



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA
DETERMINAR HIPOGLICOSILACION DE PROTEÍNAS *in vivo* en
*Schizosaccharomyces pombe***

Tesis presentada para optar al título de Magister en Biología Molecular Médica

Bacterióloga Nathalia Herrera Aguilar

Directora de Tesis: Dra. Cecilia D'Alessio

Laboratorio de Glicobiología, Fundación Instituto Leloir - Instituto de

Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires- CONICET

Buenos Aires

2014

A mi familia en Colombia
A mis amigos en Argentina

AGRADECIMIENTOS

“Solo Dios sabe lo que a cada quien algo le cuesta, solo Él sabe unir el lazo entre el esfuerzo y la constancia”

Fácil no me resultó pero como aprendizaje fue estupendo. Iniciando cada etapa de mi vida acompañada de quien estuviera conmigo por siempre inicié este proyecto de la mano de Dios y esperando en Él cada uno de los resultados. En su honor y su gloria la consecución de este logro.

A mis Padres Humberto y Margarita por avalar mis proyectos, por la motivación y las palabras de aliento toda vez que quise desertar, por la mano levantada para bendecirme y por encomendarme siempre en sus oraciones.

A mi hermana Alexandra y mi cuñado Arley por sustentar a mis padres mientras yo me realizaba profesionalmente y cumplía un sueño particular. Por la confianza y por creer en mis capacidades.

A mi sobrina Isabel por nacer, por vivir y por existir en mi vida como el motivo más grande de alegrías y sonrisas, gracias mi amor por el abrazo indicado y en el momento necesario, gracias por venir a visitarme y darme la fuerza y el valor de continuar, gracias Isa por ser la razón de mi vuelta a casa y por ser la mayor bendición para nuestra familia.

A Robert y su familia, por estar tan cerca a pesar de la distancia, gracias por el infinito amor y por fortalecer mi espíritu y mí Fe.

A todos los amigos que Argentina me regaló, especialmente a Jessy, Mary, Esteban, Diego y Ana por levantar mi ánimo toda vez que fue necesario.

A mis compañeros de trabajo y a mis compañeros de tesis, Ramiro, Lucila, Erika y Giovana, por compartirme sus experiencias y por la ayuda cuando el tiempo o el cansancio no me jugaron a favor. -A Rami-: ¡Gracias por su sinceridad!

A la Dra Cecilia D'Alessio, mi directora de tesis, por su enseñanza y por su trabajo ejemplar, por su ayuda constante y por la exigencia que para mí siempre fue buena, Ceci, gracias por dedicarle el tiempo a mis asuntos y por comprender mi situación.

Al Dr. Armando José Parodi por darme un lugar en el laboratorio, por abrirme las puertas para investigar y a todos los colaboradores de este maravilloso instituto por brindarme su ayuda.

En definitiva mis agradecimientos están dirigidos a todos aquellos que con su valioso aporte hicieron de esta una experiencia inolvidable que marcó el curso de mí ejercer profesional.

CONTENIDO

RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
Vía secretoria y modificaciones postraduccionales de proteínas.....	11
N-glicosilación.....	14
Función y procesamiento de los N-glicanos.....	15
Síntesis de Dol-PP-glicanos.....	17
La oligosacariltransferasa (OST)	18
Las enfermedades congénitas de la glicosilación	19
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MATERIALES.....	25
METODOLOGÍA.....	25
Cepas y medios de cultivo	25
Plásmidos	26
Procedimientos con DNA	27
Extracción de ADN plasmídico	27
Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
Clonados	29
Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	31
Transformación de levaduras <i>S. pombe</i>	32

Microscopía de fluorescencia.....	33
Preparación de extractos proteicos de <i>S. pombe</i>	34
Inmunodetecciones.....	35
RESULTADOS	37
Desarrollo de un sistema para detectar defectos de glicosilación en <i>S. pombe in vivo</i>	37
Elección de una proteína modelo para sensar hipoglicosilación	37
Selección de mutantes <i>S. pombe</i> para probar el sistema	38
Estrategia experimental.....	38
Obtención de variantes de GFP fusionadas a péptido señal y señal de retención en el RE de <i>S. pombe</i>	40
Expresión de GFP y GlyGFP en cepas de <i>S. pombe</i> salvaje y mutante con defectos en la <i>N</i> -glicosilación de proteínas.....	44
Clonados mediante sistema Gateway a vector de expresión en levaduras pREP1	44
Transformación de <i>S. pombe</i> <i>WT</i> y mutante de <i>N</i> -glicosilación con ER-GFP y ER-GlyGFP	46
Análisis de la expresión de ER-GFP en el RE de <i>S. pombe</i>	47
Evaluación de la expresión y fluorescencia de ER-GlyGFP en cepas de <i>S. pombe</i> <i>WT</i> y mutantes de hipoglicosilación.....	48
Microscopía de fluorescencia.....	48
Inmunodetección de GFP y Gly GFP en extractos proteicos de <i>S. pombe</i> .	51
Expresión de GlyGFP en células <i>S. pombe</i> salvajes tratadas con Tunicamicina como inhibidor de Glicosilación.....	52
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS.....	59

RESUMEN

Desarrollo de herramientas moleculares para medir hipoglicosilación de proteínas en *Schizosaccharomyces pombe* in vivo

Durante el proceso de *N*-glicosilación de proteínas el complejo oligosacariltransferasa (OST) en la membrana del retículo endoplasmático (RE) transfiere $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde el dolicol-PP al residuo Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se están translocando al interior del RE. La adición de un glicano hidrofílico voluminoso mejora la eficiencia del plegamiento de proteínas, ya que reduce la agregación de intermediarios de plegamiento. Los defectos en la reacción de transferencia de glicanos debidos a mutaciones en la OST o a la formación de estructuras de glicanos truncadas sobre el Dol-PP pueden resultar en la hipoglicosilación de proteínas (sitios de *N*-glicosilación que normalmente están ocupadas con un glicano están vacíos). Esto provoca defectos generales en el plegamiento de glicoproteínas y las enfermedades humanas conocidas como trastornos congénitos de la glicosilación tipo I (CDG I). Se ha demostrado recientemente que una variante de GFP en la que se introdujo un sitio de *N*-glicosilación (GlyGFP) pierde su fluorescencia cuando dicho sitio está ocupado por un glicano. Hemos expresado GFP y la variante GlyGFP fusionadas en el *N*-terminal a un Péptido Señal de *S. pombe* y en el *C*-terminal a una señal de retención RE tanto en una cepa de *S. pombe* salvaje como en una mutante $\Delta alg6$, en la que se produce hipoglicosilación de glicoproteínas. Nuestros resultados mostraron que mientras que la ER-GFP emite fluorescencia de en el ER de ambas cepas, ER-GlyGFP sólo emite fluorescencia en el ER de la mutante $\Delta alg6$, lo que indica que la intensidad de fluorescencia de esta construcción se puede utilizar para probar la hipoglicosilación de proteínas *in vivo* en *S. pombe*.

ABSTRACT

Development of molecular tools to measure in vivo protein hypoglycosylation in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*

During *N*-glycosylation the endoplasmic reticulum (ER) membrane oligosaccharyltransferase complex (OST) transfers Glc₃Man₉GlcNAc₂ from a dolichol-PP donor to the sequence Asn-X-Ser/Thr of proteins that are entering into the ER. The addition of a bulky hydrophilic glycan enhances protein folding efficiency as it reduces aggregation of folding intermediates. Defects in the glycan transfer reaction due either to OST mutations or to truncated glycan structures built in the Dol-PP may result in protein hypoglycosylation (the *N*-glycosylation sites that are normally occupied with a glycan are empty) thus causing ubiquitous defects and in human diseases known as congenital disorders of glycosylation type I. It has been recently shown that a GFP variant in which an *N*-glycosylation site was introduced (GlyGFP) loses its fluorescence when such site is occupied by a glycan. We expressed GFP and GlyGFP variants fused to an *N*-terminal *S. pombe* signal peptide and a C-terminal ER retention signal (ER-GFP and ER-GlyGFP), both in a *wild type* and in a $\Delta alg6$ mutant strain in which hypoglycosylation occurs. Our results showed that while expressed ER-GFP fluoresces in the ER of both strains, ER-GlyGFP only fluoresces in the ER of $\Delta alg6$ mutant, indicating that the fluorescence intensity of this construction may be used to test the glycoprotein hypoglycosylation *in vivo* in *S. pombe*.

ABREVIATURAS

ALG: Genes involucrados en la biosíntesis del glicano sobre el Dolicol-P-P

ATP: Adenosina Trifosfato.

cDNA: DNA copia

CDG: Enfermedades congénitas de la glicosilación

CNX: Calnexina

DNA: Ácido desoxiribonucleico

Dol-P-P: Dolicol pirofosfato

GFP: Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

Glc: Glucosa

GlcNAc: *N*-acetilglucosamina

HRP: peroxidasa de rábano

LB: Luria Broth

LBA: LB suplementado con ampicilina

LBK: LB suplementado con kanamicina

Man: Manosa

MMAU: Medio Mínimo suplementado con adenina y uracilo.

OST: Oligosacaryltransferasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RE: Retículo endoplásmico

RNA: Ácido ribonucleico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

UPR: Unfolded Protein Response (Respuesta a proteínas mal plegadas)

WT: Wild type (salvaje)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Vía secretora y modificaciones postraduccionales de proteínas

Las proteínas son macromoléculas que se forman a partir de la unión peptídica de aminoácidos y que cumplen un papel esencial tanto en la estructura como la función básica celular. Las proteínas poseen señales dentro de su secuencia que les indican su destino intracelular. Si su destino es la vía secretora tendrá un Péptido Señal (PS), una secuencia de aproximadamente treinta aminoácidos predominantemente hidrofóbicos que se ubica en el extremo amino terminal de la secuencia aminoacídica y que forma una α helicehidrofóbica. Esta señal es específica para que la proteína se dirija al RE. Cuando emerge del ribosoma el péptido señal se asocia a la riboproteína SRP (Signal recognition particle), que pausa la traducción evitando que la proteína se pliegue antes de su incorporación al RE y que conduce al ribosoma con la proteína naciente a la cara citosólica de la membrana del RE (**Figura 1**). Una vez allí, la SRP se une a un receptor específico, la traducción continúa y la proteína se transloca al interior del RE a través de un complejo llamado translocón a medida que va emergiendo del ribosoma. Es decir, la translocación al RE es co-traducciona (1).

El lumen del RE es el sitio de plegamiento, oligomerización y donde sufren modificaciones postraduccionales todas las proteínas que entran en la vía secretora, es decir, las proteínas residentes de RE y Golgi, las proteínas integrales de membrana, las destinadas a la secreción extracelular y las enzimas lisosomales.

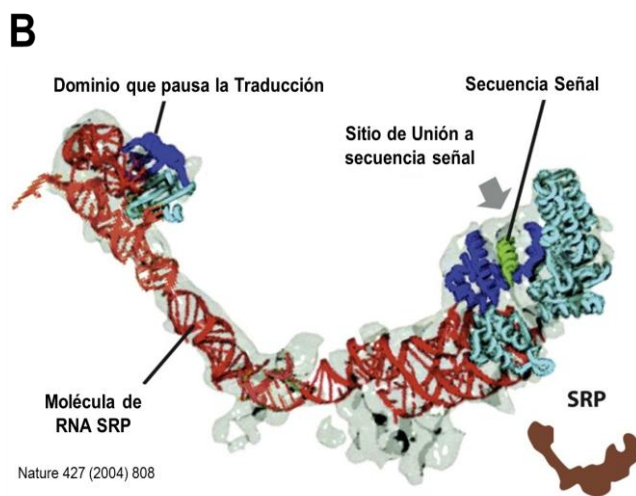
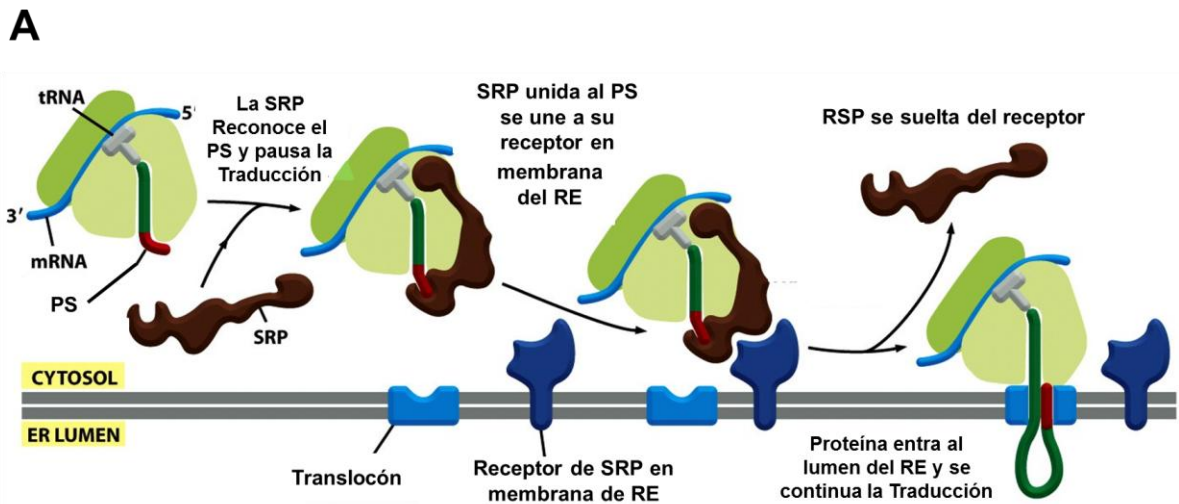


Figura 1. Translocación de proteínas al lumen del RE. La SRP reconoce la secuencia señal de la cadena polipeptídica creciente que se está traduciendo en el ribosoma, se une a ella y pausa la traducción. El sitio de reconocimiento se une al receptor en la membrana del RE y por medio del translocón la proteína se internaliza en el lumen del RE (**Figura 1A**). En la (**Figura 1B**) se muestra la estructura de la partícula de reconocimiento de secuencia señal (SRP).

