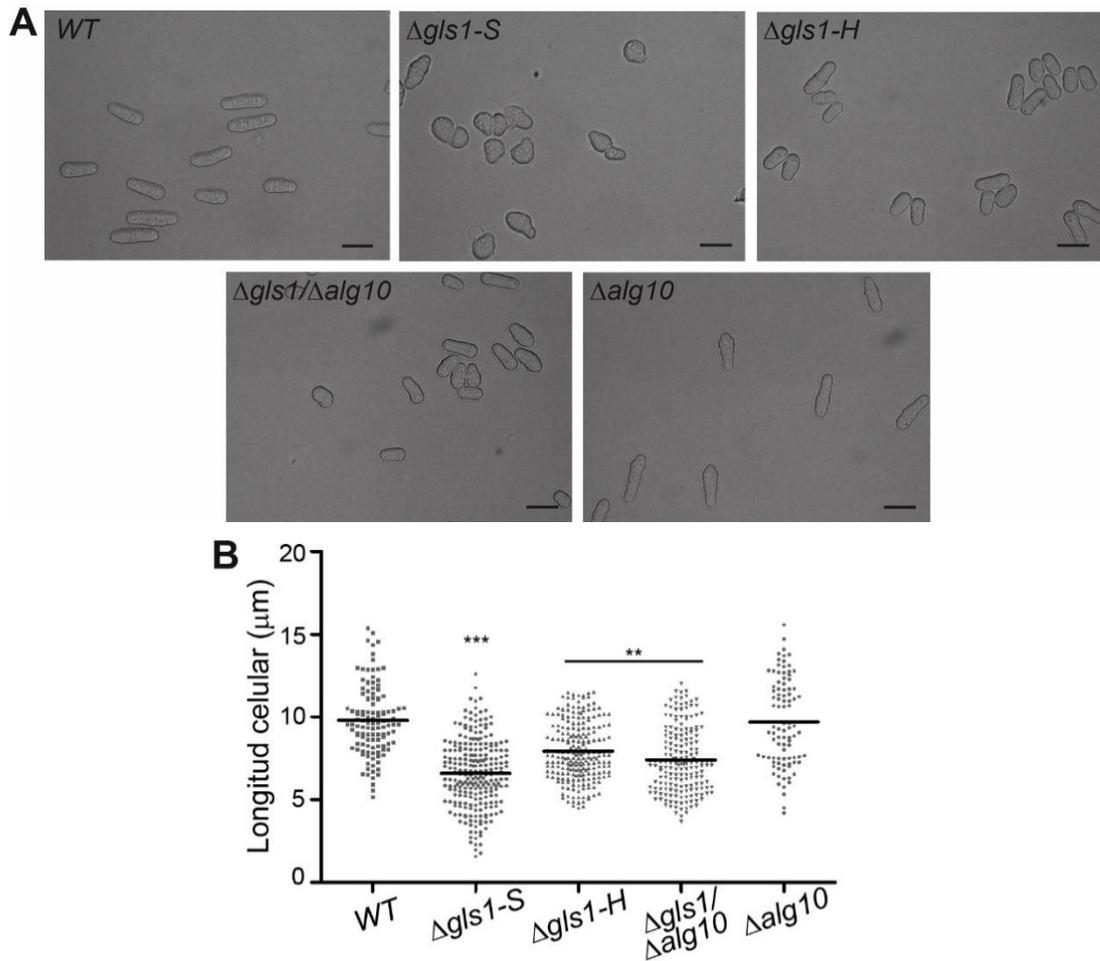


Figura 30. La mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$ tiene una longitud similar a la $\Delta gls1-H$

(A) Las células fueron crecidas en medio YEA líquido hasta $DO_{600\text{nm}} = 1.0$ y se tomaron imágenes de los cultivos frescos por microscopía de transmisión como se describe en la Figura 24 A. Barra= 5 μm . (B) Por software ImageJ se midió el tamaño de al menos 180 células por cepa y se cuantificó. La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni para pares apareados de columnas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (***) $p < 0.0001$ y ** $p < 0.001$). Los datos de la cepa WT y mutantes $\Delta gls1-S$ y $\Delta gls1-H$ son los mismos que los de la Figura 24 B.

Debido a que en la cepa $\Delta gls1-H$ apareció de manera espontánea una mutación supresora en el gen *alg10* durante la meiosis y esporulación para la obtención de mutantes carentes de GI, podría ocurrir que la tendencia a la supresión sea una estrategia de supervivencia durante el crecimiento vegetativo en una mutante con una tasa de crecimiento tan lenta. Para corroborar esto, se crecieron mutantes $\Delta gls1-S$ hasta llegar a fase estacionaria, a partir de allí se inició un cultivo nuevo durante al menos 5 veces y se comparó el crecimiento del cultivo final resultante ($\Delta gls1-S-R$) con el de la mutante $\Delta gls1-H$. Las mutantes $\Delta gls1-S-R$ y $\Delta gls1-H$ alcanzaron el mismo crecimiento en medio YEA sólido (Figura 31), sugiriendo que el defecto en la mutante $\Delta gls1-S$ es tan severo que tiende a revertir por aparición de mutaciones supresoras.

Todos juntos, estos resultados señalan que los defectos severos de la mutante carente de GI pueden suprimirse, o al menos aliviarse significativamente, por una mutación simultánea en el gen *alg10*.

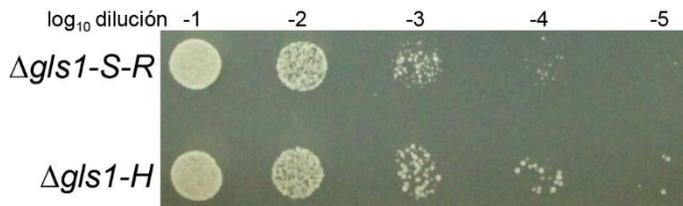


Figura 31. La mutante *Δgls1-S* tiende a revertir el defecto de crecimiento luego de varios pasajes

Las mutantes *Δgls1-S* y *Δgls1-H* fueron crecidas en medio YEA hasta saturación, diluidas a $DO_{600nm} = 1.0$ en medio fresco y crecidas nuevamente hasta saturación durante 4 veces. Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron gotas de 5 μ l en medio YEA sólido y se incubaron a 28°C durante 72 horas. *Δgls1-S-R* proviene de *Δgls1-S* luego de varios pasajes de replicación.

El perfil de glicanos de la mutante *Δgls1/Δalg10* coincide con el de la mutante *Δgls1-H*

Para verificar que la interrupción en el gen *alg10* produce únicamente Dol-PP-glicanos de tipo G2M9 en el contexto de una mutación *Δgls1*, se determinó el perfil de glicanos producido *in vivo* por *S. pombe* doble mutante *Δgls1/Δalg10*. El perfil de glicanos unidos a lípido mostró principalmente G2M9 y una pequeña cantidad de G1M9 (Figura 32 A). A diferencia la mutante *Δgls1-H* (Figura 27 C), en la doble mutante *Δgls1/Δalg10* no se produjo G3M9, lo cual es consistente con la ausencia completa de actividad del producto del gen *alg10*. El perfil de *N*-glicanos de *Δgls1/Δalg10* mostró principalmente M9 (Figura 32 B) y, luego de la adición de los inhibidores parciales de GI y GII NM-DNJ y CST, el *N*-glicano más largo observado fue G2M9 (Figura 32 C), indicando que la estructura M9 observada provino del procesamiento de G2M9 por la GII.

Juntos, estos resultados confirman que las células con una mutación en el gen *alg10* sintetizan G2M9 y que ese defecto puede suprimir el fenotipo enfermo observado en las mutantes que carecen de GI. El glicano G2M9 transferido por las mutantes *Δgls1-H* y *Δgls1/Δalg10* sería reconocido por la GII que clivaría las Glc internas *m* y *l* (Figura 2) permitiendo que las glicoproteínas ingresen al QC y continúen su destino por la vía secretoria. Estos resultados también sugieren que la falta de GI produce acumulación de la forma triglicosilada de los *N*-glicanos en las glicoproteínas como consecuencia de no poder clivar la Glc más externa, y que ésta podría ser la causa del defecto severo de crecimiento observado en la mutante *Δgls1-S*.

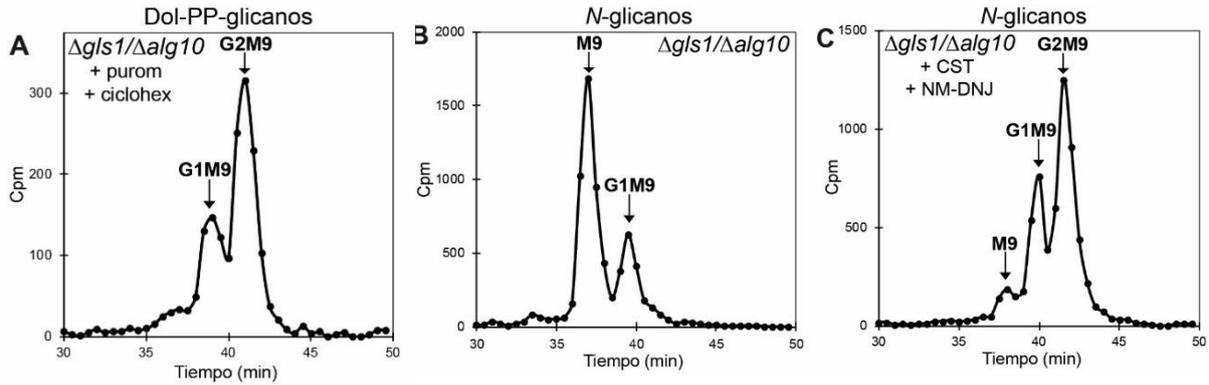


Figura 32. Perfiles de glicanos unidos a lípido y *N*-glicanos de la doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$

A) Se marcaron cultivos de *S. pombe* en fase exponencial crecidos en medio YEA *in vivo* con [^{14}C]Glc 300 Ci/mol durante 15 minutos a 28°C en presencia de puromicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y cicloheximida 75 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir la síntesis de proteínas. Se purificaron los glicanos sin el lípido por hidrólisis ácida suave. B-C) Alternativamente, se marcaron en presencia de DTT 5 mM para inhibir la salida de glicoproteínas del RE (B), y en presencia de inhibidores de glucosidasas NM-DNJ 5 mM y CST 5 mM (C). Se purificaron los *N*-glicanos marcados sensibles a Endo H. Todos los glicanos se resolvieron por HPLC. Se indican las posiciones de los estándares.

