

Universidad de Extremadura

Facultad de Ciencias

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Microbiología



TESIS DOCTORAL

Identificación y análisis funcional de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la fosforilación de *N*-oligosacáridos

Presentada para optar al Grado de Doctor por:

Isaac Corbacho Cuello

Badajoz, 25 de Noviembre de 2008

*Programa de Doctorado Avances en el Estudio de Organismos Uni- y Pluricelulares
Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología*

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>



Universidad de Extremadura

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA
Facultad de Ciencias
Edificio de Biología
Avda. de Elvas s/n
06071 Badajoz

El Dr. Gervasio Martín Partido, Director del Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología de la Universidad de Extremadura, responsable del Programa de Doctorado “Avances en el Estudio de Organismos Uni- y Pluricelulares”:

CERTIFICA

Que La Tesis Doctoral titulada: “**Identificación y análisis funcional de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la fosforilación de N-oligosacáridos**”, presentada por D. **Isaac Corbacho Cuello** para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Luis M. Hernández Martín** y la **Dra. Isabel Olivero Jiménez**, en el Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología) de la Universidad de Extremadura

Y para que así conste, expido y firmo la siguiente certificación en Badajoz, a 30 de Junio de 2008.

Fdo: Gervasio Martín Partido
Director del Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología



Universidad de Extremadura

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
Facultad de Ciencias
Edificio Juan Remón Camacho
Avda. de Elvas s/n
06071 Badajoz

Los Doctores Luis M. Hernández Martín e Isabel Olivero Jiménez, Profesores Titulares del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Extremadura

CERTIFICAN

Que el licenciado D. Isaac Corbacho Cuello ha realizado el trabajo titulado **“Identificación y análisis funcional de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la fosforilación de N-oligosacáridos”** bajo su dirección, en el Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología) de la Universidad de Extremadura, para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firman el presente certificado en Badajoz, a 30 de Junio de 2008.

Fdo: Luis M. Hernández Martín
Profesor Titular del Departamento
de Ciencias Biomédicas

Fdo: Isabel Olivero Jiménez
Profesora Titular del Departamento
de Ciencias Biomédicas

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, Luis Miguel e Isabel, porque confiaron en mí y me dieron la oportunidad de realizar este trabajo y aprender de ellos tantas cosas. No hay palabras suficientes para expresar mi agradecimiento, y espero que hayan visto recompensado su esfuerzo y su dedicación con este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, *la Mati, la Ana, la Isa, Ana la Manuela y el Paquito* por la enorme cantidad de horas que hemos pasado juntos estos años, formando una pequeña familia. Los buenos ratos, los consejos, la ayuda y el apoyo fueron muy importantes todo este tiempo.

A los otros profesores del departamento, Manolo y Pilar, por los buenos ratos, su ayuda y su consejo.

A mi familia y mis amigos, que durante este tiempo han sufrido también los avatares de este trabajo, y nunca faltó su apoyo, su ánimo y su comprensión.

A Jesús *el Jetas* que me ayudó con la parte correspondiente al inglés, sobre todo para la defensa pública de la Tesis.

A la Junta de Extremadura y a la Universidad de Extremadura, por sus becas predoctorales, que me permitieron realizar este trabajo.

Al Centro de Levaduras de la Universidad de Gotemburgo (Suecia), junto con las Becas Marie Curie de la Unión Europea, por darme la oportunidad de conocer su centro y trabajar con ellos para realizar el Capítulo V de esta Tesis.

Al Instituto Tecnológico Federal Suizo de Zúrich (Suiza), en el que gracias a las becas de EMBO y FEMS, tuve la suerte de visitar para tener una de las mejores experiencias de mi vida, y que me permitió realizar el trabajo recogido en el Capítulo IV.

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por los proyectos 2PR03A080, 3PR05A096, y PRI07A087, de la Junta de Extremadura.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Entre las distintas posibilidades que existían a la hora de estructurar la presente Memoria, hemos decidido repartir los contenidos de la siguiente forma:

La Tesis se inicia con una **Introducción** general, que recoge los antecedentes más representativos del tema de trabajo y permite fijar el contexto en el que se encuadra el trabajo presentado. Al final de la Introducción se recogen las referencias bibliográficas citadas en este apartado. Adicionalmente, al principio de cada capítulo se incluye una breve introducción específica.

Posteriormente se exponen los **Objetivos** que se perseguían con la realización de este trabajo.

Dentro de cada uno de los seis capítulos se exponen los **Resultados** y se **Discuten** adecuadamente. Así mismo, la **Bibliografía** citada en cada Capítulo se incluye al final del mismo.

El **Capítulo I** recoge el trabajo de identificación y análisis de los mutantes *ldb* de *Saccharomyces cerevisiae*, aislados previamente en nuestro grupo. Este Capítulo ha dado lugar a dos publicaciones:

Olivero, I., Corbacho, I. and Hernández, L. M. (2003). "The *ldb1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is defective in Pmr1p, the yeast secretory pathway/Golgi Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase." *FEMS Microbiol. Lett.* **219**(1): 137-142.

Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2004). "Identification of low-dye-binding (*ldb*) mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res.* **4**(4-5): 437-444.

En el **Capítulo II** se describe la búsqueda a escala genómica de genes relacionados con el proceso de manosilfosforilación de *Saccharomyces cerevisiae*. Este Capítulo está recogido en la publicación:

Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2005). "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides." *Fungal Genet. Biol.* **42**(9): 773-790.

El **Capítulo III** es una extensión de los resultados obtenidos en el Capítulo II, y en él se analiza la función de la V-ATPasa en relación con la manosilfosforilación, y

otros procesos que ocurren en el aparato de Golgi. Los resultados de este Capítulo están siendo preparados para confeccionar una publicación que será enviada en breve.

En el **Capítulo IV** se identifica y analiza el mutante *mnn3* de *Saccharomyces cerevisiae*, aun pendiente de identificar desde su aislamiento. Este Capítulo, junto con los resultados del análisis de *microarrays* de dicha cepa, descrito en el Capítulo V, serán enviados a publicar próximamente.

El **Capítulo V** recoge parte del trabajo realizado por el Doctorando durante su estancia en el Centro de Levaduras de la Universidad de Gotemburgo (Suecia), gracias a una Beca Marie Curie de la Unión Europea, bajo la supervisión de los Doctores **Stephan Hohmann** y **Per Sunnerhagen**. Durante ese tiempo tuvo acceso a la tecnología de *microarrays* de ADN. La parte de esos resultados concerniente al estudio de la cepa *vps74/mnn3Δ* será publicada junto con los resultados del Capítulo IV. La otra, referente al análisis del transcriptoma de la cepa *mnn2Δ*, ha sido publicada en el siguiente artículo:

Corbacho, I., Olivero, I., Hohmann, S., Sunnerhagen, P. and Hernández, L. (2006). "Genome-wide expression profile of the *mnn2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*." *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**(3): 485-494.

El **Capítulo VI** recoge el trabajo realizado por el Doctorando durante su estancia en el **Instituto Tecnológico Federal Suizo** (ETH) de Zúrich gracias a sendas becas de estancia corta de FEMS (*Federation of European Microbiological Societies*) y EMBO (*European Molecular Biology Organization*). Durante este tiempo el Doctorando tuvo la ocasión de trabajar en el grupo del **Dr. Markus Aebi**, una autoridad reconocida mundialmente en el campo de la glicosilación, y tener acceso a técnicas punteras desarrolladas recientemente, como las que se describen en dicho Capítulo. Así mismo, tras la finalización del trabajo, el Doctorando recibió uno de los **premios FEMS/ESCMID Research Fellowships Awards 2007**. Los resultados de este trabajo, hecho en colaboración con otro estudiante del Centro Receptor, **Benjamin L. Schulz**, están listos para ser enviados a publicar.

En el apartado de Conclusiones se recoge una lista-resumen de todas las conclusiones comentadas previamente en cada uno de los capítulos.

Por último, al final de la Memoria de la Tesis se incluye un apartado de **Materiales y Métodos** donde se describen de forma detallada todas las técnicas utilizadas para confeccionar este trabajo, así como los materiales necesarios para las mismas y protocolos detallados. Igual que en los apartados anteriores, los Materiales y Métodos llevan también una relación de las referencias bibliográficas citadas.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1. La glicosilación, importante y compleja modificación post-traducciona	7
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de glicosilación en eucariotas	8
3. Las <i>N</i> -glicoproteínas y su biosíntesis	9
3.1 Biosíntesis del oligosacárido unido al dolicol-P	10
3.2 La oligosacariltransferasa (OST)	12
3.3 Variaciones de la estructura del oligosacárido en el aparato de Golgi	12
4. La fosforilación de los <i>N</i> -oligosacáridos	15
5. Aspectos funcionales de la glicosilación de proteínas	17
6. Referencias	18
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO I	23
IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES <i>LOW-DYE-BINDING (LDB)</i> EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	
1. Introducción	23
2. Resultados y discusión	25
2.1. Características fenotípicas de los mutantes <i>ldb</i>	25
2.2. Identificación de los genes <i>ldb</i> por complementación de los fenotipos mutantes	28
2.2.1. Identificación de <i>ldb1</i>	29
2.2.2. Identificación de <i>ldb2</i>	35
2.2.3. Identificación de <i>ldb6</i>	36
2.2.4. Identificación de <i>ldb11</i>	37
2.2.5. Identificación de <i>ldb12</i>	37
2.2.6. Identificación de <i>ldb13</i>	38
2.2.7. Identificación de <i>ldb15</i>	39
2.3. Identificación de <i>ldb4, ldb5, ldb7, ldb9, ldb10 y ldb14</i>	40
3. Consideraciones finales	42
4. Referencias	43
CAPÍTULO II	47
BÚSQUEDA A ESCALA GENÓMICA DE GENES NO ESENCIALES EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> INVOLUCRADOS EN MANOSILFOSFORILACIÓN	
1. Introducción	47
2. Resultados y discusión	49
2.1 Glicosilación de proteínas y organización de la pared celular	50
2.2 Acidificación de la vacuola	57
2.3 Localización vacuolar / Otros relacionados con la vacuola	58
2.4 Secreción, transporte, y organización de actina/citoesqueleto	60
2.5 Transcripción y transducción de señales	63

2.6 Metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos	64
2.7 Miscelánea	66
2.8 ORF dudosas o no caracterizadas	67
3. Consideraciones finales	69
4. Bibliografía	72
CAPÍTULO III	77
ALGUNAS FUNCIONES DEL APARATO DE GOLGI SON DEPENDIENTES DE LA V-ATPASA	
1. Introducción	77
2. Resultados y discusión	79
2.1. Genes relacionados con la acidificación de la vacuola cuya delección da como resultado un fenotipo <i>ldb</i>	79
2.2. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la manosilfosforilación de los <i>N</i> -oligosacáridos en Golgi	81
2.3. Efecto de la actividad V-ATPasa sobre la elongación de la cadena externa de los <i>N</i> -oligosacáridos en Golgi	83
2.4. Efecto de la actividad V-ATPasa sobre la adición de las manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$ a los <i>N</i> -oligosacáridos en Golgi	84
2.5. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la maduración del factor α en Golgi	85
2.6. Efecto del pH extracelular sobre los mutantes <i>vma</i>	86
3. Consideraciones sobre el papel de la V-ATPasa en la manosilfosforilación y la elongación de la cadena externa de los <i>N</i> -oligosacáridos	89
4. Referencias	91
CAPÍTULO IV	93
IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>MNN3</i> DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> Y ANÁLISIS FUNCIONAL EN RELACIÓN CON EL FENOTIPO <i>LDB</i>	
1. Introducción	93
2. Resultados y discusión	95
2.1. Identificación del gen <i>MNN3</i>	95
2.2. Secuenciación y caracterización de la mutación <i>mnn3</i>	98
2.3. Sobreexpresión de <i>YPT6</i> y <i>VPS74</i> . Efecto sobre el fenotipo <i>ldb</i>	101
2.4. Sobreexpresión de <i>MNN6</i> en <i>vps74Δ</i> e <i>ypt6Δ</i>	104
2.5. Sobreexpresión de <i>YPT6</i> y <i>VPS74</i> . Efecto sobre la glicosilación	105
2.6. Función de <i>VPS74/MNN3</i>	107
3. Referencias	109
CAPÍTULO V	111
ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LOS MUTANTES <i>mnn2Δ</i> Y <i>mnn3Δ</i> DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i> DE ADN	
1. Introducción	111
2. Resultados y discusión	113
2.1 Análisis del transcriptoma de <i>mnn2Δ</i>	113
2.1.1. Metabolismo y energía	118
2.1.2. Transcripción	119
2.1.3. Transporte celular	119
2.1.4. Ciclo celular y procesamiento del ADN	120
2.1.5. Proteínas no clasificadas y otros grupos	120
2.1.6. Consideraciones sobre el análisis del transcriptoma de <i>mnn2Δ</i>	120
2.2 Estudio del transcriptoma de <i>vps74/mnn3Δ</i>	121
2.2.1. Biogénesis de componentes celulares	127
2.2.2. Comunicación celular/Transducción de señales	128
2.2.3. Ciclo celular y procesamiento del ADN	130

2.2.4. Destino de proteínas	131
2.2.5. Diferenciación celular	132
2.2.6. Interacción con el entorno	133
2.2.7. Metabolismo y energía	133
2.2.8. Rescate celular, defensa y virulencia	134
2.2.9. Transcripción	137
2.2.10. Transporte celular, sistemas y rutas de transporte	138
2.2.11. ORFs no caracterizadas	139
2.2.12. Consideraciones sobre el análisis del transcriptoma de <i>vps74/mnn3Δ</i>	142
3. Referencias	146
CAPÍTULO VI	153
EFICIENCIA DE LA OLIGOSACARILTRANSFERASA PARA GLICOSILAR SITIOS ESPECÍFICOS BAJO CONDICIONES LIMITANTES DE SUBSTRATO	
1. Introducción	153
2. Resultados y discusión	156
2.1. Hipoglicosilación dependiente de sitio en condiciones de limitación de LLO	157
2.2. Características de los secuencias con eficiencia de glicosilación variable	161
2.3. Introducción de secuencias en una glicoproteína modelo	166
2.4. Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDGs)	169
3. Consideraciones finales	170
4. Referencias	170
CONCLUSIONES	173
MATERIALES Y MÉTODOS	177
1. Reactivos	178
2. Medios de cultivo	178
3. Cepas	179
4. Plásmidos	180
5. Oligonucleótidos	181
6. Técnicas de cultivo y manejo de las células	182
6.1. Crecimiento	182
6.2. Conjugación y selección de diploides	182
6.3. Esporulación	183
6.4. Disección de tétradas	183
6.5. Tinción con azul alcian	183
6.6. Inhibición de la V-ATPasa	184
6.7. Tinción vital con quinacrina	185
6.8. Tinción vital con rojo neutro	185
6.9. Prueba del factor α	186
6.10. <i>Drop-test</i> o <i>spotting assay</i>	186
6.11. Microscopía	187
6.12. Medición del crecimiento	187
6.13. Conservación de las cepas	188
6.14. Ensayos de aglutinación con anticuerpos	188
7. Técnicas de manipulación genética de las células	188
7.1. Extracción de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	188
7.2. Extracción de ARN total de <i>S. cerevisiae</i>	189
7.3. Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	190
7.4. Extracción de plásmidos de <i>S. cerevisiae</i>	191
7.5. Transformación de <i>E. coli</i>	191
7.6. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	192
7.7. Selección de transformantes por afinidad	193

7.8. Producción de células competentes de <i>E. coli</i>	195
8. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	196
8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa, visualización y recuperación de bandas	196
8.2. Reacciones de amplificación (PCR)	197
8.3. Reacciones de restricción	199
8.4. Reacciones de ligamiento y <i>TA-Cloning</i>	199
8.5. Reacciones de secuenciación	199
8.6. Mutagénesis dirigida	200
8.7. Precipitación de ácidos nucleicos	203
8.8. Cuantificación y determinación de la pureza de ácidos nucleicos	203
8.9. Fabricación de microarrays	204
8.10. Síntesis de ADNc a partir de ARNm y marcaje fluorescente	204
8.11. Hibridación de microarrays	205
9. Técnicas de manipulación de proteínas	206
9.1. Extracción y electroforesis de invertasa en condiciones nativas	206
9.2. Extracción y <i>SDS-PAGE</i> de carboxipeptidasa Y	207
9.3. <i>Western-blot</i>	208
9.4. Preparación de muestras para espectrometría de masas	209
10. Técnicas de espectrometría de masas	211
10.1. MALDI-TOF/TOF o desorción/ionización láser asistida por matriz <i>Time-of-flight/Time-of-flight</i>	211
10.2. LC-ESI-MS/MS o técnica combinada de Cromatografía líquida-Ionización de electroespray-Espectrometría de masas en tándem	211
10.3. Análisis de datos e identificación de péptidos	211
11. Técnicas informáticas	212
11.1. Adquisición de imágenes de geles con bromuro de etidio	212
11.2. Escaneado y lectura de <i>microarrays</i>	212
11.3. Análisis de los resultados de los microarrays	212
11.4. Visualización de estructuras proteicas en 3D	212
11.5. Asistencia en clonaciones	212
11.6. Bases de datos	213
11.7. Predicción	213
11.8. Alineamiento de secuencias	213
11.9. Análisis estadístico	214
12. Referencias	214

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
ADNc	ADN complementario
ALG	Genes relacionados con la N-glicosilación (<i>asparagine linked glycosylation</i>)
ALP	Fosfatasa alcalina (<i>alkaline phosphatase</i>)
AMPc	Adenosín-monofosfato cíclico
Arg	Arginina
Asp	Asparagina
CDG	Desórdenes congénitos de glicosilación (<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>)
cfu	Unidades formadoras de colonias (<i>colony forming units</i>)
CPY	Carboxipeptidasa Y
CWI	Integridad de la pared celular (<i>cell wall integrity</i>)
Cys	Cisteína (<i>cysteine</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
Dol	Dolicol
Dol-P	Dolicol fosfato
Dol-PP	Dolicol pirofosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMS	Sulfonato de etil metano
endoH	Endoglicosidasa H
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum associated degradation</i>
EUROFAN	<i>European Saccharomyces cerevisiae Functional Analysis Project</i>
EUROSCARF	<i>European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis</i>
Glc	Glucosa
GPI	Glicosidilfosfatidilinositol
HCS	Supresores de alto número de copias (<i>high copy suppressors</i>)
HOG	Vía de transducción de señales mediada por Hog1p
LC-ESI-MS/MS	Técnica combinada de Cromatografía líquida-Ionización de electroespray-Espectrometría de masas en tándem
LDB	Genes cuya delección produce un fenotipo de baja unión a colorante (<i>low-dye-binding</i>)
LLO	Oligosacárido unido a lípido (<i>lipid-linked oligosaccharide</i>)
MALDI-TOF/TOF	Espectrometría de masas con fuente de ionización tipo MALDI (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>) y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem (<i>TOF/TOF, Time-of-flight/Time-of-flight</i>)
Man	Manosa
MAPK	Proteín quinasa activada por moitógeno
MCS	Sitio de clonación múltiple (<i>multi-cloning site</i>)
MEKK	Quinasa de quinasa de proteín quinasa activada por mitógeno (MKKK)
MIPS	Centro de Información de Secuencias de Proteínas de Múnich, Alemania (<i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>)
MNN	Genes relacionados con la síntesis de mananos (<i>mannan defective</i>)
M-Pol	Manano Polimerasa
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
NAcGlc	N-acetilglucosamina
ORF	Marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i>)
OST	Oligosacariltransferasa

P	Fosfato
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pi	Fosfato inorgánico
PKC	Vía de transducción de señales mediada por Pkc1p
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
Pro	Prolina
PVC	Compartimento prevacuolar (<i>prevacuolar compartment</i>)
RE	Retículo Endoplasmático
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Ser	Serina
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces Genome Database</i>)
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFN	Ácido trifluoroacético
Thr	Treonina (<i>threonine</i>)
Tm	Temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris-hidroximetil aminometano
UDP	Uridín di-fosfato
V-ATPasa	H ⁺ -ATPasa de la membrana vacuolar
VPS	Genes relacionados con el transporte de proteínas a la vacuola (<i>vacuolar protein sorting</i>)
VRG	Genes relacionados con la glicosilación cuya delección produce resistencia a vanadato (<i>vanadate-resistant glycosylation mutants</i>)

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LA GLICOSILACIÓN, IMPORTANTE Y COMPLEJA MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas de todos los organismos sufren generalmente diversas modificaciones post-traduccionales. La modificación más costosa desde el punto de vista energético, y la más compleja, es la glicosilación. Muestra de ello es la enorme cantidad de oligosacáridos que pueden unirse a las proteínas mediante enlaces *N*- y *O*-glicosídicos, y los diferentes aminoácidos que pueden ser receptores de dichos oligosacáridos (asparragina, treonina, serina, hidroxiprolina, hidroxilisina, y tirosina), en función del organismo que se esté estudiando (Spiro, 2002). Durante muchos años, la importancia funcional de la glicosilación de las proteínas se ha reducido casi exclusivamente al papel de los oligosacáridos como antígenos sanguíneos. Sólo en los últimos años se ha hecho más evidente que la falta de determinadas glicosiltransferasas, que contribuyen a la formación de las complejas estructuras oligosacáridicas de determinadas proteínas, pueden causar enfermedades congénitas muy severas en niños. Aunque los detalles moleculares que conducen a estas enfermedades apenas se entienden de momento, parece claro que los oligosacáridos unidos a proteínas juegan un papel importante en el desarrollo embrional y post-embrional de todos los eucariotas superiores.

2. *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE GLICOSILACIÓN EN EUCARIOTAS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo muy utilizado para estudios de glicosilación por diversos motivos. *S. cerevisiae* posee dos tipos de glicosilación: *N*-glicosilación de residuos de asparragina y *O*-manosilación de residuos de serina y treonina. Para la formación de esas cadenas de oligosacáridos, es necesario el producto de más de 100 genes. La *N*-glicosilación y la *O*-manosilación se encuentran muy conservadas desde las levaduras hasta los eucariotas superiores (incluyendo los seres humanos), lo que hace fácilmente extrapolable a esos sistemas los resultados obtenidos en la levadura (Lehle *et al.*, 2006).

Este organismo es de muy fácil cultivo y mantenimiento en el laboratorio, y las técnicas de Biología Celular, Molecular y Genética están ampliamente desarrolladas para trabajar con él. Así mismo, otras características, como su pared celular (Fig. 0.1), de aproximadamente 200 nm de espesor, que está formada básicamente por manoproteínas (40%), glucanos (50-60%) y quitina (1-2%, sólo en cicatrices de gemación) la hacen un sistema idóneo para la purificación y estudio de las estructuras de los *N*- y *O*-oligosacáridos, así como el efecto que sobre ellos tienen mutaciones o alteraciones en sus rutas biosintéticas.

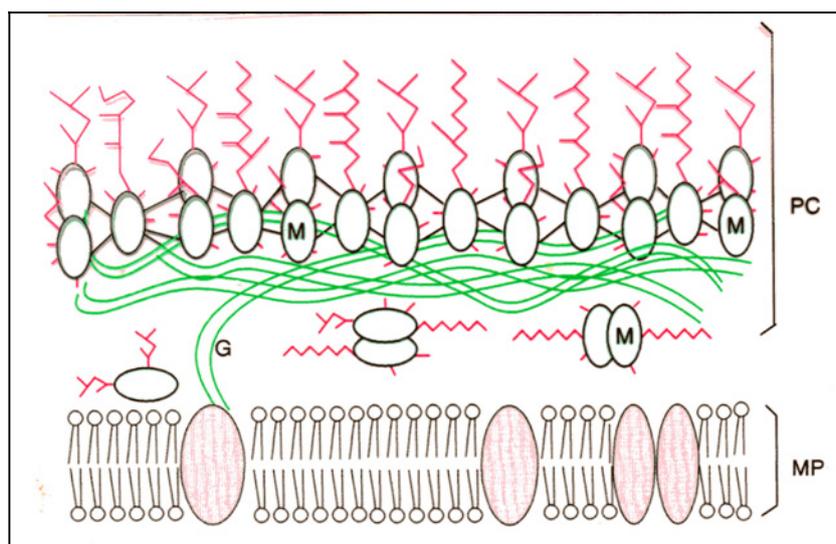


Figura 0.1. Esquema de la estructura y composición de la pared celular de *S. cerevisiae*. MP, membrana plasmática; M, mananos; PC, pared celular; G, glucanos. En la figura se muestra cómo la porción glucídica de las manoproteínas está orientada hacia el exterior de la célula, lo que facilita su estudio y análisis (tomada de Hernández, 1985).

3. LAS N-GLICOPROTEÍNAS Y SU BIOSÍNTESIS

Las glicoproteínas son proteínas unidas covalentemente a oligosacáridos formados por diferentes monómeros, unidos entre ellos por distintos tipos de enlace y en la mayoría de los casos ramificados (Gottschalk, 1972). La parte glucídica puede suponer un % variable del peso molecular total, oscilando desde menos del 10% hasta más del 90% en algunos casos. La Figura 0.2 muestra los tres tipos de enlaces que pueden darse entre las proteínas y los oligosacáridos en las glicoproteínas. En el enlace *O*-glicosídico (presente en la *O*-manosilación), la unión se establece entre una serina o una treonina, y un oligosacárido de 1 a 5 manosas. En la unión *N*-glicosídica (*N*-glicosilación) el enlace se establece entre el grupo amino libre de una asparragina y el grupo hidroxilo del C1 de una *N*-acetilglucosamina que se une a otra *N*-acetilglucosamina y esta última, a su vez, a un oligosacárido de longitud y composición variable. El tercer tipo es, en realidad, una forma de anclaje de ciertas proteínas a la membrana, a través de un oligosacárido unido a los lípidos de la misma mediante inositol-fosfato, y por el otro extremo a etanolamina-fosfato que enlaza con el extremo carboxilo de la proteína a anclar.

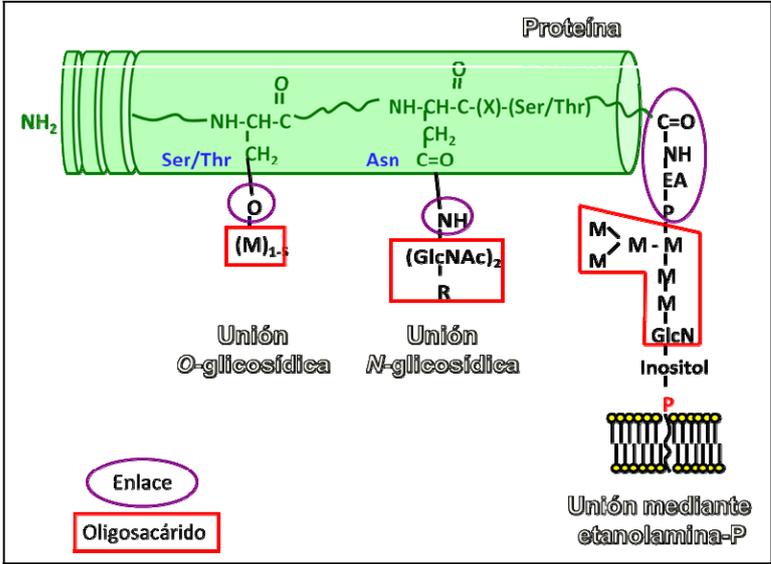


Figura 0.2. Representación de los tres tipos de unión covalente posible entre las proteínas y oligosacáridos en las glicoproteínas. En color lila, el enlace; en color rojo, el oligosacárido; verde, la proteína.