Modificado a partir de la referencia 2.

La velocidad de la síntesis de las proteínas que se translocan al RE varía según los diferentes tipos de células, del microambiente celular y de su estado fisiológico. Por tanto, el control de calidad en el plegamiento de proteínas es un proceso de alta precisión. En él, las proteínas con conformaciones no nativas o energéticamente inestables sufren degradación proteolítica mediada por proteasomas citosólicos. El control homeostático de maduración de las proteínas en el RE está mediado por una respuesta celular compleja a la acumulación de proteínas con conformaciones no nativas intentando reparar el daño: Respuesta conocida como UPR por su sigla en inglés (*Unfolded Protein Response*). Ésta involucra principalmente la inducción de la síntesis de chaperonas y otras

proteínas que asisten el proceso del plegamiento en el RE. Sin embargo, si luego de la respuesta no se restaura la homeostasis, se activa la apoptosis, que es un mecanismo de muerte celular programada que protege a los tejidos y todo el organismo (3).

Las proteínas que ingresan al RE pueden ser proteínas de membrana o proteínas solubles. Las proteínas de membrana son aquellas que permanecen insertadas en la membrana después de que se haya completado su síntesis en los ribosomas asociados al RE. En algunos casos las proteínas de membrana están ancladas a ella mediante el péptido señal, y otras a través de uno o más dominios transmembrana. Las proteínas solubles pierden el péptido señal al ser escindido de la cadena polipéptica por una enzima llamada “peptidasa de la señal”, ubicada en la cara luminal del RE. Si las proteínas solubles no son residentes del RE (es decir, no poseen una secuencia de retención del tipo –KDEL en su extremo C-terminal), entonces siguen su ruta dentro de la vía secretora (proteínas lisosomales o de secreción). Una de las primeras modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas que ingresan al RE es entonces la **proteólisis del péptido señal**.

Otras modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas que ingresan al RE son la **formación de puentes disulfuro**, asistido por proteínas disulfuroisomerasas, la **isomerización de prolinas**, asistido por la peptidil-prolil isomerasa, la **O-glicosilación**, que consiste en la modificación de Ser en la secuencia aminoacídica que comienza con el agregado de un residuo de Man, y la **N-glicosilación**, a la que nos referiremos en la siguiente sección.

***N*-glicosilación**

La *N*-glicosilación constituye una de las modificaciones postraduccionales más importantes de las proteínas en eucariotas, ya que casi el 80% de las proteínas que entran en la vía secretora son *N*-glicosiladas (4). Durante la *N*-glicosilación la oligosacaryltransferasa (OST), un complejo multimérico que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico, transfiere el oligosacárido de conformación $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ pre-ensamblado en el lípido Dol-PP a residuos de Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro (**Figura 2**). La *N*-glicosilación ocurre cuando la proteína emerge del translocón hacia el lumen del RE, a unos 20 aminoácidos de distancia de la membrana del RE. Una vez transferidos a la cadena de péptido naciente los *N*-glicanos sufren diversas modificaciones y remodelaciones tanto en el RE como en el aparato de Golgi. En el RE se eliminan los tres residuos de glucosa y uno o dos residuos de manosa, y luego en el Golgi se remueven más manosas y se pueden agregar *N*-acetil galactosamina, galactosa, ácido siálico, manosa, fucosa, y otros monosacáridos dependiendo de la especie, dando lugar a la gran diversidad de glicanos encontrados en las células eucariotas.

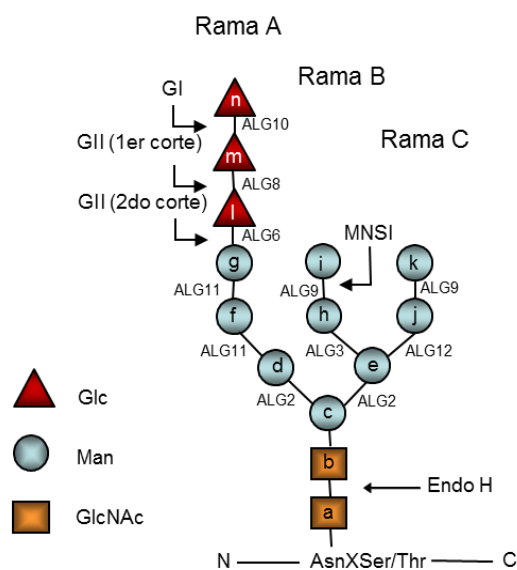


Figura 2. Estructura del oligosacárido transferido a las proteínas por la OST durante la *N*-glicosilación. El oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (en mamíferos, levaduras y plantas) es transferido a la secuencia Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se están sintetizando y translocando al lumen del RE. Las letras (a, b, c,...) siguen el orden secuencial de adición de monosacáridos durante la biosíntesis del derivado dolicol-PP y se indican los genes *ALG* involucrados en dichos pasos. Imagen tomada de la referencia (5).

Función y procesamiento de los N-glicanos

La función más importante de los *N*-glicanos en el RE es la de proveer grupos voluminosos muy hidrofílicos que ayudan a mantener en solución a los intermediarios de plegamiento proteico y modular la estructura local. Debido a la elevada especificidad del sustrato de la OST, las alteraciones en la biosíntesis del Dol-PP-glicano dan lugar a la hipoglicosilación (no se ocupan todos los sitios que normalmente lo hacen) lo que resulta en efectos deletéreos en el plegamiento de diferentes proteínas, lo que a su vez desencadena una multitud de síntomas clasificados como “defectos congénitos de la glicosilación” (CDG) tipo I (6) (ver mas adelante).

Luego de la transferencia, los *N*-glicanos se procesan y su función es la de dar información a la célula sobre el estado conformacional de la proteína: completamente plegada, mal plegada o con conformación intermedia (glóbulo fundido). A este último proceso se le conoce como “Control de Calidad del Plegamiento de Glicoproteínas” (7, 8). Luego de que se transfiere el glicano a la proteína por la OST, los tres residuos de Glc son removidos, el más externo (*n*, Figura 2) por la glucosidasa I (GI) produciendo G2M9 y los dos siguientes (*m* y *l*, Figura 2) por la glucosidasa II (GII), produciendo estructuras G1M9 y M9. En el estadio G1M9, los glicanos pueden interactuar con calnexina y/o calreticulina, que son lectinas-chaperonas no convencionales del RE que reconocen específicamente las estructuras monoglucosiladas. Esta interacción aumenta la eficiencia de plegamiento facilitando la acción de otras chaperonas y proteínas disulfuro isomerasas, e impidiendo la salida de intermediarios de plegamiento hacia el Golgi. La remoción de la última glucosa expone glicanos no glucosilados,

que pueden ser re-glucosilados por una glucosiltransferasa (GT) del RE que agrega nuevamente el residuo de Glc (**Figura 2**) sólo si la parte proteica no está correctamente plegada (9). Ciclos de glucosilación y desglucosilación, catalizados por las actividades contrarias de la GT y la GII continúan hasta que la parte proteica se haya plegado correctamente y las glicoproteínas continúan su tránsito por la vía secretora. También 1-2 residuos de Man pueden ser removidos en el RE por manosidasas específicas (residuos *i, k*) (**Figura2**), lo que constituye una señal para la retrotranslocación al citosol y degradación de glicoproteínas irreversiblemente mal plegadas en los proteasomas en un proceso conocido como ERAD (por Endoplasmic Reticulum Asociated Degradation).

Las proteínas correctamente plegadas siguen su tránsito por la vía secretora. En el aparato de Golgi los *N*-glicanos sufren modificaciones que producen estructuras diversas, cuya función está ligada fundamentalmente a fenómenos de reconocimiento de glicoproteínas por otras proteínas, como se da en la interacción célula-célula. Por ejemplo, en las células tumorales algunos *N*-glicanos anormales son reconocidos por el receptor CD337 de las células NK (*Natural Killer*) y son interpretados como una señal de que la célula que marcan es cancerosa (10).

Los *N*-glicanos tienen un rol también en la localización subcelular de las enzimas lisosomales. Aquí, la modificación de un *N*-glicano con una señal de manosa-6-fosfato sirve para que la enzima lisosomal sea reconocida por receptores en el Golgi. Este reconocimiento permite el agrupamiento de hidrolasas ácidas en el trans-Golgi y la escisión de vesículas revestidas de clatrina que darán lugar a los lisosomas funcionales (2).

Síntesis de Dol-PP-glicanos

La biosíntesis del bloque glicosídico $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ comprende un conjunto de más de 40 reacciones enzimáticas que comienza en la cara citosólica de la membrana del RE al transferirse una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) a partir del nucleótido azúcar UDP-GlcNAc a Dolicol monofosfato (Dol-P) insertados en la membrana de RE. Luego, se transferiere un residuo más de GlcNAc y cinco de Man a partir de GDP-Man. Cuando el compuesto logra una estructura de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ por acción de una “flipasa” independiente de ATP ocurre un “flip-flap” del glicano desde el citosol a la cara luminal del RE. Posteriormente en el lumen del RE se agregan cuatro residuos más de Man y tres de Glc a partir de los Dolicol monofosfato-azúcares Dol-P-Man y Dol-P-Glc, respectivamente (11). El orden de adición de los monosacáridos durante la biosíntesis del glicano y su estructura final están indicados en las **Figuras 2 y 3**. Así la síntesis del glicano comprende una serie de pasos secuenciales en donde la ausencia o mutación de alguno de los genes *ALG*, genera la síntesis sobre el Dol-PP de bloques glicosídicos incompletos o truncados en alguna de sus ramas. La mínima estructura a ser transferida para que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sea viable es $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (12).

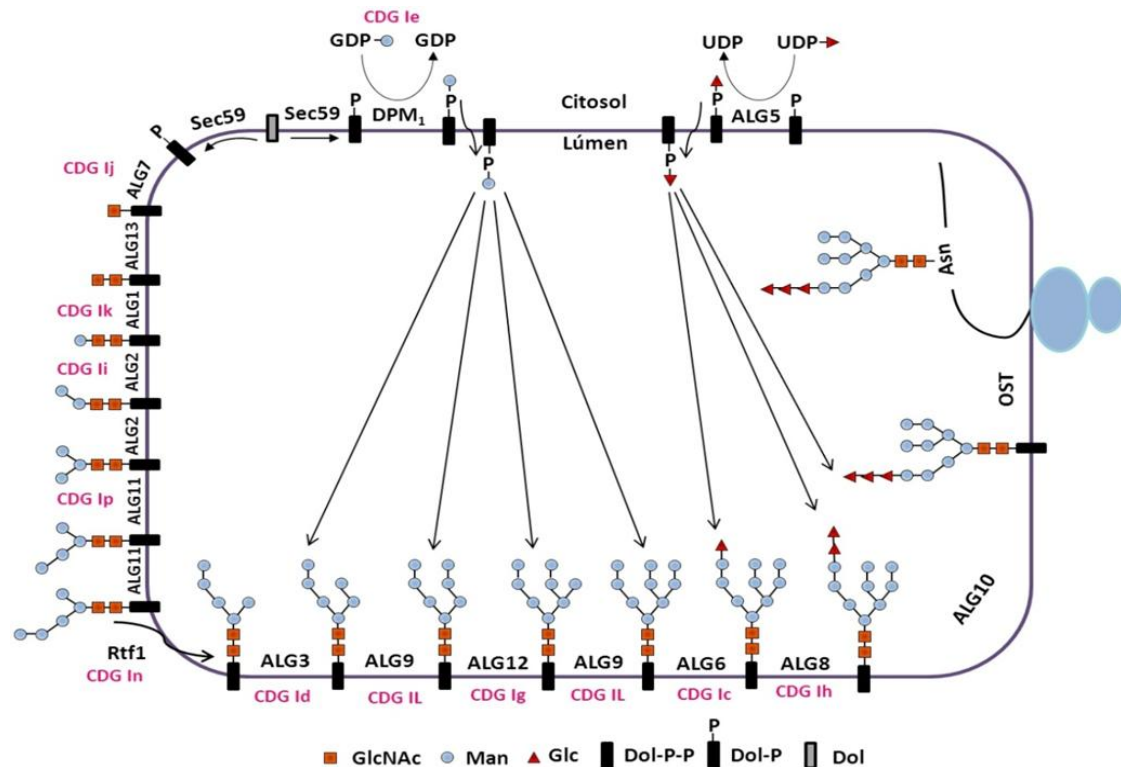


Figura 3. Topología de las reacciones durante la biosíntesis del Dol-PP-Glicano. La biosíntesis comienza en la cara citosólica de la membrana del RE con el agregado de monosacáridos a partir de nucleótido-azúcares. La estructura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ se transloca a la cara luminal del RE donde se completa la biosíntesis a partir de Dol-P-Man y Dol-P-Glc. El glicano completo es transferido a las proteínas por la OST. Se indican en fucsia las enfermedades congénitas de la glicosilación (CDG) asociadas al defecto del gen ALG respectivo. Imagen tomada de la referencia (13).