El fenotipo enfermo de las mutantes $\Delta gls1-S$ no se debe a la imposibilidad de sus glicoproteínas de entrar en los ciclos de QC del RE

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la mutación en el gen que codifica para la Gl produce un fenotipo muy enfermo, que esta mutante acumula glicoproteínas con *N*-glicanos de estructura G3M9 y que sus defectos de crecimiento pueden ser suprimidos por una mutación adicional en el gen *alg10*. Dicho gen codifica para la glucosiltransferasa responsable del último paso de la síntesis del G3M9 (Figura 3), la adición de la Glc más externa (*n*) sobre la rama A (Figura 2). Una mutación en el gen *alg10* produce la síntesis de Dol-PP-glicanos de estructura G2M9 que son transferidos a las proteínas por la OST (si bien con menor eficiencia que la estructura G3M9) y que, en el contexto de una mutante $\Delta gls1$, podrían evitar la formación y acumulación en el RE de proteínas con estructuras G3M9 que no pueden ser procesadas. Todos estos resultados sugieren que la presencia de G3M9 en las glicoproteínas sería tóxica para la célula. El próximo paso fue entonces intentar comprender por qué la presencia de tres Glc en la estructura del *N*-glicano resulta tan tóxica.

Inmediatamente luego de la *N*-glucosilación, los *N*-glicanos G3M9 son procesados por Gl y GII, produciendo G1M9 que interactúa con la lectina chaperona CNX y facilita el plegado y QC de proteínas en el RE (D'Alessio et al., 2010; Parodi et al., 2015) (Figura 6). Como primera hipótesis, se propuso que los efectos celulares producidos por la

acumulación de glicoproteínas que tienen 3 Glc en sus *N*-glicanos en mutantes $\Delta gls1$ podrían deberse a un impedimento de estas glicoproteínas para entrar a los ciclos de QC ya que la estructura G3M9 no puede interactuar con CNX. Para evaluar esta hipótesis, se comparó el crecimiento de la mutante $\Delta gls1-S$ con una mutante de *S. pombe* que carece de la subunidad catalítica de la GII ($\Delta gls2\alpha$) y que por lo tanto sus glicoproteínas acumulan el *N*-glicano G2M9 ya que el pasaje a G1M9 está bloqueado (Soussilane et al., 2009). Debido a que CNX reconoce exclusivamente estructuras monoglucosiladas, las glicoproteínas del RE de la mutante $\Delta gls2\alpha$ no pueden interactuar con dicha lectina ni entrar a los ciclos de QC, de la misma manera que ocurre con las glicoproteínas de la mutante $\Delta gls1$. Como se observa en la Figura 33, la mutante $\Delta gls2\alpha$ creció con normalidad, de manera comparable a una cepa *WT* y mucho mejor que la mutante $\Delta gls1-S$. Este resultado indica que la imposibilidad de las glicoproteínas de la vía secretoria de interactuar con CNX o de entrar a los ciclos de QC no se ve reflejada en la tasa de crecimiento global y no puede explicar el fenotipo enfermo observado en la mutante $\Delta gls1-S$. Además, muestra que la acumulación de G2M9 en las glicoproteínas no sería tan grave como la acumulación de G3M9.

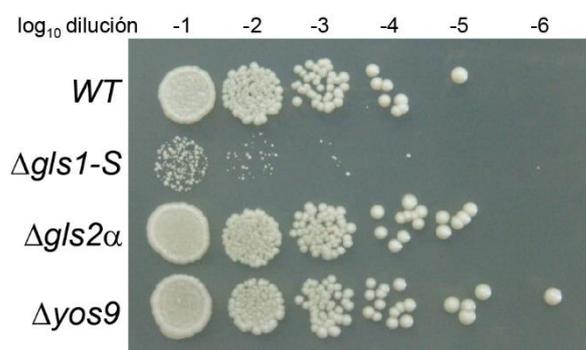


Figura 33. El crecimiento lento de $\Delta gls1-S$ no está relacionado con la incapacidad de sus glicoproteínas de entrar en los ciclos de QC del RE o en la vía de ERAD

Las cepas indicadas fueron crecidas en medio YEA hasta saturación y diluidas a $DO_{600nm} = 1.0$. Se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron gotas de 5 μ l en medio YEA sólido y se incubaron a 28°C durante 72 horas.

La degradación limitada de proteínas mal plegadas no explica el fenotipo de crecimiento lento de la mutante $\Delta gls1-S$

Durante el plegamiento de proteínas en el RE, aquellas proteínas mal plegadas o ensambladas de manera incompleta que no pueden alcanzar su estructura nativa son reconocidas y señalizadas para ser retrotranslocadas al citosol y degradadas en los proteasomas a través de la vía de ERAD (Parodi et al., 2015; Roth and Zuber, 2017). La permanencia prolongada de estas proteínas en el RE expone las Man de las ramas B y C de sus *N*-glicanos (Figura 2) a manosidasas que las clivan, dando estructuras reconocidas por lectinas chaperonas que re-direccionan esas proteínas hacia el citosol.

Una hipótesis alternativa para explicar el defecto observado en la mutante $\Delta gls1-S$ es que las proteínas con *N*-glicanos triglucosilados, al no poder entrar al QC, permanecerían un tiempo prolongado en el RE produciendo la activación de la respuesta a ERAD. Esta maquinaria, a su vez, tampoco reconocería a estas proteínas con *N*-glicanos triglucosilados y por lo tanto no podría retrotranslocarlas al citosol. La acumulación de glicoproteínas irreversiblemente mal plegadas en el RE por la imposibilidad de degradarlas induciría estrés u otros efectos deletéreos en las mutantes $\Delta gls1-S$, causando el fenotipo enfermo. Para evaluar esta hipótesis, se comparó el crecimiento de $\Delta gls1-S$ con una mutante en la lectina *yos9* ($\Delta yos9$), una proteína soluble del RE homóloga a la OS-9 de mamíferos que participa en la selección de proteínas mal plegadas a través de la unión a *N*-glicanos que actúan como señales para la vía de ERAD (Figura 6) (Buschhorn et al., 2004; Szathmary et al., 2005). Al igual que las cepas $\Delta gls2\alpha$ y *WT*, la mutante $\Delta yos9$ creció con normalidad (Figura 33), indicando que la degradación limitada de glicoproteínas mal plegadas no es tan severa como la acumulación de proteínas con *N*-glicanos triglucosilados.

El crecimiento lento de $\Delta gls1-S$ no se debe a una hipoglicosilación de proteínas causada por inhibición de la OST por producto

Los resultados hasta acá obtenidos apuntan a la acumulación de proteínas con *N*-glicanos triglucosilados como la causa de los defectos severos observados en la mutante de *S. pombe* $\Delta gls1-S$. Esa acumulación de proteínas triglucosiladas podría inhibir al complejo OST ya que son el producto de su reacción de transferencia. Como consecuencia de esa inhibición se reduciría la tasa de transferencia de glicanos resultando en hipoglicosilación de proteínas. Para estudiar si en la mutante $\Delta gls1-S$ se produce una hipoglicosilación de proteínas que pudiera explicar al menos en parte su fenotipo, se analizó el estado de *N*-glicosilación de la proteína endógena CNX, una glicoproteína residente del RE con un único sitio de *N*-glicosilación que se presenta en dos isoformas, una soluble y una unida a membrana (Nunez et al., 2015). Se prepararon extractos proteicos de las mutantes, se trataron o no con Endo H y por inmunodetección se observó que CNX de membrana mostró un corrimiento en la migración de aproximadamente 2 kDa en todas las cepas analizadas (Figura 34 A). Solo las mutantes $\Delta gls1-H$, $\Delta gls1/\Delta alg10$ y $\Delta alg10$ mostraron un patrón de hipoglicosilación en ausencia de tratamiento con Endo H, consistente en una doble banda: la superior correspondiente a CNX glicosilada y la inferior a CNX no glicosilada. No se observó doble banda en la mutante $\Delta gls1-S$ en ausencia de Endo H, indicando que CNX no está hipoglicosilada en

esta mutante y que por lo tanto la habilidad de la OST de transferir glicanos a las proteínas no está inhibida por producto (Figura 34 A).