Las denominadas “*N*-glicoproteínas”, por tanto, son las que contienen oligosacáridos unidos *N*-glicosídicamente al grupo γ -amido de asparraginas. Este tipo de restos glucídicos ha sido muy estudiado con respecto a su estructura, biosíntesis y función. Aparecen en todos los eucariotas y en muchas arqueas, pero sólo excepcionalmente en bacterias (Lechner y Wieland, 1989). Normalmente, las proteínas *N*-glicosiladas son proteínas secretadas, es decir, que viajan a través de la ruta secretora hasta la superficie externa de la célula, donde se exportarán o anclarán a la membrana plasmática, la matriz extracelular o la pared celular. La parte glucídica de esas proteínas está orientada hacia el exterior de la célula, y forma el glicocálix. La biosíntesis de los *N*-oligosacáridos comienza en el retículo endoplasmático con la síntesis de un oligosacárido unido al dolicol-P que es transferido a la proteína y pasa a continuación a Golgi donde adquiere la estructura definitiva.

3.1. Biosíntesis del oligosacárido unido al dolicol-P

La Figura 0.3 muestra la secuencia de reacciones que conduce a la formación del núcleo compuesto por Dol-PP-NAcGlc₂Man₉Glc₃. Esta estructura oligosacarídica se transfiere en bloque a la cadena polipeptídica nascente. La proteína es sintetizada en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático (RE), y se transloca a través de un canal transmembrana, el complejo Sec61, al lumen del RE. El centro activo de la oligosacariltransferasa (OST), responsable de la transferencia del oligosacárido a la proteína, se localiza en el lado luminal del RE. La OST es un complejo formado por 8 subunidades en *Saccharomyces cerevisiae*.

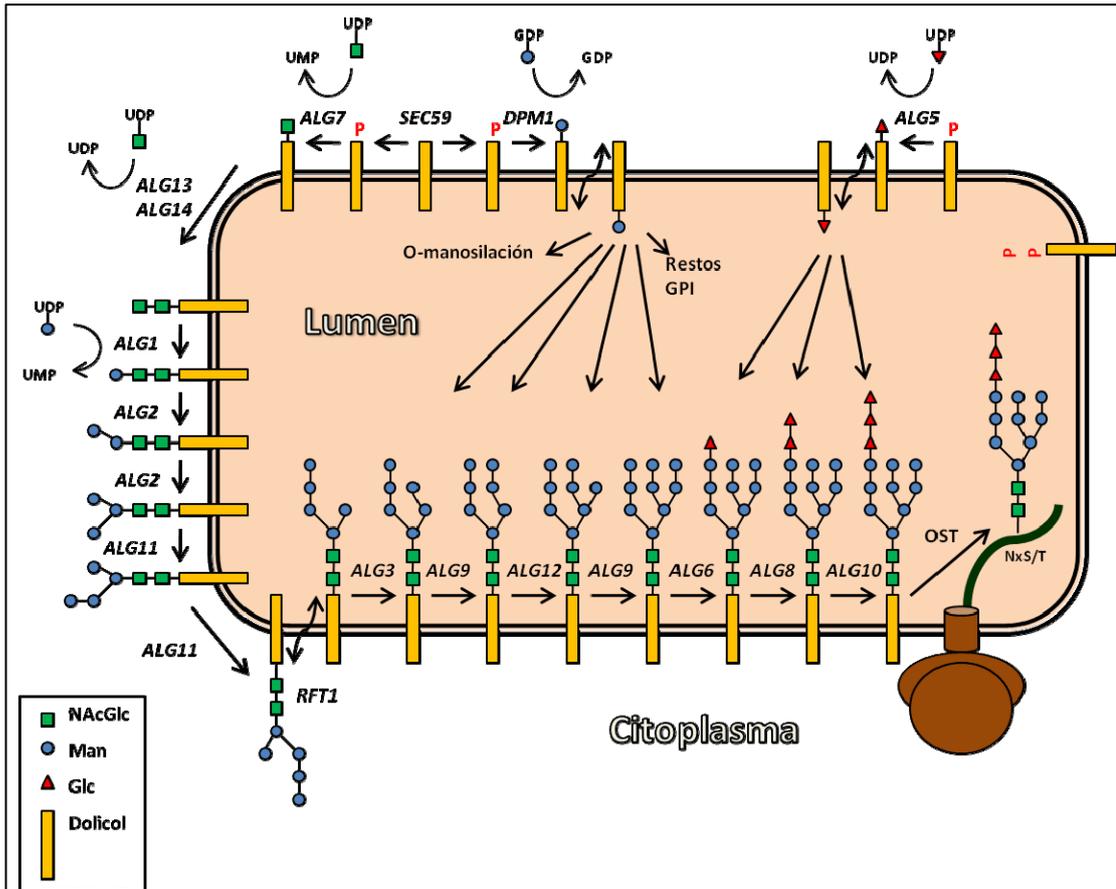


Figura 0.3. Resumen esquemático de los distintos pasos en la biosíntesis del *N*-oligosacárido en el retículo endoplasmático.

La síntesis del oligosacárido comienza con la transferencia de una *N*-acetilglucosaminafosfato de una uridina-fosfato (UDP)-NAcGlc unida en α , al dolicol-fosfato dando lugar a NAcGlc-PP-Dol. Tras la transferencia de un segundo residuo de NAcGlc, y cinco unidades de manosa en el lado citosólico del RE, la estructura $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2\text{-PP-Dol}$ se transfiere al lado luminal (Snider *et al.*, 1980). Allí se añaden cuatro manosas más y tres glucosas según una secuencia de reacciones definida, mediante una serie de glicosiltransferasas específicas. Dichas transferasas están codificadas por los genes *ALG* (*asparagine linked glycosylation*), cuyas actividades se indican en la figura. La translocación transmembrana del heptasacárido unido a dolicol no se conoce detalladamente desde el punto de vista bioquímico; en levaduras se sabe que el producto del gen *RFT1* es necesario (Helenius *et al.*, 2002; Sanyal *et al.*, 2008).

3.2. La oligosacariltransferasa (OST)

Investigaciones genéticas y bioquímicas han conducido a la identificación de nueve proteínas que forman el complejo de ocho subunidades de la oligosacariltransferasa (OST) de levaduras, cinco de las cuales son esenciales para el crecimiento (Yan y Lennarz, 2005). El papel específico de cada subunidad no se conoce aun con detalle pero diversos experimentos (Wacker *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2003; Karamyshev *et al.*, 2005; Igura *et al.*, 2008) indican que Stt3p es la subunidad catalítica de la OST, y que las subunidades Ost3p/Ost6p modifican su especificidad y eficiencia (Spirig *et al.*, 2005; Schulz y Aebi, 2008).

La secuencia consenso o secución, Asp-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro), que será glicosilada en las proteínas, es reconocida por la OST (Ronin *et al.*, 1978; Bause y Lehle, 1979). Ya que sólo el 66% de los secuciones se glicosila (Petrescu *et al.*, 2004), son necesarios otros requerimientos para que la *N*-glicosilación tenga lugar. Los aminoácidos dentro y alrededor del secución, la posición del secución en la cadena polipeptídica, la tasa de plegamiento de la proteína, y la disponibilidad del precursor influyen en la actividad de la OST (Mellquist *et al.*, 1998; Senger y Karim, 2005). El donador glicosídico preferido de la OST es el oligosacárido completo $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2\text{-PP-Dol}$, aunque otros oligosacáridos más cortos pueden transferirse también (Kelleher *et al.*, 2007).

3.3. Variaciones de la estructura del oligosacárido en el aparato de Golgi

Aunque las reacciones de *N*-glicosilación en el RE apenas se diferencian entre levaduras y mamíferos, las reacciones posteriores, que tienen lugar en las cisternas del aparato de Golgi, difieren considerablemente. Esto se debe fundamentalmente a que en las células de mamíferos incorporan una serie de azúcares que no están presentes en levaduras.

El aparato de Golgi es un orgánulo central en la ruta de secreción-glicosilación en *Saccharomyces cerevisiae*. Los oligosacáridos sintetizadas en el RE se transportan al interior del aparato de Golgi, donde sufren reacciones específicas de procesamiento

que son las responsables de la gran variedad de glicoproteínas producidas por las células eucariotas. En *Saccharomyces cerevisiae*, el procesamiento en el Golgi depende de la acción coordinada de manosidasas, manosiltransferasas, manosilfosfatotransferasas, y proteasas de diferente especificidad (Dean, 1999; Munro, 2001) que están desigualmente repartidas entre las cisternas del Golgi. Utilizando diversos marcadores se han definido diferentes regiones funcionales en el aparato de Golgi (Brigance *et al.*, 2000). Además de las enzimas mencionadas, la función global del aparato de Golgi depende de muchas otras proteínas involucradas en diferentes procesos.

En levaduras, el procesamiento en el aparato de Golgi da lugar a dos tipos de estructuras (Fig. 0.4). Muchas de las proteínas estructurales destinadas a incorporarse a la pared celular, y algunas de las enzimas del espacio periplásmico, reciben una estructura grande de manano que consiste en un esqueleto lineal de unas 50 manosas con ramificaciones cortas. En contraste, las proteínas de los orgánulos internos de la célula generalmente tienen una estructura tipo núcleo interno en la que tan solo se añaden unas pocas manosas en el aparato de Golgi a la estructura procedente del RE. La estructura y biosíntesis de los oligosacáridos de las manoproteínas fue estudiada inicialmente por el grupo de Ballou (Universidad de California en Berkeley, EE.UU.) mediante el aislamiento y caracterización de mutantes *mnn* (*mannan defective*) en las que el manano estaba ausente o alterado (revisado por Ballou, 1990). Tras mutagenizar con sulfonato de etil-metano (EMS), los mutantes fueron seleccionados por la falta de aglutinación con anticuerpos obtenidos frente a células enteras de la cepa silvestre. En consecuencia, presentaban diferentes alteraciones en la superficie celular y algunos de ellos también presentaban un fenotipo *ldb* (ver Capítulos I y II). El fenotipo de los mutantes *mnn* fue analizado de forma exhaustiva por el grupo de Ballou resultando en la elucidación de la estructura final de los *N*-oligosacáridos de las manoproteínas (Hernández *et al.*, 1989a; Hernández *et al.*, 1989b; Ballou, 1990) (ver Fig. 0.5).

En los últimos años, la mayor parte de los genes *MNN* han sido identificados. *MNN1* codifica una proteína integral de membrana localizada en Golgi requerida para la transferencia de las manosas terminales unidas por enlaces $\alpha(1,3)$ de los *N*- y *O*-

oligosacáridos (Yip *et al.*, 1994). *MNN2* codifica una proteína con actividad $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa (Rayner y Munro, 1998) que cataliza la transferencia de la primera manosa de las ramificaciones en los *N*-oligosacáridos. *Mnn5p* tiene una actividad similar responsable de la transferencia de la segunda manosa unida también por enlace $\alpha(1,2)$ en las ramificaciones (Rayner y Munro, 1998).

Los mutantes *mnn4* y *mnn6* fueron descritos como defectivos en la incorporación de grupos manosilfosfato a los *N*-oligosacáridos (Ballou *et al.*, 1973; Karson y Ballou, 1978). Posteriormente, Jigami y colaboradores identificaron los genes mutados (Odani *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Propusieron que *MNN6* codificaba una manosilfosfato transferasa mientras que *Mnn4p* parecía tener un papel regulador (ver más adelante).

Los mutantes *mnn7* y *mnn8* resultaron ser alélicos (Ballou *et al.*, 1989) y presentan un fenotipo similar a *mnn9* y *mnn10*. Todos ellos son defectivos en la elongación del cadena externa de los *N*-oligosacáridos (revisado por Ballou, 1990). Los genes correspondientes codifican subunidades que forman parte de las llamadas manano polimerasas (M-Pol) I y II, localizadas en Golgi e implicadas en la elongación de los *N*-oligosacáridos (Jungmann y Munro, 1998; Jungmann *et al.*, 1999). En estos estudios, Munro y colaboradores identificaron una nueva subunidad de la M-Pol II codificada por una ORF que denominaron *MNN11*.

Algunos otros mutantes con manano alterado, se aislaron en búsquedas posteriores basándose en el hecho de que defectos en el manano producen alteraciones en las propiedades de superficie y en las sensibilidades de las células de levadura (*ktr*, *ldb*, *ngd*, *och*, *vrg*,...) (Nakayama *et al.*, 1992; Kanik-Ennulat *et al.*, 1995; Lehle y Tanner, 1995; Mañas *et al.*, 1997; Lussier *et al.*, 1999). Con los datos obtenidos en todos estos estudios, se estableció el modelo actual de la síntesis de manano. Cuando llegan al aparato de Golgi, todos los *N*-oligosacáridos reciben una única $\alpha(1,6)$ -manosa catalizada por la transferasa *Och1p*. En una parte de las proteínas esta manosa se extiende mediante la acción secuencial de dos complejos enzimáticos, manano polimerasa I (M-Pol I) y manano polimerasa II (M-Pol II), para formar el esqueleto constituido por una cadena lineal de manosas unidas por enlaces $\alpha(1,6)$. Las manosas

de las ramificaciones se añaden posteriormente en reacciones catalizadas por Mnn2p, Mnn5p y Mnn1p. En algunas de las ramas se añade una fosfomanosa, mediante Mnn6p y Mnn4p (Odani *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Por el contrario, los mananos tipo núcleo sólo reciben una $\alpha(1,2)$ -manosa tras la acción de Och1p, y seguidamente $\alpha(1,3)$ -manosas por Mnn1p.

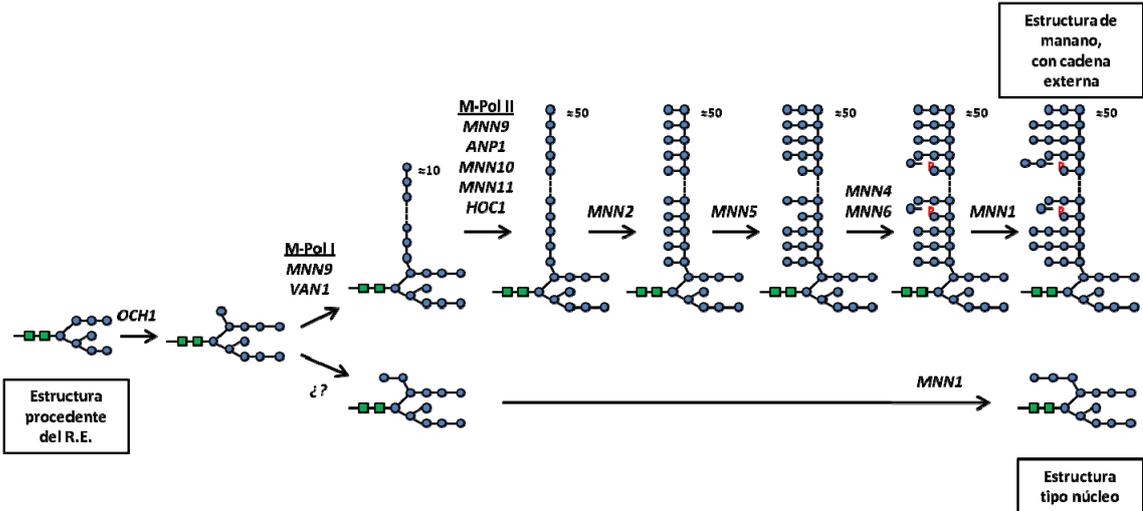


Figura 0.4. Procesamiento de los N-oligosacáridos (unidos a una proteína) en el aparato de Golgi. Se indican las vías que dan lugar a la estructura tipo manano y la estructura tipo núcleo, respectivamente.

4. LA FOSFORILACIÓN DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS

Los N-oligosacáridos de *Saccharomyces cerevisiae* tienen grupos fosfato diesterificados unidos a la posición 6 de determinadas manosas en la molécula (Hernández *et al.*, 1989a; Hernández *et al.*, 1989b; Ballou, 1990): dos sitios en la cadena externa de polimanosa (extremo no reductor y ramificaciones) y dos más en el núcleo (Fig. 0.5). Se ha descrito que la manosilfosforilación se produce también en O-oligosacáridos (Jigami y Odani, 1999). Esta modificación no es común en todas las especies de levaduras, puesto que *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis* no los poseen, mientras que *Kluyveromyces brevis* y *Candida albicans* poseen tantos como *S. cerevisiae* (Ballou *et al.*, 1976). La manosilfosforilación aparece también en mamíferos (Lazzarino y Gabel, 1988), y en ellos se ha establecido que los grupos manosilfosfato constituyen la señal que determina el transporte al lisosoma de las proteínas que los poseen (Reitman y Kornfeld, 1981). Los grupos fosfato confieren una

carga negativa neta a la superficie de la célula, lo cual podría representar una ventaja en algunos entornos. Sin embargo, no se ha conseguido establecer completamente la función precisa de esos grupos ni la ruta biosintética (Jigami y Odani, 1999).

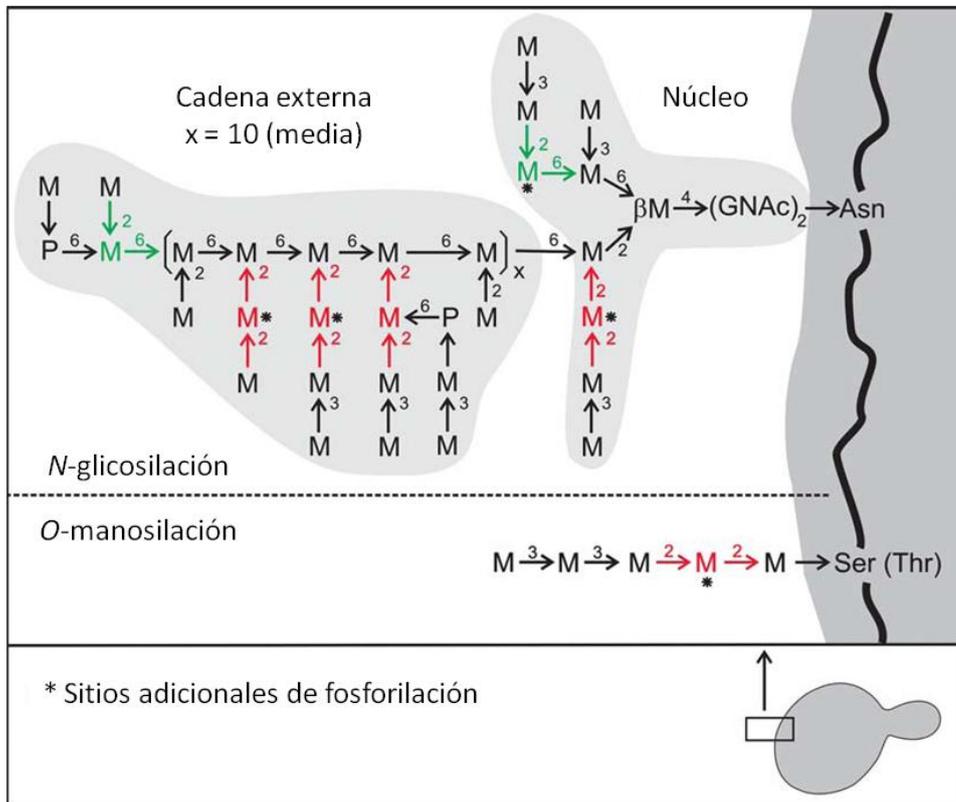


Figura 0.5. Ubicación de los grupos manosilfosfato en los *N*-oligosacáridos y los *O*-oligosacáridos. Las secuenciasceptoras de manosilfosfato se indican en verde y rojo.

Ballou y sus colaboradores llevaron a cabo los primeros estudios sobre la transferencia de grupos manosilfosfato en los *N*-oligosacáridos hace 30 años. Aislaron dos mutantes no condicionales, defectivos en manano *mnn4* (Ballou *et al.*, 1973; Raschke *et al.*, 1973) y *mnn6* (Karson y Ballou, 1978), los cuales mostraban una ausencia total de grupos fosfato en los oligosacáridos unidos a manoproteínas. Además, establecieron un método para medir la actividad manosiltransferasa (Karson y Ballou, 1978) y establecieron una correlación directa entre el contenido en fosfato y la afinidad de la célula por el colorante catiónico azul alcian (Ballou *et al.*, 1973; Raschke *et al.*, 1973). La identificación de los genes reveló que ambos genes, *MNN4* y

MNN6, están directamente involucrados en el proceso de fosforilación (Odani *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997).

El mutante *mnn6* original mostraba una reducción en la cantidad de fosfomanano en la pared celular, y un color blanco tras teñirlo con el colorante catiónico azul alcian, mientras que las células silvestres se teñían de azul (Ballou, 1990). El gen *MNN6* codifica una proteína de membrana Tipo II (Wang *et al.*, 1997), muy parecida a Kre2p/Mnt1p, una $\alpha(1,2)$ -glicosiltransferasa de Golgi. Ya que las glicosiltransferasas de Golgi tienen normalmente una topología de membrana de Tipo II se ubicó a Mnn6p en el aparato de Golgi.

La proteína codificada por *MNN4* también mostró una topología de membrana de Tipo II, con una única región transmembrana cerca del extremo amino (Odani *et al.*, 1996). Esta proteína tiene cierta homología con YJR061W, una potencial serín/treonín-quinasa (Hunter y Plowman, 1997), lo que apoya la hipótesis de un papel regulador para esta proteína (Jigami y Odani, 1999).

5. ASPECTOS FUNCIONALES DE LA GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

Una modificación de las proteínas que se ha conservado a lo largo de la evolución desde las levaduras unicelulares hasta los humanos en cuanto a estructura y ruta biosintética, debe ser de gran importancia. Sin embargo, incomprensiblemente, durante mucho tiempo no se pudo asignar un papel concreto a la más elaborada de las modificaciones post-traduccionales (Varki, 1993).

Mediante las técnicas de interrupción y/o delección de genes, se ha ido viendo cada vez más claro que la falta de un gran número de reacciones de glicosilación individualmente es letal para los eucariotas inferiores así como para los animales y las plantas (Huffaker y Robbins, 1983; Kelleher *et al.*, 1992). Si nos centramos en qué se sabe actualmente sobre la función de los *N*-oligosacáridos de las glicoproteínas, distinguiremos entre las funciones que son tan importantes para un organismo unicelular como para un humano, y que se han conservado en la evolución; y las que son fruto de las estructuras más complejas de los *N*-oligosacáridos de mamíferos (no presentes en levaduras). En el primer caso, las funciones importantes se restringen a

eventos intracelulares, mientras que en el segundo caso la función es extracelular, como por ejemplo interacciones célula-célula. Ejemplos de estas funciones son:

- Facilitan el plegamiento correcto de la proteína en el RE y colaboran en el control de calidad.
- Son necesarios en la progresión del ciclo celular.
- Contribuyen a la solubilidad de la molécula.
- Confieren protección frente a condiciones adversas (temperatura, detergentes, proteasas,...).
- Actúan como señales que determinan el destino final de la proteína.
- Intervienen en fenómenos de reconocimiento, interacciones célula-célula (ej. en células embrionarias), y actúan como receptores para otras células o moléculas (bacterias, virus, anticuerpos, etc.).

Hasta la fecha, solo hay evidencias convincentes de dos fenómenos intracelulares en los que los *N*-oligosacáridos juegan un papel decisivo como compuestos señalizadores: 1) la clasificación de proteínas lisosomales, y 2) un control de calidad del correcto plegamiento de las proteínas secretoras, que asegura que sólo las proteínas correctamente plegadas lleguen desde el RE a la superficie celular. Cuando el plegamiento no es correcto, un mecanismo de degradación de proteínas específico del RE y dependiente de oligosacáridos (ERAD, *ER-associated degradation*) se encarga de eliminar las proteínas mal plegadas.

6. REFERENCIAS

- Ballou, C., Rose, A. H. and Tempest, D. W. (1976). Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press. **Volume 14**: 93-158.
- Ballou, C. E. (1990). "Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects." *Methods Enzymol.* **185**: 445-470.
- Ballou, C. E., Kern, K. A. and Raschke, W. C. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Complementation studies and properties of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4667-4671.
- Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P. K., Dell, A. and Ballou, C. E. (1989). "Protein glycosylation defects in the *Saccharomyces cerevisiae mnn7* mutant class. Support for the stop signal proposed for regulation of outer chain elongation." *J. Biol. Chem.* **264**(20): 11857-11864.
- Bause, E. and Lehle, L. (1979). "Enzymatic *N*-glycosylation and *O*-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast." *Eur. J. Biochem.* **101**(2): 531-540.
- Brigance, W. T., Barlowe, C. and Graham, T. R. (2000). "Organization of the yeast golgi complex into at least four functionally distinct compartments." *Mol. Biol. Cell* **11**(1): 171-182.

- Dean, N. (1999). "Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 309-322.
- Gottschalk, A. (1972). Glycoproteins, their composition, structure and function.
- Helenius, J., Ng, D. T. W., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A. and Aebi, M. (2002). "Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein." *Nature* **415**(6870): 447-450.
- Hernández, L. M. (1985). Estudio de la producción, localización y ruta secretora de la actividad exo-1,3-β-D-glucanásica en *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de Microbiología. Badajoz, Universidad de Extremadura.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Gillece-Castro, B. L., Burlingame, A. L. and Ballou, C. E. (1989a). "A new *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutant N-linked oligosaccharide structure." *J. Biol. Chem.* **264**(20): 11849-11856.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P. K. and Ballou, C. E. (1989b). "Structure of the phosphorylated N-linked oligosaccharides from the *mnn9* and *mnn10* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13648-13659.
- Huffaker, T. C. and Robbins, P. W. (1983). "Yeast mutants deficient in protein glycosylation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**(24): 7466-7470.
- Hunter, T. and Plowman, G. D. (1997). "The protein kinases of budding yeast: six score and more." *Trends Biochem. Sci.* **22**(1): 18-18.
- Igura, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Yamada, M., Obita, T., Maenaka, K. and Kohda, D. (2008). "Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase." *EMBO J.* **27**: 234-243.
- Jigami, Y. and Odani, T. (1999). "Mannosylphosphate transfer to yeast mannan." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 335-345.
- Jungmann, J. and Munro, S. (1998). "Multi-protein complexes in the *cis* Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity." *EMBO J.* **17**(2): 423-434.
- Jungmann, J., Rayner, J. C. and Munro, S. (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex." *J. Biol. Chem.* **274**(10): 6579-6585.
- Kanik-Ennulat, C., Montalvo, E. and Neff, N. (1995). "Sodium orthovanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show defects in Golgi-mediated protein glycosylation, sporulation and detergent resistance." *Genetics* **140**(3): 933-943.
- Karamyshev, A. L., Kelleher, D. J., Gilmore, R., Johnson, A. E., von Heijne, G. and Nilsson, I. (2005). "Mapping the interaction of the STT3 subunit of the oligosaccharyl transferase complex with nascent polypeptide chains." *J. Biol. Chem.* **280**(49): 40489-40493.
- Karson, E. M. and Ballou, C. E. (1978). "Biosynthesis of yeast mannan. Properties of a mannosylphosphate transferase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **253**(18): 6484-6492.
- Kelleher, D. J., Banerjee, S., Cura, A. J., Samuelson, J. and Gilmore, R. (2007). "Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms." *J. Cell Biol.* **177**(1): 29-37.
- Kelleher, D. J., Kreibich, G. and Gilmore, R. (1992). "Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein." *Cell* **69**(1): 55-65.
- Lazzarino, D. A. and Gabel, C. A. (1988). "Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation." *J. Biol. Chem.* **263**(21): 10118-10126.
- Lechner, J. and Wieland, F. (1989). "Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins." *Annu. Rev. Biochem.* **58**(1): 173-194.
- Lehle, L., Strahl, S. and Tanner, W. (2006). "Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate Congenital Human Diseases." *Angew. Chem.* **45**(41): 6802-6818.
- Lehle, L. and Tanner, W. (1995). Glycoproteins. New Comprehensive Biochemistry. M. J, V. JFG and S. H. Amsterdam, Elsevier. **29a**: 475-509.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M. and Bussey, H. (1999). "The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 323-334.
- Mañas, P., Olivero, I., Avalos, M. and Hernandez, L. M. (1997). "Isolation of new nonconditional *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in asparagine-linked glycosylation." *Glycobiology* **7**(4): 487-497.