La oligosacariltransferasa (OST)

En la cara luminal de la membrana del RE el complejo multimérico OST transfiere el glicano pre-ensamblado en el lípido Dol-PP a los residuos Asn de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X no puede ser Pro) de las proteínas que se están sintetizando y translocando al RE (4). La adición del bloque glicosídico se realiza en el átomo de Nitrogeno del grupo amida que posee la Asparagina que es poco reactivo, por tanto necesita la formación de un pequeño bucle o “loop” en el polipéptido y así acercar los grupos hidroxilos de la Serina o Treonina favoreciendo que este grupo amida se vuelva más nucleofílico. Una prolina sería

poco flexible porque no podría ser el residuo central de la secuencia consenso X al no permitir la formación de dicha estructura en el polipéptido (14). El complejo de la OST de *S. cerevisiae* está compuesto por ocho cadenas polipeptídicas, conservadas entre mamíferos y levaduras. Cinco son esenciales, entre ellas la subunidad catalítica STT3. En *S. cerevisiae* y mamíferos la OST requiere la presencia de tres residuos de Glc en el glicano (residuos *l-n*, **Figura 2**) para catalizar una transferencia eficiente; trabajos previos del laboratorio mostraron que dicho requerimiento reside en el complejo OST, no en la subunidad catalítica (15). El requerimiento del complemento total de los residuos de Man del glicano para la transferencia sería menos estricto según lo muestran ensayos realizados en sistemas libres de células, aunque se ha encontrado que defectos en la adición de los residuos de Man *h-k* (**Figura 2**) resultan en un impedimento parcial del agregado de los residuos de Glc. Esto es debido a que el producto de una reacción de transferencia es el sustrato óptimo de la siguiente. Sin embargo, no ha sido realizado hasta el momento un estudio detallado del efecto causado por la ausencia de cada residuo en el glicano en la eficiencia de su transferencia a proteínas por la OST *in vivo*. Esto justifica la importancia de construir modelos experimentales que permitan evaluar el efecto de la estructura del *N*-glicano en la eficiencia de la transferencia por la OST.

Las enfermedades congénitas de la glicosilación

Las enfermedades humanas congénitas de glicosilación (CDG) son clínicamente y bioquímicamente heterogéneas y usualmente afectan a múltiples órganos. Se clasifican en tipos I y II. Los pacientes con CDG tipo I tienen sub-ocupados sitios

Asn-X-Ser/Thr de glicosilación, es decir, unidades enteras de glicanos están ausentes. Sin embargo, la estructura de los *N*-glicanos que quedan en estos pacientes es prácticamente normal. En las CDG tipo II, los sitios de *N*-glicosilación tienen ocupación normal, pero la estructura de los glicanos unidos a proteínas está alterada (16).

Los defectos en la biosíntesis del Dol-PP-glicano producen CDG tipo I. Se conocen enfermedades humanas por deficiencias en prácticamente todas las glicosiltransferasas (genes *ALG* (por Asparagine-linked glycosilation)) involucrados en la biosíntesis del Dol-P-Glicano (**figura 3**). Un ejemplo de CDG tipo I fue descrita en un paciente con una mutación en el gen *ALG9* (17). Aunque los síntomas descritos no son idénticos, todos los pacientes presentan bajo tono muscular, retardo motor y mental, defectos de coagulación e incluso en muchos casos se observó muerte pocos días luego del nacimiento.

Debido a la alta especificidad de sustrato de la OST, la estructura del Dol-PP-oligosacárido es crucial para la transferencia eficiente del glicano. Alteraciones en la biosíntesis de dicho sustrato resultan en la hipoglicosilación de muchas proteínas diferentes y en la multitud de síntomas observados en los pacientes con CDG tipo I. La comprensión de los requerimientos estructurales del glicano para la transferencia mediada por la OST *in vivo* podría abrir el camino para el desarrollo de drogas que afecten las propiedades de especificidad de dicha enzima o para terapias génicas por el agregado de proteínas que transfieran glicanos de manera inespecífica.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

El objetivo general de este proyecto consiste en desarrollar una herramienta molecular que permita determinar la hipoglicosilación de proteínas *in vivo* en *Schizosaccharomyces pombe*, un microorganismo versátil para la manipulación genética y que constituye un excelente modelo experimental para reproducir las modificaciones genéticas observadas en CDG Tipo I (ausencia total o parcial de actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de glicanos). Se propone utilizar la herramienta desarrollada para cuantificar la hipoglicosilación que dichas modificaciones genéticas producen en las glicoproteínas *in vivo*.

HIPÓTESIS

La GFP es una proteína ampliamente estudiada y usada como biomarcador funcional y estructural en diferentes sistemas. Recientemente se ha diseñado y probado en células de mamífero una variante de GFP con un sitio de *N*-glicosilación ubicado en una porción tal de la estructura que pierde la fluorescencia cuando dicho sitio está ocupado con un glicano (18). Se pretende expresar dicha variante en el RE de levaduras *S. pombe WT* y mutantes que sintetizan glicanos truncados unidos a Dol-PP (y que por lo tanto no lo transfieren eficientemente a las proteínas) para probar su utilidad como proteína marcadora de hipoglicosilación. La hipótesis es que la GFP con un sitio de glicosilación expresada en células *WT* (que glicosilan normalmente) no emita fluorescencia, mientras que la expresada en mutantes que hipoglicosilan (no se ocupan los sitios de *N*-glicosilación) comience a fluorescer.

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Obtener construcciones que codifiquen GFP con y sin un sitio de *N*-glicosilación fusionadas a un péptido señal de entrada al RE específico de *S. pombe* y a una señal de retención en RE**

Se clonarán las variantes GFP y GlyGFP (variante con un sitio de *N*-glicosilación) con el agregado del Péptido Señal de entrada al RE de la subunidad β de la glucosidasa II en el extremo amino terminal y la señal VDEL de localización en el RE en el extremo carboxilo terminal, para la conducción y posterior retención de la variante GFP en el RE de las levaduras *S. pombe*.

- **Expresar las construcciones obtenidas en cepas de *S. pombe* WT y con defectos en la *N*-glicosilación de proteínas**

Las construcciones obtenidas se transferirán a un vector de expresión para levaduras *S. pombe* y se expresarán en el RE de levaduras WT y de mutantes $\Delta alg6$ con defectos en la *N*-glicosilación de proteínas (debido a que sintetiza glicanos truncados M9 sobre el Dol-PP).

- **Comparar la fluorescencia de las variantes de GFP con y sin sitio de *N*-glicosilación en *S. pombe* WT y mutante de glicosilación.**

Se evaluará por microscopía de fluorescencia la utilidad de la GlyGFP como marcadora de hipoglicosilación comparando su fluorescencia en *S. pombe* WT con la fluorescencia en la cepa mutante $\Delta alg6$ en la que se sabe que se produce la hipoglicosilación de proteínas (19).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El extracto de levadura y agar utilizados fueron de Britania. Los inhibidores de proteasas, el ditioneitol (DTT), la Tunicamicina, los antibióticos ampicilina y kanamicina, los aminoácidos y suplementos para medios de cultivo y las drogas de uso común en el laboratorio fueron de Sigma. Las enzimas utilizadas en procedimientos de DNA recombinante fueron de New England Biolabs. La LR Clonasa Gateway fue de Invitrogen.

METODOLOGÍA

Cepas y medios de cultivo

La cepa de bacterias *Escherichia coli* utilizada para el procedimiento de clonado y expresión de las proteínas recombinantes fue JA226 (*hsdR*, *hsdM*, *trpE5*, *fecAI*, *LeuB6*, *ZopII*, *thil*, *recBC*, *strR*). Las bacterias se cultivaron 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. 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**. Dichas levaduras se crecieron a 28°C en medio rico YEA (glucosa 2% extracto de levadura 0.5%, adenina 75 mg/L) o en mínimo MM (KH ftalato 0.3%, Na₂HPO₄ 0.22%, NH₄Cl 0.5%, Glc 2%, con agregado de sales, minerales y vitaminas (descriptas en referencias 20 y 21). Cuando fue necesario los medios fueron suplementados con adenina (75 mg/L) y uracilo (75 mg/L).

Cepa (Nombre coloquial)	Genotipo	Origen
ADm (WT)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18</i>	Stock del laboratorio (D'Alessio et al., 1999)
Sp61A ($\Delta alg6$)	<i>h⁻, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, ade1, \Delta alg6::ura4⁺</i>	Stock del laboratorio (Fanchiotti et al 1998,(19))

Tabla 1. Genotipo de las dos cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

Plásmidos

Los mapas de los vectores utilizados en este trabajo se muestran en la **Figura 4**. El vector pDONR 201 compatible con el sistema Gateway (Invitrogen) fue utilizado para armar las construcciones conteniendo GFP y GlyGFP fusionadas a un péptido señal de *S. pombe* en el N-terminal y a una señal de retención en RE en el C-terminal (pDONR-ER-GFP y pDONR-ER-GlyGFP). Dichos vectores fueron luego utilizados como dadores de las construcciones en recombinaciones del sistema Gateway al vector pREP1-ccdB2 utilizado como plásmido aceptor para expresar ER-GFP y su variante ER-GlyGFP en *S. pombe*.

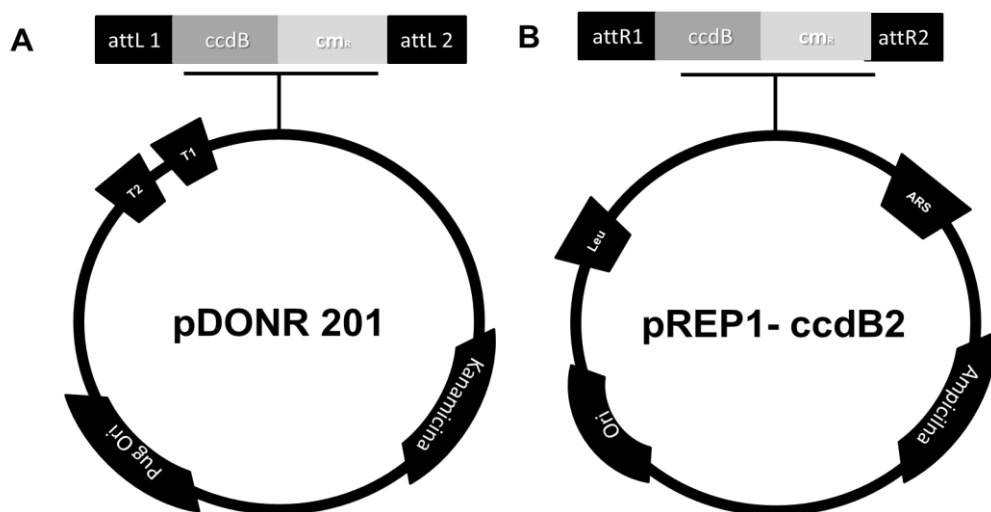


Figura 4. Vectores utilizados para clonado y expresión. (A) Mapa del vector dador del sistema Gateway para clonado en bacterias pDONR201 (B) Mapa del vector de destino del sistema Gateway para expresión en *S. pombe* pREP1-ccdB2.

Procedimientos con DNA

Extracción de ADN plasmídico

Se partió de 3 ml de un cultivo de bacterias *E. coli* crecido a 37 °C en agitación durante toda la noche en LB suplementado con antibiótico. Se cosecharon las células por centrifugación y el pellet se resuspendió en 200 µl de solución P1 (Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8). Luego se agregaron 300 µl de solución P2 (NaOH 2 N, SDS 1%) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Se le agregaron 300 µl de solución P3 (KAcO 3 M pH 4.8), se mezcló por inversión y se centrifugó a 20000x g 15 minutos 4 °C. Se separó el sobrenadante, se le agregaron 5 µl de RNAsa A 10 mg/ml y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Se realizó luego una extracción con cloroformo y se precipitó el DNA de la fase acuosa por el agregado de 1 volumen de isopropanol e incubación durante 25 minutos en hielo. Se centrifugó a 20000x g durante 25 minutos a 4 °C, se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70 %, se dejó evaporar el etanol y se resuspendió el DNA en 25 µl de agua milliQ.

Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0.2 mM cada uno, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM y 1 µM de cada oligonucleótido. Se utilizó la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa, Invitrogen). El templado de DNA fue desnaturalizado inicialmente a 92 °C por 5 min y luego se llevaron a cabo 31

ciclos de desnaturalización /hibridación/extensión. La temperatura de hibridación fue entre 50 °C y 58 °C según se indica en cada caso durante 40 seg y la extensión fue a 72 °C, durante 1 min/kb aproximadamente. Luego de 31 ciclos se incubó por 4 min adicionales a 72 °C. Cuando fue necesario amplificar DNA con alta fidelidad se utilizó la polimerasa KOD (Merck). En ese caso, el MgCl fue reemplazado por MgSO₄ 1.5 mM, la temperatura de extensión fue de 70 °C y el tiempo de extensión 25 seg/kb. Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa 1 % en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8) teñidos con bromuro de etidio.