Este resultado, sin embargo, no descarta la posibilidad de que otras glicoproteínas de $\Delta gls1-S$ estén hipoglicosiladas debido a una transferencia de glicanos ineficiente por la OST. Si esto fuera así, la sobreexpresión de la OST debería aliviar la hipoglicosilación que ocurriera en cualquier glicoproteína del RE y no solo CNX. Para evaluar esta hipótesis, se sobreexpresó en la mutante $\Delta gls1-S$ la OST de *L. major* que consiste únicamente en la subunidad catalítica STT3 y no estaría inhibida por la acumulación de *N*-glicanos triglucosilados ya que su sustrato natural es M9, el glicano principal sintetizado en esos parásitos (Parodi, 1993). Esta enzima tiene, además, un amplio rango de especificidad ya que es capaz de transferir la forma completa del glicano G3M9 y formas intermedias de manera eficiente, sin preferencia ni especificidad aparente (Nasab et al., 2008). La variante STT3D de *L. major* fusionada a un tag de HA (LmSTT3D) fue expresada en el RE de las cepas *WT* y $\Delta gls1-S$ de *S. pombe* y se corroboró la correcta expresión y localización por inmunodetección, detectando mayor concentración de la misma en fracciones enriquecidas de RE con respecto a los extractos proteicos totales correspondientes (Figura 34 B). Para verificar que la LmSTT3D, además de expresarse correctamente, fuera capaz de revertir la hipoglicosilación de proteínas, se expresó en una mutante $\Delta alg6$ que, como se vio en el capítulo I, hipoglicosila proteínas y se evaluó el estado de *N*-glicosilación de CNX por inmunodetección. La desaparición de la banda proteica inferior no glicosilada de CNX en la mutante $\Delta alg6$ que sobreexpresa LmSTT3D muestra que la enzima fue capaz de revertir la hipoglicosilación en esta mutante (Figura 34 C).

La mutante $\Delta gls1-S$ que sobreexpresa la LmSTT3D, sin embargo, no mostró una mejoría en su defecto de crecimiento (Figura 34 D), indicando que no se produciría en esta mutante hipoglicosilación de proteínas. Estos resultados muestran que la actividad de la OST no se vio afectada por la acumulación de G3M9 en las glicoproteínas como consecuencia de la falta de actividad de GI y que, por lo tanto, no habría hipoglicosilación de proteínas en la mutante $\Delta gls1-S$ que permita explicar su fenotipo enfermo.

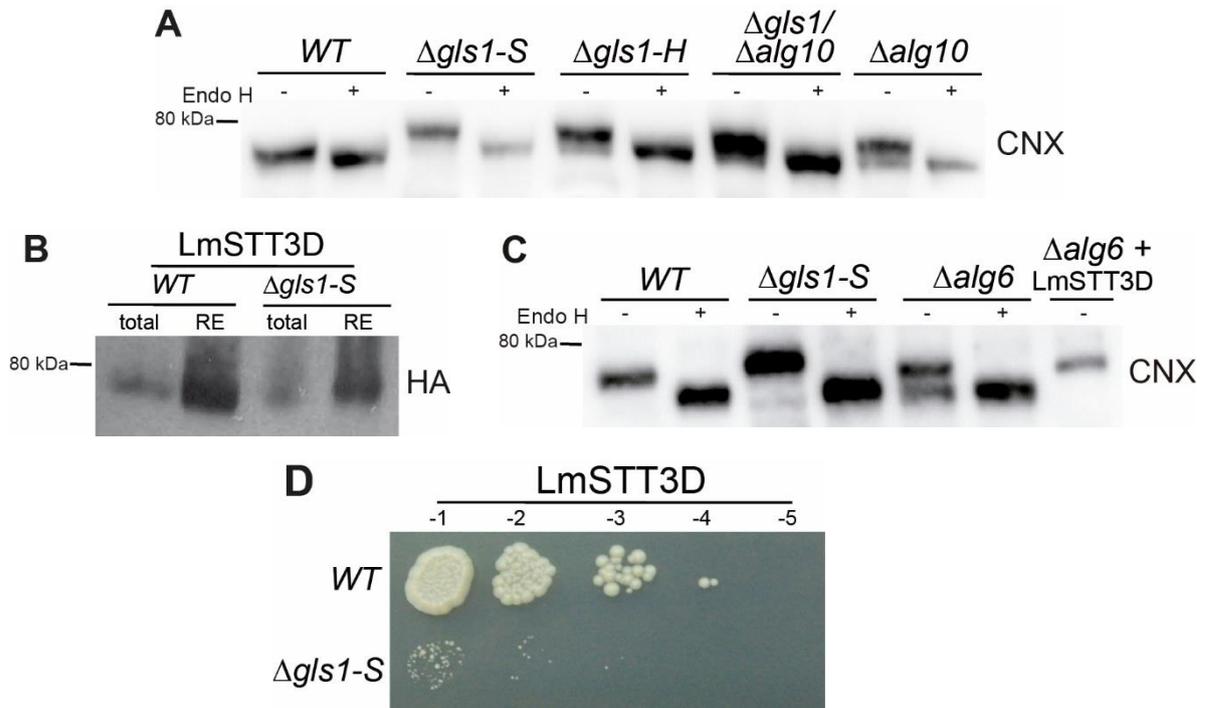


Figura 34. La actividad de la proteína OST no está afectada en la mutante $\Delta gls1-S$

(A) Las cepas de *S. pombe* fueron crecidas en medio YEA hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y sometidas a extracción de proteínas totales, de los cuales 20 μg fueron tratados o no con 1mU de Endo H durante 16 horas a 37°C. Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE 12%, transferidas a una membrana de PVDF y se reveló CNX como se describe en la Figura 18 D. (B) Las cepas WT y $\Delta gls1-S$ fueron transformadas con LmSTT3D marcada con el epítopo HA. Se crecieron cultivos de las transformantes en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y se obtuvieron extractos proteicos totales y fracciones microsomales enriquecidas en RE. 50ug de cada uno fueron resueltos por SDS-PAGE 12% y transferidos a membrana de PVDF. Se detectó la LmSTT3D utilizando como anticuerpo primario anti-HA hecho en rata en una dilución 1: 5000 y como secundario anti-rata conjugado a HRP en una dilución 1: 5000. (C) Se crecieron cultivos de las cepas WT, $\Delta gls1-S$ y $\Delta alg6$ en medio YEA y de la mutante $\Delta alg6$ que sobreexpresa LmSTT3D en medio EMM suplementado con adenina y uracilo hasta $DO_{600nm} = 1.0$ y se obtuvieron extractos proteicos totales. 20 μg fueron tratados o no con 1 mU de Endo H durante 16 horas a 37°C y se inmunodetectó CNX como se describe en la Figura 18 D. (D) Las cepas WT y $\Delta gls1-S$ que sobreexpresan LmSTT3D fueron crecidas en medio YEA hasta saturación y diluidas a $DO_{600nm} = 1.0$. Se realizaron diluciones seriadas al décimo, se sembraron gotas de 5 μl en medio YEA sólido y se incubaron a 28°C durante 72 horas.

La acumulación de glicoproteínas triglucosiladas en el RE produce una pérdida severa de vitalidad y viabilidad de las células

La mutante $\Delta gls1-S$ mostró un crecimiento en medio YEA tanto sólido como líquido muy afectado en comparación con la cepa WT, indicando que la acumulación de proteínas con *N*-glicanos triglucosilados en el RE afectó su crecimiento (Figura 23 B y C). Sin embargo, los requerimientos de síntesis de glicoproteínas en el RE no son los mismos durante las distintas etapas de crecimiento ya que, por ejemplo, durante la fase exponencial se requiere de síntesis más rápida de glicoproteínas que durante el resto de las etapas. Con el objetivo de estudiar cómo la acumulación de proteínas con *N*-glicanos

triglicosilados afecta a las distintas fases de crecimiento de la mutante $\Delta gls1-S$, se estudió la vitalidad y viabilidad de las células. Para el estudio de la vitalidad, se analizó la habilidad de éstas de excluir el colorante vital Phloxin B, un marcador fluorescente que se incorpora a las células de manera pasiva y es excretado activamente sólo por las células metabólicamente activas, tiñendo selectivamente células muertas. La proporción de células tanto vivas como muertas en un cultivo se monitoreó por citometría de flujo (Roux et al., 2006) (Figura 35).

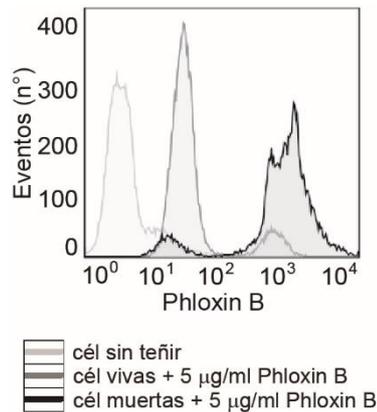


Figura 35. Las células vivas eliminan el colorante vital Phloxin B

Se crecieron cultivos *WT* de *S. pombe* en medio YEA a saturación y se incubaron o no durante 10 minutos a 100°C . Se tomaron 1.4×10^7 células, se adicionó o no Phloxin B $5 \mu\text{g/ml}$, se incubó durante 2 horas a 28°C y 250 rpm y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo.

Como se puede observar en la Figura 36, el porcentaje de células vivas en un cultivo de la mutante $\Delta gls1-S$ fue muy bajo durante toda la curva de crecimiento en comparación con la *WT* ($p < 0.0001$). Al igual que ésta, alcanzó su máximo nivel en fase logarítmica, pero este valor llegó solo al 30%, mientras que para la *WT* se ubicó cerca de 100% de células vivas ($p < 0.0001$). Luego de 24 horas en fase estacionaria, la vitalidad $\Delta gls1-S$ decayó rápidamente a valores cercanos a cero. La vitalidad de la cepa $\Delta gls1-H$ fue significativamente más alta que la de $\Delta gls1-S$ en prácticamente todas las etapas de crecimiento ($p < 0.001$). Estos valores, a su vez, correspondieron aproximadamente a un 50-60% de los valores de la cepa *WT*, lo cual es consistente con los parámetros de la curva de crecimiento de la $\Delta gls1-H$ que, si bien son significativamente mejores que los de la mutante $\Delta gls1-S$, no alcanzaron los valores de la cepa *WT*. La mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$ mostró la misma vitalidad que la cepa $\Delta gls1-H$ en todas las etapas de crecimiento, con un porcentaje de células vivas superior al de la $\Delta gls1-S$, principalmente en la fase lag ($p < 0.001$), y correspondiendo a un 35-50% de los valores de la *WT* ($p < 0.001$).