- Mellquist, J., Kasturi, L., Spitalnik, S. L. and Shakin-Eshleman, S. (1998). "The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency." *Biochemistry* **37**(19): 6833-6837.
- Munro, S. (2001). "What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus?" *FEBS Lett.* **498**(2-3): 223-227.
- Nakayama, K.-i., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. and Jigami, Y. (1992). "OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides." *EMBO J.* **11**(7): 2511-2519.
- Nilsson, I., Kelleher, D. J., Miao, Y., Shao, Y., Kreibich, G., Gilmore, R., von Heijne, G. and Johnson, A. E. (2003). "Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex." *J. Cell Biol.* **161**(4): 715-725.
- Odani, T., Shimma, Y.-i., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1996). "Cloning and analysis of the MNN4 gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*." *Glycobiology* **6**(8): 805-810.
- Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A. and Wormald, M. R. (2004). "Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding." *Glycobiology* **14**(2): 103-114.
- Raschke, W. C., Kern, K. A., Antal, C. and Ballou, C. E. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4660-4666.
- Rayner, J. C. and Munro, S. (1998). "Identification of the MNN2 and MNN5 mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **273**(41): 26836-26843.
- Reitman, M. L. and Kornfeld, S. (1981). "Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes." *J. Biol. Chem.* **256**(23): 11977-11980.
- Ronin, C., Bouchilloux, S., Granier, C. and Van Rietschoten, J. (1978). "Enzymatic N-glycosylation of synthetic ASN-X-THR containing peptides." *FEBS Lett.* **96**(1): 179-182.
- Sanyal, S., Frank, C. G. and Menon, A. K. (2008). "Distinct flippases translocate glycerophospholipids and oligosaccharide diphosphate dolichols across the endoplasmic reticulum." *Biochemistry* **47**(30): 7937-7946.
- Schulz, B. and Aebi, M. (2008). "Analysis of glycosylation site occupancy reveals a role for Ost3p and Ost6p in site-specific N-glycosylation efficiency." *Mol. Cell. Proteomics* (**en prensa**).
- Senger, R. S. and Karim, M. N. (2005). "Variable site-occupancy classification of N-linked glycosylation using artificial neural networks." *Biotechnol. Prog.* **21**(6): 1653-1662.
- Snider, M. D., Sultzman, L. A. and Robbins, P. W. (1980). "Transmembrane location of oligosaccharide-lipid synthesis in microsomal vesicles." *Cell* **21**(2): 385-392.
- Spirig, U., Bodmer, D., Wacker, M., Burda, P. and Aebi, M. (2005). "The 3.4-kDa Ost4 protein is required for the assembly of two distinct oligosaccharyltransferase complexes in yeast." *Glycobiology* **15**(12): 1396-1406.
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." *Glycobiology* **12**(4): 43R-56.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology* **3**(2): 97-130.
- Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P. G., Nita-Lazar, M., Haslam, S. M., North, S. J., Panico, M., Morris, H. R., Dell, A., Wren, B. W. and Aebi, M. (2002). "N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*." *Science* **298**(5599): 1790-1793.
- Wang, X.-H., Nakayama, K.-i., Shimma, Y.-i., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1997). "MNN6, a member of the KRE2/MNT1 family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **272**(29): 18117-18124.
- Yan, A. and Lennarz, W. J. (2005). "Unraveling the mechanism of protein N-Glycosylation." *J. Biol. Chem.* **280**(5): 3121-3124.
- Yip, C. L., Welch, S. K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J. and MacKay, V. L. (1994). "Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(7): 2723-2727.

OBJETIVOS

1. Identificación de los genes afectados en mutantes *ldb* aislados previamente mediante mutagénesis al azar. (Capítulo I)
2. Análisis de la posible función de dichos genes en relación con la manosilfosforilación. (Capítulo I)
3. Búsqueda a nivel genómico de genes implicados en la transferencia de manosilfosfato en *Saccharomyces cerevisiae*. (Capítulo II)
4. Análisis de la posible función de algunos de ellos en relación con la manosilfosforilación. (Capítulo II)
5. Análisis del efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la manosilfosforilación y otros procesos que se llevan a cabo en el aparato de Golgi. (Capítulo III)
6. Identificación del gen *MNN3* y caracterización de la mutación en la cepa original *mnn3*. (Capítulo IV)
7. Análisis funcional del gen *MNN3* con respecto a la glicosilación en general, y la manosilfosforilación en particular. (Capítulo IV)
8. Análisis de posibles cambios en el transcriptoma de la cepa *mnn3Δ* en relación con la cepa silvestre. (Capítulo V)
9. Análisis de posibles cambios en transcriptoma de la cepa *mnn2Δ* en relación con la cepa silvestre. (Capítulo V)
10. Análisis del grado de ocupación de sitios potenciales de glicosilación en glicoproteínas de pared de *S. cerevisiae*, bajo condiciones de limitación de sustrato para la OST. (Capítulo VI)
11. Análisis del grado de ocupación de sitios potenciales de glicosilación en glicoproteínas de pared de *S. cerevisiae*, en cepas que sintetizan sustratos incompletos para la OST. (Capítulo VI)
12. Determinación de las características de los secuencias que varían en su grado de ocupación bajo las condiciones anteriores. (Capítulo VI)
13. Introducción de sitios nuevos de glicosilación en proteínas modelo, y análisis del grado de ocupación. (Capítulo VI)

IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES *LOW-DYE-BINDING* (*LDB*) EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. INTRODUCCIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Características fenotípicas de los mutantes *ldb*

2.2. Identificación de los genes *ldb* por complementación de los fenotipos mutantes

2.2.1. Identificación de *ldb1*

2.2.2. Identificación de *ldb2*

2.2.3. Identificación de *ldb6*

2.2.4. Identificación de *ldb11*

2.2.5. Identificación de *ldb12*

2.2.6. Identificación de *ldb13*

2.2.7. Identificación de *ldb15*

2.3. IDENTIFICACIÓN DE *ldb4*, *ldb5*, *ldb7*, *ldb9*, *ldb 10* Y *ldb14*

3. CONSIDERACIONES FINALES

4. REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

Los *N*-oligosacáridos de *Saccharomyces cerevisiae* tienen grupos fosfato di-esterificados unidos a la posición 6 de determinadas manosas en la molécula (Hernández *et al.*, 1989a; Hernández *et al.*, 1989b; Ballou, 1990). Los grupos fosfato confieren una carga negativa neta a la superficie de la célula que podría representar una ventaja en algunos entornos. Sin embargo, todavía no se ha conseguido establecer completamente la función precisa de esos grupos ni su ruta biosintética (Jigami y Odani, 1999). Ballou y sus colaboradores llevaron a cabo los primeros estudios sobre la transferencia de grupos manosilfosfato a los *N*-oligosacáridos hace unos 30 años.

Aislaron dos mutantes no condicionales, *mnn4* (Ballou *et al.*, 1973; Raschke *et al.*, 1973) y *mnn6* (Karson y Ballou, 1978), los cuales mostraban una ausencia casi total de grupos fosfato en los oligosacáridos unidos a manoproteínas.

En los últimos años, nuestro grupo ha estudiado la fosforilación de oligosacáridos unidos a manoproteínas mediante la selección y caracterización de mutantes generados en experimentos de mutagénesis aleatoria. Se aislaron 15 mutantes *low-dye-binding* o *ldb*, que mostraban una reducción en el nivel de grupos fosfato unidos a los *N*-oligosacáridos de las manoproteínas (Mañas *et al.*, 1997; Mañas *et al.*, 1998) (ver Fig. I.1). *LDB3* y *LDB8* se identificaron como alias de *VRG4* y *MNN2* respectivamente. *Vrg4p* está involucrada en el transporte de nucleósidos en el aparato de Golgi (Antebi y Fink, 1992), y *Mnn2p* es una $\alpha(1,2)$ -manosiltransferasa responsable de la iniciación de las ramificaciones en la cadena externa de los *N*-oligosacáridos (Rayner y Munro, 1998). En los dos casos, la reducción de grupos manosilfosfato unidos a *N*-oligosacáridos parece ser una consecuencia del mal funcionamiento del aparato de Golgi, o de una reducción en el tamaño de los *N*-oligosacáridos, más que un defecto específico en la ruta biosintética y/o en la transferencia de grupos manosilfosfato. En un análisis más detallado, encontramos que *ldb1* también mostraba *N*- y *O*-oligosacáridos más cortos, un procesamiento proteolítico incompleto de la exoglucanasa secretada, y la falta de una manosa particular unida en $\alpha(1,3)$ del precursor unido a lípido de los *N*-oligosacáridos, una reacción que tiene lugar en el retículo endoplasmático. Estas características fenotípicas nos permiten sugerir que *ldb1* podría ser defectivo en una proteína involucrada en el funcionamiento general del aparato de Golgi y quizás también en la función del retículo endoplasmático (Mañas *et al.*, 1997; Mañas *et al.*, 1998). De hecho, todas las características fenotípicas del *ldb1* descritas previamente coinciden con las descritas en las cepas con mutaciones en *PMR1*. En este trabajo demostramos que los defectos de *ldb1* son complementados por *PMR1*, el gen que codifica la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPasa de *S. cerevisiae* localizada en el aparato de Golgi. Además, en este trabajo se identifican también los genes afectados en los restantes mutantes *ldb* aislados previamente. Las funciones de los genes identificados son diversas, y la mayoría de ellos están implicados en procesos generales como secreción-glicosilación, así como en organización de la pared celular o

respuesta a estrés. Es de resaltar que *ldb6* y *ldb7* son defectivos en ORFs hipotéticas, de función desconocida y que, en otros casos, aunque las ORFs hayan sido confirmadas, la función no ha sido bien establecida todavía. En este sentido, los resultados presentados en esta capítulo pueden contribuir a la caracterización funcional del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

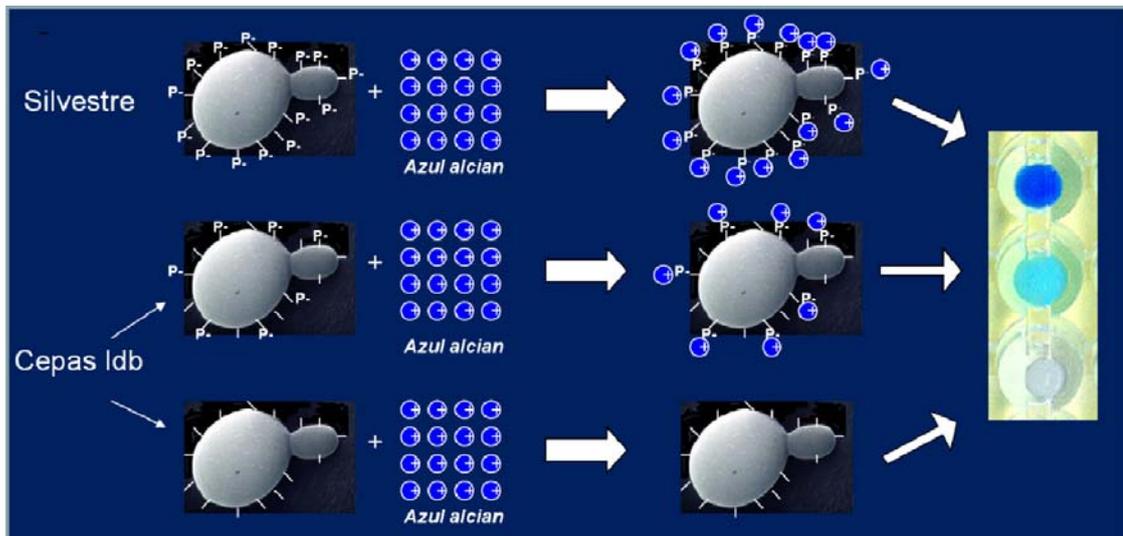


Figura I.1 Representación del fenotipo *ldb* en *S. cerevisiae*. En condiciones de pH bajo, en la cepa silvestre la superficie celular tiene carga negativa debido a la presencia de grupos fosfato en los oligosacáridos, lo que posibilita la unión del colorante catiónico azul alcian. Las células se tiñen por tanto de color azul oscuro. En las cepas *ldb*, la cantidad de grupos fosfato es menor o incluso no están presentes, confiriendo entonces menor (o ninguna) carga negativa a la superficie. Esas células se teñirán de color azul claro, en distintas tonalidades, o incluso permanecerán blancas.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Características fenotípicas de los mutantes *ldb*

La Tabla I.1 resume algunas de las características fenotípicas de los mutantes *ldb* relevantes en este estudio. La afinidad por el colorante azul alcian define el fenotipo *ldb*.

Tabla I.1 Características fenotípicas de las cepas *ldb* estudiadas.

Mutante	Azul alcian ^a	PMI ^b	Grumos ^c	Crecimiento en vanadato ^d			Gen mutado
				2 mM	10 mM	15 mM	
<i>ldb1</i>	0	<i>mnn9</i>	+++++				<i>PMR1</i>
<i>ldb2</i>	0	silvestre	-	++++	-	-	<i>ERD1</i>
<i>ldb4</i>	4	<i>mnn2</i>	-	++++	-	-	<i>SPC72</i>
<i>ldb5</i>	4	<i>mnn9-mnn2</i>	-	++++	-	-	<i>RLR1</i>
<i>ldb6</i>	2-3	<i>mnn2</i>	-	++++	-	-	<i>GON7/ YJL184W</i>
<i>ldb7</i>	4	silvestre	-	++++	-	-	<i>YBL006C</i>
<i>ldb9</i>	3-4	silvestre	++++	++++	-	-	<i>ELM1</i>
<i>ldb10</i>	4	<i>mnn9-mnn2</i>	-	++++	-	-	<i>CWH36</i>
<i>ldb11</i>	3	<i>mnn9-mnn2</i>	++++	++++	++	+	<i>COG1</i>
<i>ldb12</i>	2-3	<i>mnn9</i>	+++++	++++	++++	++++	<i>OCH1</i>
<i>ldb13</i>	3	<i>mnn9</i>	++	++++	++++	++++	<i>VAN1</i>
<i>ldb14</i>	2-3	<i>mnn2</i>	-	++++	-	-	<i>BUD32</i>
<i>ldb15</i>	1	silvestre	-	++++	-	-	<i>PHO85</i>

^a El rango de valores está comprendido entre 0 (blanco, como *mnn6*) y 5 (azul oscuro, como silvestre)

^b Patrón de Migración de la Invertasa (ver Fig. I.2)

^c El número de símbolos + indica el grado relativo de agregación. *ldb9* muestra además alteraciones en la forma de las células (ver Fig. I.3C)

^d Cuatro símbolos + indican crecimiento normal

El tamaño de la invertasa externa secretada es indicativo del funcionamiento de la maquinaria de glicosilación, oscilando desde el patrón que aparece en la cepa silvestre hasta el más reducido que presenta el mutante *mnn9* (Fig. I.2).

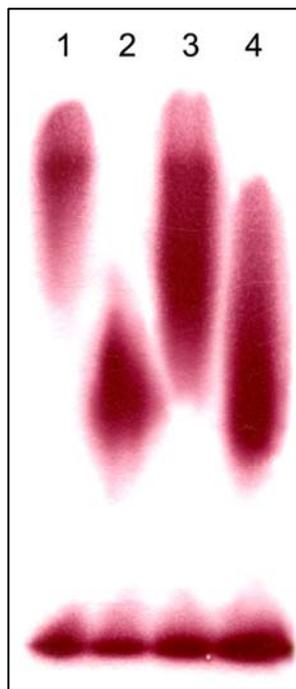


Figura I.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas de la invertasa secretada en cepas representativas de *S. cerevisiae*. Calle 1, silvestre; calle 2, *mnn9*; calle 3, *mnn2*; calle 4, *ldb11*. La banda estrecha al final de cada calle corresponde con la forma constitutiva no glicosilada de la enzima.

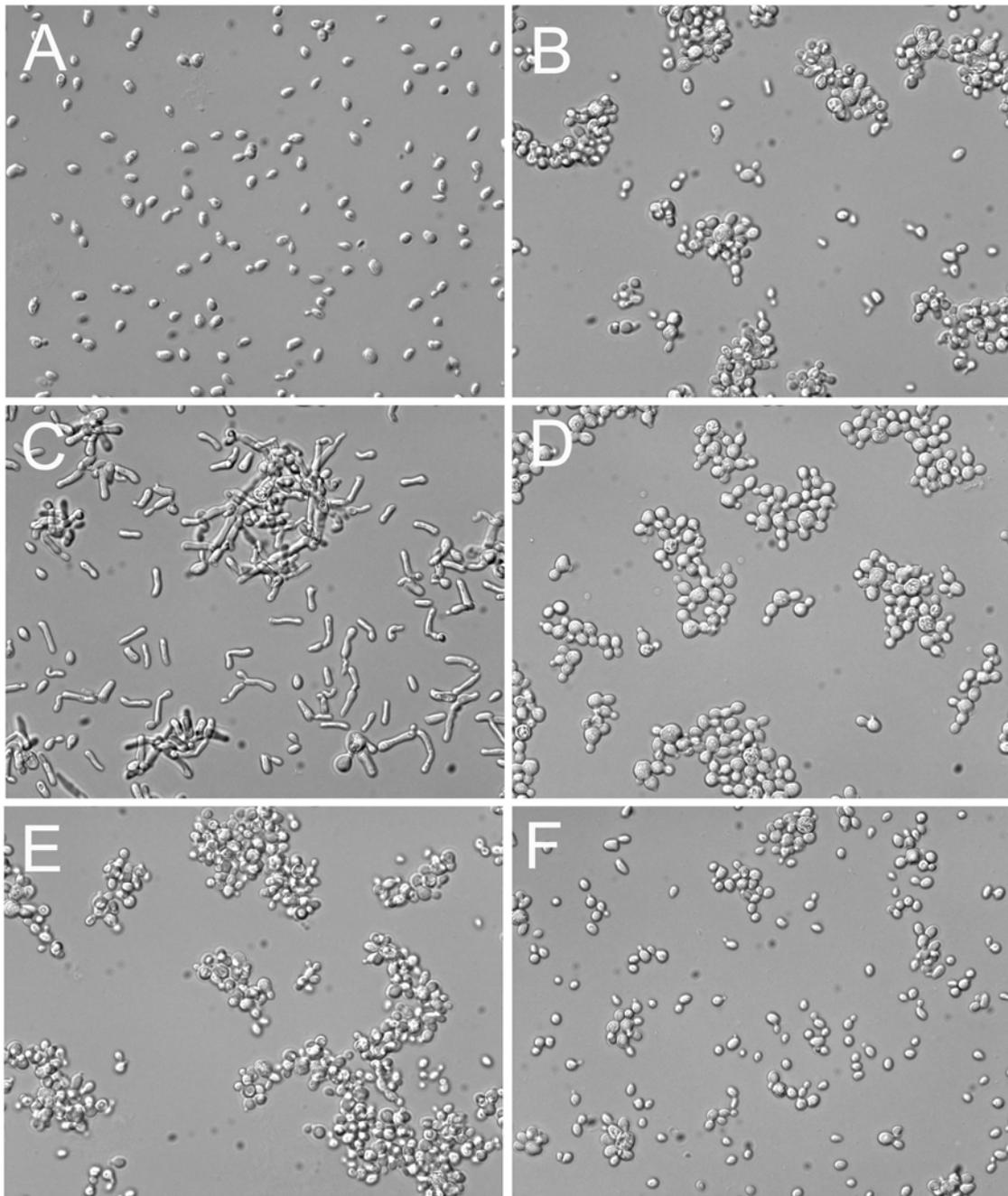


Figura 1.3 Microfotografías de los mutantes *ldb* con fenotipo grumoso y/o alteraciones en la forma celular. A, silvestre; B, *mnn9*; C, *ldb9*; D, *ldb11*; E, *ldb12*; F, *ldb13*.

La formación de agregados o grumos puede reflejar defectos en la organización y/o biosíntesis de la pared celular, así como problemas en el ciclo celular. La Figura 1.3 muestra microfotografías de algunos mutantes *ldb* con fenotipo grumoso y/o alteraciones en la forma celular. Las cepas silvestre y *mnn9* se muestran como controles de comportamiento conocido.

Otra característica relacionada con la maquinaria de glicosilación es la capacidad de crecimiento en un medio con ortovanadato de sodio. La cepa silvestre puede crecer a 2 mM de ortovanadato de sodio pero no a 10 o 15 mM, mientras que el *mnn9* es resistente a las tres concentraciones (Ballou *et al.*, 1991) (Fig. I.4).

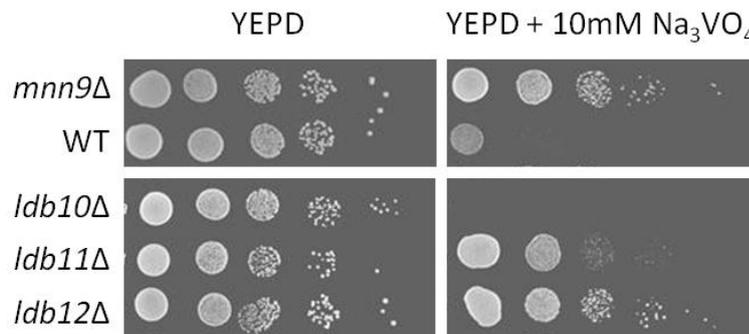


Figura I.4 Drop-test para comprobar la resistencia a vanadato de tres cepas *ldb*: *ldb10Δ*, *ldb11Δ*, *ldb12Δ*. Como se indicó en la Tabla I.1, la cepa *ldb10Δ* no es capaz de crecer con una concentración de ortovanadato 10mM en el medio, mientras que *ldb11Δ* es resistente, y *ldb12Δ* es tan resistente como la cepa control *mnn9Δ*.

2.2. Identificación de los genes *ldb* por complementación de los fenotipos mutantes

Los mutantes *ldb*, todos ellos portando el marcador *ura3*, se transformaron con la librería genómica CEN BANK, la cual está construida en el sitio de corte de *Bam*HI del plásmido centromérico YCp50 (tamaño de inserto de 15-20 kb) (Rose *et al.*, 1987). Los clones que recuperaron el fenotipo silvestre fueron seleccionados con la ayuda de bolas de QAE-Sephadex como se describe en Materiales y Métodos (Sección 7.7). Con éste método se pudieron encontrar transformantes con fenotipo silvestre en siete casos: *ldb1*, *ldb2*, *ldb6*, *ldb11*, *ldb12*, *ldb13*, y *ldb15*. Los plásmidos responsables de la complementación de los fenotipos mutantes se recuperaron, se amplificaron en *Escherichia coli*, y los insertos se identificaron por secuenciación. Las Figuras I.5 y de I.8 a I.13 muestran los fragmentos de ADN que complementaron los siete defectos. En las figuras se observa que cada uno de los insertos incluye varias ORF. Para identificar el gen en concreto responsable de la complementación del fenotipo mutante, seguimos el mismo protocolo en todos los casos (ver más adelante y Sección 7.7 de Materiales y Métodos). Aunque todos los mutantes *ldb* son no condicionales, existe la posibilidad de que un fenotipo *ldb* pudiera ser el resultado de una mutación que causase una

actividad residual de un gen esencial. De todos modos, parece más probable que las mutaciones estén localizadas en genes no esenciales, de modo que se consideraron en primer lugar los no esenciales de cada fragmento. Aprovechando la disponibilidad de la colección completa de cepas delecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, hicimos ensayos de azul alcian en todas las cepas con deleción en cada uno de los genes no esenciales incluidos en los fragmentos secuenciados y, en los casos indicados, también se hicieron electroforesis en condiciones nativas de la invertasa secretada. Los fenotipos de los mutantes delecionados correspondientes a los genes de un fragmento en particular se compararon con el fenotipo del mutante *ldb* que era complementado por ese fragmento. Finalmente, los mutantes delecionados que mostraron un fenotipo similar al del correspondiente *ldb* se cruzaron con él para comprobar que no se complementaban el uno al otro en el cigoto. Adicionalmente, los diploides se esporularon para probar que todas las esporas de cada tétrada mostraban el fenotipo *ldb*.

2.2.1. Identificación de *ldb1*

La cepa de *S. cerevisiae mnn1ldb1ura3* se transformó con la librería genómica CEN BANK. Los transformantes se crecieron en medio selectivo (SD-ura) y posteriormente se buscaron las células que recuperaron el fenotipo silvestre. El método de selección, basado en la diferente afinidad de las células silvestres y mutantes por las bolas de QAE-Sephadex (ver Materiales y Métodos, Sección 7.7) resultó ser muy efectiva ya que más del 85% de las colonias que crecieron en SD-ura tras la selección, mostraron un intenso color azul cuando se tiñeron con azul alcian. La intensidad era indistinguible de la mostrada por el silvestre, lo cual indicaba que habían recuperado el fenotipo silvestre.

El plásmido YCp50 con el inserto conteniendo el gen que complementó el defecto de *ldb1* se recuperó de seis de las colonias transformantes seleccionadas en el paso anterior. La fase acuosa de la extracción fenol/cloroformo mostró en ambos casos la presencia de una banda correspondiente a 23-24 kb en una electroforesis en gel de agarosa, que está en el rango de tamaño molecular esperado para el plásmido recombinante. Los plásmidos se amplificaron en *E. coli* DH5 α y se purificaron. Se

diseñaron dos cebadores alrededor del sitio de *Bam*HI de YCp50 para secuenciar un fragmento a cada lado del inserto e identificar ambos extremos. Una comparación directa de las secuencias obtenidas frente al genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* nos permitió identificar los insertos como un fragmento del cromosoma VII entre las posiciones 175264-191638 (Fig. I.5). En cada una de las seis colonias seleccionadas, los insertos fueron idénticos, lo cual sugiere que las células que se unen a QAE-Sephadex durante la selección, seguramente pertenecen a la misma colonia y fueron generadas en un único evento de transformación.