Ver en la Tabla 2 las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Colony PCR de bacterias *E. coli*

Se resuspendió una colonia aislada (o varias en el caso del screening) directamente en los 50 µl de la mezcla de reacción de PCR y se elevó el tiempo de desnaturalización inicial a 10 min.

Colony PCR de levaduras *S. pombe*

Una pequeña cantidad de las colonias de *S. pombe* se incubaron por 5 minutos a 100 °C en 40 µl de NaOH 10 mM. Se tomaron 3µl como templado de la reacción de PCR.

Nombre	Secuencia
GFP fw-BamHI	5'- GATGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG -3'
GFP rev-EcoRI	5'- CTGACGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATG -3'
VDEL + Stop attL fw-EcoRI	5'- AATCAGAATTCGTCGATGAGTTATAATATACC -3'
PSGII β rev-BamHI	5'- GATGGATCCTGCAGCATTACTGTATAC -3'
pDONR 201s	5'- TTAACGCTAGCATGGATCTC -3'
pDONR 201a	5'- 5'-CATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
pREP rev-b	5'-TATGCAGCTTGAATGGGCTTC-3'
pREP fw	5'-AGGAAGAGGAATCCTGGC -3'

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los sitios de restricción introducidos en las secuencias se encuentran subrayados.

Clonados

La amplificación por PCR del DNA de *GFP* y *GlyGFP* se realizó utilizando los primers GFP fw-BamHI y GFP rev-EcoRI y como templado los plásmidos pCDNA3.1-ER-GFP y cDNA3.1-ER-GlyGFP, conteniendo la GFP sin y con sitio de *N-glicosilación* fusionado a un péptido señal de mamíferos (enviado por Hudson Freeze, Sanford-Burnham Medical Research Institute, USA). La amplificación del vector pDONR 201 conteniendo el péptido señal de *S. pombe* y la señal de retención en el RE se realizó con los primers VDEL + Stop attL fw EcoRI y PSGII β rev-BamHI. Todos los fragmentos se amplificaron con la enzima KOD polimerasa y purificados por gel de agarosa utilizando el kit QIAquick de QIAGEN. Los fragmentos fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI durante 18 hs a 37°C en los buffers provistos por el fabricante (NEB).

Los fragmentos fueron purificados nuevamente por gel de agarosa y ligados 16 hs a 14 °C utilizando 0.1 unidades de la T4 DNA ligase (Promega). El producto de la ligación (pDONR 201–ER-GFP y pDONR 201–ER-GlyGFP) se transformó a bacterias *JA226* competentes. Se verificó la secuencia correcta del fragmento clonado por secuenciación en un secuenciador de cuatro capilares Applied Biosystem.

Clonados mediante sistema Gateway

Gateway (Invitrogen) es una tecnología de clonación por recombinación que se basa en la integración del bacteriófago lambda en el genoma de *E. coli* durante su ciclo lisogénico. En este trabajo utilizamos la enzima LR clonasa que cataliza la recombinación de los sitios *attL* presentes en los *vectores de entrada* con los sitios *attR* presentes en los *vectores de destino*, catalizando así la transferencia de un inserto del primer vector al segundo (**Figura 5**). Se realizó una mezcla de ambos plásmidos (entrada y destino), se incubaron con la mezcla comercial de enzimas (LR clonase) según instrucciones del fabricante y luego se transformó una alícuota de esta reacción en bacterias *E. coli JA226*. La selección positiva se realizó mediante la resistencia de la bacteria al antibiótico presente en el vector de destino. Además ocurrió una selección negativa dado que los vectores de destino que no recibieron el inserto contienen el gen *ccdB* el cual es citotóxico para la cepa de *E. coli* transformada (22). En este trabajo los vectores de entrada fueron pDONR-ER-GFP y pDONR-ER-GlyGFP y el vector de destino pREP1-ccdB2.

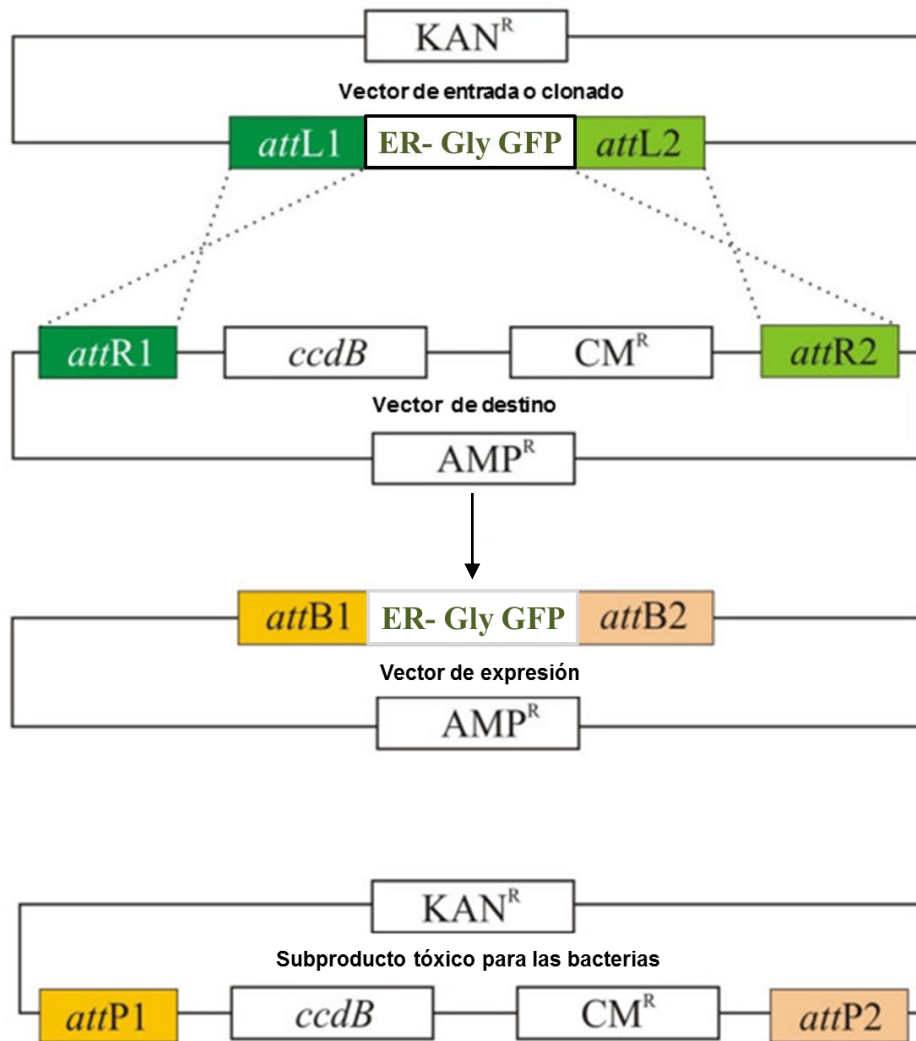


Figura 5. Esquema de la reacción de clonado por recombinación LR del sistema Gateway. La enzima LR clonasa cataliza la reacción de recombinación por los sitios *attL* y *attR* en el cual el inserto contenido en el vector de entrada se transfiere al vector de destino. Figura obtenida de la referencia (22)

Transformación de bacterias *E. coli*

- a) *Preparación de E. coli electrocompetentes*: Se inocularon un cultivo de 5 ml de medio LB con una colonia aislada de *E. coli* JA226 y se incubó 16 hs (ON) a 37°C en agitación. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo en medio LB y se incubó a 37°C hasta $OD_{600} = 0.6$. Luego se colocó el cultivo en hielo durante 10 min y se cosecharon las bacterias por centrifugación a 8000 xg durante 10 min a 4°C. Las bacterias se resuspendieron en agua

milliQ fría estéril, y se realizaron 3 lavados centrifugando a 8000 xg por 10 min cada vez. Las bacterias se resuspendieron en glicerol 10%, se centrifugaron a 8000 xg durante 10 min, se resuspendieron en un volumen de glicerol 10% 100 veces menor al original y se alicuotaron de a 50 µl. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el momento de usarse (23).

b) *Electroporación*: Se emplearon 50 µl de células electrocompetentes, que se incubaron con 200 ng de DNA y se electroporaron a 2.5 kV, 200 Ohm y 25 µF en un electroporador Biorad. Las células fueron recuperadas en 1 ml de LB durante 1 hora a 37°C y se plaquearon diluciones en LB con el antibiótico adecuado. Las colonias transformantes fueron verificadas por *colony* PCR.

Transformación de levaduras S. pombe

a). *Preparación de S. pombe electrocompetentes*: Se Inocularon 20 ml de medio YEA con la cepa de *S. pombe* adecuada y se dejó crecer toda la noche a 28°C con agitación. Se procedió a enfriar en hielo y centrifugar 5 min a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante rápido y bajo mechero. Se lavó el pellet 2 veces con 20 ml de agua fría estéril, centrifugando y descartando el sobrenadante cada vez. Las células se resuspendieron en el líquido residual y se lavaron con 20 ml de sorbitol 1M frío estéril. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante tratando de escurrir bien el pellet. A continuación se resuspendió en 1 ml de Sorbitol 1 M y se transfirió a un tubo eppendorf. Luego de una centrifugación corta de 10 segundos se

retiró el sobrenadante con pipeta y se resuspendió en 200 μ l finales de sorbitol 1M. Se distribuyó el material en alícuotas de a 50 μ l que se guardaron a -80 °C.

b). *Electroporación*: A 50 μ l de células electrocompetentes se le agregaron 2-3 μ l del fragmento de DNA o plásmido (0.5 - 1 μ g de DNA). Luego de dejar 3 min en hielo se transfirió a cubetas de electroporación previamente enfriadas. La electroporación se hizo a 1.5 KV, 200 ohm, 25 μ F en un electroporador BioRad. Inmediatamente se agregaron 900 μ l de sorbitol 1M frío (o Sorbitol 1M en YEA), se dejó recuperando 30 minutos a 28°C, se centrifugó 3 min a 3000 rpm, se retiró cuidadosamente el sobrenadante con pipeta y se resuspendieron las células para rastrillar en el medio sólido selectivo adecuado 1/3 y 2/3 del volumen total. Se incubaron las placas a 28°C al menos 4 días. Las transformaciones fueron repicadas para obtener colonias aisladas al mismo medio selectivo y verificadas luego por *colony* PCR.

Microscopía de fluorescencia

Se cultivaron las células *S. pombe* transformadas con las variantes pREP1–ER-GFP y pREP1–ER-GlyGFP en 1 ml de medio MMAU a 28 °C durante 24 a 48 horas según tiempo de crecimiento óptimo para cada cepa hasta OD₆₀₀= 2.0. Se colocaron 3 μ l de cada cultivo sobre un portaobjeto, se cubrió con un cubreobjeto y se hizo presión por 30 segundos. El cubreobjetos fue sellado con esmalte para evitar la deshidratación del preparado. Cada transformación de levaduras se observó al microscopio en luz transmitida y posteriormente con fluorescencia

utilizando un filtro de 530 nm para GFP. La longitud de onda usada para la excitación de la GFP fue de 488 nm. Las observaciones y registros fotográficos se realizaron con objetivo de 100x (Zeiss ECPlaN-NEOFLUAR 1,3). Para comparar la fluorescencia entre cepas se utilizaron los mismos parámetros de detección para todas, en luz transmitida se usó tiempo de exposición 1 ms y para todas las observaciones en fluorescencia se usaron 40 ms como tiempo de exposición. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio trinocular Carl ZEISS Axio. La adquisición de imágenes se realizó mediante el software AxioVision Rel 4.8.

Preparación de extractos proteicos de S. pombe

Los extractos proteicos totales de *S. pombe* fueron preparados a partir de 20 ml de cultivo en fase exponencial ($OD_{600} = 2.0$). Las células se cosecharon, lavaron con agua milliQ y se 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) 100 μ M, L-1-tosilamida-2-feniletíl-clorometilcetona (TPCK) 10 μ M, N α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) 10 μ M, leupeptina 10 μ M, pepstatina 10 μ M y E64 10 μ M). Las levaduras se rompieron mediante 10 ciclos repetitivos de vortex por 1 min y hielo por 1 min con bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El lisado fue centrifugado a 20000 xg durante 20 min a 4°C y se guardó el sobrenadante en alícuotas a -20 °C.

La determinación de la concentración proteica del extracto obtenido se realizó por el ensayo BioRad Protein Assay como describe el fabricante.

Inmunodetecciones

80 µg de los extractos proteicos totales se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) 10 %. Las electroforesis se realizaron en buffer Tris Base 25mM, Glicina 0.2 M y 0.1 % SDS a 120 V constantes durante 90 minutos. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas ImmobilonP (Millipore) de PVDF (polifluoruro de vinilideno) a 90 mA durante 1 h para realizar la inmunodetección de las proteínas GFP y CNX por la técnica "Western Blot". Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM) conteniendo 4 % leche durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron luego con anticuerpo de conejo anti GFP (1:1000, Life Technologies) o anti CNX (1:5000, obtenido en el laboratorio como se describe en la referencia 24) en TBS conteniendo 3 % leche toda la noche a 4 °C en agitación suave. Se realizaron 3 lavados por 5 min cada uno con TBS y se incubó con anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a HRP (peroxidasa de rabano) (1:5000, Sigma) durante al menos 2 hs a 4 °C. Se lavó luego 3 veces por 5 min cada una con TBS.