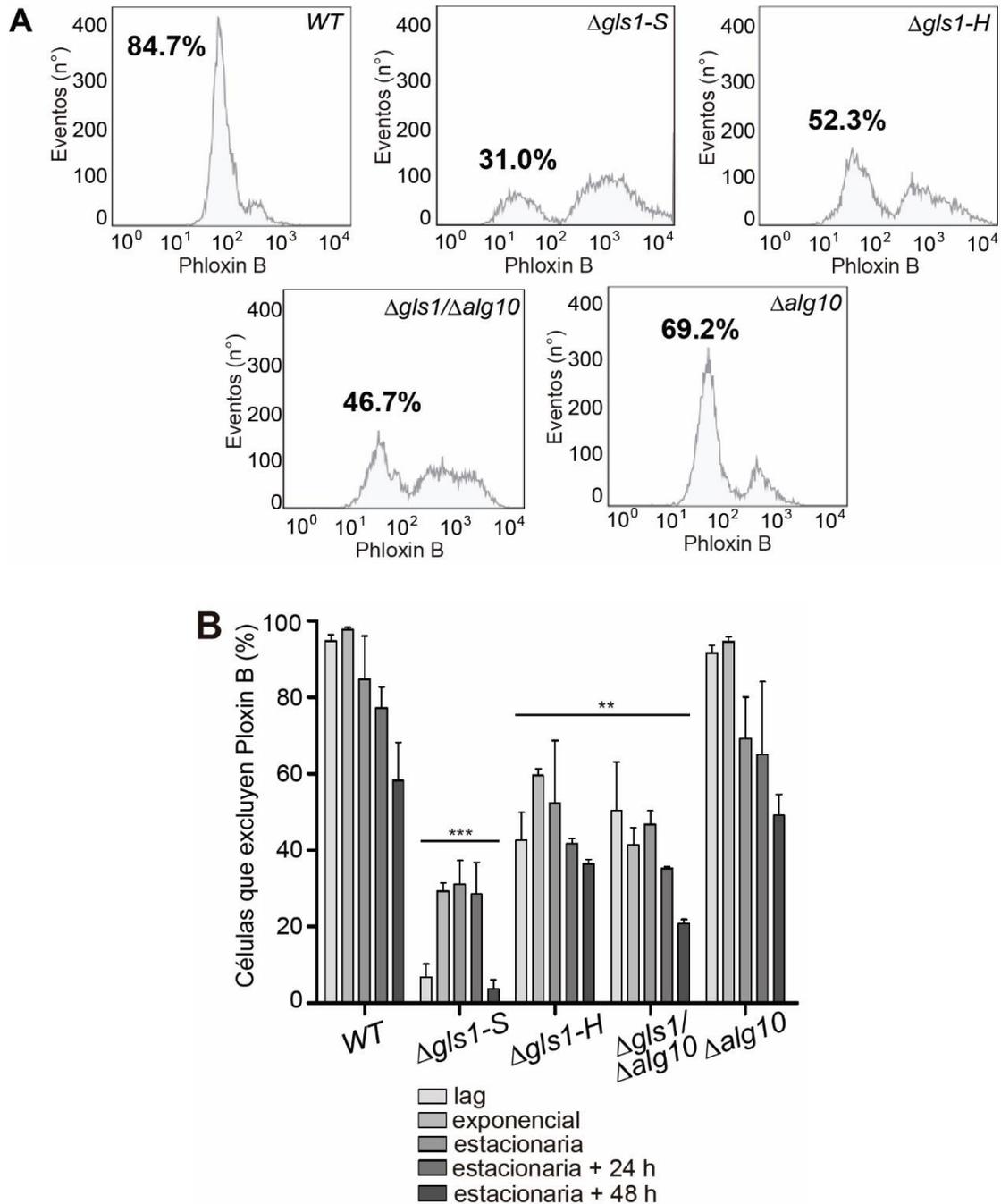


Figura 36. La mutante $\Delta gls1-S$ presenta una vitalidad muy baja durante todo el crecimiento
 (A) Se crecieron cultivos de *S. pombe* en 50 ml de medio YEA líquido a partir de $DO_{600nm} = 0.2$ y durante 5 días como se describe en la Figura 23 C. Cada 4 horas se tomaron 1.4×10^7 células y se adicionó Phloxin B $5 \mu g/ml$, se incubó durante 2 horas a $28^\circ C$ y 250 rpm y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo. Se muestra a modo de ejemplo el porcentaje de células vivas que están llegando a fase estacionaria y rechazan el colorante vital. (B) Se cuantificó el porcentaje de células que excluyen Phloxin B en todas las etapas de la curva de crecimiento. Se tomaron al menos 3 muestras independientes para cada punto. La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni para pares apareados de columnas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (** $p < 0.0001$ y ** $p < 0.001$).

Por otro lado, se estudió la viabilidad de las células, es decir, la capacidad de duplicarse y formar colonias. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de la curva de crecimiento, se diluyeron y sembraron en medio YEA sólido y se cuantificaron las UFC (Roux et al., 2006). Se observó que la viabilidad de la mutante $\Delta gls1-S$ fue muy baja en cualquier momento de la curva (Figura 37). En fase exponencial, solamente alrededor del 10% de las células fueron capaces de duplicarse y generar una colonia visible, en contraste con el 40% de las células de la cepa *WT* ($p < 0.0001$). Esto podría explicar que la velocidad de duplicación de la cepa $\Delta gls1-S$ en fase exponencial sea 4 veces menor que la de la *WT* (tabla 4). En fase estacionaria, la viabilidad decayó a valores cercanos a cero, lo que podría explicar, al menos en parte, el lag tan prolongado que se observa para esta mutante. La mutante $\Delta gls1-H$ mostró una viabilidad significativamente superior a la de la mutante $\Delta gls1-S$ en la mayoría de los puntos de la curva, principalmente en fase exponencial ($p < 0.001$) pero que, sin embargo, no alcanzaron los valores de la cepa *WT*. La doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$, en consonancia con los resultados obtenidos, se comportó de la misma manera que la $\Delta gls1-H$ y mostró una viabilidad superior a la de la mutante $\Delta gls1-S$ e inferior a la de la cepa *WT* en todas las etapas de crecimiento ($p < 0.001$ para la mayoría de las fases analizadas). La mutante $\Delta alg10$ no mostró diferencias de vitalidad ni viabilidad con respecto a la cepa *WT*, observándose únicamente una caída un poco más significativa de ambos parámetros de la cepa $\Delta alg10$ a partir del día 3 en fase estacionaria ($p < 0.01$).

El recuento de colonias provee información del número de células viables capaces de reasumir el crecimiento, mientras que no refleja la vitalidad de las células en cultivo (Roux et al., 2006). Para las cepas aquí analizadas, se observó que la proporción de células metabólicamente activas es mayor que el número de células replicativamente activas, es decir, que hay células que están vivas pero que son incapaces de reasumir el crecimiento. Esto, además, se intensificó con el envejecimiento del cultivo.

En resumen, tanto la vitalidad como la viabilidad de la mutante $\Delta gls1-S$ están severamente comprometidas, lo que explica, al menos en parte, el fenotipo de crecimiento enfermo que muestra esta mutante. A su vez, estos marcadores metabólicos mejoran en las mutantes $\Delta gls1-H$ y $\Delta gls1/\Delta alg10$, coincidiendo con un alivio en el crecimiento de estas cepas. Estos resultados se suman a los ya obtenidos y sostienen la hipótesis de que la acumulación de *N*-glicanos triglucosilados en la mutante $\Delta gls1-S$ sería la responsable de la pérdida de vitalidad y viabilidad de esta mutante.

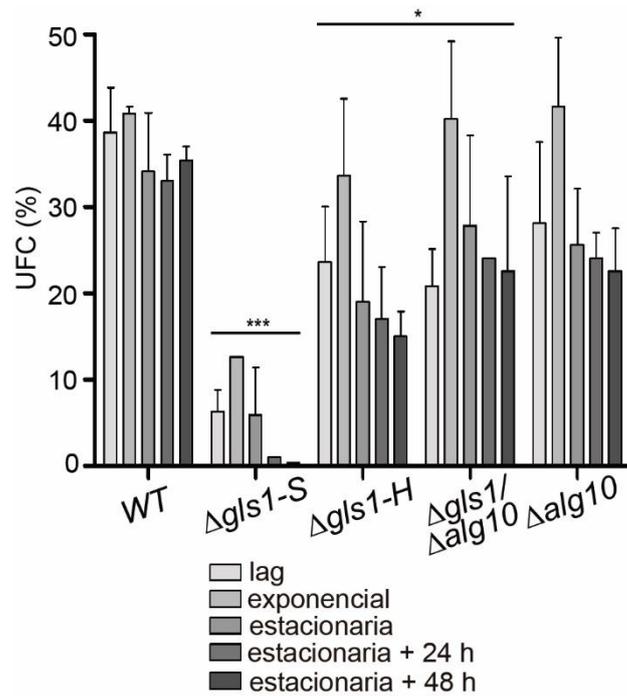


Figura 37. La viabilidad de la mutante Δ *gls1-S* es muy baja

Se crecieron cultivos de *S. pombe* en 50 ml de medio YEA líquido a partir de $DO_{600nm} = 0.2$ y durante 5 días como se describe en la Figura 23 C. Cada 4 horas se tomó una alícuota, se diluyó y sembró en medio YEA sólido, se incubó hasta 10 días a 28°C y se contó el número total de colonias aparecidas. Se tomaron al menos 3 muestras independientes para cada punto. La significancia estadística fue calculada mediante test de Bonferroni para pares apareados de columnas. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto a la WT (***) $p < 0.0001$ y * $p < 0.05$).