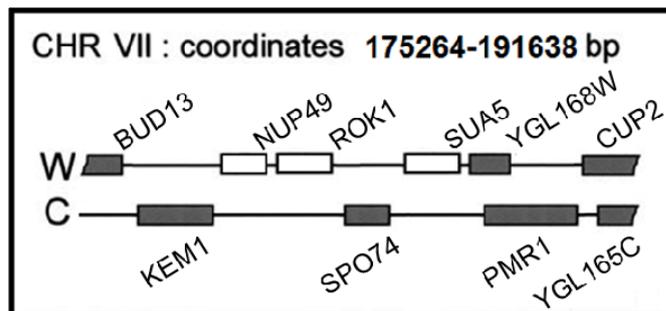


Figura I.5 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb1*. Los rectángulos blancos representan genes esenciales.

Como se muestra en la Figura I.5, el inserto incluye tres ORF incompletas: YGL173W (*BUD13*) en el extremo 5' de la hebra de Watson, YGL166W (*CUP2*) en el extremo 3' de la hebra de Watson, e YGL165C en el extremo 5' de la hebra de Crick. También incluye una ORF cuestionable (YGL168W) de 332 pb que parcialmente se solapa con YGL167C (*PMR1*). De hecho, YGL168W comparte más de la mitad de su longitud (181 pb) con *PMR1*. Esta particularidad, junto con el bajo índice de adaptación de codón, y la ausencia de homologías significativas con proteínas conocidas, nos lleva a pensar que YGL168W no se corresponde con un gen real (Klima *et al.*, 1996). Finalmente, el inserto también incluye seis ORF completas y bien definidas: YGL173C, YGL172W, YGL171W, YGL170C, YGL169W e YGL167C, tres de las cuales codifican proteínas esenciales YGL172W (*NUP49*), YGL171W (*ROK1*) e YGL169W (*SUA5*). Un defecto en cualquiera de estos tres genes esenciales resultaría en una cepa haploide inviable. *ldb1* fue descrito como un mutante no condicional obtenido a partir de una cepa parental haploide (Mañas *et al.*, 1997). Como se ha indicado anteriormente, podría derivar de una actividad residual parcialmente funcional de un gen esencial,

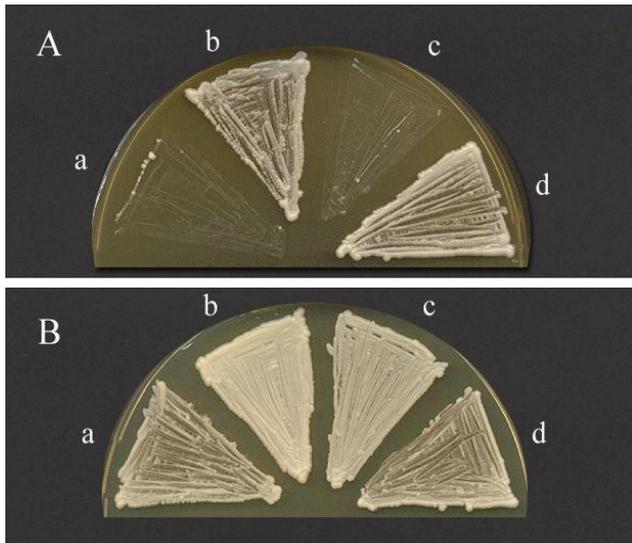
pero lo más probable es que la mutación afecte a un gen no esencial, de modo que los genes no esenciales se investigaron primero: YGL173C (*KEM1*), YGL170C (*SPO74*) e YGL167C (*PMR1*). *KEM1* codifica una enzima con actividad exonucleasa 5'-3' en ADN y ARN monocatenario que participa en meiosis (Solinger *et al.*, 1999), pero no se ha descrito ninguna implicación en glicosilación o en procesamiento de proteínas secretadas, las cuales son funciones típicamente afectadas en las cepas *ldb1*. *SPO74* codifica una proteína involucrada en esporulación (Rabitsch *et al.*, 2001). Como en el caso de *KEM1*, no se ha descrito que el mutante *spo74Δ* tuviese ningún defecto en la glicosilación o en el procesamiento de proteínas secretadas. Finalmente, YGL167C (*PMR1*) codifica una ATPasa de tipo P de la membrana del aparato de Golgi que participa en el tránsito de proteínas a lo largo de la ruta secretora de la levadura (Rudolph *et al.*, 1989). Las mutaciones en *PMR1* dan como resultado varios defectos de glicosilación, como una hipoglicosilación de la invertasa secretada (Rudolph *et al.*, 1989) y el procesamiento proteolítico incompleto del factor α (Antebi y Fink, 1992), y también afecta a la degradación proteolítica de proteínas en el RE (Durr *et al.*, 1998). Aparentemente, todos estos defectos son una consecuencia del mal funcionamiento del conjunto de la maquinaria de secreción de la célula debido a la falta de iones Ca^{2+} y/o Mg^{2+} suministrados por la bomba (Durr *et al.*, 1998). Cuando se describió el aislamiento y la caracterización del mutante *ldb1* se encontró que secretaba invertasa hipoglicosilada (Mañas *et al.*, 1997), que el procesamiento proteolítico de la exoglucanasa era incompleto (Mañas *et al.*, 1998), y que la función del RE estaba también afectada ya que los *N*-oligosacáridos maduros mantenían la manosa unida en $\alpha(1,2)$ (Mañas *et al.*, 1997) que se supone que es eliminada en el RE por una $\alpha(1,2)$ -manosidasa específica codificada por el gen *MNS1* (Camirand *et al.*, 1991). Estos datos sugieren fuertemente que *PMR1* es el principal candidato para ser responsable de la complementación del defecto de *ldb1*.

Aprovechando la disponibilidad de la colección completa de cepas delecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* obtuvimos de EUROSCARF cepas con deleciones únicas en *KEM1*, *SPO74*, y *PMR1* para comparar sus fenotipos con los descritos para *ldb1* así como para hacer ensayos de complementación. Las tres cepas se tiñeron con azul alcian, y encontramos que sólo *pmr1Δ* mostró un fenotipo típico de baja unión a

colorante. Además, cada una de las cepas delecionadas *pmr1Δ*, *kem1Δ*, y *spo74Δ MAT a* se cruzaron con *mnn1ldb1 MAT α* y se analizaron los zigotos para ver complementación del fenotipo de baja unión a colorante. Los zigotos obtenidos de los cruces *kem1Δ x mnn1ldb1* y *spo74Δ x mnn1ldb1* mostraron un fenotipo silvestre, lo que indica que ni *KEM1* ni *SPO74* son responsables de la complementación del fenotipo *ldb1* por el fragmento de la librería genómica. Por el contrario, los zigotos obtenidos del cruce *pmr1Δ x mnn1ldb1* mostraron las mismas características fenotípicas que las dos cepas haploides. El tamaño de la invertasa secretada producida por el zigoto fue el mismo que el de la enzima producida por los parentales y el tratamiento con el colorante azul alcian, no teñía las células de azul. Estos resultados demuestran la falta de complementación del fenotipo del mutante *ldb1* por una cepa con una deleción simple en *PMR1* y sugieren fuertemente que el mutante *ldb1* es defectivo en Pmr1p.

Adicionalmente, se hizo un test estándar de alelismo esporulando el diploide *pmr1Δ x mnn1ldb1*. La esporulación de este diploide tarda más tiempo que la de los silvestres diploides pero después de 15 días en medio de esporulación conseguimos un porcentaje de ascas razonablemente bueno. Aunque la mayoría de las ascas tenían sólo dos o tres esporas, fuimos capaces de diseccionar 15 tétradas completas. La tinción con azul alcian y el tamaño de la invertasa secretada mostraron un patrón de segregación de 4 (mutante): 0 (silvestre) en todos los casos, lo que es otro indicativo de que *ldb1* está mutado en *PMR1*.

También se ha descrito que las cepas defectivas en *PMR1* no pueden crecer en medio con 3 mM de Mn^{2+} , mientras que el silvestre sí puede (Wei *et al.*, 1999). En la Figura I.6A se muestra que *ldb1* y *pmr1Δ* no crecen mientras que sí lo hacen la cepa silvestre y *ldb1* transformado con YCp50 con el inserto mostrado en la Fig. I.5. Todas las cepas fueron capaces de crecer en YEPD sin adiciones (Fig I.6B).

**Figura I.6**

Panel A: Crecimiento de diversas cepas en YEPD suplementado con 3mM Mn^{2+} . a, $\Delta pmr1$; b, silvestre; c, *ldb1*; d, *ldb1* transformado con YCp50 incluyendo el inserto mostrado en la Fig I.5.

Panel B: Las mismas cepas creciendo en YEPD.

Como controles adicionales, las cepas *ldb1* y *pmr1* Δ se transformaron con el plásmido recuperado de los transformantes de *ldb1*. En ambos casos, analizamos 500 transformantes y encontramos que todos ellos habían perdido el fenotipo *ldb* ya que se tiñeron de color azul con el colorante azul alcian.

Aunque los datos presentados apoyan la hipótesis de que el fenotipo *ldb1* es la consecuencia de una mutación en *PMR1* conducente a la inactivación de la Ca^{2+}/Mn^{2+} ATPasa codificada por este gen, la confirmación definitiva es la complementación del defecto *ldb1* con un plásmido incluyendo como inserto exclusivamente la secuencia codificante de *PMR1*. La cepa *mnn1ldb1ura3* se transformó con el plásmido de levadura de 2μ YEpHis*PMR1*. Encontramos que en todos los transformantes analizados se producía la complementación del fenotipo de baja unión a colorante. Recuperaron la capacidad de unir el colorante azul alcian de tal manera que eran indistinguibles del silvestre. En un experimento control paralelo *pmr1* Δ y el silvestre se transformaron también con el mismo plásmido. Los resultados obtenidos con *pmr1* Δ fueron exactamente los mismos que en el caso de *mnn1ldb1ura3* mientras que el silvestre no modificó su patrón de tinción. Analizamos 600 transformantes de cada cepa tiñéndolos en placas de microtitulación. La parte superior de la Figura I.7 muestra el patrón de tinción de las cepas antes y después de la transformación.

La Figura I.7 también muestra que el plásmido YEpHis*PMR1* adicionalmente complementó los defectos de glicosilación de *mnn1ldb1* y *pmr1* Δ . Diez transformantes

de cada cepa seleccionados aleatoriamente se crecieron y procesaron para determinar el tamaño de la invertasa secretada en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas. Puesto que encontramos el mismo resultado en todos los casos, sólo se muestra un transformante de cada caso en la Figura I.7. Las calles 1 y 3 muestran la invertasa secretada por las cepas *mnn1ldb1* y *pmr1Δ* antes de la transformación. Las calles 2 y 4 muestran que la invertasa secretada por los transformantes de *mnn1ldb1* y *pmr1Δ* había recuperado el tamaño de la invertasa secretada por la cepa silvestre (calle 5). Las calles 5 y 6 muestran el resultado de un experimento control que demuestra que el tamaño de la invertasa sintetizada por la cepa silvestre se mantiene sin cambios después de transformarse con el mismo plásmido. En todas las calles, la banda al final del gel corresponde con la invertasa no glicosilada citosólica.

Todos estos resultados definitivamente demuestran que *ldb1* es defectivo en la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPasa de la ruta secretora/aparato de Golgi codificada por *PMR1*. Consecuentemente se propuso *LDB1* como sinónimo de *PMR1*.

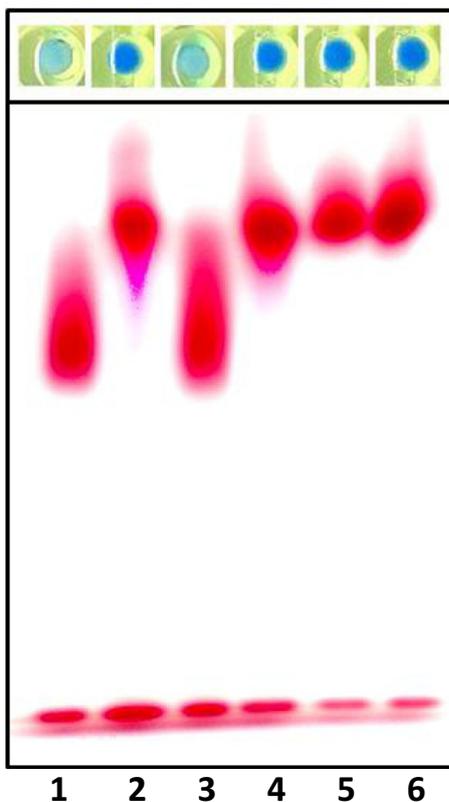


Figura I.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas de la invertasa secretada por diferentes cepas de levadura. Calle 1, *mnn1ldb1*; calle 2, *mnn1ldb1* después de transformar con YEpHisPMR1; calle 3, *pmr1Δ*; calle 4, *pmr1Δ* después de transformar con YEpHisPMR1; calle 5, silvestre; calle 6, silvestre después de transformar con YEpHisPMR1. Sobre cada una de las calles se muestra el patrón de tinción con azul alcian de las cepas correspondientes.

2.2.2. Identificación de *ldb2*

Como se muestra en la Tabla I.1, *ldb2* muestra un valor 0 de unión a colorante, lo que indica una ausencia total de afinidad por el colorante azul alcian. En la Figura I.8 se muestra el inserto que contenía el YCp50 aislado de cepas *ldb2* que habían recuperado el fenotipo silvestre después de la transformación. Hay cinco genes completos no esenciales incluidos en el inserto que son candidatos a complementar el defecto de *ldb2*: *ADE8*, *SIZ1*, *STE14*, *YDR411C*, y *ERD1*.

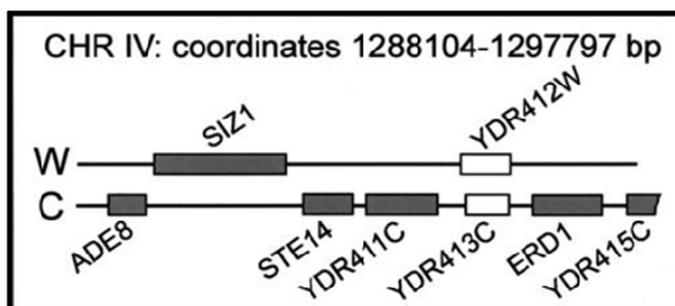


Figura I.8 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb2*. Los rectángulos blancos representan genes esenciales.

El ensayo de unión a colorante de las correspondientes cepas delecionadas mostró que sólo *erd1Δ* tiene un fenotipo *ldb* idéntico al de *ldb2*, mientras que *ade8Δ*, *siz1Δ*, *ste14Δ*, e *YDR411CΔ* se tiñeron de azul del mismo modo que el silvestre utilizado como control. *ERD1* está involucrado en la retención de proteínas en el retículo endoplasmático así como en la modificación de proteínas dependiente del aparato de Golgi (Hardwick *et al.*, 1990). Ya que la transferencia de grupos fosfato a los *N*-oligosacáridos es una función dependiente del aparato de Golgi, parece que el fenotipo de *ldb2* es sólo una consecuencia de un mal funcionamiento del aparato de Golgi más que un defecto en una proteína directamente involucrada en la transferencia de manosilfosfato.

Para probar definitivamente que *LDB2* y *ERD1* son alélicos, hicimos un test estándar de alelismo cruzando *ldb2* x *erd1Δ*. Los zigotos mostraron un fenotipo *ldb* y, cuando se esporularon, cada una de las esporas de cada tétrada se comportaba como *ldb*. Como consecuencia, *LDB2* debe ser considerado como un alias de *ERD1*.

2.2.3. Identificación de *ldb6*

La Figura I.9 muestra que hay tres genes no esenciales completos en el inserto que complementa la mutación *ldb6*. El test de azul alcian de los mutantes de delección correspondientes mostró que *mnn5Δ* y *gon7Δ* tienen ambos un fenotipo con valores de 2-3, muy similares a *ldb6* (ver Tabla I.1). Además, la electroforesis de invertasa secretada también mostró un patrón de migración similar al de *mnn2* en ambos casos.

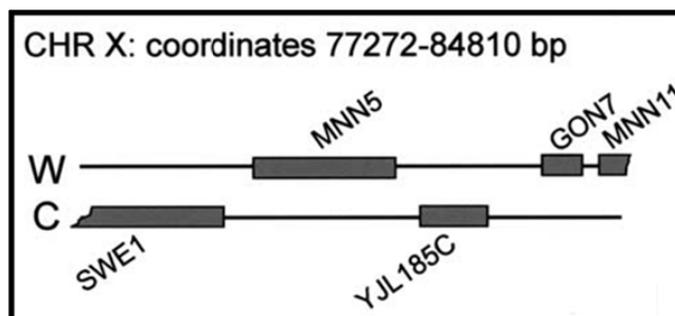


Figura I.9 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb6*.

MNN5 es un gen bien conocido que codifica una $\alpha(1,2)$ -manosiltransferasa involucrada en la extensión de las ramificaciones de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos (Rayner y Munro, 1998). En el aislamiento inicial del mutante *mnn5* (Cohen *et al.*, 1980) se describió que sintetizaba *N*-oligosacáridos más pequeños. Como consecuencia parece razonable que en el presente trabajo también muestre una reducción en el número de grupos fosfato. *GON7* es actualmente un nombre reservado para YJL184W, una ORF hipotética de función desconocida. El test estándar de alelismo reveló que la cepa *mnn5Δ* complementó el fenotipo *ldb6*, pero *gon7Δ* no lo hizo. Por tanto proponemos *LDB6* como el nombre estándar de YJL184W, o un alias de *GON7*. Estos resultados sugieren que YJL184W podría estar involucrado en la síntesis de *N*-oligosacáridos de una forma directa, o bien como consecuencia de un defecto más general en la función del aparato de Golgi. La proteína predicha Ldb6p tiene 123 aminoácidos, un peso molecular de 13605 Da y no parece tener péptido líder ni dominios transmembrana. La secuencia está conservada en otras levaduras.

2.2.4. Identificación de *ldb11*

La Figura I.10 muestra que los genes *STD1*, *COG1*, y *EDC1*, localizados en el cromosoma VII, son candidatos a complementar el defecto de *ldb11*. El test de azul alcian de las correspondientes cepas delecionadas reveló que sólo *cog1Δ* mostraba el fenotipo *ldb*. Además, la electroforesis en condiciones nativas de la invertasa secretada de *cog1Δ* también mostró un patrón de migración heterogéneo, similar al de la cepa *ldb11* (Fig. I.2, Calle 4). La ausencia de complementación en el zigoto obtenido cruzando *ldb11* x *cog1Δ* confirmó que *LDB11* es alélico a *COG1*. *COG1* es miembro de una familia involucrada en el transporte en el aparato de Golgi (Whyte y Munro, 2001), de modo que un transporte deficiente en el aparato de Golgi parece ser la razón del fenotipo *ldb11*. El cierto grado de resistencia a vanadato de *ldb11* (ver Tabla I.1) así como la formación de agregados celulares (Tabla I.1 y Figura I.3D) también los comparte *COG1*.

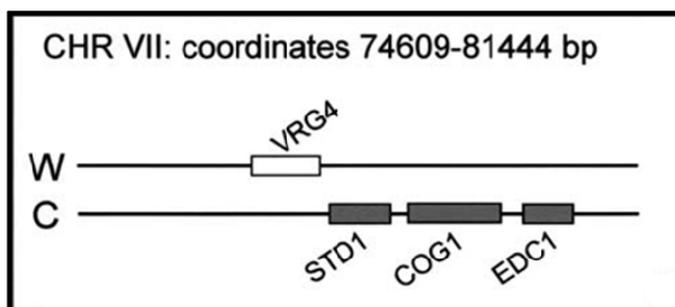


Figura I.10 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb11*. El rectángulo blanco indica que el gen es esencial.

2.2.5. Identificación de *ldb12*

En este caso, *OCH1*, *PNC1*, *YGL036W*, *MIG1*, e *YGL034C* localizados en el cromosoma VII son los candidatos a portar la mutación *ldb12* (Fig. I.11). Hay que reseñar que *OCH1* es un gen bien definido que codifica una $\alpha(1,6)$ -manosiltransferasa responsable de la iniciación de la cadena externa en los *N*-oligosacáridos (Nakayama *et al.*, 1992). El patrón de migración de la invertasa externa sintetizada por *och1Δ* es casi indistinguible de la de las cepas *mnn9* (Nakanishi-Shindo *et al.*, 1993) y *ldb12* (Tabla I.1). Estas observaciones hacen a *OCH1* un buen candidato para ser alélico a *LDB12*. Los ensayos de unión a colorante probaron que *och1Δ* mostró un claro fenotipo *ldb*

mientras que *pnc1Δ*, *YGL036WΔ*, *mig1Δ*, e *YGL034CΔ* se tiñeron como el silvestre. Además, la resistencia a vanadato (ver Tabla I.1), la formación de agregados (Tabla I.1 y Fig. I.3E), y el test estándar de alelismo confirmó que *LDB12* y *OCH1* son alélicos.

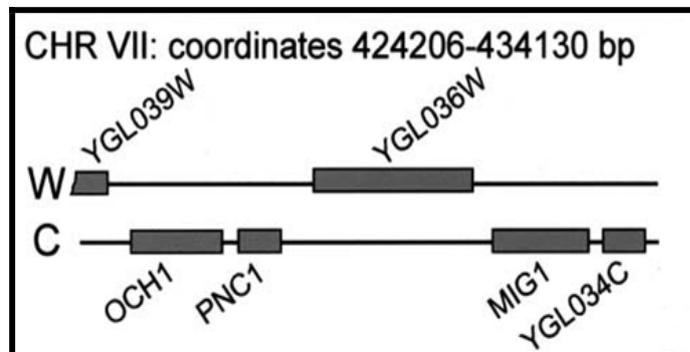


Figura I.11 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb12*.

2.2.6. Identificación de *ldb13*

El mutante *ldb13* también mostró un patrón de migración de la invertasa tipo *mnn9*, y es capaz de crecer en ortovanadato de sodio 10 y 15 mM (ver Tabla I.1). El fragmento que muestra complementación del defecto *ldb13* recae en el cromosoma XIII e incluye los genes no esenciales *VAN1*, *DAT1*, y *CTK3* (Fig. I.12). El nombre *VAN1* es un sinónimo de *VRG7* y *VRG8* los cuales fueron denominados de esa forma por la capacidad de sus correspondientes mutantes de crecer en vanadato (*vanadate resistant glycosylation mutants*) (Ballou *et al.*, 1991). Además, los mutantes *van1* mostraban un patrón de migración de la invertasa de tipo *mnn9*. Estos datos sugieren que *VAN1* podría ser el candidato a complementar el defecto de *ldb13*. El ensayo de unión a colorante, la formación de agregados celulares (Tabla I.1 y Figura I.3F), y el test estándar de alelismo confirmaron que *LDB13* debe ser considerado un alias de *VAN1*. Van1p es una proteína localizada en el *cis*-Golgi, e involucrada en la elongación de los *N*-oligosacáridos (Jungmann y Munro, 1998). Van1p y Mnn9p forman el Complejo Mananopolimerasa I, responsable de la elongación inicial de la cadena externa en el *cis*-Golgi (Jungmann *et al.*, 1999), de modo que la causa del fenotipo *ldb* mostrado por *ldb13* parece ser la reducción en el tamaño de los *N*-oligosacáridos.

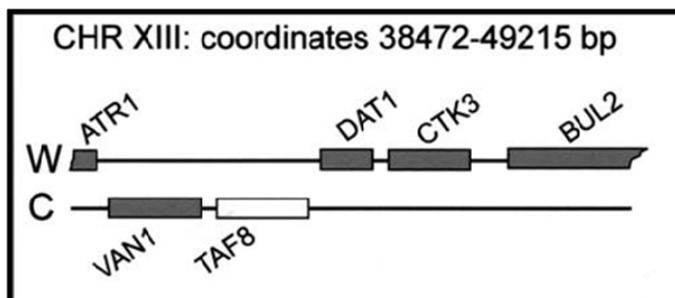


Figura I.12 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb13*. El rectángulo blanco indica que el gen es esencial.

2.2.7. Identificación de *ldb15*

El fenotipo de *ldb15* se complementó con un fragmento del cromosoma XVI que incluía los siguientes genes no esenciales: *PHO85*, *YPL030W*, *SUV3*, y *SMA1* (Fig. I.13). El ensayo de unión a colorante de las correspondientes cepas delecionadas mostró que sólo *pho85Δ* tiene una reducción en la afinidad por el colorante azul alcian. Asignamos el valor de 1 (azul muy claro) a *pho85Δ* el cual es idéntico al que se muestra en la Tabla I.1 para *ldb15*. El resto de las cepas delecionadas (*YPL030WΔ*, *suvs3Δ* y *sma1Δ*) se tiñeron como el silvestre. Además, cuando se cruzó *ldb15* x *pho85Δ* obtuvimos un cigoto con el fenotipo *ldb* que era incapaz de esporular. Consecuentemente, *LDB15* debe ser considerado un alias de *PHO85*. *PHO85* codifica una proteína-quinasa involucrada en la adaptación a estrés y en integridad celular. La deleción de *PHO85* causa un fenotipo pleiotrópico relacionado con diferentes aspectos del metabolismo, el ciclo celular, la polaridad celular, y la expresión génica (Huang *et al.*, 2002). Nuestros resultados añaden una característica más a este fenotipo, la severa reducción en la incorporación de grupos fosfato en los *N*-oligosacáridos. El modo en que *PHO85* participa en la transferencia de manosilfosfato no está claro, aunque se ha sugerido que la transferencia de fosfato a los *N*-oligosacáridos podría ser parte de la respuesta general de la célula a situaciones de estrés (Jigami y Odani, 1999). La relación de *PHO85* con este proceso podría reforzar esta suposición. Además, es también posible que en mutantes *pho85* las células se comporten como “hambrientas” de fosfato (Lenburg y O’Shea, 1996) y por esa razón no pueden fosforilar los *N*-oligosacáridos. Debemos apuntar que *pho85Δ* muestra un patrón de migración de la

invertasa indistinguible del silvestre, lo cual sugiere que el defecto en *PHO85* afecta específicamente a la incorporación de grupos manosilfosfato en los N-oligosacáridos.



Figura I.13 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *ldb15*. El rectángulo blanco indica que el gen es esencial.

2.3. Identificación de *ldb4*, *ldb5*, *ldb7*, *ldb9*, *ldb10*, y *ldb14*

Cuando transformamos los mutantes *ldb4*, *ldb5*, *ldb7*, *ldb9*, *ldb10*, y *ldb14* con la librería genómica CEN BANK, no fuimos capaces de detectar clones que recuperaran el fenotipo silvestre en dos experimentos independientes. La razón de este resultado puede estar relacionada con la cantidad de fosfato presente en estos mutantes, ya que ninguno de ellos tiene una reducción demasiado severa en su afinidad por el colorante azul alcian (ver Tabla I.1). Esto podría hacer más difícil distinguir mediante las bolas de QAE-Sephadex entre silvestre y mutantes y consecuentemente podría reducir la probabilidad de unir las células que hubiesen recuperado el fenotipo silvestre. De todos modos, antes de analizar más en detalle las razones de estos resultados negativos aprovechamos la situación de que simultáneamente a estos experimentos estábamos realizando una búsqueda a escala genómica en la colección completa de cepas delecionadas de *S. cerevisiae* para encontrar fenotipos *ldb*. Encontramos alrededor de 200 cepas con deleción que mostraban diferentes grados de reducción en la afinidad por el colorante azul alcian (ver Capítulo II, y Corbacho *et al.* (2005)).