Las reacciones fueron detectadas por quimioluminiscencia con el sustrato West Pico SuperSignal (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante y expuestas a placas fotográficas (Kodak BioMAX). Cuando fue necesario hacer una nueva inmunodetección con membranas ya utilizadas se lavaron las mismas con TBST (TBS con 0.2 % Tween 20) durante 15 minutos, luego con buffer de *stripping* (60 mM Tris HCl pH 6.8, 7 % β-2-mercaptoetanol, 2 % SDS) en un recipiente cerrado por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lavó 5 veces por 5 minutos cada vez con TBST. Las membranas se bloquearon y se realizaron inmunodetecciones como se describió anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Desarrollo de un sistema para detectar defectos de glicosilación en S. pombe in vivo

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un sistema que permita determinar la hipoglicosilación de proteínas *in vivo* en la levadura *S. pombe*, de manera de poder analizar luego los efectos de las mutaciones observadas en las CDG tipo I (que producen glicanos incompletos sobre el Dol-PP) en la *N*-glicosilación de proteínas.

Elección de una proteína modelo para sensar hipoglicosilación

Recientemente se ha diseñado y probado en células de mamífero una variante de GFP la que mediante una mutación N 147 T se ha generado con un sitio de *N*-glicosilación que pierde la fluorescencia cuando dicho sitio está ocupado con un glicano (18). Partiendo de la GFP y la GFP a la que se le introdujo el sitio de *N*-glicosilación (N 147 T) para su expresión en el RE de células de mamíferos (GlyGFP, enviada por Hudson Freeze, Sanford-Burnham Medical Research Institute, USA) se diseñó una estrategia para fusionar dichas proteínas a un péptido señal funcional en *S. pombe* en el extremo amino terminal y la señal de retención del RE para proteínas solubles en el extremo carboxilo terminal (*secuencia VDEL*). La hipótesis de trabajo es que a mayor defecto en la *N*-glicosilación de proteínas de una cepa de *S. pombe*, mayor será la fluorescencia de la GlyGFP observada en el RE.

Selección de mutantes *S. pombe* para probar el sistema

Con el objetivo de analizar el efecto de la estructura del glicano en la transferencia *in vivo* por la OST se utilizaron dos cepas de *S. pombe*, una *WT* (*ADm*) que permite el proceso de glicosilación normal y una segunda cepa de *S. pombe* (*Δalg6*) con defectos en la *N*-glicosilación debido a que el glicano no se sintetiza completo sobre el Dol-PP y transfiere glicanos de composición $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a las proteínas (**Figuras 2 y 3**). La comparación de estas dos cepas permitió evaluar la utilidad de la proteína GlyGFP como marcadora de hipoglicosilación de proteínas. La construcción paralela de la variante de GFP sin sitio de glicosilación se usó como control en todas las comparaciones.

Estrategia experimental

Para el desarrollo de las construcciones de GFP y GlyGFP que se expresen en el RE de *S. pombe* y luego comparar su fluorescencia, fue necesario obtener GFP y GlyGFP en fase con el péptido señal y la señal de retención en RE. Estas nuevas construcciones se nombraron ER-GFP y ER-GlyGFP. Para ello la estrategia fue reemplazar la secuencia comprendida entre el péptido señal y la señal de retención en RE de la subunidad β de la Glucosidasa II ($\text{GII}\beta$, una proteína soluble del RE de *S. pombe*) previamente clonada en el vector dador Gateway-compatible pDONR201, con las variantes de GFP (**Figura 6**). Luego de obtenidas las construcciones, se transfirieron a un vector de expresión en *S. pombe* compatible con el sistema Gateway, se transformaron las mutantes de *S. pombe* *WT* y *Δalg6*. Y se puso a punto el sistema de detección que permitió determinar defectos de glicosilación en las levaduras seleccionadas. En las siguientes secciones se detallan los resultados obtenidos para cada etapa.

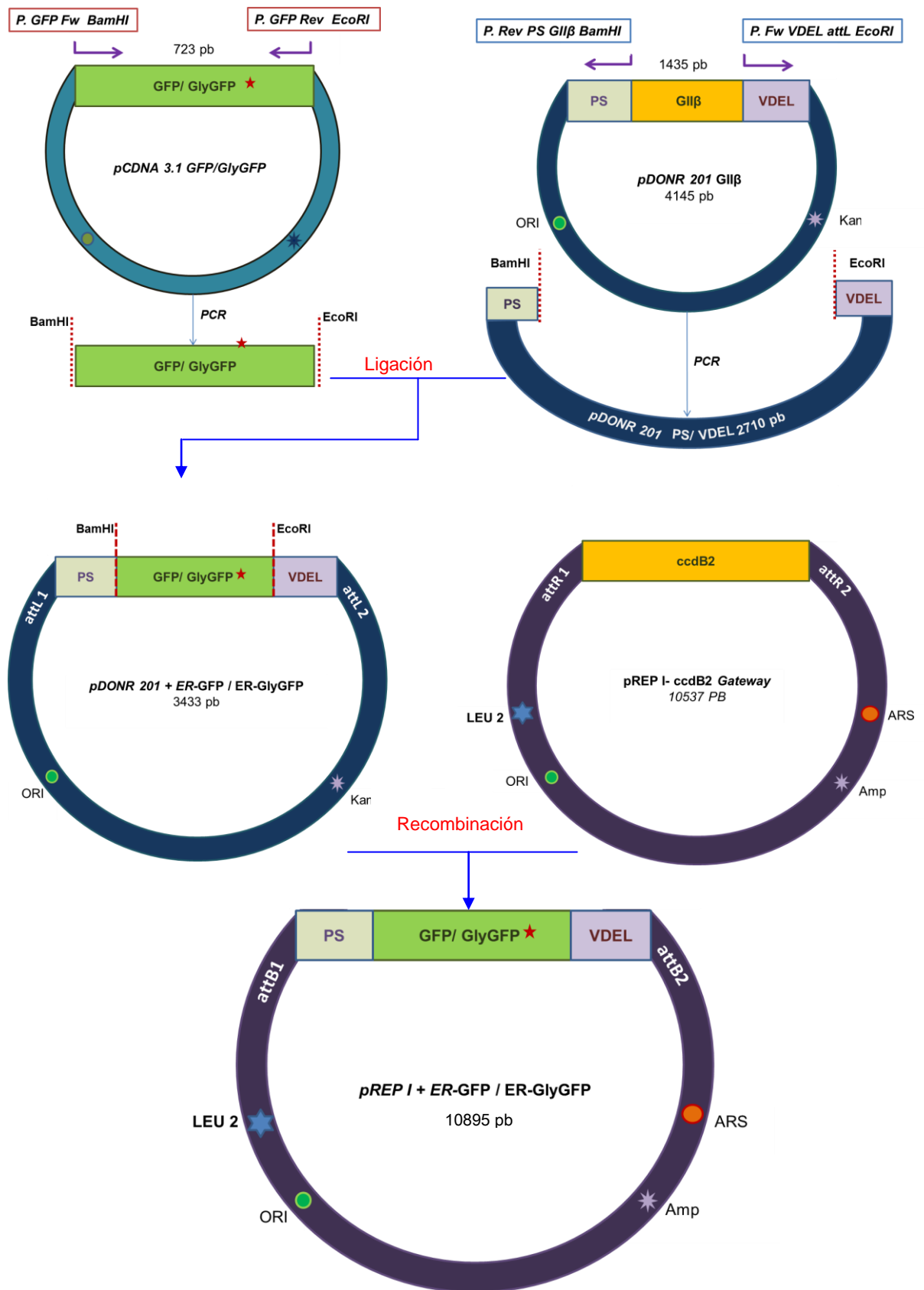


Figura 6. Estrategia de clonado. La figura muestra el esquema la estrategia para clonar GFP y GlyGFP fusionado a péptido señal y señal de retención del RE en vector de expresión de *S. pombe*.

Obtención de variantes de GFP fusionadas a péptido señal y señal de retención en el RE de *S. pombe*

Con el objetivo de realizar las construcciones detalladas en la **Figura 6**. Se obtuvieron por PCR:

- 1) El fragmento correspondiente al vector pDONR 201-PS/VDEL (2710pb), que se amplificó con los primers VDEL+ Stop attL Fw EcoRI y PSGII β Rev BamHI a partir del templado pDONR201-GII β
- 2) Los insertos GFP y GlyGFP (723pb) que se amplificaron con los primers GFP fw BamHI y GFP rev EcoRI a partir de los templados pCDNA 3.1 conteniendo las secuencias de GFP y GlyGFP enviados por Hudson Freeze.

Con esto se logró incluir en las secuencias de los insertos y el vector sitios de corte con enzimas de restricción (**Figura 7**). Las secuencias de los primers utilizados se detallan en la Tabla 2.

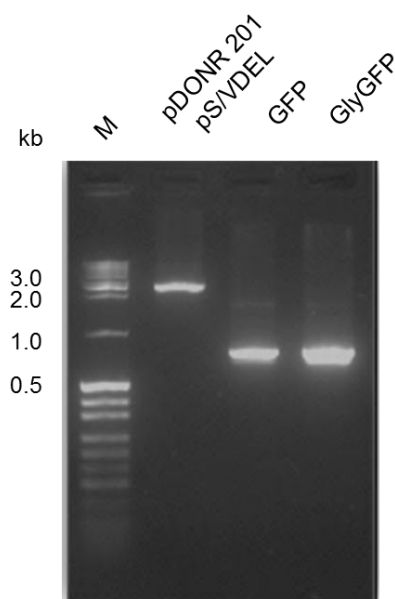


Figura 7. Amplificación de vector e Insertos.

Las bandas corresponden al vector pDONR201 que contiene PS y VDEL (Calle 2) y a la GFP, y su forma mutada con sitio de glicosilación GlyGFP (Calles 3 y 4 respectivamente) con sitios de restricción BamHI y EcoRI en sus extremos. Se observan los fragmentos esperados de 2710 pb para el vector y de 723 pb de los insertos.

Los productos de la amplificación anterior se purificaron por gel de agarosa y se llevaron a una concentración de 25 µg/mL. La digestión con enzimas de restricción dejó en el pDONR 201-PS/VDEL un extremo cohesivo BamHI y un extremo EcoRI (Figura 6). Tanto el inserto que codifica GFP como el que codifica GlyGFP se cortaron en el extremo *N*-terminal en el sitio BamHI y en C-terminal en el sitio EcoRI. Estos fragmentos fueron luego ligados por acción de la enzima ligasa como se indica en materiales y métodos y transformados a las cepas de bacterias *E. coli* JA226.

Las bacterias transformadas con las construcciones anteriores y seleccionadas por el marcador de resistencia a Kanamicina se confirmaron por Colony-PCR (**Figura 8**). Las **Figuras 8A y 8B** muestran la amplificación de fragmentos de los nuevos plásmidos pDONR 201-ERGFP y pDONR 201-ER-GlyGFP con dos juegos diferentes de primers que hibridaron en distintos lugares de las construcciones: en un caso se amplificó el inserto y en el otro el inserto con la secuencia codificante del PS. Con esto se verificó que las bacterias fueron transformadas con plásmidos que codifican para las proteínas de fusión ER-GFP y ER-GlyGFP y que las construcciones primarias a partir de las cuales iniciamos las transformaciones agregaron a sus secuencias el péptido señal y la señal de retención en RE.