Conclusiones

Capítulo I

Estudio de las bases moleculares de las CDG de tipo I: influencia de la estructura del glicano en la eficiencia de su transferencia a proteínas

- Se reprodujeron en *S. pombe* los defectos genéticos que dan lugar a las CDG de tipo I debidas a defectos en la biosíntesis de Dol-PP-glicanos y se construyeron mutantes que sintetizan toda la combinación de Dol-PP-glicanos posibles.
- Se estableció un sistema para cuantificar la hipoglicosilación en estas mutantes de manera precisa y sensible mediante la utilización de un biosensor GlyGFP.
- Se determinó que tanto de los residuos de Glc como de Man que componen la estructura de Dol-PP-glicano son necesarios para el reconocimiento del mismo por la OST, pero que, sin embargo, la presencia de los residuos de Glc es más importante que la de Man en este proceso de reconocimiento y transferencia por parte de la OST.
- Se validaron los resultados obtenidos mediante el estudio de la hipoglicosilación de glicoproteínas endógenas de pared celular de *S. pombe*, confirmando la eficacia del biosensor desarrollado como metodología para medir hipoglicosilación en *S. pombe*.
- Se determinó que los defectos en la síntesis del Dol-PP-glicano afectan también a las estructuras de los *N*-glicanos en las glicoproteínas maduras.

Capítulo II

Estudio de las bases moleculares de la CDG-IIb: efectos producidos por la delección de la GI

- Se reprodujo en *S. pombe* el defecto genético observado en pacientes con CDG-IIb generada por defectos en el gen *gls1*. La mutante mostró defectos severos en el crecimiento, viabilidad y morfología.

- Se determinó que una mutación adicional en el gen *alg10*, que codifica para la glicosiltransferasa responsable de la adición de la última Glc y por lo tanto sintetiza G2M9 unido a Dol-PP, suprime los defectos morfológicos y de crecimiento de la mutante Δ *gls1*.

- Se demostró que el crecimiento defectuoso de la mutante Δ *gls1* no se debe a que sus glicoproteínas con G3M9 no puedan entrar a los ciclos de QC, y tampoco a que no puedan ser degradadas por la vía de ERAD.

- Se determinó, además, que dicho fenotipo no puede explicarse por la hipoglicosilación de proteínas debida a inhibición por producto de la OST, ya que la acumulación de glicoproteínas con G3M9 no generó tal inhibición.

- Se propone que la acumulación de glicoproteínas con *N*-glicanos triglicosilados en el RE o en el aparato de Golgi produce una toxicidad que es la responsable del severo defecto en el crecimiento que se observa en las mutantes Δ *gls1*.

Discusión

A lo largo de este trabajo se aportó conocimiento a la comprensión de las bases moleculares que subyacen a las enfermedades congénitas de glicosilación de tipo I y tipo IIb. Para ello, y utilizando a la levadura de fisión *S. pombe* como modelo, se estudió en detalle la relevancia cada residuo de azúcar que componen la estructura del glicano reconocido por la OST y se estudió la hipoglicosilación que se produce como consecuencia de la síntesis de formas truncas de dicho Dol-PP-glicano. Por otro lado, se caracterizó en particular el fenotipo de una levadura que reproduce la CDG-IIb por mutaciones en la GI y se estudiaron posibles hipótesis sobre las consecuencias de la acumulación del *N*-glicano G3M9 en las glicoproteínas del RE.

Durante el primer capítulo de este trabajo, con el objetivo de medir hipoglicosilación de proteínas en mutantes de *S. pombe* que sintetizan Dol-PP-glicanos truncados, se desarrolló una herramienta molecular que consiste en una GFP dirigida al lumen del RE a la que se le incorporó un sitio de *N*-glicosilación cuya ocupación produjo pérdida de fluorescencia (Figura 12). Se realizaron todos los controles y modificaciones necesarios para garantizar que la herramienta desarrollada refleje la eficiencia de la *N*-glicosilación de la mutante que se quisiera medir. Se logró que el biosensor estuviera correctamente direccionado hacia el RE de las células, fuera glicosilable, tuviera un nivel de expresión homogéneo, fuera estable y que no saturara a la maquinaria de *N*-glicosilación.

El biosensor mostró un nivel mínimo de fluorescencia en la cepa *WT* (Figura 13) que aumentó con la inhibición de la *N*-glicosilación por tratamiento con tunicamicina (Figura 14). Estos resultados coincidieron con lo observado en células HeLa (Losfeld, Soncin et al. 2012) y corroboraron que la fluorescencia del biosensor depende de la *N*-glicosilación. Para estudiar la tasa de *N*-glicosilación de una glicoproteína es importante tener en cuenta el nivel de expresión de la misma, ya que la sobreexpresión podría generar que se salteen secuencias consenso y esto produciría que se considere hipoglicosilación donde no la hay. El nivel basal de fluorescencia que se observó en la cepa *WT* correspondió a su tasa normal de *N*-glicosilación ya que la regulación fina del nivel de expresión del biosensor por inhibición de su promotor *nmt1* con tiamina no la mejoró (Figura 18), indicando que la maquinaria de *N*-glicosilación no está saturada en el sistema desarrollado en este trabajo.

Una vez probada la herramienta en las cepas testigo *WT* y $\Delta alg6$, y evaluado que su fluorescencia reflejó las diferencias de *N*-glicosilación que existen entre ambas cepas, se ensayó en las mutantes de *S. pombe* que sintetizan todas las combinaciones de Dol-PP-glicanos posibles (tabla 3). Si bien se han reportado CDG de tipo I por mutaciones en los genes *alg* involucrados en prácticamente todos los pasos de la biosíntesis del Dol-PP-glicano, hasta el momento se desconocía cuál es el grado de hipoglicosilación de las

glicoproteínas en función de la estructura del Dol-PP-glicano sintetizada. En este trabajo se determinó que la presencia de los residuos de Glc de la rama A es más importante que la de residuos de Man de las ramas B y C para que la estructura del glicano sea reconocida por la OST y transferida a la proteína naciente y que a medida que faltan residuos de Man de las ramas B y C disminuye el reconocimiento por la OST (Figuras 19 y 20). Estos resultados complementan los conocimientos actuales que proponían que únicamente el residuo Glc terminal de la estructura G3M9 era importante para el reconocimiento por la OST (Karaoglu et al., 2001; Spiro, 2000).

El grupo del Dr. Markus Aebi desarrolló recientemente una metodología para determinar la eficiencia de la *N*-glicosilación en la levadura *S. cerevisiae*, basada en la actividad de la fosfatasa ácida, una enzima que posee 12 *N*-glicanos en su estructura y cuya secreción al medio extracelular depende de la correcta *N*-glicosilación (Frey and Aebi, 2015). Si bien la metodología fue eficaz en determinar hipoglicosilación en mutantes de *S. cerevisiae* $\Delta alg9$ y $\Delta alg3$ que sintetizan M6 y M5, respectivamente, mostró la limitación de no poder determinar el estado de *N*-glicosilación en mutantes que manifiesten hipoglicosilación severa, ya que la actividad de la fosfatasa ácida decae al 30% y 0% cuando se eliminan 4 y 6 sitios de *N*-glicosilación, respectivamente (Frey and Aebi, 2015). El biosensor GlyGFP desarrollado en este trabajo permitió, en cambio, cuantificar el grado de hipoglicosilación en mutantes que sintetizaron una gran variedad de estructuras Dol-PP-glicano.

Por otro lado, en este trabajo se estudió el grado de hipoglicosilación de proteínas de pared celular *S. pombe* mutantes mediante un abordaje glicoproteómico (Xu et al., 2015). Se determinó la macroheterogeneidad u ocupancia de los sitios N92VS y N203VT de la proteína de pared Ecm33, es decir, la diversidad estructural que presenta esa glicoproteína debida a la presencia o ausencia de *N*-glicanos en cada sitio específico. Los resultados obtenidos mostraron que las mutantes de *S. pombe* que sintetizan Dol-PP-glicanos deglucosilados produjeron los grados de hipoglicosilación más elevados en el sitio estudiado (Figura 21). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos previamente con el biosensor GlyGFP y corroboraron la importancia de los residuos de Glc en la estructura G3M9 para la reacción de transferencia por la OST. Curiosamente, dentro de cada serie de mutantes de *S. pombe*, las mutantes de deglucosilación simples ($\Delta alg10$, $\Delta alg8$ y $\Delta alg6$) que transfieren G2M9, G1M9 y M9, respectivamente, mostraron más hipoglicosilación que las dobles mutantes en las que decae el contenido de Man. Recientemente se analizó la ocupancia de sitios de *N*-glicosilación en mutantes de *S. cerevisiae* en distintos genes *alg* y se observó que, en línea con los resultados obtenidos en este trabajo, las mutantes que sintetizan Dol-PP-glicanos deglucosilados mostraron el

mayor grado de hipoglicosilación (Zacchi and Schulz, 2016). La ventaja que presenta el modelo de *S. pombe* con respecto a *S. cerevisiae* es, como se mencionó, la capacidad de sintetizar la rama A del Dol-PP-glicano a pesar de no tener las ramas B y C completas (Stigliano et al., 2011), lo que permitió ampliar el análisis estudiando mayor cantidad de estructuras intermedias de Dol-PP-glicanos.