Cada uno de los mutantes *ldb* mencionados anteriormente se cruzó con diferentes cepas delecionadas de fenotipo similar (intensidad de tinción con azul alcian, patrón de migración de la invertasa, morfología celular, y formación de agregados celulares). Los resultados de estos test estándar de alelismo fueron los

siguientes: *LDB4* alélico a *SPC72*, *LDB5* alélico a *RLR1*, *LDB7* alélico a YBL006C (ORF hipotética), *LDB9* alélico a *ELM1*, *LDB10* alélico a *CWH36*, y *LDB14* alélico a *BUD32*.

Spc72p es un componente esencial del cuerpo polar del huso. Los mutantes en *SPC72* tienen muy pocos microtúbulos citoplasmáticos (Chen *et al.*, 1998), y el tránsito de glicoproteínas a través del aparato de Golgi podría verse afectado como consecuencia del defecto en el citoesqueleto. Esto podría explicar el hallazgo de que la transferencia de manosilfosfato a los *N*-oligosacáridos es ligeramente menos efectiva en la cepa *ldb4*.

RLR1 codifica una proteína con actividad de unión a ácido nucleico la cual está involucrada en la elongación del ARN a partir del promotor de la ARN Polimerasa II. Mutantes en *RLR1* tienen un amplio rango de defectos de crecimiento y no son capaces de expresar fusiones de *LacZ* en levaduras (West *et al.*, 2000). El fenotipo *ldb* podría ser el resultado de un defecto general de transcripción que afecta a la maquinaria de glicosilación y probablemente al gen (o genes) involucrado(s) en la transferencia de grupos manosilfosfato.

YBL006C es una ORF hipotética de función desconocida. El mutante de delección YBL006CΔ muestra un patrón de migración de la invertasa que es muy similar, sino idéntico, al del silvestre. La morfología celular es normal y no muestra formación de agregados ni resistencia a vanadato. Lo único que se puede decir en estos momentos es que la transferencia de grupos manosilfosfato a los *N*-oligosacáridos está reducida en este mutante, de modo que el gen debe estar de alguna forma involucrado en el proceso. La proteína predicha que codificaría *LDB7/YBL006C* tiene 145 aminoácidos, un peso molecular de 15.869 Da y no tiene péptido líder ni dominios transmembrana. La secuencia está conservada en otras levaduras aunque es destacable que *Ldb7p* es 35-38 residuos más corta que sus ortólogos en las levaduras más cercanas.

ELM1, *CWH36*, y *BUD32* son genes involucrados en eventos morfogénicos que afectan a la organización de la pared celular. *ELM1* y *BUD32* codifican proteínas con actividad serín/treonín-quinasa implicadas en el crecimiento de la yema y en la selección del sitio de gemación. *ELM1* es un tipo particular de proteín-quinasa cuya delección causa crecimiento pseudomicelial, sugiriendo que *Elm1p* actúa como un

represor del crecimiento micelial bajo condiciones no inductoras (Blacketer *et al.*, 1993) (ver Figura I.3C). *BUD32* se detectó en un estudio a escala genómica de genes relacionados con la gemación (Ni y Snyder, 2001). La delección de *BUD32* causa un fenotipo pleiotrópico que incluye crecimiento lento, alteraciones en la pared celular, y gemación aleatoria (Ni y Snyder, 2001; Facchin *et al.*, 2002). El mutante *ldb14* (ver Tabla I.1) y *bud32Δ* también mostraron defectos en la maquinaria de glicosilación, como se deduce de la reducción en el tamaño de la invertasa secretada. La participación de proteín-quinasas en diversos procesos celulares es una característica muy común de estas enzimas, de modo que no sorprende que influyan sobre la manosilfosforilación de *N*-oligosacáridos. Finalmente, *CWH36* se detectó en una búsqueda de mutantes de *S. cerevisiae* que mostraran sensibilidad al blanco de calcoflúor (CWH) debido a alteraciones en la biogénesis y/o organización de la pared celular (Ram *et al.*, 1994). El mutante *ldb10* (Tabla I.1) y *cwh36Δ* también sintetizan invertasa externa de tamaño reducido. Aunque la función molecular de *CWH36* no se conoce aún, la reducida cantidad de *N*-oligosacáridos en las manoproteínas podría ser la razón del fenotipo *ldb*.

3. CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo se han identificado 12 genes que cuando están mutados/eliminados dan como resultado un fenotipo *ldb* (ver Tabla I.1). Las funciones de los genes son muy diversas: secreción (*ERD1*, *COG1*), organización de microtúbulos (*SPC2*), transcripción (*RLR1*), organización de la pared celular (*CWH36*), glicosilación de proteínas (*OCH1*, *VAN1*), y fosforilación de proteínas (*ELM1*, *BUD32*, *PHO85*). Además, *LDB6* (*GON7/YJL184W*) y *LDB7* (*YBL006C*) son ORF hipotéticas de función desconocida. Desde la fecha de publicación de estos resultados (Corbacho *et al.*, 2004) *LDB7* aparece en SGD como nombre estándar para la ORF *YBL006C*. A partir de estos datos, parece claro que la transferencia de grupos manosilfosfato a los *N*-oligosacáridos de las manoproteínas de las levaduras depende de muchos genes y está ligado a procesos celulares importantes. Las nuevas características fenotípicas de las cepas delecionadas que aquí se muestran, pueden contribuir a la caracterización funcional del genoma de *S. cerevisiae*.

Los resultados presentados en este capítulo han sido objeto de dos publicaciones (Olivero *et al.*, 2003; Corbacho *et al.*, 2004).

4. REFERENCIAS

- Antebi, A. and Fink, G. R. (1992). "The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution." *Mol. Biol. Cell* **3**(6): 633-654.
- Ballou, C. E. (1990). "Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects." *Methods Enzymol.* **185**: 445-470.
- Ballou, C. E., Kern, K. A. and Raschke, W. C. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Complementation studies and properties of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4667-4671.
- Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S. and Ballou, C. E. (1991). "Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(8): 3209-3212.
- Blacketer, M. J., Koehler, C. M., Coats, S. G., Myers, A. M. and Madaule, P. (1993). "Regulation of dimorphism in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the novel protein kinase homolog Elm1p and protein phosphatase 2A." *Mol. Cell. Biol.* **13**(9): 5567-5581.
- Camirand, A., Heysen, A., Grondin, B. and Herscovics, A. (1991). "Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing alpha-mannosidase." *J. Biol. Chem.* **266**(23): 15120-15127.
- Cohen, R. E., Ballou, L. and Ballou, C. E. (1980). "*Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein mutants. Isolation of the *mnn5* mutant and comparison with the *mnn3* strain." *J. Biol. Chem.* **255**(16): 7700-7707.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2004). "Identification of low-dye-binding (*ldb*) mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res.* **4**(4-5): 437-444.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2005). "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides." *Fungal Genet. Biol.* **42**(9): 773-790.
- Chen, X. P., Yin, H. and Huffaker, T. C. (1998). "The yeast spindle pole body component Spc72p interacts with Stu2p and is required for proper microtubule assembly." *J. Cell Biol.* **141**(5): 1169-1179.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H. and Rudolph, H. K. (1998). "The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation." *Mol. Biol. Cell* **9**(5): 1149-1162.
- Facchin, S., Lopreiato, R., Stocchetto, S., Arrigoni, G., Cesaro, L., Marin, O., Carignani, G. and Pinna, L. A. (2002). "Structure-function analysis of yeast piD261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life." *Biochem. J.* **364**(2): 457-463.
- Hardwick, K., Lewis, M., Semenza, J., Dean, N. and Pelham, H. (1990). "*ERD1*, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus." *EMBO J.* **9**: 623-630.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Gillece-Castro, B. L., Burlingame, A. L. and Ballou, C. E. (1989a). "A new *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutant N-linked oligosaccharide structure." *J. Biol. Chem.* **264**(20): 11849-11856.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P. K. and Ballou, C. E. (1989b). "Structure of the phosphorylated N-linked oligosaccharides from the *mnn9* and *mnn10* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13648-13659.
- Huang, D., Moffat, J. and Andrews, B. (2002). "Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity." *Mol. Cell. Biol.* **22**(14): 5076-5088.
- Jigami, Y. and Odani, T. (1999). "Mannosylphosphate transfer to yeast mannan." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 335-345.
- Jungmann, J. and Munro, S. (1998). "Multi-protein complexes in the *cis* Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity." *EMBO J.* **17**(2): 423-434.

- Jungmann, J., Rayner, J. C. and Munro, S. (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* Protein Mnn10p/Bed1p Is a Subunit of a Golgi Mannosyltransferase Complex." *J. Biol. Chem.* **274**(10): 6579-6585.
- Karson, E. M. and Ballou, C. E. (1978). "Biosynthesis of yeast mannan. Properties of a mannosylphosphate transferase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **253**(18): 6484-6492.
- Klima, R., Coglievina, M., Zaccaria, P., Bertani, I. and Bruschi, C. V. (1996). "A putative helicase, the *SUA5*, *PMR1*, *tRNA^{Lys1}* genes and four open reading frames have been detected in the DNA sequence of an 8.8 kb fragment of the left arm of chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **12**(10B): 1033-1040.
- Lenburg, M. and O'Shea, E. (1996). "Signaling phosphate starvation." *Trends Biochem. Sci.* **21**(10): 383-387.
- Mañas, P., Olivero, I., Avalos, M. and Hernandez, L. M. (1997). "Isolation of new nonconditional *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in asparagine-linked glycosylation." *Glycobiology* **7**(4): 487-497.
- Mañas, P., Olivero, I. and Hernández, L. M. (1998). "Proteolytic processing of a secreted glycoprotein and *O*-glycosylation of mannoproteins are affected in the *N*-glycosylation mutant *Saccharomyces cerevisiae* *ldb1*." *Biochim. Biophys. Acta* **1380**(3): 320-328.
- Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K. I., Tanaka, A., Toda, Y. and Jigami, Y. (1993). "Structure of the *N*-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from *och1*, *och1 mnn1*, and *och1 mnn1 alg3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **268**(35): 26338-26345.
- Nakayama, K.-i., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. and Jigami, Y. (1992). "*OCH1* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides." *EMBO J.* **11**(7): 2511-2519.
- Ni, L. and Snyder, M. (2001). "A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **12**(7): 2147-2170.
- Odani, T., Shimma, Y.-i., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1996). "Cloning and analysis of the *MNN4* gene required for phosphorylation of *N*-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*." *Glycobiology* **6**(8): 805-810.
- Olivero, I., Corbacho, I. and Hernández, L. M. (2003). "The *ldb1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is defective in Pmr1p, the yeast secretory pathway/Golgi Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase." *FEMS Microbiol. Lett.* **219**(1): 137-142.
- Rabitsch, K. P., Tóth, A., Gálová, M., Schleiffer, A., Schaffner, G., Aigner, E., Rupp, C., Penkner, A. M., Moreno-Borchart, A. C., Primig, M., Esposito, R. E., Klein, F., Knop, M. and Nasmyth, K. (2001). "A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression." *Curr. Biol.* **11**(13): 1001-1009.
- Ram, A. F. J., Wolters, A., Hoopen, R. T. and Klis, F. M. (1994). "A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white." *Yeast* **10**(8): 1019-1030.
- Raschke, W. C., Kern, K. A., Antalis, C. and Ballou, C. E. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4660-4666.
- Rayner, J. C. and Munro, S. (1998). "Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **273**(41): 26836-26843.
- Rose, M. D., Novick, P., Thomas, J. H., Botstein, D. and Fink, G. R. (1987). "A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector." *Gene* **60**(2-3): 237-243.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J.-i. and Moir, D. T. (1989). "The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca²⁺ ATPase family." *Cell* **58**(1): 133-145.
- Solinger, J. A., Pascolini, D. and Heyer, W.-D. (1999). "Active-site mutations in the Xrn1p exoribonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* reveal a specific role in meiosis." *Mol. Cell. Biol.* **19**(9): 5930-5942.
- Wang, X.-H., Nakayama, K.-i., Shimma, Y.-i., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1997). "*MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **272**(29): 18117-18124.

- Wei, Y., Marchi, V., Wang, R. and Rao, R. (1999). "An N-terminal EF hand-like motif modulates ion transport by Pmr1, the yeast Golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase." *Biochemistry* **38**(44): 14534-14541.
- West, R. W., Kruger, B., Thomas, S., Ma, J. and Milgrom, E. (2000). "*RLR1 (THO2)*, required for expressing *lacZ* fusions in yeast, is conserved from yeast to humans and is a suppressor of *SIN4*." *Gene* **243**(1-2): 195-205.
- Whyte, J. R. C. and Munro, S. (2001). "The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic." *Dev. Cell* **1**(4): 527-537.

BÚSQUEDA A ESCALA GENÓMICA DE GENES NO ESENCIALES EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INVOLUCRADOS EN MANOSILFOSFORILACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Glicosilación de proteínas y organización de la pared celular

2.2. Acidificación de la vacuola

2.3. Localización vacuolar / Otros relacionados con la vacuola

2.4. Secreción, transporte, y organización de actina/citoesqueleto

2.5. Transcripción y transducción de señales

2.6. Metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos

2.7. Miscelánea

2.8. ORF dudosas o no caracterizadas

3. CONSIDERACIONES FINALES

4. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

Los *N*-oligosacáridos de *Saccharomyces cerevisiae* contienen grandes cantidades de grupos manosilfosfato unidos en determinadas posiciones en el núcleo interno y en la cadena externa (Hernández *et al.*, 1989a; Hernández *et al.*, 1989b). La presencia de tales grupos se ha descrito también en una posición de los *O*-oligosacáridos (Nakayama *et al.*, 1998) (ver Figura 0.5 la de Introducción General). Las unidades de manosilfosfato son muy abundantes y están localizadas mayoritariamente en el exterior por lo que confieren carga negativa a la superficie de la célula y permite la tinción con colorantes catiónicos como el azul alcian (Ballou, 1990). Estudios preliminares del grupo de Ballou (Karson y Ballou, 1978) describieron una actividad manosil transferasa unida a membrana que era defectiva en los mutantes *mnn4* y

mnn6. Estudios posteriores por Jigami y colaboradores identificaron los genes *MNN4* (Odani *et al.*, 1996) y *MNN6* (Wang *et al.*, 1997). Encontraron que Mnn6p es una manosilfosfato transferasa perteneciente a la familia *KRE2/MNT1*, mientras que Mnn4p parecía tener un papel regulador. De todos modos, Aravind y Koonin (Aravind y Koonin, 1999) describieron que *MNN4* tiene una secuencia de fukutina típica de las enzimas que modifican glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular, sugiriendo que Mnn4p podría ser una transferasa por sí misma. Ninguna de estas dos actividades ha sido demostrada.

El estudio de la manosilfosforilación es interesante no solo desde el punto de vista de la investigación básica, para entender el funcionamiento de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, sino también desde un punto de vista aplicado, por estar presentes en hongos de interés médico como *Candida albicans*. Aunque la función de dichos grupos aun no está totalmente establecida, su localización en el exterior de la pared celular les hace candidatos a ligandos potenciales para interactuar con las células del hospedador.

La disponibilidad de la colección completa de cepas delecionadas en *Saccharomyces cerevisiae* y los métodos para la detección de defectos en manosilfosforilación (Ballou, 1990; Mañas *et al.*, 1997) hace de este organismo un modelo más adecuado para el estudio del proceso. El análisis fenotípico de la colección mencionada permite obtener nuevos datos sobre el papel potencial de cada gen no esencial en la transferencia de los grupos manosilfosfato.

Hace unos años nuestro grupo comenzó una búsqueda de genes involucrados en la fosforilación de oligosacáridos unidos a proteínas. En el primer intento, se puso a punto un método para seleccionar mutantes que mostraran una reducción en la carga negativa de la superficie celular (Mañas *et al.*, 1997; Olivero *et al.*, 2001) (Ver Capítulo I). Por este procedimiento se aislaron 15 grupos de complementación, todos los cuales mostraban una reducción en la afinidad por el colorante catiónico azul alcian, de modo que los llamamos *ldb* (*low dye binding*).

Como los 15 mutantes *ldb* se generaron por mutagénesis aleatoria, parecía muy probable que hubiera más genes no identificados cuya deleción resultase en un

fenotipo *ldb*. Por esa razón, en este trabajo, hemos llevado a cabo una búsqueda a escala genómica de tales genes en *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados amplían el número de genes involucrados en el fenotipo *ldb* a 199 y añade nuevos aspectos relacionados con la transferencia de grupos manosilfosfato a oligosacáridos unidos a glicoproteínas.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo hemos realizado una búsqueda a escala genómica de genes no esenciales de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en manosil fosforilación, mediante un análisis del fenotipo *ldb* en la colección completa de cepas delecionadas. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, los ensayos se realizaron (por duplicado) en cada una de las colecciones de ambos tipos sexuales. Encontramos 198 mutantes delecionados que mostraron un fenotipo *ldb* detectable en ambos sexos a y α . Dos cepas mostraron el fenotipo sólo en el sexo α , aunque en una de ellas el defecto resultó no estar ligado al gen delecionado. Según la intensidad del fenotipo, 24 cepas (12%) se clasificaron en el Grupo 1 (fenotipo *ldb* severo), 75 cepas (37,5%) en el Grupo 2 (fenotipo *ldb* moderado) y las restantes 101 cepas (50,5%) en el Grupo 3 (fenotipo *ldb* débil). En cada cepa *ldb* se examinó el tamaño de la invertasa secretada mediante electroforesis en condiciones nativas. Para realizar un análisis más coherente de los resultados, los genes se separaron en grupos funcionales según la información disponible en la base de datos *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD) y el Centro de Información de Múnich para la Secuencia de Proteínas (MIPS). Cada gen aparece listado sólo en una categoría aunque la mayoría podría haberse situado en más de una de ellas. Las Tablas II.1 a II.12 muestran todos los genes/ORFs, seleccionados, así como una pequeña descripción del producto del gen, la intensidad del fenotipo *ldb* y el tamaño de la invertasa de la correspondiente cepa delecionada (ver Fig. II.1). Los genes identificados en esta búsqueda corresponden al 4% de los 4813 genes no esenciales representados en las colecciones haploides utilizadas en este trabajo.

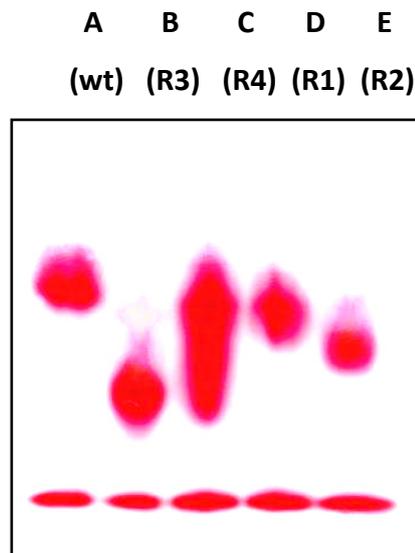


Figura II.1 Electroforesis en condiciones nativas de la invertasa secretada por diversas cepas representativas: Calle **A**, silvestre; Calle **B**, *mnn9Δ*; Calle **C**, *vps15Δ*; Calle **D**, *vma9Δ*; Calle **E**, *mnn11Δ*. Los diversos grados de reducción en el tamaño de la invertasa se indican con R1, R2, R3, y R4.

Los grupos de Glicosilación de proteínas (Tabla II.1) y Función vacuolar (Tablas II.3 y II.4) son grupos bien definidos que parecen ser los más directamente relacionados con la manosilfosforilación. Por esta razón se describen en detalle a continuación.

2.1. Glicosilación de proteínas y organización de la pared celular

En glicosilación de proteínas incluimos 19 cepas que están delecionadas en los genes listados en la Tabla II.1. Todos ellos son genes bien conocidos involucrados en la síntesis o procesamiento de *N*-oligosacáridos en el RE y Golgi. La Figura II.2 es una representación esquemática de la ruta de glicosilación en la cual está indicada la función concreta de cada gen no esencial. Se incluyen en este grupo diversos mutantes descritos previamente como *ldb: mnn4Δ*, *mnn6Δ (kre6Δ)*, *mnn2Δ (ldb8Δ)*, *ldb12Δ (och1Δ)*, *ldb13Δ (van1Δ)* (ver Capítulo I y Corbacho *et al.*, 2004). *ALG3 (RHK1)* y *ALG9* codifican manosiltransferasas localizadas en la cara luminal de la membrana del RE que transfieren manosa desde el Dol-P-Man al oligosacárido creciente unido a Dol-PP (Aebi *et al.*, 1996; Burda *et al.*, 1996). Se ha sugerido que las manosas transferidas por Alg3p y Alg9p juegan un papel importante en el procesamiento adicional de *N*-oligosacáridos

en el Golgi (Cipollo y Trimble, 2000). Nuestros resultados corroboran las sugerencias antes citadas ya que los correspondientes mutantes mostraron defectos en la elongación de la cadena externa y consecuentemente una reducción en la cantidad de manosilfosfato. Alg12p (Ecm39p) cataliza la transferencia de la segunda manosa unida por enlace $\alpha(1,6)$ de los oligosacáridos unidos al Dol-PP (Cipollo y Trimble, 2002) que es uno de los dos sitios potenciales de fosforilación en el núcleo (Figura 0.1 de la Introducción). De todos modos, *alg12 Δ* mostró una afinidad por el azul alcian indistinguible de la mostrada por el silvestre, de modo que la hipofosforilación del núcleo interno no resulta en un fenotipo *ldb*, al menos cuando la cadena externa está presente. El mayor tamaño de la cadena externa con más sitios de fosforilación que el núcleo, así como la orientación hacia el exterior, de las largas cadenas de azúcares, probablemente la hacen dominante sobre el núcleo interno, con respecto a la carga negativa de la superficie celular.

Tabla II.1

Genes relacionados con la glicosilación de proteínas cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBL082C	<i>RHK1/ALG3</i>	1,3-manosil transferasas dependiente de Dol-P-Man del RE	3	R1
YBR015C	<i>MNN2/LDB8</i>	α -1,2-manosiltransferasa de Golgi	1	R2
YDL232W	<i>OST4</i>	Subunidad 3.6 kDa de la glicosiltransferasa Dol-PP-oligosacárido/proteína (OST)	1	R1
YDR245W	<i>MNN10</i>	Subunidad de la manano polimerasa II (Man Pol II) de Golgi	1	R2
YEL036C	<i>ANP1/MNN8</i>	Subunidad de la manano polimerasa II (Man Pol II) de Golgi	1	R1
YEL042W	<i>GDA1</i>	GDPasa de la membrana de Golgi	2	WT
YGL038C	<i>OCH1/LDB12</i>	α -1,6-manosiltransferasa de Golgi	1	R3
YGR036C	<i>CAX4</i>	Pirofosfatasa involucrada en la N-glicosilación	1	R4
YJL183W	<i>MNN11</i>	Subunidad del Man Pol II de Golgi	1	R2
YJL186W	<i>MNN5</i>	α -1,2-manosiltransferasa de Golgi	1	R1
YJR075W	<i>HOC1</i>	Subunidad del Man Pol II de Golgi	2	R1
YKL201C	<i>MNN4</i>	Requerido para la transferencia de Man-P a los oligosacáridos	1	WT
YML115C	<i>VAN1/LDB13</i>	Subunidad del Man Pol I de Golgi	2	R3
YNL219C	<i>ALG9</i>	Manosiltransferasa del RE (biosíntesis del oligosacárido unido a Dol-PP)	3	R1
YOR002W	<i>ALG6</i>	Glucosiltransferasa (biosíntesis del oligosacárido unido a Dol-PP)	3	R1
YOR085W	<i>OST3</i>	Subunidad α de 34 kDa de la OST del RE	2	WT
YPL053C	<i>KTR6/MNN6</i>	Manosilfosfato transferasa a oligosacáridos de Golgi	1	WT
YPL050C	<i>MNN9</i>	Subunidad de Man Pol I y Man Pol II de Golgi	1	R3
YPL227C	<i>ALG5</i>	UDP-Glc:DolP glucosiltransferasa	3	WT

a Ver Fig. II.1

Alg5p cataliza la síntesis de Dol-P-Glc a partir de UDP-Glc en el lado citosólico de la membrana del RE (Heesen *et al.*, 1994) y Alg6p es una glucosiltransferasa responsable de la transferencia de la primera glucosa del Dol-P-Glc al oligosacárido

unido al Dol-PP en la cara luminal de la membrana (Reiss *et al.*, 1996). En el anterior trabajo, se demostró además que el defecto *alg6* conduce a una hipoglicosilación de las proteínas lo que puede explicar el débil fenotipo *ldb* mostrado por la cepa delecionada. Creemos de interés resaltar que todos los mutantes *algΔ* seleccionados en esta búsqueda mostraron una reducción débil de la afinidad por el azul alcian, por lo que fueron asignados al grupo 3. *ALG8* y *ALG10* (*DIE2*) son responsables de la transferencia de la segunda y tercera glucosa al oligosacárido unido a lípido (Stagljar *et al.*, 1994; Burda y Aebi, 1998). El hecho de que *alg6Δ* mostrara un débil fenotipo *ldb*, mientras que *alg8Δ* y *alg10Δ* se tiñan como el silvestre, sugiere que la primera glucosa transferida al oligosacárido unido al lípido es la más significativa para la actividad de la oligosacariltransferasa (OST). Los resultados obtenidos con los genes *ALG* indican claramente que el fenotipo *ldb* débil mostrado por *alg3Δ*, *alg5Δ*, *alg6Δ*, y *alg9Δ* debe ser una consecuencia indirecta de la reducción del tamaño de la cadena externa.

La oligosacariltransferasa (OST) es un complejo multiproteico de la membrana del RE que cataliza la transferencia del $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ desde el lípido intermediario a la proteína naciente. Está constituida por 9 polipéptidos organizados en 3 subcomplejos funcionales (Knauer y Lehle, 1999). La deleción de los genes que codifican cinco subunidades (*OST1*, *OST2*, *STT3*, *SWP1*, y *WBP1*) conduce a cepas inviables. La deleción de *OST3* y *OST4* resultan en fenotipos *ldb* moderado y severo respectivamente (ver Tabla II.1), mientras que *ost5Δ* y *ost6Δ* fueron indistinguibles del silvestre. El fenotipo *ldb* severo de *ost4Δ* podría estar relacionado con la función de Ost4p que une Stt3p y Ost3p para formar un sub-complejo de OST (Kim *et al.*, 2003). Estos resultados confirman la diferente contribución de las subunidades de OST a la actividad enzimática final, y apuntan a que las subunidades Ost5p y Ost6p podrían tener un papel menos relevante.