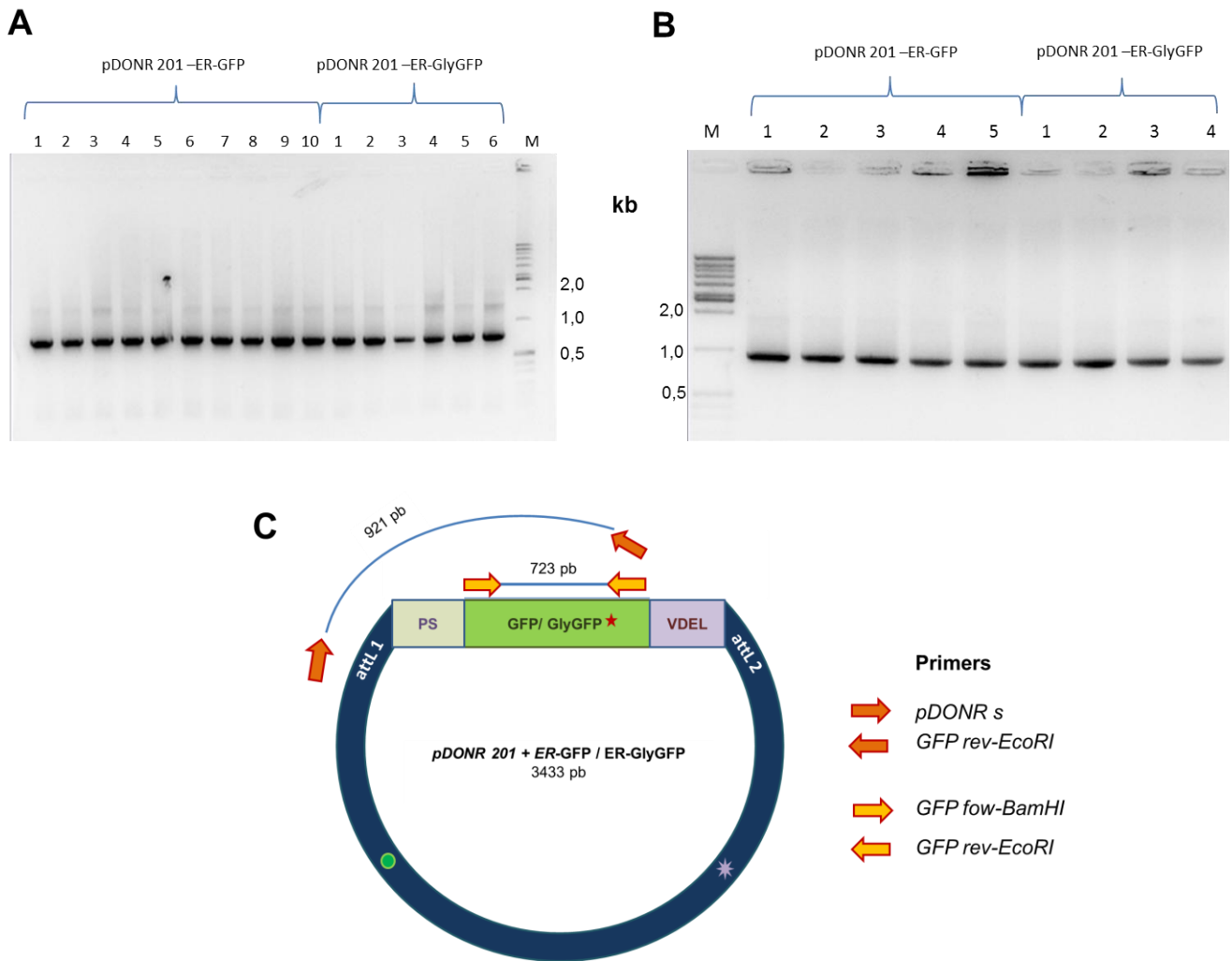


Figura 8. Colony PCR para verificar transformación de *E.coli* JA226 con las construcciones obtenidas de pDONR 201-ER-GFP y pDONR 201-ER-GlyGFP. En la Figura (A) se muestra la amplificación con primers GFP fw BamHI y GFP rev EcoRI, la figura (B) muestra la amplificación de las construcciones con primers pDONR 201 s y GFP rev EcoRI, es decir uno que hibridiza sobre el vector y otro sobre el inserto. Por su parte la figura (C) muestra los sitios de la construcción sobre los que hibridizan los primers utilizados.

Una vez elegidas las tres primeras colonias de cada construcción se realizó una preparación de DNA plasmídico y luego una digestión durante toda la noche a 37°C con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, liberándose los fragmentos esperados y verificándose por lo tanto los resultados obtenidos por *colony* PCR. Con el corte con BamHI se logró conocer el tamaño total de la construcción (3433

pb aproximadamente) que hace referencia al tamaño esperado del vector pDONR 201 con la inserción de ER-GFP o ER-GlyGFP (**Figura 9A**). Con el corte con BamHI y EcoRI en simultaneo se liberaron del vector a los fragmentos correspondientes al tamaño de los insertos de 723 pb (**Figura 9B**).

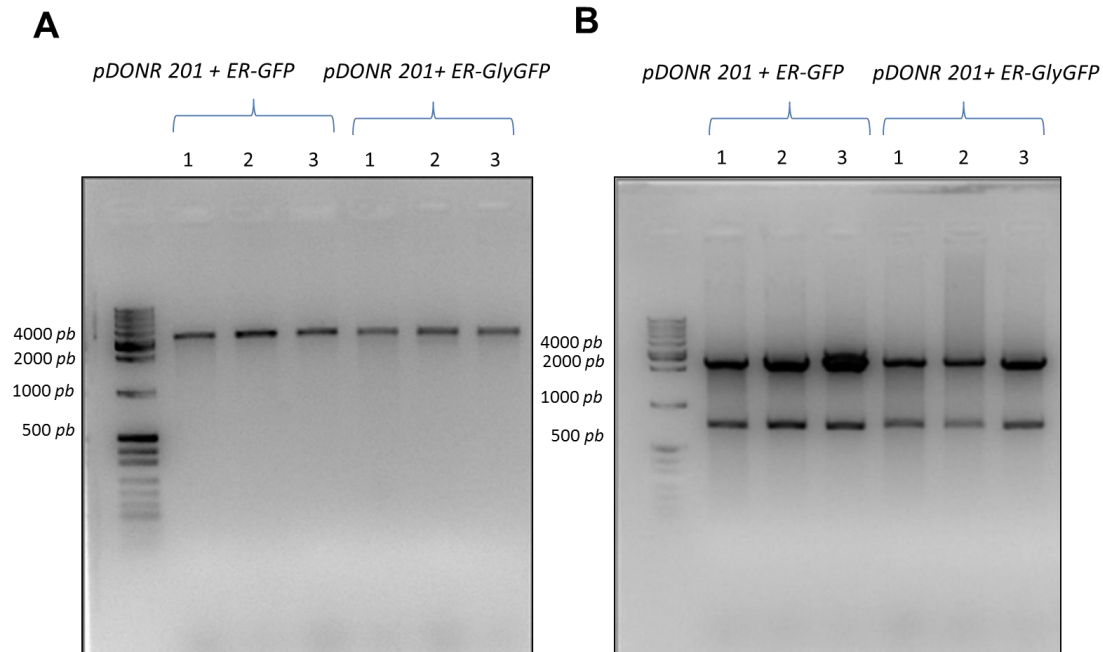


Figura 9. Verificación de las construcciones por digestión con enzimas de restricción. La figura (A) muestra la digestión con BamHI que linealiza las construcciones para conocer el tamaño total. La figura (B) muestra los cortes con BamHI y EcoRI para liberar la GFP y GlyGFP del pDONR 201-PS/VDEL.

Para verificar de forma definitiva que las construcciones eran las adecuadas, los tres clones de pDONR 201-ER-GFP y los tres clones de pDONR 201-ER-GlyGFP que fueron verificados por PCR con dos juegos de primers y también por digestión con enzimas de restricción fueron secuenciados. Estas reacciones se realizaron utilizando los primers pDONR 201s y pDONR 201 α que hibridizan sobre el vector pDONR 201, y mostraron que las secuencias de GFP y su variante con un sitio de *N*-glicosilación habían sido clonadas en fase con las secuencias codificantes para

el péptido señal de *S. pombe* y la señal de retención en el RE de dichas levaduras (resultados no mostrados). Estas construcciones realizadas sobre el vector Gateway compatible fueron entonces adecuadas para ser transferidas a un vector de expresión en levaduras *S. pombe* del sistema Gateway: el pREP1-ccdB.

Expresión de GFP y GlyGFP en cepas de S. pombe salvaje y mutante con defectos en la N-glicosilación de proteínas

Clonados mediante sistema Gateway a vector de expresión en levaduras pREP1

Las construcciones obtenidas de GFP fusionadas al PS y a la secuencia de retención VDEL en el vector pDONR 201 se transfirieron al vector de expresión en *S. pombe* pREP1-ccdB (Gateway compatible) mediante la reacción de recombinación LR clonasa. Este vector posee el promotor fuerte reprimible por tiamina nmt (por no message in thiamine) para expresión en *S. pombe*, un marcador de selección en bacterias (bla, que codifica para la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina) y un marcador de selección en levaduras (LEU2, que permite a las levaduras crecer en ausencia de leucina en el medio de cultivo). Además, posee el gen ccdB que es tóxico para las bacterias *E. coli* JA226, de manera que sólo los plásmidos que recombinaron e intercambiaron el gen ccdB por la construcción deseada pueden sobrevivir **(Figuras 5 y 6)**.

Los productos de la reacción de recombinación se electroporaron a bacterias *E. coli* JA226. Las colonias que crecieron en medio rico suplementado con ampicilina

(LBA) fueron utilizadas como templado de una reacción de *Colony* PCR utilizando los primers pREP fw y pREP rev b, es decir, que hibridizan en el nuevo vector de destino. La **Figura 10 A** muestra un gel de agarosa en el que se observan bandas de amplificación con el tamaño esperado (1088 pb aproximadamente). Se seleccionaron tres colonias de cada transformación para realizar una extracción de DNA plasmídico y posterior secuenciación. Los resultados de la secuenciación mostraron que se habían recombinado adecuadamente las construcciones al vector de expresión de levaduras (resultado no mostrado).

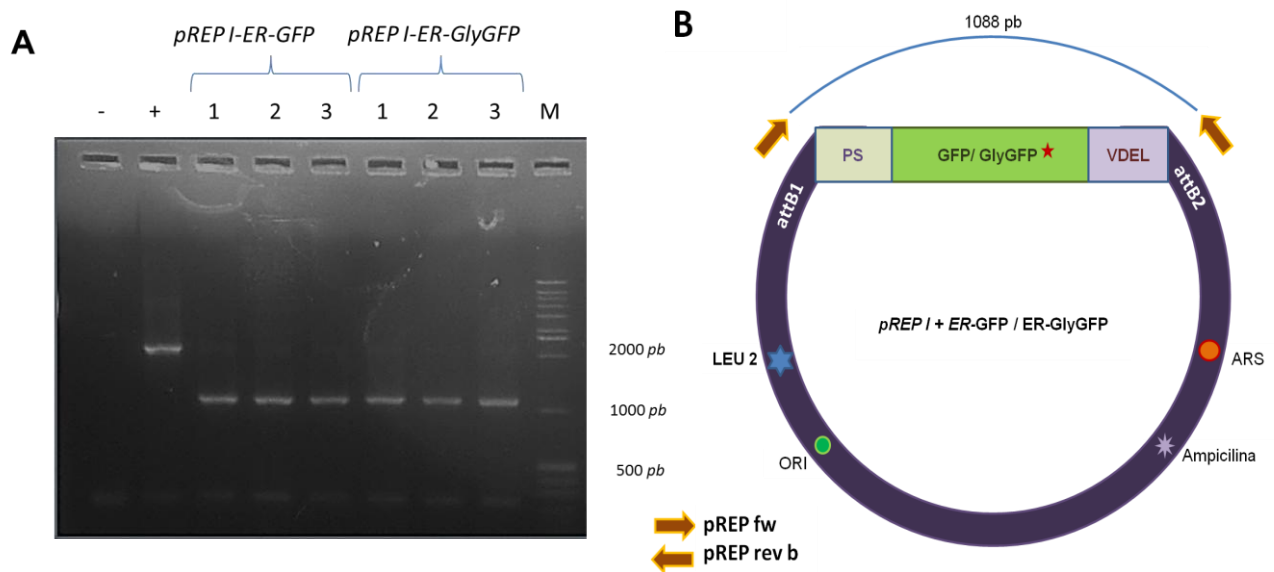


Figura 10. Verificación de la transferencia de las construcciones al vector de expresión pREP1 por colony PCR. La figura (A) muestra tres colonias positivas de bacterias *E. coli* JA226 que incorporaron el plásmido pREP1-ER-GFP y tres colonias que incorporaron el plásmido pREP1-ER-GlyGFP. El tamaño de las bandas se corresponde con tamaño esperado de 1088 pb. El control positivo de la reacción de PCR muestra el tamaño del vector de destino pREP1-ccdB. En el control negativo se utilizó H₂O en lugar de las colonias como templado de la PCR. La figura (B) muestra los sitios de la construcción donde hibridizan los primers utilizados.

Transformación de *S. pombe* WT y mutante de *N*-glicosilación con ER-GFP y ER-GlyGFP

Con estas nuevas construcciones se transformaron las dos cepas de levaduras elegidas para probar el sistema: una salvaje y otra con defectos en la *N*-glicosilación (*ADm* y Δ *alg6* respectivamente), cada una con los plásmidos que codifican las proteínas ER-GFP y ER-GlyGFP. Para ello se prepararon levaduras electrocompetentes como se indica en materiales y métodos, se electroporaron con 0.5 μ g de cada plásmido y se seleccionaron en un medio mínimo suplementado con adenina y uracilo pero sin leucina (MMAU) para seleccionar aquellas que incorporaron el plásmido (posee LEU2 como marcador de selección, **Figuras 4 y 6**). Se incubaron las placas a 28°C (temperatura óptima de crecimiento de las levaduras) y las colonias que aparecieron luego de 4-5 días de incubación fueron re-aisladas al mismo medio selectivo. Las mismas fueron confirmadas por *colony* PCR, nuevamente se amplificó el fragmento correspondiente al gen que codifica GFP con los primers GFP fw BamHI y GFP rev EcoRI y se confirmó la transformación de las dos cepas cada una con los plásmidos pREP1-ER-GFP y pREP1-ER-GlyGFP (**Figura 11**).