Por otra parte, el estudio glicoproteómico permitió determinar la microheterogeneidad de los sitios analizados, es decir, la diversidad estructural de glicoproteínas debida a la presencia de diferentes estructuras de *N*-glicano en un sitio de *N*-glicosilación específico. Los resultados obtenidos mostraron que las mutantes que sintetizaron Dol-PP-glicanos con menor número de residuos de hexosas tuvieron *N*-glicanos menos extendidos en sus glicoproteínas de pared (Figura 22). Esta menor extensión de no se debió, sin embargo, a un problema durante el procesamiento de los *N*-glicanos en el RE o en el aparato de Golgi, ya que en todas las mutantes los *N*-glicanos fueron extendidos de la misma manera. Los resultados obtenidos en el análisis de microheterogeneidad de proteínas de pared de *S. cerevisiae* coinciden con lo reportado en este trabajo (Zacchi and Schulz, 2016). Estos resultados sugieren que la maquinaria de procesamiento de *N*-glicanos de la vía secretoria de las levaduras *S. pombe* y *S. cerevisiae* fue capaz de reconocer estructuras incompletas de *N*-glicanos y modificarlas, pero que sin embargo la síntesis incompleta de Dol-PP-glicanos afectó la estructura final de los mismos en las proteínas nativas, lo que puede tener consecuencias en su funcionamiento. Es importante mencionar que en el trabajo del Dr. Benjamin Schulz se estudiaron entre 8 y 46 glicopéptidos pertenecientes a 15 glicoproteínas, lo que brindó más robustez al análisis de datos. El estudio de una mayor cantidad de sitios de las mutantes *alg* de *S. pombe* permitirá reforzar los resultados obtenidos.

En resumen, en este capítulo del trabajo se desarrolló una herramienta molecular capaz de medir hipoglicosilación en *S. pombe* de manera eficiente y sensible, y se utilizó para demostrar la importancia de cada residuo de azúcar de la estructura del glicano para el reconocimiento y transferencia por parte de la OST en la reacción de *N*-glicosilación. Estos resultados fueron respaldados por un estudio glicoproteómico.

Durante el desarrollo del segundo capítulo de este trabajo, en un intento por comprender las bases moleculares de la patología observada en pacientes con CDG-IIb que presentan mutaciones en el gen que codifica para la GI, se reprodujo en *S. pombe* el defecto genético de esta enfermedad, y se obtuvieron dos mutantes haploides a partir de un único evento de meiosis de una cepa de *S. pombe* diploide heterocigota. Una de las mutantes, $\Delta gls1$ -S, mostró un grave defecto de crecimiento y una morfología aberrante (Figuras 23 y 24), lo cual fue coincidente con la clínica que presentan los pacientes con

CDG-IIb, en los cuales se observa un conjunto de patologías severas entre las que se incluyen crecimiento retardado y discapacidades en el desarrollo (De Praeter et al., 2000; Kim et al., 2018). En el proyecto de análisis global de deleciones de todos los genes *S. pombe*, sin embargo, esta mutante había sido reportada como letal (Kim et al., 2010). Por otro lado, la otra mutante que se obtuvo, $\Delta gls1-H$, mostró un fenotipo casi normal, bastante similar a una cepa *WT* (Figuras 23 y 24). Al estudiarla, se determinó que la causa de que los parámetros de esta mutante fueran más cercanos a los de una cepa *WT* que a los de la mutante $\Delta gls1-S$ fue una mutación supresora. Esta mutación consistió en una inserción puntual en el gen *alg10* (Figura 28) que dio lugar a que en estas mutantes se sintetizara y transfiriera G2M9 en lugar de G3M9. De esta manera, se sobrepasó o “bypaseo” la necesidad del corte de la Glc terminal por parte de la Gl (D'Alessio et al., 2010; Parodi et al., 2015). Para corroborar que la mutación en el gen *alg10* fue la causa de la mejora en el fenotipo de la mutante $\Delta gls1-S$, se construyó la doble mutante $\Delta gls1/\Delta alg10$, en la que el gen *alg10* fue completamente delecionado, y se corroboró que se comportaba como la mutante $\Delta gls1-H$ (Figura 29 y 30). El hecho de que apareciera una supresión durante la construcción de la mutante $\Delta gls1$, sugiere que la falta de Gl es extremadamente perjudicial para la célula. De hecho, la cepa mostró una tendencia constante a suprimir su fenotipo aberrante ya que luego de algunas rondas de replicación el cultivo comenzó a crecer a una tasa mejor, comparable a la de la mutante supresora $\Delta gls1-H$ (Figura 31).

Los resultados hasta aquí obtenidos parecen indicar que el crecimiento lento y la morfología aberrante observada en la mutante $\Delta gls1-S$ se deben a la falta de deglucosilación de G3M9 unido a proteína. La presencia de este *N*-glicano impide que las proteínas puedan entrar a los ciclos de QC, ya que CNX reconoce exclusivamente estructuras monoglucosiladas. Este impedimento, sin embargo, no pareciera ser la causa del crecimiento lento, ya que mutantes $\Delta gls2\alpha$ que no pueden hidrolizar el G2M9 de sus proteínas (Soussilane et al., 2009) tampoco pueden interactuar con la maquinaria de QC y sin embargo crecieron a tasas normales (Figura 33). La incapacidad de las proteínas con *N*-glicanos triglucosilados de entrar a los ciclos de QC podría generar, entonces, una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, como se sugiere en el caso del hongo patógeno oportunista *Aspergillus fumigatus* deficiente en el gen que codifica para la Gl (*Afcwh41*), donde los niveles de las proteínas de QC CNX y Lhspl están aumentados (Zhang et al., 2009), o en el gusano *C. elegans* knock down para el gen *agl-1*, responsable de la síntesis de Gl, donde la chaperona HSP-4, un marcador de estrés del RE, está inducida, indicando que en estos gusanos se induce la vía de señalización de la

respuesta a proteínas mal plegadas por acumulación de las mismas en el RE (Kato et al., 2013). Las proteínas mal plegadas que acumulan G3M9 podrían no ser degradadas por la vía de ERAD si las lectinas que las señalizan para su retrotranslocación al citosol y posterior degradación no las reconocieran (Xie and Ng, 2010). Esta supuesta incapacidad de degradar proteínas mal plegadas con *N*-glicanos triglucosilados tampoco explicó el fenotipo de crecimiento lento ya que mutantes $\Delta yos9$, que tienen completamente impedida la vía de ERAD, no manifestaron problemas en el crecimiento (Figura 33). Otra hipótesis para explicar el fenotipo observado en la mutante $\Delta gls1-S$ es que la presencia de proteínas con G3M9 podría generar inhibición de la enzima de la cual son producto, la OST, provocando hipoglicosilación general de proteínas en la célula. En este trabajo no se observó hipoglicosilación de CNX, una proteína endógena residente del RE, y tampoco se observó una mejoría en el crecimiento de las mutantes $\Delta gls1-S$ al sobreexpresar la OST de *L. major* LmSTT3D, cuyo sustrato es el *N*-glicano M9 (Parodi 1993) y por lo tanto no es inhibida por G3M9 (Figura 34). Si bien no se puede descartar la posibilidad de que ocurra hipoglicosilación en alguna proteína clave, los resultados aquí mostrados apuntan a que la acumulación de glicoproteínas con G3M9 en la mutante $\Delta gls1-S$ no generaría hipoglicosilación de proteínas por inhibición de la OST que pudiera explicar su fenotipo aberrante. Estos datos coinciden con lo observado en pacientes, donde la ausencia de GI no afecta la actividad de otras proteínas de la vía de *N*-glicosilación, entre ellas la OST (Volker et al., 2002).

En estos pacientes, por otro lado, se ha detectado la sobreexpresión de una endo- α 1,2-manosidasa del aparato de Golgi que cliva G3M de la estructura G3M9 dejando M8 unido a las proteínas (De Praeter et al., 2000; Volker et al., 2002). Esto permitiría a las glicoproteínas continuar su camino por la vía secretoria ya que alrededor del 80% de los *N*-glicanos de estos pacientes son procesados correctamente y presentan estructuras similares a las observadas en células sanas. Sin embargo, los pacientes aun muestran fenotipos extremadamente severos, lo que indica que sobreexpresión de la endomanosidasa en el aparato de Golgi no es capaz de compensar la totalidad del defecto en la GI. Este mecanismo compensatorio indica, de todas maneras, que las vías mediadas por estas enzimas no operan de manera independiente (Roth et al., 2003). La levadura de fisión *S. pombe* no posee esta endomanosidasa del aparato de Golgi, por lo que sería interesante evaluar si la sobreexpresión de esta enzima de manera heteróloga en el aparato de Golgi de la mutante $\Delta gls1-S$ revierte el fenotipo de crecimiento lento. Parte del trabajo que continuará esta tesis implica la realización de estos experimentos.

Tanto el fenotipo aberrante observado en las mutantes de *S. pombe* $\Delta gls1-S$ como la clínica severa que manifiestan los pacientes con CDG-IIb indican que la falta de GI es extremadamente perjudicial. La tendencia a generar mutantes supresoras, por un lado, y la inducción de la endomanosidasa en pacientes, por el otro, reflejan la necesidad de las células de generar mecanismos que les permitan aliviar este fenotipo.