Una vez que el núcleo *N*-oligosacárido unido a la proteína es transportado al aparato de Golgi, se alarga por adición de la cadena externa (ver Fig. II.2). Diversas proteínas participan en la síntesis de esta estructura, incluyendo Och1p, el complejo manano polimerasa I (M-Pol I), manano polimerasa II (M-Pol II), Mnn2p, Mnn5p, Mnn4p, Mnn6p y Mnn1p (para una revisión ver Munro, 2001). Och1p es una $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa responsable de la adición de la primera manosa de la cadena

externa, la cual está unida a una manosa concreta del núcleo por enlace $\alpha(1,6)$ (Nakayama *et al.*, 1992; Nakanishi-Shindo *et al.*, 1993). M-Pol I y M-Pol II también tienen actividad $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa, y trabajan secuencialmente en la elongación de la cadena central de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ de la cadena externa. M-Pol I está formada por Mnn9p y Van1p, mientras que M-Pol II es un complejo multiproteico que incluye Mnn8p (Anp1p), Mnn9p, Mnn10p, Mnn11p y Hoc1p (Jungmann y Munro, 1998; Jungmann *et al.*, 1999). Mnn2p y Mnn5p son $\alpha(1,2)$ manosil transferasas que catalizan la transferencia de la primera y la segunda manosas de las ramificaciones, respectivamente, a la cadena central de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ (Ballou, 1990; Rayner y Munro, 1998). Mnn6p (Ktr6p) es la manosilfosfato transferasa, mientras que Mnn4p parece tener un papel regulador en este proceso (Odani *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997), aunque no se puede descartar totalmente que tenga actividad manosilfosfato transferasa (Aravind y Koonin, 1999). Finalmente, Mnn1p cataliza la transferencia de las manosas terminales en $\alpha(1,3)$ al extremo no reductor de las ramificaciones (Ballou, 1990; Yip *et al.*, 1994). Este paso se cree que es el último en la construcción de la cadena externa, lo que hace esta etapa irrelevante para el proceso de fosforilación (Mañas *et al.*, 1997). Como se muestra en la Tabla II.1 y Figura II.2, todas las cepas que carecen de alguna de las proteínas involucradas en la síntesis de la cadena externa, excepto *mnn1* Δ se seleccionaron. Nueve de ellas mostraron un fenotipo *ldb* severo, y dos de ellas moderado. En todos los casos, excepto *mnn4* Δ y *mnn6* Δ , el fenotipo *ldb* podría explicarse solo por la falta de secuenciasceptoras de los grupos manosil fosfato en la cadena externa. Además, se ha propuesto que las enzimas involucradas en la construcción de la pared celular interaccionan con las rutas de transducción de señales de manera que la carencia de uno de los componentes podría inducir un mecanismo de compensación y modificar la síntesis de otros (Ram *et al.*, 1998). En este contexto, encontramos que el mutante *mnn2/ldb8* mostró una reducción inesperada de la fosforilación del núcleo interno, sugiriendo que el defecto en la proteína Mnn2p y la asociada carencia de secuenciasceptoras de manosilfosfato podría ser detectada y transmitida por rutas de transducción de señales, resultando en un descenso de la síntesis y/o actividad de las enzimas involucradas en las modificaciones posteriores de estructuras sintetizadas por Mnn2p (Olivero *et al.*, 2000). Tal efecto podría darse también para otros productos

génicos implicados en la construcción de la pared celular.

Dos cepas más con un fenotipo *ldb* severo (*cax4Δ*) y moderado (*gda1Δ*) se incluyeron en esta categoría. *CAX4* codifica una Dol-PP fosfatasa localizada en la cara luminal de la membrana del RE, implicada en la reutilización del dolicol para rondas adicionales de biosíntesis del intermediario lipídico. El Dol-PP debe ser hidrolizado a Dol-P + Pi después de su liberación cuando OST transfiere el Glc₃Man₉NAcGlc a residuos de Asn en la proteína naciente (Fernandez *et al.*, 2001). La disminución de la disponibilidad de dolicol conduce a una reducción del sustrato de la OST unido a dolicol, y la consecuente ineficiencia en la *N*-glicosilación de proteínas (van Berkel *et al.*, 1999). Esto puede ser una explicación razonable del severo fenotipo *ldb* de la cepa *cax4Δ*. Finalmente Gda1p es una guanidin difosfatasa localizada en el lumen del aparato de Golgi. La enzima convierte GDP a GMP, que sale del lumen de Golgi en una reacción *antiporter* permitiendo la entrada de GDP-Man adicional del citosol para ser utilizada en la glicosilación de proteínas (Abeijon *et al.*, 1993). Se ha demostrado que mutantes defectivos en ese gen exhiben un bloqueo parcial en la *O*- y *N*-glicosilación de proteínas, que podría explicar el fenotipo *ldb*.

La obtención de la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae* ha permitido la definición de la familia completa de la manosiltransferasa *KRE2/MNT1* (Lussier *et al.*, 1997b). Actualmente incluye *KRE2*, *YUR1*, *KTR1*, *KTR2*, *KTR3*, *KTR4*, *KTR5*, *KTR6* (*MNN6*), y *KTR7*. En todos ellos se ha predicho que son proteínas de membrana localizadas en Golgi, pero aun no se ha hecho una caracterización exhaustiva funcional para algunos miembros (Lussier *et al.*, 1999). El primer miembro de esta familia (*KRE2/MNT1*) se identificó como codificante de una $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa involucrada en la síntesis de *O*-oligosacáridos (Hausler *et al.*, 1992). Análisis posteriores revelaron que *KRE2*, *YUR1*, *KTR1*, *KTR2*, *KTR3* y *KTR6* (*MNN6*) participan en la síntesis de *O*- y *N*-oligosacáridos (ver Figura II.2). Kre2p/Mnt1p, Ktr1p, y Ktr3p, tienen papeles superpuestos, y colectivamente añaden la mayoría de los segundos y terceros residuos de manosa unidos en $\alpha(1,2)$ en los *O*-oligosacáridos así como algunas de las manosas unidas en $\alpha(1,2)$ en las ramas de *N*-oligosacáridos (Lussier *et al.*, 1996; Lussier *et al.*, 1997a). Es interesante reseñar que, sólo *ktr6Δ* mostró un fenotipo *ldb*. *kre2Δ*, *zur1Δ*, *ktr1Δ*, *ktr2Δ*, *ktr3Δ*, *ktr4Δ*, *ktr5Δ*, y *ktr7Δ* mostraron un comportamiento de unión la

colorante indistinguible del silvestre. Este resultado contrasta con el fenotipo *ldb* severo mostrado por *mnn2Δ* y *mnn5Δ*, lo que confirma que las $\alpha(1,2)$ manosiltransferasas codificadas por *MNN2* y *MNN5* son las principales responsables de la síntesis de las ramificaciones de la cadena externa en los *N*-oligosacáridos de las manoproteínas de la pared celular. *MNN2* y *MNN5* compensan la carencia de cualquiera de los genes *KTR* codificantes de $\alpha(1,2)$ manosiltransferasas, pero en cambio, la ausencia de cualquiera de los dos no se compensa por los productos de los genes *KTR*. Con respecto a los *O*-oligosacáridos, ninguna de las cepas delecionadas en genes involucrados en la *O*-glicosilación mostró un fenotipo *ldb*. Se ha propuesto que la mayoría de las etapas biosintéticas son catalizadas por enzimas redundantes (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). El mutante sencillo *pmt1Δ*, presenta una reducción del 50% de los *O*-oligosacáridos, pero su afinidad por el azul alcian no se vio afectada. Los resultados sugieren que los grupos manosilfosfato unidos a los *O*-oligosacáridos representan una muy pequeña proporción del contenido total de manoproteínas o están enmascaradas por las mucho más largas cadenas de *N*-oligosacáridos. Esta conclusión está apoyada por los resultados de Nakayama *et al.* (1998).

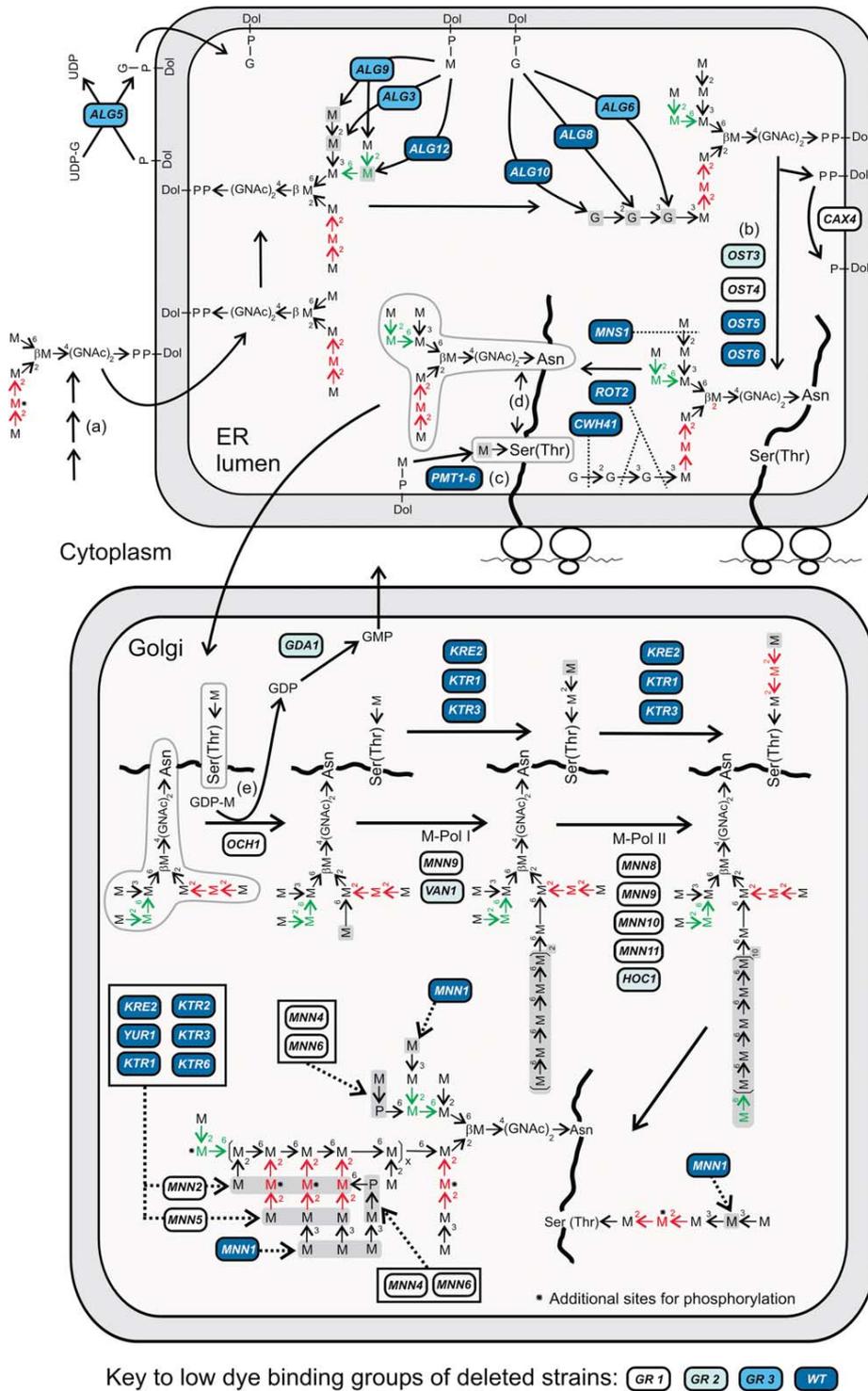


Figura II.2 Ruta esquemática de la biosíntesis de N- y O-oligosacáridos en *S. cerevisiae*. Están indicados los genes no esenciales bien conocidos y relevantes implicados en la ruta. El color de las etiquetas con los nombres de los genes imita el color con que tiñe el azul alcian a las correspondientes cepas delecionadas. Las secuencias aceptoras de manosilfosfato se muestran en rojo y verde. (a) La síntesis de M5-NacGlc2-PP-Dol tiene lugar en la cara citoplasmática de la membrana del RE con la acción secuencial de los productos génicos de *ALG7*, *ALG1*, *ALG2*, y *ALG11*. Los primeros 3 son esenciales y *alg11Δ* no está en esta colección de cepas delecionadas. (b) Las 5 subunidades adicionales de OST están codificadas por genes esenciales: *OST1*, *OST2*, *STT3*, *SWP1*, y *WBP1*. (c) *pmt4Δ* no está representada en la colección de mutantes delecionados. (d) Las estructuras finales sintetizadas en el RE son posteriormente modificadas en el Golgi. (e) La GDP-Manosa se sintetiza en el citoplasma y entra en las cisternas del Golgi donde actúa como donador de manosa en las reacciones de glicosilación.

Los datos obtenidos con los genes incluidos en esta categoría funcional claramente indican que los grupos manosilfosfato localizados en el exterior de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos son los principales responsables, sino los únicos, de la carga negativa de la superficie de la célula en el silvestre, y consecuentemente del fenotipo *ldb* cuando están total o parcialmente ausentes. Esto hace de la síntesis y el procesamiento de *N*-oligosacáridos, la vía central que controla la expresión del fenotipo de baja unión a colorante (ver Figura II.2), y conduce a la predicción de que la delección de cualquier otro gen que interaccione con esta vía podría dar lugar a una cepa defectiva en manosilfosfato.

Las cepas carentes de sitios de fosforilación en la cadena externa, como *och1Δ*, *mnn9Δ*, o *mnn2Δ*, muestran un fenotipo *ldb* severo. Es sólo en estos tres casos donde los grupos fosfato en el núcleo interno de los *N*-oligosacáridos y/o en los *O*-oligosacáridos podrían determinar la débil afinidad por el azul alcian mostrada por dichas cepas.

En la siguiente tabla (Tabla II.2) se incluyen un reducido número de genes implicados en la organización de la pared celular, cuyo efecto sobre el fenotipo *ldb* debe ser indirecto y motivado precisamente por la desorganización parcial de la pared.

Tabla II.2

Genes relacionados con la organización de la pared celular cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBR078W	<i>ECM33</i>	Involucrado la organización y biogénesis de la pared celular	2	R1
YDR293C	<i>SSD1</i>	Proteína de unión a ARN	3	WT
YDR077W	<i>SED1</i>	Posible glicoproteína de la superficie celular	3	WT
YMR307W	<i>GAS1</i>	Glicoproteína de la superficie celular con actividad α -1,3-glucanosil transferasa	2	WT
YPR159W	<i>KRE6</i>	Posible β -Glucán sintetasa	2	WT
YNL322C	<i>KRE1</i>	Componente estructural de la pared celular	3	WT

a Ver Fig. II.1

2.2. Acidificación de la vacuola

Dieciséis genes que codifican subunidades de la protón ATPasa de la membrana vacuolar (V-ATPasa), o polipéptidos implicados en su ensamblaje, mostraron un fenotipo *ldb* (Tabla II.3). Estos resultados se comentan en el Capítulo III.

Tabla II.3

Genes relacionados con la acidificación de la vacuola cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBR127C	<i>VMA2</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad B	2	WT
YCL005W-A	<i>VMA9/LDB10</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad e	2	R1
YDL185W	<i>TFP1/VMA1</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad A	2	WT
YEL027W	<i>CUP5/VMA3</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad c	2	R1
YEL051W	<i>VMA8</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad D	3	WT
YGR020C	<i>VMA7</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad F	2	WT
YGR105W	<i>VMA21</i>	Requerido para la biogénesis de una ATPasa vacuolar funcional	3	WT
YHR026W	<i>PPA1/VMA16</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad c	3	R1
YHR039C-A	<i>VMA10</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad G	2	WT
YHR060W	<i>VMA22</i>	Requerido para la biogénesis de una ATPasa vacuolar funcional	2	WT
YKL080W	<i>VMA5</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad C	2	WT
YKL119C	<i>VPH2/VMA12</i>	Requerido para la biogénesis de una ATPasa vacuolar funcional	2	R2
YLR447C	<i>VMA6</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad d	3	WT
YOR332W	<i>VMA4</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad E	2	WT
YPL234C	<i>TFP3/VMA11</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad c	3	WT
YPR036W	<i>VMA13/CLS11</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad H	3	R1

^a Ver Fig. II.1

2.3. Localización vacuolar / Otros relacionados con la vacuola

Incluimos en esta categoría 21 cepas delecionadas, la mayoría de ellas afectadas en transporte intracelular de proteínas a la vacuola (ver Tabla II.4). Podrían haberse incluido en la sección de la familia de transporte-secreción (ver Tabla II.5). Sin embargo, debido a la especial relevancia que parece tener la función vacuolar en la manosi-fosforilación, los hemos considerado en un grupo aparte.

El transporte de proteínas vacuolares recién sintetizadas a la vacuola tiene lugar por medio de dos vías diferentes en *S. cerevisiae*. La vía de la carboxipeptidasa Y (CPY) transporta proteínas de las vesículas finales del Golgi a la vacuola a través de un compartimento prevacuolar (PVC) (Conibear y Stevens, 1998; Mullins y Bonifacino, 2001), mientras que la vía de la fosfatasa alcalina (ALP) usa vesículas de Golgi diferentes y evita el PVC (Cowles *et al.*, 1997; Rehling *et al.*, 1999). Los genes que determinan la selección de proteínas vacuolares (*VPS*) han sido detectados en diferentes *screenings*, siendo el último el realizado por Bonangelino *et al.* (2002). En este trabajo fueron identificados más de 50 genes *VPS* involucrados en la selección de proteínas vacuolares, y algunos más, implicados en el mismo proceso, a los que previamente se les habían asignado diferentes nombres ya que habían sido implicados en otros procesos celulares.

Tabla II.4

Genes relacionados con el transporte a la vacuola cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBR097W	<i>VPS15</i>	Serín/treonín proteín quinasa involucrada en la retención en Golgi/transporte a la vacuola	2	R4
YCR044C	<i>PER1/COS16</i>	Proteína de membrana vacuolar involucrada en la homeostasis de Mn ²⁺	2	WT
YDR027C	<i>VPS54</i>	Requerida para la integridad del citoesqueleto de actina	3	WT
YDR080W	<i>VPS41</i>	Involucrado en la organización y biogénesis de la vacuola	3	WT
YDR200C	<i>VPS64</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola	3	WT
YDR264C	<i>AKR1</i>	Palmitoiltransferasa involucrada en endocitosis	2	WT
YDR372C	<i>VPS74</i>	Involucrado in el transporte de proteínas a la vacuola	1	R3
YDR495C	<i>VPS3</i>	Involucrado in el transporte de proteínas a la vacuola	2	R4
YGL095C	<i>VPS45</i>	Proteína de la familia Sec1p esencial para el transporte de proteínas a la vacuola	3	R2
YJR001W	<i>AVT1</i>	Transporte de aminoácidos neutros a la vacuola	3	WT
YKL041W	<i>VPS24</i>	Involucrado en el transporte del endosoma tardío a la vacuola	2	WT
YLR240W	<i>VPS34</i>	3-Fosfatidilinositolquinasa	3	R4
YLR261C	<i>VPS63</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola	3	WT
YLR322W	<i>VPS65</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola	3	R2
YLR396C	<i>VPS33</i>	Transporte del endosoma tardío a la vacuola	3	R2
YNL059C	<i>ARP5</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola. Parte de la ruta de la Carboxipeptidasa Y	3	WT
YNL297C	<i>MON2</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola	3	R4
YOR036W	<i>PEP12/VPS6</i>	Actividad <i>T-snare</i> involucrada en transporte de Golgi a vacuola	3	R4
YPL045W	<i>VPS16</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola (endosoma a vacuola)	2	R4
YPR087W	<i>VPS69</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola	2	WT
YPR139C	<i>VPS66</i>	Involucrado en el transporte de proteínas a la vacuola	2	WT

a Ver Fig. II.1

En nuestra búsqueda, seleccionamos cepas delecionadas en 16 genes *VPS*. Sólo *vps74Δ* mostró un fenotipo *ldb* severo. Recientemente se han publicado dos trabajos en relación con la función de *VPS74* (Schmitz *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008) que podrían explicar la severa reducción en la afinidad por el colorante azul alcian (ver Capítulo IV). Los restantes mutantes *vpsΔ* exhiben fenotipos *ldb* moderados (6 cepas) o débiles (9 cepas). La función de los productos génicos es diversa, incluyendo una serín/treonín quinasa (Vps15p), una fosfatidil-inositol 3 quinasa (Vps34p), un miembro de la familia de la Sec61p (Vps45p), un miembro del complejo de *tethering* del Golgi (Vps54p), y algunos otros de función desconocida. Adicionalmente encontramos 6 cepas no designadas como *VPS*: *arp5Δ*, *per1Δ*, *mon2Δ*, *akr1Δ*, y *kcs1Δ*. Arp5p es una proteína relacionada con la actina que participa en la vía de la CPY hacia la vacuola (Bonangelino *et al.*, 2002). *PER1* codifica una proteína de membrana de la vacuola que parece estar relacionada con la homeostasis de Mn²⁺ (Paidhungat y Garrett, 1998). Mon2p funciona en la endocitosis y el mantenimiento de la integridad de la vacuola (Jochum *et al.*,

2002) y *AKR1* se requiere también para la endocitosis (Feng y Davis, 2000). Finalmente, *AVT1* es necesario para la captación vacuolar de grandes aminoácidos neutros (Russnak *et al.*, 2001) y *KCS1* codifica una inositol polifosfato quinasa que es esencial para la biogénesis de la vacuola de la levadura y las respuestas celulares a ciertos estreses ambientales (Dubois *et al.*, 2002). Aunque la conexión precisa entre el papel de todos los productos de estos genes y el fenotipo *ldb* es difícil de establecer, defectos ligeros en la función vacuolar debidos al transporte deficiente de moléculas importantes como proteínas, iones o aminoácidos, podría contar para el fenotipo *ldb* (ver sección previa). Por otra parte, teniendo en cuenta el intercambio continuo y en ambos sentidos, que se produce entre la vacuola y el Golgi cualquiera de los factores vacuolares pueden afectar a procesos que se llevan a cabo en Golgi, como la manosi fosforilación de las manoproteínas (ver Capítulos III y IV).

Los genes listados en las Tablas II.3 y II.4 suman un total de 37 (18.5% de los genes identificados en esta búsqueda) que están claramente relacionados con la función vacuolar. Además, en algunas de las cepas listadas en las Tablas II.5 y II.6 podría estar afectada también la función vacuolar. Estos resultados parecen sugerir que la función vacuolar, especialmente la acidificación, parece jugar un papel importante en la transferencia de grupos manosi fosfato a los *N*-oligosacáridos (ver Capítulo III).

2.4. Secreción, transporte, y organización de actina/citoesqueleto

Está bien documentado que la glicosilación de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar por la acción secuencial de enzimas estratégicamente situadas en diferentes compartimentos subcelulares a lo largo de la ruta secretora. De esta manera, cualquier defecto en el mecanismo de transporte de las proteínas glicosiladas o de las enzimas glicosidasas a lo largo de la ruta secretora podría afectar a la transferencia de manosi fosfato en sí misma, la síntesis de las secuenciasceptoras apropiadas para esos grupos, o la construcción general de la cadena externa. Cualquiera de estas situaciones podría dar lugar a un fenotipo *ldb* detectable. Realmente, la delección de los 14 genes listados en la Tabla II.5 da lugar a la hipoglicosilación de la invertasa secretada. La reducción de la longitud de los *N*-

oligosacáridos podría ser razón suficiente para explicar la reducción en el contenido de manosil fosfato. De especial interés son los mutantes *ldb2Δ* y *chc1Δ* que muestran un fenotipo *ldb* severo mientras que mantienen una invertasa aparentemente de tamaño silvestre (*ldb2Δ*) o ligeramente reducida (*chc1Δ*). El gen *ERD1/LDB2* codifica una proteína implicada en la retención de proteínas del RE, y su posible papel en la manosilfosforilación ha sido discutido anteriormente en el Capítulo I (Corbacho *et al.*, 2004). *CHC1* codifica la cadena pesada de clatrina implicada en el transporte mediado por vesículas. Los mutantes defectivos mostraron diferentes fenotipos, incluyendo localización errónea de proteínas del *late*-Golgi y un transporte de proteínas vacuolares retrasado que también podría influir en la transferencia de manosilfosfato.

También el complejo oligomérico conservado de Golgi (COG), un complejo de 8 componentes implicado en el transporte *intra*-Golgi (Whyte y Munro, 2001), parece tener cierta relevancia en la transferencia de manosilfosfato ya que los 5 genes no esenciales representados en esta colección fueron seleccionados en este estudio.