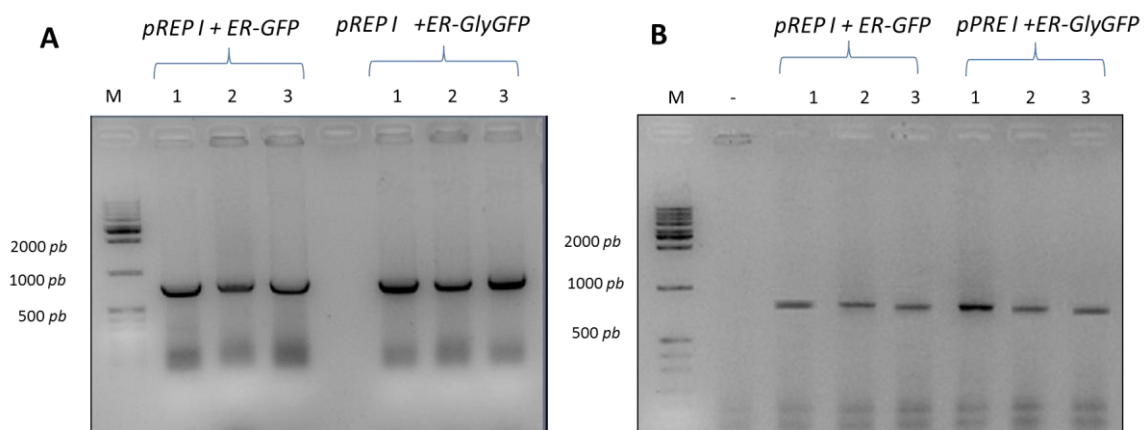


Figura 11. Verificación por *colony* PCR de la transformación de cepas de *S. pombe* WT y Δ *alg6*. La figura (A) muestra 3 colonias de la cepa *ADm* que incorporaron los plásmidos pREP1-ER-GFP y pREP1-ER-GlyGFP. La figura (B) muestra las mismas transformaciones pero en la cepa Δ *alg6*. El tamaño de las bandas amplificadas es el esperado de 723 pb.

Análisis de la expresión de ER-GFP en el RE de *S. pombe*

Para verificar que las construcciones efectivamente se estaban expresando en las levaduras *S. pombe* y que la GFP estaba siendo direccionada al RE, se realizó una microscopía de fluorescencia de la cepa *ADm* salvaje transformada con pREP1-ER-GFP.

Como se puede observar en la **figura 12**, las levaduras *S. pombe* transformadas con GFP no sólo fluorescen mostrando la expresión de la proteína GFP, sino que la fluorescencia presenta la formación de un halo perinuclear típico de la expresión en RE de *S. pombe*(24). Este resultado permite concluir que el agregado de péptido señal y la señal de retención VDEL fueron adecuados para la correcta expresión de la GFP en el RE de *S. pombe*.

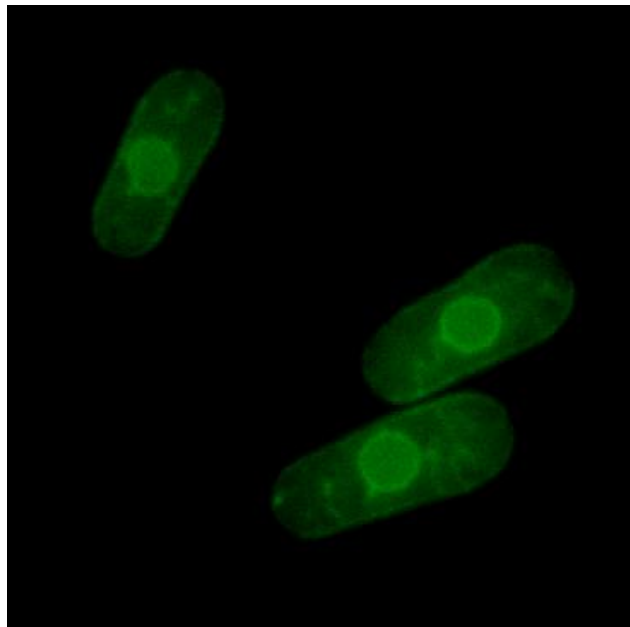


Figura 12. Expresión de ER-GFP en el RE de *S. pombe*. *S. pombe* transformada con pREP1-ER-GFP, que codifica para la proteína GFP fusionada en los extremos *N*- terminal al Péptido Señal y *C*- terminal a la señal VDEL presentes en la proteína residente del RE GII β .

Evaluación de la expresión y fluorescencia de ER-GlyGFP en cepas de S. pombe WT y mutantes de hipoglicosilación.

Microscopía de fluorescencia

Con el objetivo de evaluar la utilidad de la proteína ER-GlyGFP como bioamarcador de *N*-glicosilación se comparó la fluorescencia de las cepas *WT* y mutante Δ *Alg6* transformadas cada una de ellas con los plásmidos de expresión conteniendo los insertos ER-GFP y ER-GlyGFP al microscopio.

Se analizaron imágenes de fluorescencia de las cepas *ADm* y Δ *Alg6* expresando ER-GFP o ER-GlyGFP a partir de cultivos líquidos de levaduras crecidos hasta $OD_{600nm}=2.0$ en el medio selectivo MMAU. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en poco volumen del mismo medio para obtener un mayor número de células en fase exponencial de crecimiento por campo del microscopio.

La microscopía de fluorescencia permitió determinar para los clones de *ADm* expresando ER-GFP, como se mencionó anteriormente, que la fluorescencia es evidente con un halo peri nuclear característico del direccionamiento y retención de la proteína en el RE (**Figura 13A**). A esta cepa se consideró como control positivo porque al ser una proteína que carece de sitio de glicosilación, el glicano no es transferido y por tanto la GFP fluoresce.

La cepa *ADm* que expresa la variante ER-GlyGFP, es decir, cuya secuencia tenía incorporado un sitio de *N*-glicosilación Asn-X-Thr (por mutagenesis de la secuencia Asn-x-Asn en la secuencia Asn-X-Thr) perdió la fluorescencia, presumiblemente cuando éste sitio se ocupó por un glicano (**figura 13A**).

Consideramos a esta cepa como control negativo de fluorescencia, pues la cepa *WT* es una cepa que no tiene problemas para sintetizar ni transferir *N*-glicanos. Podemos concluir que en presencia de la *N*-glicosilación normal, la proteína GFP que presenta la secuencia consenso de *N*-glicosilación no fluoresce. Las imágenes también fueron capturadas en luz transmitida para verificar la existencia de células que con filtro para GFP no mostraron fluorescencia (**Figura 13B**).

Por su parte, la cepa $\Delta alg6$ (que se sabe produce hipoglicosilación en sus proteínas porque tiene defectos en la síntesis del glicano al no poder transferir la primera Glc al glicano $Glc_3Man_9GlcNAc_2$) transformada con la construcción ER-GFP también mostró fluorescencia en RE similar a la observada en la cepa *WT*. Esto ocurrió porque si bien ésta cepa tiene defectos en la síntesis del glicano la construcción de la proteína de fusión carece de sitio de *N*-glicosilación. Es decir, la cepa $\Delta alg6$ puede expresar la GFP normalmente.

Sin embargo en las transformaciones de la cepa $\Delta alg6$ con el constructo ER-GlyGFP se evidenció fluorescencia que sin llegar a ser cuantificada resultó ser intensa, con la aparición de un halo fluorescente peri-nuclear confirmando que la construcción se expresó en el RE. En este caso no sólo la cepa tiene defectos en la síntesis de los glicanos sino que la proteína tiene un sitio de glicosilación que precisamente no puede ser ocupado y por tanto fluoresce (**Figura 13A**).

Es decir, la proteína GFP con un sitio de glicosilación expresada en RE de levaduras *S. pombe WT* no emite fluorescencia, y la mutante $\Delta alg6$ que no transfiere eficientemente a las proteínas al no ocuparse los sitios de *N*-glicosilación si mostró fluorescencia.

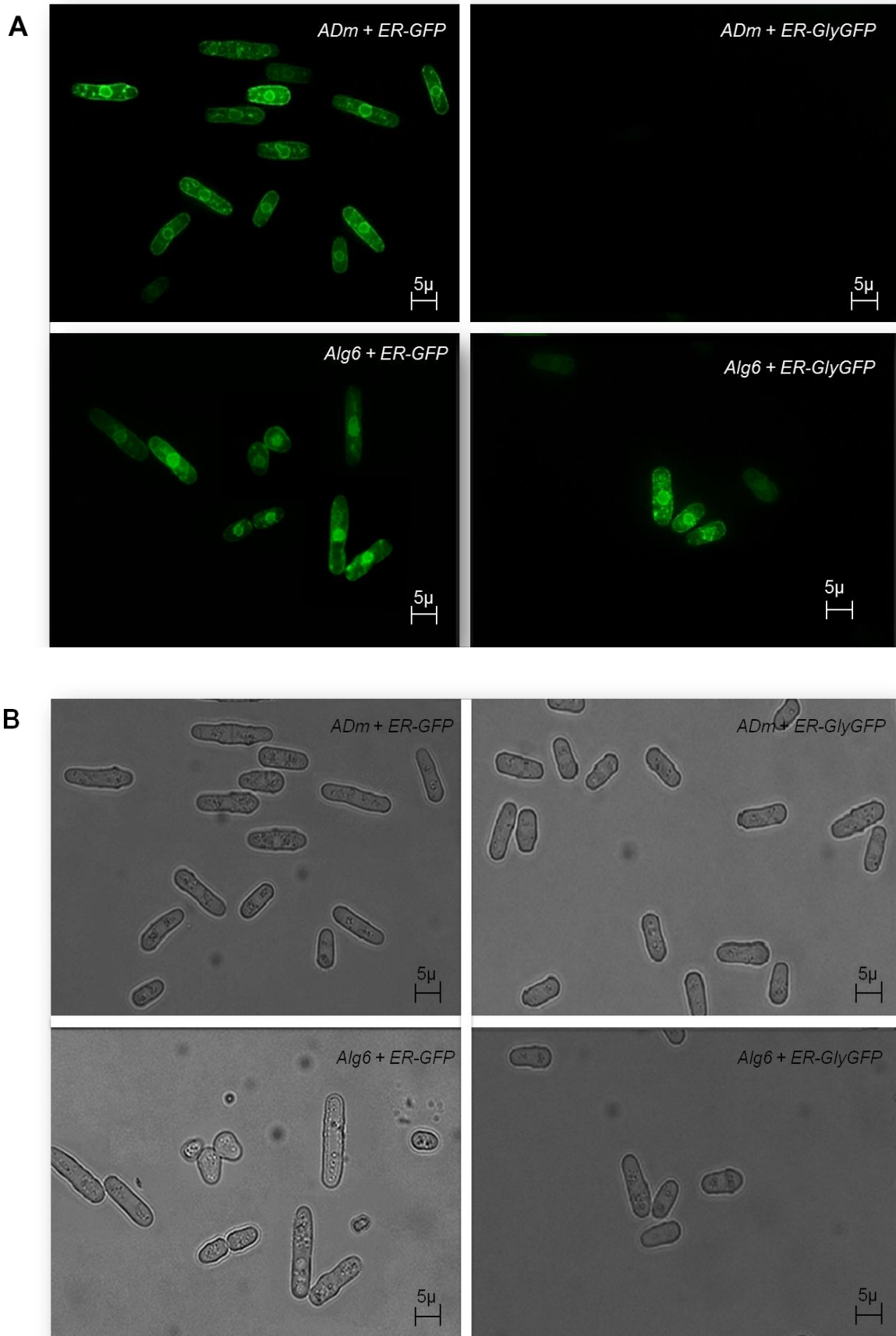


Figura 13. Comparación de fluorescencia en levaduras *WT* y Δ *alg6* expresando ER-GFP y ER-GlyGFP. (A) microscopía de fluorescencia (B) Las mismas cepas observadas en luz transmitida.

Inmunodetección de GFP y Gly GFP en extractos proteicos de *S. pombe*

Con el objetivo de verificar la expresión de las proteínas variantes de GFP se realizó un Western Blot a partir de los extractos proteicos obtenidos de las diferentes cepas transformadas y corridos en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La expresión de ER-GFP en la cepa transformada *ADm* se puede evidenciar con la aparición de una banda del tamaño esperado para la GFP madura (26 kDa). Para el caso de *ADm* transformada con ER-GlyGFP no se llegó a ver claramente una banda que demostrara la expresión de la proteína. La mutante $\Delta alg6$ transformada con ER-GFP muestra una banda que representa la forma no glicosilada de la GFP, mientras que la cepa $\Delta alg6$ transformada con ER-GFP presenta una doble banda consistente con la aparición de la forma glicosilada y la no glicosilada de la proteína (**figura 14 A**). El control de carga se realizó con CNX, que es una proteína integral de membrana del RE (**Figura 14 B**). Dicha proteína posee dos isoformas de diferente tamaño (25). Se puede observar que las cepas que expresan GFP con el sitio de *N*-glicosilación presentan la isoforma más pequeña. Al presente desconocemos los motivos de esta preferencia y será objeto de investigación en el laboratorio.

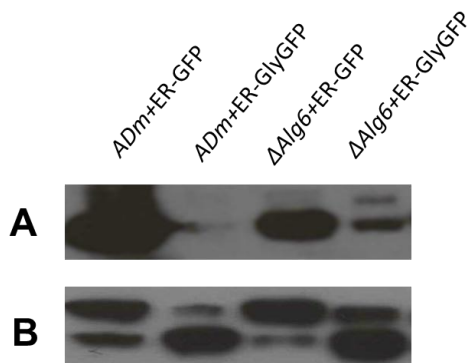


Figura 14: Inmunodetección de GFP (A) y Calnexina (B) en cepas de *S. pombe* *ADm* y *Alg6* expresando ER-GFP Y ER-GlyGFP Todas las cepas transformadas fueron sometidas a extracción de proteínas totales y 80 μ g de proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE 10%, transferidas a membrana de PVDF e inmunodetectadas como se describe en la sección de materiales y métodos.