Los resultados presentados a lo largo este trabajo apuntan a que el fenotipo enfermo de la mutante $\Delta gls1-S$ se debe a la acumulación de *N*-glicanos triglucosilados como consecuencia de la falta de actividad de la enzima GI. Sin embargo, no se puede descartar que la enzima también tenga un rol estructural, dado que se encuentra en estrecha proximidad con la OST (Roth and Zuber, 2017) y ésta, a su vez, con el translocón (Pfeffer et al., 2014). En el laboratorio se estudiará esta hipótesis.

En *S. cerevisiae*, la disrupción del gen *cwh41* no mostró defectos de crecimiento detectables (Romero et al., 1997) (Jian, Bussey 1996). La eliminación del gen *Afcwh41* en *A. fumigatus* causa un fenotipo severo, que incluye una reducción significativa de alrededor del 50% en la formación de conidios y anomalías en el crecimiento polar y la septación (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2008). En el caso de semillas de *A. thaliana* deficientes en GI se acumula un nivel bajo de proteínas de almacenamiento, lo que afecta a la posterior diferenciación celular (Boisson et al., 2001). El mutante *agl-1* de *C. elegans* no muestra fenotipo conductual o visible, y no presenta diferencias en el número de huevos puestos ni tasas de eclosión, sin embargo, la duración de la vida se vio acortada a menos de la mitad con respecto al gusano *WT* (Kato et al., 2013). En este trabajo se logró reproducir en la levadura de fisión el fenotipo que ocurre en pacientes que padecen CDG-IIb, la mutante $\Delta gls1-S$ de *S. pombe* mostró una reducción drástica de la vitalidad y viabilidad a lo largo de toda su curva de crecimiento (Figuras 36 y 37). Observaciones preliminares de la mutante $\Delta gls1-S$ por microscopía electrónica de transmisión realizadas en nuestro laboratorio mostraron en esta mutante una pared celular engrosada y de apariencia difusa, donde no se observó la organización característica de la pared celular de *S. pombe* consistente en 3 capas distinguibles por la diferencia de densidad electrónica (Perez and Ribas, 2017). Estos datos coinciden con lo observado en células de *A. thaliana* mutantes en GI que muestran formaciones incompletas de la pared celular (Boisson et al., 2001), o con mutantes *Afcwh41* de *A. fumigatus* donde también se vio afectada la síntesis de la pared celular (Zhang et al., 2008) y sugieren la relevancia de la GI en la integridad de la pared celular de diferentes organismos.

En resumen, en el segundo capítulo del trabajo se demostró que la incapacidad para deglucosilar *N*-glicanos G3M9 unidos a proteínas en el RE resultó extremadamente tóxica

para la levadura de fisión *S. pombe*. Se propone que la persistencia de esas estructuras en el RE podría ser al menos en parte responsable del severo defecto en el crecimiento que se observa en la mutante $\Delta gls1$.

Todos los resultados presentados en esta tesis aportaron información novedosa para una mejor comprensión de las bases moleculares que subyacen a las enfermedades congénitas de glicosilación humanas.

Bibliografía

- Abu Bakar, N., Lefeber, D.J., van Scherpenzeel, M., 2018. Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Journal of inherited metabolic disease* 41, 499-513.
- Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2430-2437.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N., 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473, 4-8.
- Bai, L., Wang, T., Zhao, G., Kovach, A., Li, H., 2018. The atomic structure of a eukaryotic oligosaccharyltransferase complex. *Nature* 555, 328-333.
- Barker, M.K., Rose, D.R., 2013. Specificity of Processing alpha-glucosidase I is guided by the substrate conformation: crystallographic and in silico studies. *J Biol Chem* 288, 13563-13574.
- Barker, M.K., Wilkinson, B.L., Faridmoayer, A., Scaman, C.H., Fairbanks, A.J., Rose, D.R., 2011. Production and crystallization of processing alpha-glucosidase I: *Pichia pastoris* expression and a two-step purification toward structural determination. *Protein expression and purification* 79, 96-101.
- Bertozzi, C.R., Rabuka, D., 2009. Structural Basis of Glycan Diversity, in: nd, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY).
- Boisson, M., Gomord, V., Audran, C., Berger, N., Dubreucq, B., Granier, F., Lerouge, P., Faye, L., Caboche, M., Lepiniec, L., 2001. Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *The EMBO journal* 20, 1010-1019.
- Brasil, S., Pascoal, C., Francisco, R., Marques-da-Silva, D., Andreotti, G., Videira, P.A., Morava, E., Jaeken, J., Dos Reis Ferreira, V., 2018. CDG Therapies: From Bench to Bedside. *International journal of molecular sciences* 19.
- Bredeston, L.M., Marino-Buslje, C., Mattera, V.S., Buzzi, L.I., Parodi, A.J., D'Alessio, C., 2017. The conundrum of UDP-Glc entrance into the yeast ER lumen. *Glycobiology* 27, 64-79.
- Burda, P., Aebi, M., 1999. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426, 239-257.
- Burda, P., Borsig, L., de Rijk-van Andel, J., Wevers, R., Jaeken, J., Carchon, H., Berger, E.G., Aebi, M., 1998. A novel carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome characterized by a deficiency in glycosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. *J Clin Invest* 102, 647-652.
- Buschhorn, B.A., Kostova, Z., Medicherla, B., Wolf, D.H., 2004. A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett* 577, 422-426.
- Cali, T., Vanoni, O., Molinari, M., 2008. The endoplasmic reticulum crossroads for newly synthesized polypeptide chains. *Progress in molecular biology and translational science* 83, 135-179.
- Castro, O., Movsichoff, F., Parodi, A.J., 2006. Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14756-14760.
- Cylwik, B., Naklicki, M., Chrostek, L., Gruszewska, E., 2013. Congenital disorders of glycosylation. Part I. Defects of protein N-glycosylation. *Acta biochimica Polonica* 60, 151-161.
- Chantret, I., Dancourt, J., Dupre, T., Delenda, C., Bucher, S., Vuillaumier-Barrot, S., Ogier de Baulny, H., Peletan, C., Danos, O., Seta, N., Durand, G., Oriol, R., Codogno, P., Moore, S.E., 2003. A deficiency in dolichyl-P-glucose:Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl alpha3-glycosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation. *J Biol Chem* 278, 9962-9971.
- D'Alessio, C., Caramelo, J.J., 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.
- D'Alessio, C., Fernandez, F., Trombetta, E.S., 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.
- de Groot, P.W., Yin, Q.Y., Weig, M., Sosinska, G.J., Klis, F.M., de Koster, C.G., 2007. Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 24, 267-278.
- De Praeter, C.M., Gerwig, G.J., Bause, E., Nuytinck, L.K., Vliegenthart, J.F., Breuer, W., Kamerling, J.P., Espeel, M.F., Martin, J.J., De Paepe, A.M., Chan, N.W., Dacremont, G.A., Van Coster, R.N., 2000. A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am J Hum Genet* 66, 1744-1756.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A.B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., Gasser, B., 2013. The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS microbiology reviews* 37, 872-914.
- Fanchiotti, S., Fernandez, F., D'Alessio, C., Parodi, A.J., 1998. The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *The Journal of cell biology* 143, 625-635.
- Faridmoayer, A., Scaman, C.H., 2007. Truncations and functional carboxylic acid residues of yeast processing alpha-glucosidase I. *Glycoconj J* 24, 429-437.
- Fernandez, F.S., Trombetta, S.E., Hellman, U., 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.
- Frank, C.G., Grubenmann, C.E., Eyaid, W., Berger, E.G., Aebi, M., Hennet, T., 2004. Identification and functional analysis of a defect in the human ALG9 gene: definition of congenital disorder of glycosylation type IL. *Am J Hum Genet* 75, 146-150.
- Freeze, H.H., Schachter, H., Kinoshita, T., 2015. Genetic Disorders of Glycosylation, in: rd, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY), pp. 569-582.
- Frey, A.D., Aebi, M., 2015. An enzyme-based screening system for the rapid assessment of protein N-glycosylation efficiency in yeast. *Glycobiology* 25, 252-257.
- Grubenmann, C.E., Frank, C.G., Kjaergaard, S., Berger, E.G., Aebi, M., Hennet, T., 2002. ALG12 mannosyltransferase defect in congenital disorder of glycosylation type Ig. *Human molecular genetics* 11, 2331-2339.
- Hagan, I.M.C., A. M.; Grallert, A.; Nurse. P., 2016. *Fission Yeast. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hedges, S.B., 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nature reviews. Genetics* 3, 838-849.
- Helenius, A., Aebi, M., 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* 73, 1019-1049.
- Herrera Aguilar, N., 2014. Development of molecular tools to measure in vivo protein hypoglycosylation in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Faculty de Pharmacy and Biochemistry University of Buenos Aires.
- Imbach, T., Burda, P., Kuhnert, P., Wevers, R.A., Aebi, M., Berger, E.G., Hennet, T., 1999. A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6982-6987.