Tabla II.5

Genes relacionados con la secreción-transporte de proteínas cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBL047C	<i>EDE1/BUD15</i>	Proteína de dominio EH involucrada en endocitosis	3	R1
YBR171W	<i>SEC66</i>	Subunidad del complejo Sec63	2	R1
YDR159W	<i>SAC3</i>	Componente del poro nuclear involucrado en la exportación nuclear de ARNm y proteínas	2	WT
YDR414C	<i>ERD1/LDB2</i>	Involucrado en la retención de proteínas del RE	1	WT
YEL031W	<i>SPF1</i>	ATPasa tipo P de membrana de RE	3	R2
YER122C	<i>GLO3</i>	Activador de ARF GTPasa de Golgi	2	R4
YER151C	<i>UBP3</i>	Proteasa específica de ubiquitina	2	R4
YGL167C	<i>PMR1/LDB1</i>	Ca ²⁺ /Mn ²⁺ ATPasa de Golgi	1	R3
YGL206C	<i>CHC1</i>	Cadena pesada de clatrina	1	R1
YGL223C	<i>COG1/COD3/LDB11</i>	Subunidad del complejo de transporte de Golgi	1	R3
YGL005C	<i>COG7/COD5</i>	Subunidad del complejo de transporte de Golgi	2	WT
YGL054C	<i>ERV14</i>	Proteína de 14 kDa de vesículas derivadas del RE	3	R2
YKL179C	<i>COY1</i>	Proteína de membrana de Golgi	3	WT
YLR262C	<i>YPT6</i>	GTPasa de Golgi	3	WT
YML071C	<i>COG8/DOR1</i>	Subunidad del complejo de transporte de Golgi	2	R4
YMR091C	<i>NPL6</i>	Papel en la importación nuclear de proteínas	3	R4
YNL041C	<i>COG6/COD2</i>	Subunidad del complejo de transporte de Golgi	2	WT
YNL051W	<i>COG5/COD4</i>	Subunidad del complejo de transporte de Golgi	2	WT
YNL084C	<i>END3</i>	Proteína de dominio EH involucrada en endocitosis	3	R2
YNR051C	<i>BRE5</i>	Involucrado en la deubiquitinación de proteínas	2	R1
YOR216C	<i>RUD3</i>	Involucrado en la deubiquitinación de proteínas	2	R3

a Ver Fig. II.1

Tabla II.6

Genes relacionados con la organización del citoesqueleto de actina cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YAL047C	<i>SPC72/LDB4</i>	Constituyente estructural del esqueleto (placa externa del cuerpo polar del huso)	2	R2
YNL225C	<i>CNM6 7</i>	Constituyente estructural del esqueleto (placa externa del cuerpo polar del huso)	3	WT
YCR002C	<i>CDC10</i>	Constituyente estructural del esqueleto (anillo de septina)	1	WT
YDL225W	<i>SHS1</i>	Constituyente estructural del esqueleto (anillo de septina)	3	WT
YMR294W	<i>JNM1</i>	Constituyente estructural del esqueleto	3	WT
YNL243W	<i>SLA2</i>	Constituyente estructural del esqueleto (parche de actina—endocitosis)	1	WT
YLR370C	<i>ARC18</i>	Constituyente estructural del esqueleto (subunidad del complejo Arp2/3)	2	WT
YBL007C	<i>SLA1</i>	Proteína de unión a proteínas del citoesqueleto (ensamblaje del parche cortical de actina-endocitosis)	2	R2
YCR009C	<i>RVS161</i>	Proteína de unión a proteínas del citoesqueleto (parche cortical/cable de actina—endocitosis)	2	R1
YDR129C	<i>SAC6</i>	Proteína de unión a filamentos de actina (parche cortical de actina-endocitosis)	2	R1
YDR150W	<i>NUM1</i>	Proteína de unión a tubulina (migración del núcleo)	3	WT
YGR078C	<i>PAC10</i>	Polipéptido de unión a tubulina	3	WT
YLR337C	<i>VRP1</i>	Proteína de unión a actina—organización del citoesqueleto (parche cortical de actina—endocitosis)	2	R1
YML094W	<i>GIM5</i>	Une tubulina y participa en el plegamiento de la tubulina	3	WT
YMR032W	<i>HOF1</i>	Proteína de unión al citoesqueleto (anillo contráctil)	2	R1
YOR035C	<i>SHE4</i>	Proteína de unión a proteína requerida para la organización del citoesqueleto de actina (endocitosis)	3	R1
YPR141C	<i>KAR3</i>	Motor de microtúbulos en el cuerpo polar del huso. Funciones en mitosis y meiosis	3	WT
YJL179W	<i>PFD1</i>	Proteína con actividad chaperona involucrada en la organización de la actina	3	R1
YAL016W	<i>TPD3</i>	Proteínofosfatasa involucrada en la organización de la actina	2	WT
YDL047W	<i>SIT4</i>	Proteína de actividad serín/treonín fosfatasa	2	R1
YER155C	<i>BEM2</i>	Proteína activadora de GTPasa (GAP)	2	WT
YEL061C	<i>CIN8</i>	Involucrado in el ensamblaje del huso mitótico	3	WT

a Ver Fig. II.1

Con respecto a la estructura y función del citoesqueleto encontramos 22 genes que codifican componentes estructurales así como proteínas de unión al citoesqueleto cuya delección da lugar a un fenotipo *ldb* (Tabla II.6). Participan en diversos procesos como el transporte intracelular de orgánulos o vesículas o la correcta separación de las células madre e hija, entre otros. Las cepas delecionadas en genes relacionados con la tubulina (*num1Δ*, *pac10Δ*, o *gim5Δ*) mostraron un fenotipo *ldb* débil, mientras que la mayoría del resto, que son defectivos en actina, mostraron un fenotipo *ldb* moderado o incluso severo. Además, la mayoría de estas últimas también exhibían una reducción del tamaño de la invertasa, sugiriendo que defectos generales en la deposición del material de la pared celular, migración de vesículas, y/o organización de las cisternas de Golgi debido a un ensamblaje defectuoso de la actina, podría ser la razón del

fenotipo *ldb* que muestran esas cepas.

2.5. Transcripción y transducción de señales

El grupo de cepas incluidas en la sección de transcripción o en las secciones de quinasas/transducción de señales (Tablas II.7 y II.8) también muestran un fenotipo *ldb*, principalmente como un efecto indirecto de ligeras alteraciones en las vías metabólicas generales de la célula, aunque un defecto más específico en la transferencia de manosi fosfato no puede descartarse, sobre todo en algunas de las cepas que secretan invertasa de tipo silvestre.

Tabla II.7

Genes relacionados con la transcripción cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBR112C	<i>CYC8</i>	Correpressor general de la transcripción (actúa con Tup1p)	3	R4d
YCR084C	<i>TUP1</i>	Correpressor general de la transcripción (actúa con Cyc8p)	3	R2
YDL005C	<i>MED2</i>	Subunidad de la RNA polimerasa II holoenzima/mediador	2	WT
YDR138W	<i>HPR1</i>	Componente del complejo ARN polimerasa II	3	WT
YDR195W	<i>REF2</i>	Involucrado en la terminación de la transcripción del promotor de Pol II	2	WT
YDR310C	<i>SUM1</i>	Actividad represora transcripcional	3	WT
YER111C	<i>SWI4</i>	Factor de transcripción	3	WT
YGL025C	<i>PGD1</i>	Actividad mediadora de la transcripción de la ARN polimerasa II	2	WT
YGL070C	<i>RPB9</i>	Subunidad del núcleo de la ARN polimerasa II	3	R1
YHR041C	<i>SRB2</i>	Subunidad de la RNA polimerasa II holoenzima/mediador	3	WT
YHR167W	<i>THP2</i>	Involucrado en la elongación de la transcripción del promotor de la Pol II	3	R2
YIL154C	<i>IMP2'</i>	Factor de transcripción	3	WT
YJL127C	<i>SPT10</i>	Regulador transcripcional	3	WT
YJL140W	<i>RPB4</i>	Cuarta subunidad grande de la ARN polimerasa II	2	WT
YLR182W	<i>SWI6</i>	Factor de transcripción	1	WT
YNL025C	<i>SSN8</i>	Actividad de factor de transcripción de la ARN polimerasa II	3	R2
YNL139C	<i>RLR1/LDB5</i>	Proteína de unión a ácidos nucleicos involucrada en la elongación del promotor de la ARN polimerasa II	2	R2
YNR010W	<i>CSE2</i>	Actividad mediadora de la transcripción de la ARN polimerasa II	3	R1
YOL051W	<i>GAL11</i>	Actividad mediadora de la transcripción de la ARN polimerasa II	3	WT
YOL072W	<i>THP1</i>	Proteína de unión a proteína involucrada en la elongación del ARN del promotor de la Pol II	2	WT
YOL148C	<i>SPT20</i>	Factor de transcripción	3	WT
YPL086C	<i>ELP3</i>	Subunidad elongadora de la ARN polimerasa II	3	WT
YPL129W	<i>TAF14</i>	Subunidad pequeña del factor iniciador de la transcripción TFIIF	3	R4
YPL254W	<i>HFI1</i>	Factor de transcripción	2	WT
YPR072W	<i>NOT5</i>	Miembro del complejo NOT, regulador negativo global de la transcripción	2	WT

^a Ver Fig. II.1

La transcripción mediada por el complejo de la ARN polimerasa II es un proceso complicado que determina el nivel de expresión de todo el genoma. En consecuencia, cualquier defecto en la maquinaria general de transcripción, se puede esperar que afecte a la manosi fosforilación bien directamente o a través de una ruta relacionada.

Entre los genes cuya delección producía un fenotipo *ldb* hay genes implicados en la iniciación de la transcripción, elongación, y regulación negativa del proceso.

La fosforilación de las proteínas es el mecanismo más general de regulación reversible de los procesos biológicos en los organismos superiores. No es sorprendente, por tanto, que distintas proteín quinasa puedan estar implicadas en la manosilfosforilación de las manoproteínas de la pared celular. Como se ha sugerido anteriormente (Corbacho *et al.*, 2004), *PHO85* es especialmente interesante porque muestra un fenotipo *ldb* muy severo pero una invertasa de tamaño silvestre, lo que sugiere una interacción específica entre Pho85p y la maquinaria de transferencia de manosil fosfato. Por otro lado, *PHO85* podría representar un enlace entre la respuesta a estrés y la manosilfosforilación. De hecho, se ha sugerido anteriormente (Jigami y Odani, 1999) que la manosilfosforilación podría estar relacionada con la respuesta general a estrés, la cual está mediada por Pho85p.

Tabla II.8

Genes codificantes de proteín quinasa o relacionados con la transducción de señales cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YAL056W	<i>GPB2</i>	Proteína con actividad de transcripción de señales	3	WT
YDR017C	<i>KCS1</i>	Inositol polifosfato quinasa	2	WT
YDR226W	<i>ADK1</i>	Adenilato quinasa	2	R2
YDR477W	<i>SNF1</i>	Serín/treonín proteín quinasa	2	R3
YDR507C	<i>GIN4</i>	Serín/treonín proteín quinasa	2	WT
YDR173C	<i>ARG82</i>	Inositol/fosfatidilinositol quinasa	2	WT
YDR523C	<i>SPS1</i>	Serín/treonín proteín quinasa	3	R1
YGR092W	<i>DBF2</i>	Proteín quinasa	3	WT
YGR262C	<i>BUD32/LDB14</i>	Serín/treonín proteín quinasa	1	R1
YKL048C	<i>ELM1/LDB9</i>	Proteín quinasa	2	WT
YLR226W	<i>BUR2</i>	Proteín quinasa dependiente de ciclina, actividad reguladora intrínseca	3	R1
YLR362W	<i>STE11</i>	Involucrado en la ruta de señalización de la conjugación	3	WT
YLR423C	<i>ATG17</i>	Requerido para la activación de la proteín quinasa Apg1	3	WT
YLR425W	<i>TUS1</i>	Parte de la ruta de señalización de la integridad celular	3	WT
YNL298W	<i>CLA4</i>	Serín/treonín proteín quinasa	3	WT
YOL081W	<i>IRA2</i>	Proteína activadora de GTPasa	3	WT
YPL031C	<i>PHO85/LDB15</i>	Proteín quinasa dependiente de ciclina	1	WT

a Ver Fig. II.1

2.6. Metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos

De los genes incluidos en el metabolismo de proteínas tres están relacionados con la síntesis y los otros nueve con la degradación (Tabla II.9). Estos resultados

parecen unir el catabolismo de proteínas a la manosilfosforilación. Además, se ha visto que mutaciones en *KEX2* dan como resultado un fenotipo *vma*, y que consecuentemente Kex2p podría tener algún papel en la acidificación de la vacuola (Oluwatosin y Kane, 1998). Como se muestra en la Tabla II.3, la delección de cualquiera de los genes *VMA*, que codifican subunidades de la ATPasa vacuolar u otros polipéptidos que se requieran para el ensamblaje del complejo enzimático, dan como resultado un fenotipo *ldb*. En consecuencia, el defecto en la acidificación vacuolar en el mutante *kex2Δ* podría ser la razón del débil fenotipo *ldb* mostrado por esta cepa, y probablemente también en *mck7Δ*. *MCK7* se aisló como un supresor de la sensibilidad al frío de un mutante *kex2* (Komano y Fuller, 1995), lo que sugiere que esos dos genes podrían tener funciones solapadas in vivo.

Tabla II.9

Genes relacionados con la síntesis/degradación de proteínas cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YDL020C	<i>RPN4</i>	Involucrado en la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina	3	WT
YDR069C	<i>DOA4</i>	Proteasa específica de ubiquitina	3	R3
YDR144C	<i>MKC7</i>	Peptidasa de señal tipo aspártico	3	WT
YGL058W	<i>RAD6</i>	Enzima conjugante de ubiquitina	3	R1
YGL240W	<i>DOC1</i>	Involucrado en el catabolismo proteico dependiente de ubiquitina	3	WT
YIL052C	<i>RPL34B</i>	Componente estructural del ribosoma	3	WT
YJR090C	<i>GRR1</i>	Componente del complejo SCF ubiquitín–ligasa	3	R2
YKL054C	<i>DEF1</i>	Involucrado en el catabolismo proteico dependiente de ubiquitina	3	WT
YLR244C	<i>MAP1</i>	Aminopeptidasa de metionina	2	R3
YMR116C	<i>ASC1</i>	Proteína tipo G que interacciona con la maquinaria de traducción	2	WT
YNL238W	<i>KEX2</i>	Serín proteasa dependiente de Ca ²⁺	3	R1
YPR163C	<i>TIF3</i>	Factor iniciador de la traducción eIF-4B	2	WT

a Ver Fig. II.1

Con respecto a las síntesis/modificación de ácidos nucleicos, los resultados mostrados en la Tabla II.10 sugieren que los genes no esenciales implicados en este proceso no parecen ser muy relevantes para la manosil fosforilación puesto que en la mayor parte de los casos el fenotipo *ldb* es débil.

Tabla II.10

Genes relacionados con la síntesis/modificación de ácidos nucleicos cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YCR020W-B	<i>HTL1</i>	Interacciona con RSC	2	R1
YDR364C	<i>CDC40</i>	Factor de procesamiento del Pre-ARNm	2	WT
YDR378C	<i>LSM6</i>	Factor de procesamiento del Pre-ARNm	3	R1
YER116C	<i>SLX8</i>	Posible papel en la resolución de intermediarios de recombinación durante la replicación del ADN	3	R1
YGL163C	<i>RAD54</i>	Involucrado en la reparación recombinatoria de roturas de doble cadena en el ADN	3	R1
YGR056W	<i>RSC1</i>	Miembro del complejo RSC, que remodela la estructura de la cromatina	3	WT
YHR191C	<i>CTF8</i>	Complejo del factor C de replicación del ADN	3	WT
YLR318W	<i>EST2</i>	Telomerasa transcriptasa inversa	3	WT
YLR320W	<i>MMS22</i>	Involucrado en reparaciones de rotura de doble cadena	3	WT
YMR125W	<i>STO1</i>	Involucrado en el procesamiento nuclear del ARNm, via espliceosoma	3	R1
YNL133C	<i>FYV6</i>	Involucrado en reparaciones de rotura de doble cadena	3	R1
YNL250W	<i>RAD50</i>	Involucrado en el procesamiento de roturas de doble cadena de ADN	3	WT

a Ver Fig. II.1

2.7. Miscelánea

Las funciones de los genes incluidos en esta sección son diversas (ver Tabla II.11). Sólo *hur1Δ*, y *ldb6Δ* mostraron un fenotipo *ldb* severo. YGL168W es una ORF pequeña que solapa con *PMR1/LDB1*. Se pensó que podría ser una ORF hipotética, pero ha sido verificada recientemente y se ha añadido a SGD como *HUR1*. En cualquier caso, el fenotipo *ldb* mostrado por *hur1Δ* se debe probablemente a un defecto en la ATPasa codificada por *PMR1/LDB1*. *LDB6* y *LDB7* han sido descritos previamente (Corbacho *et al.*, 2004), pero su función todavía se desconoce. Las restantes 20 cepas mostraron fenotipos moderados (10 cepas) y débiles (10 cepas).

También incluimos en este grupo una cepa delecionada que mostró un fenotipo *ldb* sólo en *MAT α*: *ict1Δ*. *ICT1* codifica un componente de un complejo de remodelación de la cromatina que se requiere para la expresión de los genes específicos del sexo *α* (Escribano y Mazón, 2000). Los fenotipos anormales mostrados por la cepa delecionada sólo se expresan en el *MAT α* (Escribano y Mazón, 2000; Ruiz *et al.*, 2003), y es el caso también del fenotipo *ldb*.

Tabla II.11

Genes de varias funciones (misceláneos) cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBL006C	<i>LDB7</i>	Desconocido	2	WT
YBL058W	<i>SHP1</i>	Regulador de la fosfoproteínfosfatasa 1	2	R4
YBR200W	<i>BEM1</i>	Proteína de unión a proteínas con dominio SH3	2	WT
YDL100C	<i>ARR4</i>	ATPasa, involucrada en la resistencia a estreses térmico y metálico	3	R4
YER014C-A	<i>BUD25</i>	Selección del sitio de gemación	3	WT
YGL020C	<i>MDM39</i>	Involucrado en la organización y biogénesis de la mitocondria	2	R4
YGL033W	<i>HOP2</i>	Específico de meiosis	3	R1
YGL084C	<i>GUP1</i>	Posible transportador de glicerol	2	R1
YGL168W	<i>HUR1</i>	Resistencia a hidroxiurea	1	R4
YHR050W	<i>SMF2</i>	Involucrado en el transporte del ion manganeso	2	WT
YIL097W	<i>FYV10</i>	Involucrado en la regulación negativa de la gluconeogénesis	3	WT
YJL062W	<i>LAS21</i>	Biosíntesis del anclaje GPI	2	WT
YJL080C	<i>SCP160</i>	Proteína de unión a ARN involucrada en la segregación de cromosomas/localización del ARNm	2	R1
YJL184W	<i>GON7/LDB6</i>	Desconocido	1	R1
YLR242C	<i>ARV1</i>	Proteína involucrada en la distribución de esteroides	2	R1
YLR369W	<i>SSQ1</i>	Chaperona mitocondrial de la familia HSP70	2	WT
YML062C	<i>MFT1</i>	Proteína de señalización a la mitocondria	3	WT
YNL064C	<i>YDJ1</i>	Esencial para la translocación post-traducciona de la proteína	2	WT
YNR027W	<i>BUD17</i>	Proteína involucrada en la selección del sitio de gemación	3	WT
YOR198C	<i>BFR1</i>	Involucrado en el metabolismo del ARNm, segregación de los cromosomas y quizás secreción	3	WT
YOR258W	<i>HNT3</i>	Miembro de la superfamilia HIT de proteínas de unión a nucleótidos	3	WT
YPL024W	<i>NCE4</i>	Involucrado en la separación celular	3	WT
YPL262W	<i>FUM1</i>	Fumarasa (fumarato hidrolasa)	3	WT
YGL133C	<i>ITC1</i>	Débil fenotipo <i>ldb</i> expresado solo en MAT. Requerida para la represión de genes específicos.	3	WT

a Ver Fig. II.1

2.8. ORF dudosas o no caracterizadas

Finalmente, en la Tabla II.12 están listados 17 genes que aparecen como dudosos o no caracterizados en SGD. Trece de ellos están delecionados en ORFs que aparecen como dudosas en SGD. De ellas, 12 mostraron un elevado grado de solapamiento con otras ORF bien caracterizadas (ver el sitio *web* de SGD) cuya delección produce un fenotipo *ldb* similar al mostrado por la correspondiente ORF dudosa. Estos resultados sugieren que el fenotipo *ldb* mostrado por la cepa delecionada en cada una de las ORF dudosas es el resultado de un defecto en el producto génico codificado por la ORF que solapa la dudosa. La única ORF que aparece como dudosa y no está solapada por ninguna otra, es YEL059W. Cabe resaltar que la cepa delecionada YEL059W Δ muestra diferente fenotipo en el MAT *a* y el MAT α . La cepa MAT α muestra un fenotipo *ldb* severo, y las células formaron grumos en cultivos viejos, mientras que la cepa MAT *a* se comporta como el silvestre con respecto a esas

características. El caso de YEL059W podría ser similar a *ICT1* que incluimos en la Tabla II.11, sin embargo, para demostrar que el fenotipo *ldb* era el resultado de la deleción de YEL059W y que el defecto estaba ligado al tipo sexual, llevamos a cabo un análisis de tétradas cruzando YEL059WΔ *MAT* α con el parental silvestre *MAT* a. Diseccionamos 60 tétradas y analizamos el tipo sexual, el fenotipo *ldb* y la resistencia a geneticina en cada componente de la tétrada. Hemos encontrado que las 3 características segregan independientemente unas de otras. Además, cuando cruzamos YEL059WΔ *MAT* a con el parental *MAT* α, ninguno de los segregantes mostró el fenotipo *ldb*. Los resultados indican que el fenotipo *ldb* mostrado por YEL059WΔ *MAT* α es un defecto extra en esta cepa en particular, no ligado con la deleción de YEL059W.

Cuatro ORFs más aparecen como no caracterizadas, y la correspondiente cepa delecionada mostró un fenotipo *ldb* débil. Proponemos los siguientes nombres para ellos: YCL005W, *LDB16*; YDL164W, *LDB17*; YLL049W, *LDB18*; e YOR322C, *LDB19*.

Tabla II.12

ORFs no caracterizadas y ORFs dudosas cuya deleción da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Solapa con	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño de la invertasa ^a	Nombre propuesto
YCL005W		Sin caracterizar		3	WT	<i>LDB16</i>
YBL083C		Dudosa	<i>RHK1/ALG3</i>	3	WT	
YBR113W		Dudosa	<i>CYC8</i>	3	R4	
YCL007C	<i>CWH36</i>	Dudosa	<i>VMA9/LDB10</i>	2	R1	
YDL146W		Sin caracterizar		3	WT	<i>LDB17</i>
YDR149C		Dudosa	<i>NUM1</i>	3	WT	
YDR199W		Dudosa	<i>VPS64</i>	3	WT	
YEL059W		Dudosa		1(α)	WT	
YGL024W		Dudosa	<i>PGD1</i>	2	WT	
YKL118W		Dudosa	<i>VPH2/VMA12</i>	2	R2	
YKL202W		Dudosa	<i>MNN4</i>	1	WT	
YLL049W		Sin caracterizar		3	WT	<i>LDB18</i>
YML095C-A		Dudosa	<i>GIM5</i>	3	WT	
YLR338W		Dudosa	<i>VRP1</i>	2	R1	
YNL296W		Dudosa	<i>MON2</i>	3	R4	
YOL050C		Dudosa	<i>GAL11</i>	3	WT	
YOR322C		Sin caracterizar		3	R1	<i>LDB19</i>

a Ver Fig. II.1

3. CONSIDERACIONES FINALES

La manosilfosforilación de los oligosacáridos unidos a manoproteínas confiere una carga negativa a la superficie de la célula de la levadura que se mantiene incluso a bajo pH. Aunque el significado fisiológico concreto del proceso no está totalmente establecido, los resultados que presentamos aportan nueva información sobre los genes, rutas bioquímicas, y procesos celulares implicados de alguna manera en la transferencia de grupos manosilfosfato. Consideramos que este estudio supone un paso importante en la caracterización de la ruta de transferencia de los grupos manosilfosfato en *S. cerevisiae*.

En un artículo publicado durante la realización de este trabajo (Conde *et al.*, 2003), realizaron un análisis de unión al colorante azul alcian en 622 cepas delecionadas de *S. cerevisiae* generadas durante el proyecto EUROFAN. Los resultados publicados discrepan fuertemente con los encontrados por nosotros principalmente en tres aspectos: (a) el % de genes seleccionados (8%) duplica los seleccionados por nosotros (4%); (b) algunos genes seleccionados por Conde y cols. no han aparecido en nuestro *screening* y viceversa; (c) en cepas seleccionadas en los dos estudios, la intensidad del fenotipo *ldb* no coincide en muchos casos. Desconocemos las razones de estas discrepancias pero suponemos que se deben al método utilizado en la tinción de las células con al azul alcian así como en la cuantificación del color de las células teñidas. Conde y cols. utilizaron un método que fue descrito por Ballou en 1990 para un reducido número de muestras y utilizado también por nosotros en trabajos anteriores (Ballou, 1990; Mañas *et al.*, 1997; Olivero *et al.*, 2000). En el estudio que se presenta aquí, hemos mejorado notablemente el método, adaptándolo al análisis de un gran número de muestras (ver Sección 6.5 de Materiales y Métodos) y hemos sustituido también la cuantificación visual directa de la intensidad del color del precipitado, por la digitalización de las imágenes y análisis en la pantalla del ordenador. A esta mejora del método hemos de añadir que todas las tinciones se han realizado por cuadruplicado; las cepas seleccionadas se han teñido al menos dos veces más y, cuando se detectaba alguna discrepancia entre los diferentes análisis, se pedía de nuevo la cepa a EUROSCARF y se repetían las tinciones. En consecuencia, pensamos que nuestros resultados están suficientemente comprobados y aparecen resumidos en

la Figura II.3.

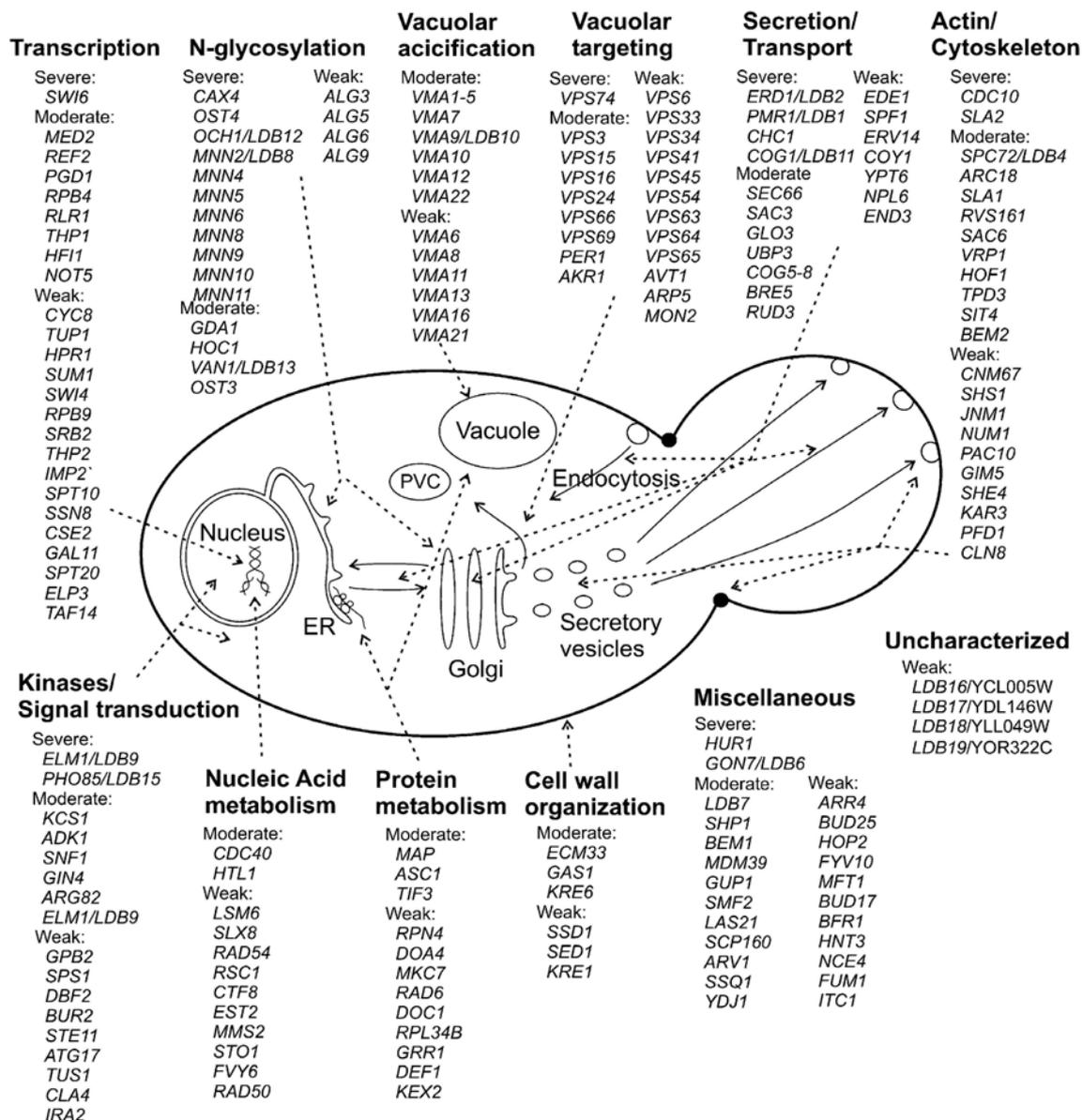


Figura II.3 Esquema de los genes no esenciales de *S. cerevisiae* identificados en este estudio, cuya delección produce la reducción en de la manosilfosforilación de los *N*-oligosacáridos. Hemos adoptado el esquema de Ni y Snyder (2001). Los genes se separan en familias funcionales (ver texto). Las flechas punteadas señalan la localización de los principales procesos modulados por los productos de los genes indicados.