Expresión de GlyGFP en células S. pombe salvajes tratadas con Tunicamicina como inhibidor de Glicosilación

Con el objetivo de comprobar que la ausencia de la banda en la inmunodetección con anti-GFP para la cepa *ADm* (salvaje) transformada con GlyGFP no se debió a un defecto en la expresión de la proteína, se realizaron cultivos de esta cepa en medio MMAU con el agregado de Tunicamicina, una droga que actúa inhibiendo la glicosilación de proteínas. Los ensayos se realizaron diluyendo el medio en varias concentraciones de la droga hasta obtener 1.0 µg/mL – 0.5 µg/mL -0.25 µg/mL de Tunicamicina. Cada concentración se realizó por triplicado para hacer observación a las 24, 48 y 72h.

A las 24 horas de incubación ninguno de los medios desarrollaron un crecimiento representativo que permitiera encontrar una cantidad considerable de células en las tres concentraciones **(Figura 15 A)**.

Las células cultivadas durante 48 horas mostraron mejor crecimiento (OD_{600} = 1.5-2.0) lo que permitió evidenciar la cepa *ADm* transformada con la variante GlyGFP con fluorescencia en RE, observación que permitió establecer los 0.5 µg/mL de droga como la concentración óptima para el tratamiento. Los cultivos cosechados a la concentración más alta (1.0 µg/mL) resultaron letales para el crecimiento de las levaduras **(Figura 15B)**.

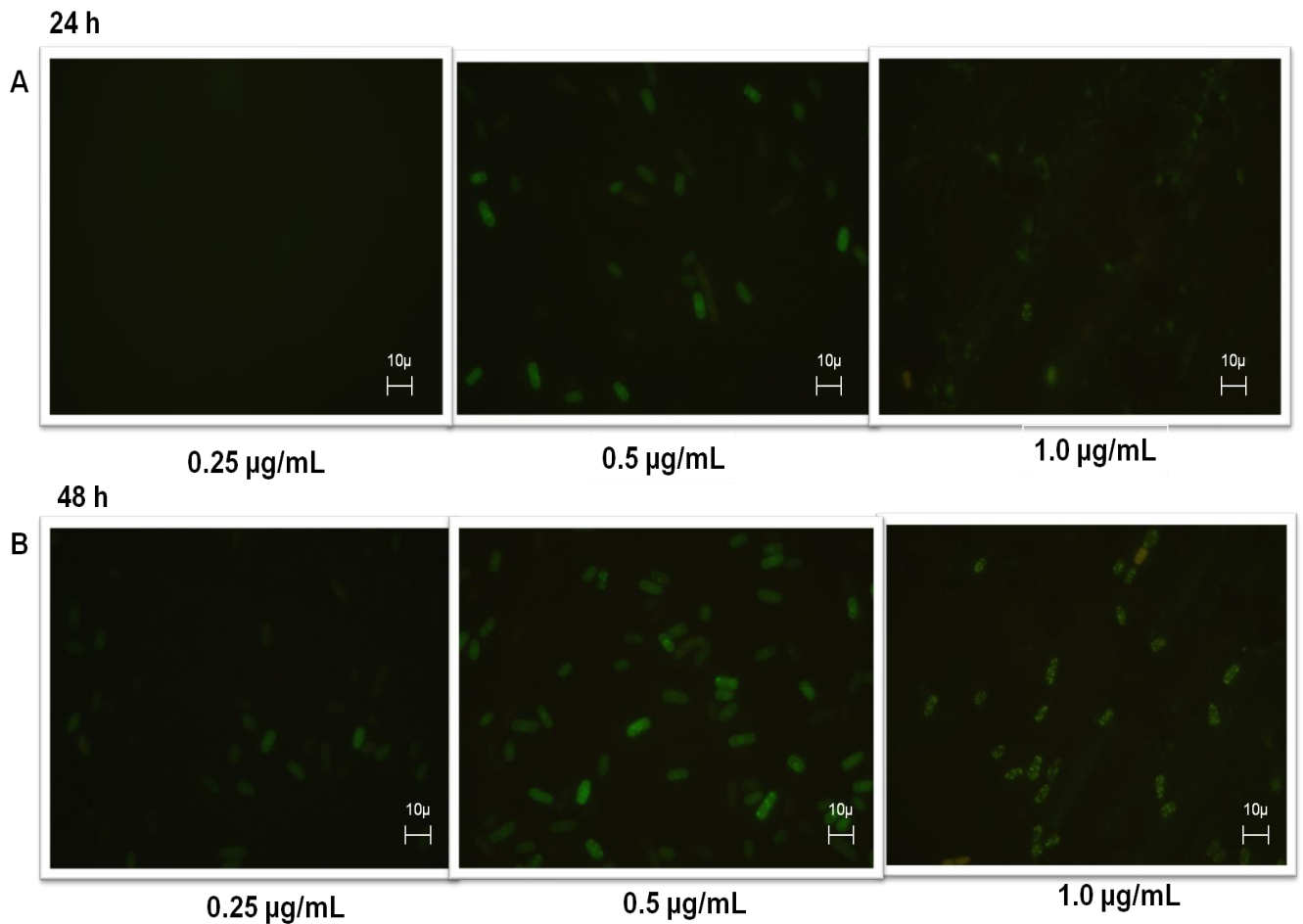


Figura 15. Tratamiento con Tunicamicina de *S. pombe Adm* transformada con GlyGFP. Fluorescencia de levaduras tratadas con las concentraciones de droga indicadas a las 24 horas (A) o 48 horas (B) de incubación. La concentración más alta de Tunicamicina es letal para el desarrollo de *S. pombe*. El halo perinuclear muestra la expresión de la proteína en RE.

El hecho de que la cepa *ADm* salvaje transformada con ER-GlyGFP no fluoresciera, ni hubiese bandas correspondientes al tamaño de la proteína esperado en el Western Blot, pero que al agregar un inhibidor de la *N*-glicosilación apareciera la fluorescencia indica que probablemente la acumulación de GFP mal plegada debido a la disrupción de su estructura terciaria por el agregado de un glicano conduce a esta proteína a degradación por ERAD.

Estos resultados permiten concluir que si bien hay dos motivos por los cuales se pierde la fluorescencia de la variante de GFP con sitio de glicosilación (la pérdida de la estructura de la proteína y su posterior degradación), el sistema desarrollado es válido para detectar cepas que producen hipoglicosilación en sus proteínas debidas a defectos en la composición de los glicanos unidos a Dol-PP y por lo tanto con defectos en la *N*-glicosilación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos desarrollado un sistema para monitorear la eficiencia de la glicosilación de proteínas *in vivo* en el RE de la levadura *S. pombe*. Para ello utilizamos como proteína modelo la proteína verde fluorescente GFP con un sitio introducido de *N*-glicosilación. El agregado del PS en el *N*-terminal y la señal de retención –VDEL en el *C*- terminal permitió que éstas proteínas de fusión se dirigieran y retuvieran en el RE. Aunque las levaduras *S. pombe* sin transformar tienen características de auto fluorescencia, la inserción de secuencias que direccionen la proteína a retículo y la posterior expresión y retención de la misma se logró demostrar con la aparición de un anillo peri nuclear fluorescente característico de la localización de proteínas en el RE de *S. pombe*. La microscopia de fluorescencia permitió ver tanto la expresión de ER-GFP y ER-GlyGFP en *S. pombe*, como su localización y retención en el RE.

La herramienta molecular desarrollada en el presente trabajo permitió determinar la hipoglicosilación de proteínas *in vivo* en una cepa de *S. pombe* $\Delta alg6$, que reproduce una de las modificaciones genéticas observadas en CDG Tipo I. Se comparó la fluorescencia de las cepas *ADm (WT)* y $\Delta alg6$ transformadas con los plásmidos ER-GFP y ER-GlyGFP, con lo que se determinó que las cepas *ADm WT* (sin defectos en la glicosilación), y $\Delta alg6$ (con deficiencia en una actividad enzimática involucrada en la biosíntesis de glicanos) al expresar construcciones de GlyGFP, variaron su capacidad de fluorescer de acuerdo a la ocupación dicho sitio con un glicano, mientras que no hubo variaciones en la fluorescencia cuando la proteína GFP expresada carecía de un sitio de *N*-glicosilación.

Lo anterior permitió demostrar la capacidad de la proteína GlyGFP como biomarcadora de hipoglicosilación ya que para la cepa $\Delta alg6$ ambas construcciones evidenciaron fluorescencia en RE, la transformada con GFP mostró fluorescencia porque no tiene sitio de ocupación, y la transformada con GlyGFP fluoresció también, porque si bien la construcción tiene sitio de *N*-glicosilación, es la levadura propiamente dicha la que tiene problemas en la transferencia de *N*-glicanos.

Los hallazgos obtenidos en el Western Blot permitieron confirmar la presencia de la proteína en las cepas transformadas. No obstante, la cepa *ADm* + ER-GlyGFP no mostró ni fluorescencia ni presencia de proteína en el Western Blot, pero al someterse a tratamiento con Tunicamicina algunas células empezaron a verse fluorescentes en RE. Es decir, al someter las células a la droga que inhibe la *N*-glicosilación se logró ver la expresión de ER-GlyGFP en cepas que previas al tratamiento no mostraban fluorescencia.

Con estos resultados se demostró que al inhibirse la glicosilación por acción de la droga, no se ocupan los sitios de *N*-glicosilación y por tanto la proteína fluoresce, sugiriendo que la ausencia de banda en el Western Blot de la cepa *ADm* transformada con ER-GlyGFP es probablemente producto de la degradación de la proteína mal plegada y no a que el clon no se expresa adecuadamente. Nuestros resultados indican que este sistema desarrollado es útil para la evaluación de hipoglicosilación de proteínas *in vivo* en *S. pombe*.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Duncan CD, Mata J. (2014) The translational landscape of fission-yeast meiosis and sporulation. *Nat Struct Mol Biol.* doi: 10.1038/nsmb.2843.
2. Alberts et al. "Molecular Biology of the cell" fifth edition (2008) 522- 525.
3. Mesitov MV, Moskovtsev AA, Kubatiev AA, (2013) Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 97-108.
4. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
- 5 Stigliano, ID; Alculumbre, SG; Labriola, CA.; Parodi, AJ. y 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
6. Mohorko E, Glockshuber R, Aebi M. (2011) Oligosaccharyl transferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2011;34(4):869-78.
7. Parodi, A. J. (2000) Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 69-95.
8. D'Alessio, C; Caramelo, J.; y Parodi, A.J. (2010) UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control. *Semin Cell Dev Biol.* 21, 491-9.
9. Sousa, M., Ferrero-García, M. and Parodi, A. J. (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* 31, 97-105.

-
10. Hua-Bei Guo, Heather Johnson, Matthew Randolph, and Michael Pierce (2009) Regulation of Homotypic Cell-Cell Adhesion by Branched *N*-Glycosylation of N-cadherin Extracellular EC2 and EC3 Domains *J Biol Chem.*; 284(50): 34986–34997.
 - 11 Perez, M. and Hirschberg, C.B. (1986) Topography of glycosylation reactions in the rough endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 261, 6822-6830
 12. Burda P, Aebi M (1999) “The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*” 1426, 239-57.
 - 13 Tesis de Licenciatura Micaela D. García, UNSAM, 2013
 14. Helenius, A. y Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 1019–1049.
 - 15 Castro O, Movsichoff F, Parodi AJ (2006) Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14756-60.
 16. Freeze HH, Schachter H. (2009) Genetic Disorders of Glycosylation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 42.
 17. Vleugels W, Keldermans L, Jaeken J, Butters TD, Michalski JC, Matthijs G, Foulquier F. Quality control of glycoproteins bearing truncated glycans in an ALG9-defective (CDG-IL) patient. *Glycobiology* vol. 19 no. 8 pp. 910–917.
 18. Losfeld ME, Soncin F, Ng BG, Singec I, Freeze HH (2012) A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy *FASEB J.* 26(10):4210-7.

-
19. Fanchiotti, S., Fernández F., D'Alessio, C., y Parodi, J. (1998) "The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress". *Cell Biol* 143 (3), 625-635.
 20. Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. y Wabrik, E. (1993). Experiments with fission yeast: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 21. Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795–823.
 22. Magnani, E., Bartling, L. y Hake, S. (2006) From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Mol. Biol.* 7: 46.
 23. Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3ra ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 24. Stigliano I., Caramelo J., Labriola C, Parodi AJ and D'Alessio C (2009). "Glucosidase II β Subunit Modulates N-Glycan Trimming in Fission Yeasts and Mammals" *Mol. Biol. Cell.* vol. 20 no. 17, 3974-3984.
 25. Guérin R, Beauregard PB, Leroux A, Rokeach LA (2009) Calnexin regulates apoptosis induced by inositol starvation in fission yeast. *PLoS One.* Jul 16;4(7):e6244. doi: 10.1371/journal.pone.0006244.