- Jaeken, J., Peanne, R., 2017. What is new in CDG? *Journal of inherited metabolic disease* 40, 569-586.
- Jiang, B., Sheraton, J., Ram, A.F., Dijkgraaf, G.J., Klis, F.M., Bussey, H., 1996. CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta 1,6-glucan assembly. *Journal of bacteriology* 178, 1162-1171.
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Gilmore, R., 2001. Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase. *Biochemistry* 40, 12193-12206.
- Katoh, T., Takase, J., Tani, Y., Amamoto, R., Aoshima, N., Tiemeyer, M., Yamamoto, K., Ashida, H., 2013. Deficiency of alpha-glucosidase I alters glycoprotein glycosylation and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Glycobiology* 23, 1142-1151.
- Kelleher, D.J., Gilmore, R., 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16, 47R-62R.
- Kim, D.U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.O., Won, M., Yoo, H.S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., Han, S., Jeffery, L., Baek, S.T., Lee, H., Shim, Y.S., Lee, M., Kim, L., Heo, K.S., Noh, E.J., Lee, A.R., Jang, Y.J., Chung, K.S., Choi, S.J., Park, J.Y., Park, Y., Kim, H.M., Park, S.K., Park, H.J., Kang, E.J., Kim, H.B., Kang, H.S., Park, H.M., Kim, K., Song, K., Song, K.B., Nurse, P., Hoe, K.L., 2010. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 28, 617-623.
- Kim, Y.M., Seo, G.H., Jung, E., Jang, J.H., Kim, S.Z., Lee, B.H., 2018. Characteristic dysmorphic features in congenital disorders of glycosylation type IIb. *Journal of human genetics* 63, 383-386.
- Korner, C., Knauer, R., Stephani, U., Marquardt, T., Lehle, L., von Figura, K., 1999. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. *The EMBO journal* 18, 6816-6822.
- Losfeld, M.E., Soncin, F., Ng, B.G., Singec, I., Freeze, H.H., 2012. A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy. *FASEB J* 26, 4210-4217.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., Yoshida, M., 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24, 841-847.
- Matsuyama, A., Shirai, A., Yashiroda, Y., Kamata, A., Horinouchi, S., Yoshida, M., 2004. pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. *Yeast* 21, 1289-1305.
- McDowall, M.D., Harris, M.A., Lock, A., Rutherford, K., Staines, D.M., Bahler, J., Kersey, P.J., Oliver, S.G., Wood, V., 2015. PomBase 2015: updates to the fission yeast database. *Nucleic acids research* 43, D656-661.
- Nasab, F.P., Schulz, B.L., Gamarro, F., Parodi, A.J., Aebi, M., 2008. All in one: *Leishmania major* STT3 proteins substitute for the whole oligosaccharyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19, 3758-3768.
- Ng, B.G., Freeze, H.H., 2018. Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders. *Trends in genetics* : TIG 34, 466-476.
- Nunez, A., Dulude, D., Jbel, M., Rokeach, L.A., 2015. Calnexin is essential for survival under nitrogen starvation and stationary phase in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 10, e0121059.
- Parodi, A., Cummings, R.D., Aebi, M., 2015. Glycans in Glycoprotein Quality Control, in: rd, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*,

Cold Spring Harbor (NY), pp. 503-511.

Parodi, A.J., 1993. N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology* 3, 193-199.

Perez, P., Ribas, J.C., 2017. Fission Yeast Cell Wall Analysis. Cold Spring Harbor protocols 2017, pdb top079897.

Pfeffer, S., Dudek, J., Gogala, M., Schorr, S., Linxweiler, J., Lang, S., Becker, T., Beckmann, R., Zimmermann, R., Forster, F., 2014. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nature communications* 5, 3072.

Romero, P.A., Dijkgraaf, G.J., Shahinian, S., Herscovics, A., Bussey, H., 1997. The yeast CWH41 gene encodes glucosidase I. *Glycobiology* 7, 997-1004.

Roth, J., Ziak, M., Zuber, C., 2003. The role of glucosidase II and endomannosidase in glucose trimming of asparagine-linked oligosaccharides. *Biochimie* 85, 287-294.

Roth, J., Zuber, C., 2017. Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9. *Histochem Cell Biol* 147, 269-284.

Roux, A.E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., Rokeach, L.A., 2006. Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5, 345-357.

Sadat, M.A., Moir, S., Chun, T.W., Lusso, P., Kaplan, G., Wolfe, L., Memoli, M.J., He, M., Vega, H., Kim, L.J.Y., Huang, Y., Hussein, N., Nievas, E., Mitchell, R., Garofalo, M., Louie, A., Ireland, D.C., Grunes, C., Cimbri, R., Patel, V., Holzapfel, G., Salahuddin, D., Bristol, T., Adams, D., Marciano, B.E., Hegde, M., Li, Y., Calvo, K.R., Stoddard, J., Justement, J.S., Jacques, J., Priel, D.A.L., Murray, D., Sun, P., Kuhns, D.B., Boerkoel, C.F., Chiorini, J.A., Di Pasquale, G., Verthelyi, D., Rosenzweig, S.D., 2014. Glycosylation, hypogammaglobulinemia, and resistance to viral infections. *The New England journal of medicine* 370, 1615-1625.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, NY.

Sato, M., Dhut, S., Toda, T., 2005. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 583-591.

Shrimal, S., Cherepanova, N.A., Gilmore, R., 2015. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 41, 71-78.

Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A., Parodi, A.J., 1992. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* 31, 97-105.

Soussilane, P., D'Alessio, C., Paccalet, T., Fitchette, A.C., Parodi, A.J., Williamson, R., Plasson, C., Faye, L., Gomord, V., 2009. N-glycan trimming by glucosidase II is essential for *Arabidopsis* development. *Glycoconj J* 26, 597-607.

Spiro, R.G., 2000. Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 275, 35657-35660.

Stanley, P., Cummings, R.D., 2015. Structures Common to Different Glycans, in: rd, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY), pp. 161-178.

Stanley, P., Taniguchi, N., Aebi, M., 2015. N-Glycans, in: rd, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY), pp. 99-111.

- Stigliano, I.D., Alculumbre, S.G., Labriola, C.A., Parodi, A.J., D'Alessio, C., 2011. Glucosidase II and *N*-glycan mannose content regulate the half-lives of monoglucosylated species *in vivo*. *Mol Biol Cell* 22, 1810-1823.
- Stigliano, I.D., Caramelo, J.J., Labriola, C.A., Parodi, A.J., D'Alessio, C., 2009. Glucosidase II Beta Subunit Modulates *N*-Glycan Trimming in Fission Yeasts and Mammals. *Mol Biol Cell* 20, 3974-3984.
- Szathmary, R., Biemann, R., Nita-Lazar, M., Burda, P., Jakob, C.A., 2005. Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* 19, 765-775.
- Tai, V.W., Imperiali, B., 2001. Substrate specificity of the glycosyl donor for oligosaccharyl transferase. *J Org Chem* 66, 6217-6228.
- Trombetta, S.E., Bosch, M., Parodi, A.J., 1989. Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry* 28, 8108-8116.
- Ungar, D., 2009. Golgi linked protein glycosylation and associated diseases. *Semin Cell Dev Biol* 20, 762-769.
- Varki, A., Cummings, R.D., Aebi, M., Packer, N.H., Seeberger, P.H., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G., Darvill, A., Kinoshita, T., Prestegard, J.J., Schnaar, R.L., Freeze, H.H., Marth, J.D., Bertozzi, C.R., Etzler, M.E., Frank, M., Vliegenthart, J.F., Lutteke, T., Perez, S., Bolton, E., Rudd, P., Paulson, J., Kanehisa, M., Toukach, P., Aoki-Kinoshita, K.F., Dell, A., Narimatsu, H., York, W., Taniguchi, N., Kornfeld, S., 2015. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* 25, 1323-1324.
- Volker, C., De Praeter, C.M., Hardt, B., Breuer, W., Kalz-Fuller, B., Van Coster, R.N., Bause, E., 2002. Processing of N-linked carbohydrate chains in a patient with glucosidase I deficiency (CDG type IIb). *Glycobiology* 12, 473-483.
- Wild, R., Kowal, J., Eyring, J., Ngwa, E.M., Aebi, M., Locher, K.P., 2018. Structure of the yeast oligosaccharyltransferase complex gives insight into eukaryotic N-glycosylation. *Science* 359, 545-550.
- Wood, V., Harris, M.A., McDowall, M.D., Rutherford, K., Vaughan, B.W., Staines, D.M., Aslett, M., Lock, A., Bahler, J., Kersey, P.J., Oliver, S.G., 2012. PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic acids research* 40, D695-699.
- Xie, W., Ng, D.T., 2010. ERAD substrate recognition in budding yeast. *Semin Cell Dev Biol* 21, 533-539.
- Xu, Y., Bailey, U.M., Schulz, B.L., 2015. Automated measurement of site-specific N-glycosylation occupancy with SWATH-MS. *Proteomics* 15, 2177-2186.
- Zacchi, L.F., Schulz, B.L., 2016. SWATH-MS Glycoproteomics Reveals Consequences of Defects in the Glycosylation Machinery. *Mol Cell Proteomics* 15, 2435-2447.
- Zhang, L., Feng, D., Fang, W., Ouyang, H., Luo, Y., Du, T., Jin, C., 2009. Comparative proteomic analysis of an *Aspergillus fumigatus* mutant deficient in glucosidase I (Afcwh41). *Microbiology* 155, 2157-2167.
- Zhang, L., Zhou, H., Ouyang, H., Li, Y., Jin, C., 2008. Afcwh41 is required for cell wall synthesis, conidiation, and polarity in *Aspergillus fumigatus*. *FEMS microbiology letters* 289, 155-165.
- Zhang, X., Wang, Y., 2016. Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure. *Journal of molecular biology* 428, 3183-3193.
- Zielinska, D.F., Gnad, F., Schropp, K., Wisniewski, J.R., Mann, M., 2012. Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery. *Mol Cell* 46, 542-548.