Para concluir este capítulo, enumeramos a continuación las aportaciones, a nuestro juicio, más interesantes extraídas de los resultados expuestos.

Siete cepas: *mnn4Δ*, *mnn6Δ*, *ldb2Δ*, *cdc10Δ*, *sla2Δ*, *swi6Δ*, y *pho85Δ* mostraron un fenotipo *ldb* severo sin que estuvieran afectadas en la elongación de la cadena

externa, lo que sugiere que están afectadas específicamente en la manosilfosforilación. Dado que sólo *MNN6* codifica una enzima con actividad manosilfosfato transferasa los productos génicos de los otros seis deben interactuar, de forma indirecta con la maquinaria de manosilfosforilación. Otras cepas que mostraron fenotipos *ldb* débiles o moderados y tampoco parecían afectados en el tamaño de la invertasa, también pueden estar en la misma situación que los anteriores. Sin embargo, en estos casos, los resultados deben tomarse con cautela puesto que una ligera disminución de tamaño en la invertasa secretada podría no hacerse evidente, por limitaciones en la sensibilidad del método utilizado.

Además, se han seleccionado cuatro ORFs no caracterizadas asignándosele un nombre *LDB* a cada una de ellas, que ha sido incorporado como nombre estándar en SGD. Inicialmente, YEL059W fue seleccionado como una ORF cuya delección provoca un fenotipo *ldb* severo solo en la cepa *MAT α* , sin embargo, un análisis de tétradas demostró que esta cepa particular tiene un defecto adicional responsable del fenotipo, que segregó independientemente del gen delecionado.

Los grupos manosilfosfato localizados en la cadena externa de los *N*-oligosacáridos son las principales, sino las únicas, moléculas responsables de las propiedades iónicas de la superficie celular a pHs ácidos. El gran tamaño y la localización superficial de la cadena externa, es muy probablemente la razón de su dominancia sobre el núcleo interno y los *O*-oligosacáridos.

De los resultados mostrados en la Tabla II.1 podemos concluir que la contribución de la familia de genes de la manosiltransferasa *KRE2/MNT1* a la ramificación de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos es indetectable en ausencia de *MNN2* o *MNN5*.

Otra conclusión novedosa de este trabajo es la, aparentemente, estrecha relación entre la función vacuolar y la transferencia de manosilfosfato, como apunta el hecho de que la delección de todos los genes que codifican alguna de las subunidades de la ATPasa vacuolar, o proteínas implicadas en su ensamblaje, dieron como resultado un fenotipo *ldb* (Tabla II.3) (ver discusión detallada en el Capítulo III). Además, otros

genes que afectan a la acidificación vacuolar también fueron seleccionados (Tablas II.4 y II.5).

Los resultados presentados en este capítulo han sido objeto de una publicación (Corbacho *et al.*, 2005).

4. BIBLIOGRAFÍA

- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E. C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C. B. and Robbins, P. W. (1993). "Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Cell Biol.* **122**(2): 307-323.
- Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H. and Heesen, S. t. (1996). "Cloning and characterization of the *ALG3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Glycobiology* **6**(4): 439-444.
- Aravind, L. and Koonin, E. (1999). "The fukutin protein family-predicted enzymes modifying cell-surface molecules." *Curr. Biol.* **9**: R836-R837.
- Ballou, C. E. (1990). "Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects." *Methods Enzymol.* **185**: 445-470.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. and Bonifacino, J. S. (2002). "Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **13**(7): 2486-2501.
- Burda, P. and Aebi, M. (1998). "The *ALG10* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the α -1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient *N*-linked glycosylation." *Glycobiology* **8**(5): 455-462.
- Burda, P., te Heesen, S., Brachat, A., Wach, A., Dusterhoft, A. and Aebi, M. (1996). "Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the *ALG9* gene encoding a putative mannosyl transferase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(14): 7160-7165.
- Cipollo, J. F. and Trimble, R. B. (2000). "The accumulation of Man6GlcNAc2-PP-dolichol in the *Saccharomyces cerevisiae Dalg9* mutant reveals a regulatory role for the Alg3p α 1,3-Man middle-arm addition in downstream oligosaccharide-lipid and glycoprotein glycan processing." *J. Biol. Chem.* **275**(6): 4267-4277.
- Cipollo, J. F. and Trimble, R. B. (2002). "The *Saccharomyces cerevisiae* Δ alg12 mutant reveals a role for the middle-arm α 1,2Man- and upper-arm α 1,2Man α 1,6Man- residues of Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol in regulating glycoprotein glycan processing in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus." *Glycobiology* **12**(11): 749-762.
- Conde, R., Pablo, G., Cueva, R. and Larriba, G. (2003). "Screening for new yeast mutants affected in mannosylphosphorylation of cell wall mannoproteins." *Yeast* **20**(14): 1189-1211.
- Conibear, E. and Stevens, T. H. (1998). "Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research* **1404**(1-2): 211-230.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2004). "Identification of low-dye-binding (*ldb*) mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res.* **4**(4-5): 437-444.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2005). "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides." *Fungal Genet. Biol.* **42**(9): 773-790.
- Cowles, C. R., Snyder, W. B., Burd, C. G. and Emr, S. D. (1997). "Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component." *EMBO J.* **16**: 2769-2782.
- Dubois, E., Scherens, B., Vierendeels, F., Ho, M. M. W., Messenguy, F. and Shears, S. B. (2002). "In *Saccharomyces cerevisiae*, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis." *J. Biol. Chem.* **277**(26): 23755-23763.
- Escribano, M. V. and Mazón, M. J. (2000). "Disruption of six novel ORFs from *Saccharomyces cerevisiae*

- chromosome VII and phenotypic analysis of the deletants." *Yeast* **16**(7): 621-630.
- Feng, Y. and Davis, N. G. (2000). "Akr1p and the Type I Casein Kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane." *Mol. Cell. Biol.* **20**(14): 5350-5359.
- Fernandez, F., Rush, J. S., Toke, D. A., Han, G.-s., Quinn, J. E., Carman, G. M., Choi, J.-Y., Voelker, D. R., Aebi, M. and Waechter, C. J. (2001). "The *CWH8* gene encodes a dolichyl pyrophosphate phosphatase with a lumenally oriented active site in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **276**(44): 41455-41464.
- Hausler, A., Ballou, L., Ballou, C. E. and Robbins, P. W. (1992). "Yeast glycoprotein biosynthesis: *MNT1* encodes an α -1,2-mannosyltransferase involved in *O*-glycosylation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(15): 6846-6850.
- Heesen, S. t., Lehle, L., Weissmann, A. and Aebi, M. (1994). "Isolation of the *ALG5* locus encoding the UDP-Glucose:Dolichyl-Phosphate Glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur. J. Biochem.* **224**(1): 71-79.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Gillece-Castro, B. L., Burlingame, A. L. and Ballou, C. E. (1989a). "A new *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutant *N*-linked oligosaccharide structure." *J. Biol. Chem.* **264**(20): 11849-11856.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P. K. and Ballou, C. E. (1989b). "Structure of the phosphorylated *N*-linked oligosaccharides from the *mnn9* and *mnn10* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13648-13659.
- Jigami, Y. and Odani, T. (1999). "Mannosylphosphate transfer to yeast mannan." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 335-345.
- Jochum, A., Jackson, D., Schwarz, H., Pipkorn, R. and Singer-Kruger, B. (2002). "Yeast Ysl2p, homologous to Sec7 domain guanine nucleotide exchange factors, functions in endocytosis and maintenance of vacuole integrity and interacts with the Arf-like small GTPase Arl1p." *Mol. Cell. Biol.* **22**(13): 4914-4928.
- Jungmann, J. and Munro, S. (1998). "Multi-protein complexes in the *cis* Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with α -1,6-mannosyltransferase activity." *EMBO J.* **17**(2): 423-434.
- Jungmann, J., Rayner, J. C. and Munro, S. (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex." *J. Biol. Chem.* **274**(10): 6579-6585.
- Karson, E. M. and Ballou, C. E. (1978). "Biosynthesis of yeast mannan. Properties of a mannosylphosphate transferase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **253**(18): 6484-6492.
- Kim, H., Yan, Q., von Heijne, G., Caputo, G. A. and Lennarz, W. J. (2003). "Determination of the membrane topology of Ost4p and its subunit interactions in the oligosaccharyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(13): 7460-7464.
- Knauer, R. and Lehle, L. (1999). "The Oligosaccharyltransferase Complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the *OST6* gene, its synthetic interaction with *OST3*, and analysis of the native complex." *J. Biol. Chem.* **274**(24): 17249-17256.
- Komano, H. and Fuller, R. S. (1995). "Shared functions in vivo of a glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in Yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(23): 10752-10756.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussereau, F., Jacquet, M. and Bussey, H. (1997a). "The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast *O*- and *N*-linked carbohydrate chains." *J. Biol. Chem.* **272**(24): 15527-15531.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M. and Bussey, H. (1999). "The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 323-334.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Camirand, A. and Bussey, H. (1996). "Functional characterization of the *YUR1*, *KTR1*, and *KTR2* genes as members of the yeast *KRE2/MNT1* mannosyltransferase gene family." *J. Biol. Chem.* **271**(18): 11001-11008.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Winnett, E., Vo, D. H., Sheraton, J., Düsterhöft, A., Storms, R. K. and Bussey, H. (1997b). "Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of *KTR5*, *KTR6* and *KTR7* and definition of the nine-membered *KRE2/MNT1* mannosyltransferase gene family in this organism." *Yeast* **13**(3): 267-274.
- Mañas, P., Olivero, I., Avalos, M. and Hernandez, L. M. (1997). "Isolation of new nonconditional *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in asparagine-linked glycosylation." *Glycobiology* **7**(4): 487-497.

- Mullins, C. and Bonifacino, J. S. (2001). "The molecular machinery for lysosome biogenesis." *Bioessays* **23**(4): 333-343.
- Munro, S. (2001). "What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus?" *FEBS Lett.* **498**(2-3): 223-227.
- Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K. I., Tanaka, A., Toda, Y. and Jigami, Y. (1993). "Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from *och1*, *och1 mnn1*, and *och1 mnn1 alg3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **268**(35): 26338-26345.
- Nakayama, K.-i., Feng, Y., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1998). "The involvement of *mnn4* and *mnn6* mutations in mannosylphosphorylation of O-linked oligosaccharide in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim. Biophys. Acta* **1425**(1): 255-262.
- Nakayama, K.-i., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. and Jigami, Y. (1992). "OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides." *EMBO J.* **11**(7): 2511-2519.
- Ni, L. and Snyder, M. (2001). "A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **12**(7): 2147-2170.
- Odani, T., Shimma, Y.-i., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1996). "Cloning and analysis of the *MNN4* gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*." *Glycobiology* **6**(8): 805-810.
- Olivero, I., Corbacho, I. and Hernández, L. M. (2001). "Isolation of new low dye binding (*ldb*) mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *6th Annual Conference of the Society for Glycobiology. Glycobiology* **11**: 911.
- Olivero, I., Mañas, P. and M. Hernández, L. (2000). "The *mnn2* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is affected in phosphorylation of N-linked oligosaccharides." *FEBS Lett.* **475**(2): 111-116.
- Oluwatosin, Y. E. and Kane, P. M. (1998). "Mutations in the Yeast KEX2 Gene Cause a Vma--Like Phenotype: a Possible Role for the Kex2 Endoprotease in Vacuolar Acidification." *Mol. Cell. Biol.* **18**(3): 1534-1543.
- Paidhungat, M. and Garrett, S. (1998). "Cdc1 and the vacuole coordinately regulate Mn²⁺ homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **148**(4): 1787-1798.
- Ram, A. F. J., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H. P., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H. and Klis, F. M. (1998). "Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta 1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity." *J. Bacteriol.* **180**(6): 1418-1424.
- Rayner, J. C. and Munro, S. (1998). "Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **273**(41): 26836-26843.
- Rehling, P., Darsow, T., Katzmann, D. J. and Emr, S. D. (1999). "Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function." *Nat. Cell Biol.* **1**(6): 346-353.
- Reiss, G., Heesen, S. t., Zimmerman, J., Robbins, P. and Aebi, M. (1996). "Isolation of the *ALG6* locus of *Saccharomyces cerevisiae* required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway." *Glycobiology* **6**(5): 493-498.
- Ruiz, C., Escribano, V., Morgado, E., Molina, M. and Mazon, M. J. (2003). "Cell-type-dependent repression of yeast a-specific genes requires Itc1p, a subunit of the Isw2p-Itc1p chromatin remodelling complex." *Microbiology* **149**(2): 341-351.
- Russnak, R., Konczal, D. and McIntire, S. L. (2001). "A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport." *J. Biol. Chem.* **276**(26): 23849-23857.
- Schmitz, K. R., Liu, J., Li, S., Setty, T. G., Wood, C. S., Burd, C. G. and Ferguson, K. M. (2008). "Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer." *Dev. Cell* **14**(4): 523-534.
- Stagljar, I., te Heesen, S. and Aebi, M. (1994). "New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the *ALG8* locus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(13): 5977-5981.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentsch, M. and Tanner, W. (1999). "Protein O-mannosylation." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 297-307.
- Tu, L., Tai, W. C. S., Chen, L. and Banfield, D. K. (2008). "Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi." *Science* **321**(5887): 404-407.
- van Berkel, M. A., Rieger, M., te Heesen, S., Ram, A. F., van den Ende, H., Aebi, M. and Klis, F. M. (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* *CWH8* gene is required for full levels of dolichol-linked

- oligosaccharides in the endoplasmic reticulum and for efficient *N*-glycosylation." *Glycobiology* **9**(3): 243-253.
- Wang, X.-H., Nakayama, K.-i., Shimma, Y.-i., Tanaka, A. and Jigami, Y. (1997). "*MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **272**(29): 18117-18124.
- Whyte, J. R. C. and Munro, S. (2001). "The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic." *Dev. Cell* **1**(4): 527-537.
- Yip, C. L., Welch, S. K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J. and MacKay, V. L. (1994). "Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *MNN9* and *MNN1* genes required for complex glycosylation of secreted proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(7): 2723-2727.

CAPÍTULO III

ALGUNAS FUNCIONES DEL APARATO DE GOLGI SON DEPENDIENTES DE LA V-ATPASA

1. INTRODUCCIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Genes relacionados con la acidificación de la vacuola cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*

2.2. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la manosilfosforilación de los N-oligosacáridos en Golgi

2.3. Efecto de la actividad V-ATPasa sobre la elongación de la cadena externa de los N-oligosacáridos en Golgi

2.4. Efecto de la actividad V-ATPasa sobre la adición de las manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$ a los N-oligosacáridos en Golgi

2.5. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la maduración del factor α en Golgi

2.6. Efecto del pH extracelular sobre los mutantes *vma*

3. CONSIDERACIONES SOBRE EL PAPEL DE LA V-ATPASA EN LA MANOSILFOSFORILACIÓN Y LA ELONGACIÓN DE LA CADENA EXTERNA DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS

4. REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

El pH de los compartimentos intracelulares de las células eucariotas es un parámetro cuidadosamente controlado que afecta a muchos procesos celulares (Nishi y Forgac, 2002). El control de este parámetro se lleva a cabo mediante una familia de H⁺ ATPasas que en *Saccharomyces cerevisiae* está representado por una H⁺ ATPasa descrita inicialmente en la membrana vacuolar (V-ATPasa). La V-ATPasa está constituida por un complejo multiproteico formado a su vez por dos subcomplejos denominados V₀ y V₁ (revisado por Graham *et al.*, 2000). Se han identificado ocho

genes que codifican subunidades del subcomplejo soluble V_1 responsable de la actividad de hidrólisis del ATP: *VMA1*, *VMA2*, *VMA4*, *VMA5*, *VMA7*, *VMA8*, *VMA10* y *VMA13*. Siete genes más codifican las subunidades del subcomplejo integral de membrana V_0 , responsable de la actividad de translocación de protones: *VPH1/STV1*, *VMA3*, *VMA6*, *VMA9*, *VMA11*, y *VMA16*. *VPH1* y *STV1* codifican polipéptidos homólogos que no están presentes simultáneamente en el complejo de la enzima. Finalmente, *VMA12*, *VMA21*, y *VMA22* codifican factores proteicos localizados en la membrana del RE que se requieren para el ensamblaje de nuevas subunidades de V-ATPasa pero que no forman parte del complejo final.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la V-ATPasa se localiza principalmente en la membrana de la vacuola aunque también se ha descrito que puede estar presente en otros compartimentos de la ruta secretora como el aparato de Golgi y en el endosoma (Manolson *et al.*, 1994; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001b). Se ha propuesto, además, que tiene un papel fundamental en el control de pH de la mayoría de los compartimentos intracelulares (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a; Perzov *et al.*, 2002). La H^+ ATPasa vacuolar (V-ATPasa) de *Saccharomyces cerevisiae*, así como las de otros eucariotas, se inhibe con alta especificidad con bafilomicina y concamicina, antibióticos macrólidos de estructuras similares (Bowman *et al.*, 1988; Muroi *et al.*, 1993; Bowman *et al.*, 2004).

En la búsqueda genómica a escala global de genes no esenciales relacionados con la manosilfosforilación de *N*-oligosacáridos (Capítulo II) (Corbacho *et al.*, 2005) encontramos que la delección de cualquiera de los genes que codifican subunidades de la V-ATPasa o bien polipéptidos relacionados con su ensamblaje daba como resultado un fenotipo *ldb*. Estos resultados sugieren una relación directa entre la actividad de la V-ATPasa y la transferencia de manosilfosfato en *S. cerevisiae*.

En este capítulo hemos estudiado la importancia que la actividad de la V-ATPasa tiene sobre la manosilfosforilación y otros procesos que se llevan a cabo en el aparato de Golgi. Para ello hemos abordado el tema de dos formas: por un lado, hemos usado cepas representativas de mutantes afectados en la V-ATPasa que exhiben fenotipo *ldb*: *vma2Δ* y *vma3Δ*; y por otro hemos inhibido la actividad de la V-

ATPasa, cultivando la cepa WT en presencia de bafilomicina.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Genes relacionados con la acidificación de la vacuola cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*

En la Tabla III.1 se muestran los mutantes delecionados en los genes relacionados con la V-ATPasa estudiados en el Capítulo II (Corbacho *et al.*, 2005). Todos estos genes, excepto *VPH1* y *STV1*, mostraron un fenotipo *ldb* (Fig. III.1). *Vph1p* y *Stv1p* son isoformas de la misma subunidad que no están presentes simultáneamente en la ATPasa completa (Manolson *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 2000), por lo que es razonable suponer que la falta de una de ellas sea funcionalmente reemplazada por la otra. Resultados similares habían sido descritos previamente en células creciendo en diferentes condiciones de pH. Perzov *et al.* (2002) encontraron que, mientras la interrupción de cualquier gen que codificase subunidades de la V-ATPasa producía una parada del crecimiento a pH 7,5, los mutantes *VPH1* o *STV1* pueden crecer a este pH sugiriendo que, en ausencia de cualquiera de ellos, aun podría ensamblarse una V-ATPasa funcional.

Es interesante resaltar que en un trabajo previo (Corbacho *et al.*, 2004) publicamos que *LDB10* era alélico a *YCL007C/CWH36*. Sin embargo *YCL005W-A* se añadió recientemente a SGD como una ORF verificada que solapa un 87% con *YCL007C*, que en consecuencia pasa a ser una ORF dudosa. Posteriormente se publicó que *YCL005W-A* codifica una nueva subunidad del complejo de la V-ATPasa, que se llamó *VMA9* (Davis-Kaplan *et al.*, 2004). En consecuencia, *LDB10* se incluyó en SGD como un alias de *YCL005W-A/VMA9*. Los resultados en este apartado indican que la manosilfosforilación es dependiente de la actividad de la V-ATPasa.

Tabla III.1 Genes relacionados con la acidificación de la vacuola cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*.

ORF	Nombre del gen	Descripción breve	Grupo <i>ldb</i>	Tamaño invertasa ^a
YBR127C	<i>VMA2</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad B	2	WT
YCL005W-A	<i>VMA9/LDB10</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad e	2	R1
YDL185W	<i>TFP1/VMA1</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad A	2	WT
YEL027W	<i>CUP5/VMA3</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad c	2	R1
YEL051W	<i>VMA8</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad D	3	WT
YGR020C	<i>VMA7</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad F	2	WT
YGR105W	<i>VMA21</i>	Requerido para la biogénesis de una ATPasa vacuolar funcional	3	WT
YHR026W	<i>PPA1/VMA16</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad c	3	R1
YHR039C-A	<i>VMA10</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad G	2	WT
YHR060W	<i>VMA22</i>	Requerido para la biogénesis de una ATPasa vacuolar funcional	2	WT
YKL080W	<i>VMA5</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad C	2	WT
YKL119C	<i>VPH2/VMA12</i>	Requerido para la biogénesis de una ATPasa vacuolar funcional	2	R2
YLR447C	<i>VMA6</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad d	3	WT
YOR332W	<i>VMA4</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad E	2	WT
YPL234C	<i>TFP3/VMA11</i>	ATPasa vacuolar dominio V0 Subunidad c	3	WT
YPR036W	<i>VMA13/CLS11</i>	ATPasa vacuolar dominio V1 Subunidad H	3	R1

a Ver Fig. II.2 (Capítulo II) y Fig. III.1

Se ha propuesto que la V-ATPasa tiene un papel fundamental en el control de pH de diversos compartimentos intracelulares (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a; Perzov *et al.*, 2002) sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la influencia de la actividad de la V-ATPasa, se han centrado en procesos que se llevan a cabo en la vacuola o implicados en el transporte de proteínas post-Golgi (Morano y Klionsky, 1994; Bowers *et al.*, 2000). En cambio, no ha sido objeto de estudio la importancia que tiene la actividad de la V-ATPasa sobre procesos que se llevan a cabo en Golgi. Por tanto, en los siguientes sub-apartados se exponen los resultados del estudio que hemos realizado sobre el efecto que tiene la ausencia de la actividad de la V-ATPasa sobre dichos procesos, centrándonos sobre todo en los relacionados con la N-glicosilación.

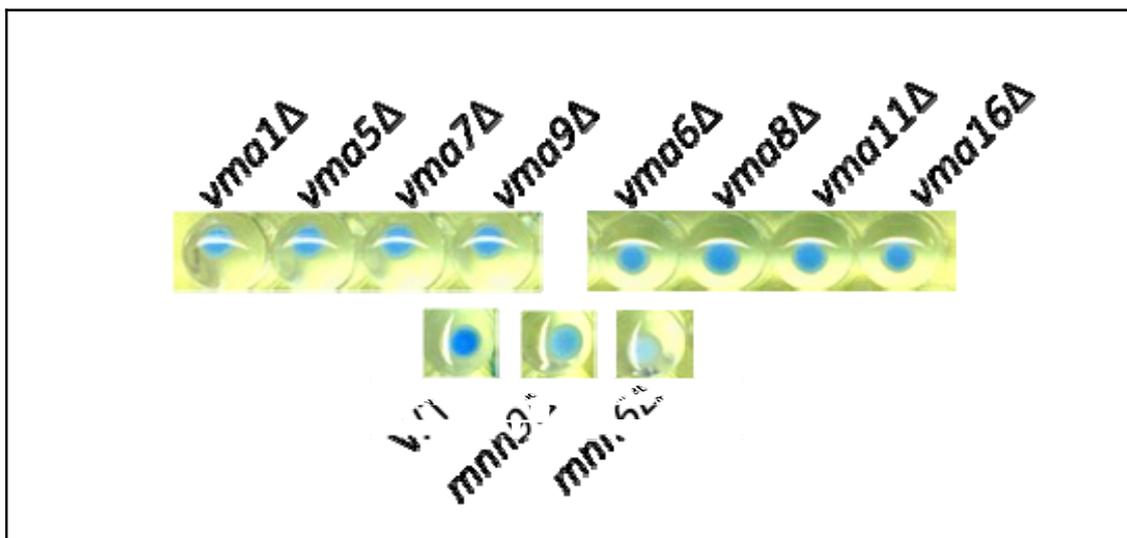


Figura III.1 Tinción con azul alcian de algunas de las cepas delecionadas en genes *VMA* detectadas en la búsqueda a escala genómica de genes implicados en manosilfosforilación. *vma1Δ*, *vma5Δ*, *vma7Δ*, y *vma9Δ* mostraron un fenotipo *ldb* moderado (Grupo 2), mientras que *vma6Δ*, *vma8Δ*, *vma11Δ*, y *vma16Δ* mostraron un fenotipo *ldb* débil (Grupo 3) (Ver Tabla III.1 y Capítulo II).

2.2. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la manosilfosforilación de los *N*-oligosacáridos en Golgi

La primera aproximación para estudiar la relación entre la función de la V-ATPasa y el fenotipo *ldb* fue probar el efecto de la inhibición selectiva de la V-ATPasa utilizando un inhibidor específico. Así se podría comprobar si la ausencia de acidificación, mediante la inhibición específica de la V-ATPasa produciría un fenotipo *ldb* del mismo modo que en los mutantes *vmaΔ*.

Como cepas *vma* modelo para nuestro estudio utilizamos *vma2Δ* y *vma3Δ*. Para conseguir la inhibición de la V-ATPasa en células de la cepa silvestre utilizamos el antibiótico macrólido bafilomicina, descrito como un potente inhibidor específico de la V-ATPasa (Bowman *et al.*, 2004). Para monitorizar la inhibición de la acidificación de la vacuola se utilizaron las tinciones vitales con quinacrina y rojo neutro (ver Materiales y Métodos, Secciones 6.6 a 6.8).

La Figura III.2 muestra el efecto de la inhibición de la acidificación de la vacuola, con la cepa *vma3Δ* como control. Los colorantes quinacrina y rojo neutro tienen afinidad por los orgánulos ácidos y tienden a acumularse en éstos. En los Paneles A y

B se muestra la vacuola de la cepa silvestre teñida con estos colorantes. La mutación de una subunidad de la V-ATPasa (como es el caso de *vma2Δ* y *vma3Δ*) produce un defecto en la acidificación vacuolar y, por tanto, una pérdida de la capacidad de tinción de la bafilomicina y el rojo neutro en este orgánulo (Paneles E y F). Las células de la cepa silvestre tratadas con bafilomicina 20mM se comportan como las células de las cepas *vma2Δ* y *vma3Δ* confirmando que la bafilomicina inhibe la acidificación de la vacuola (Paneles C y D).

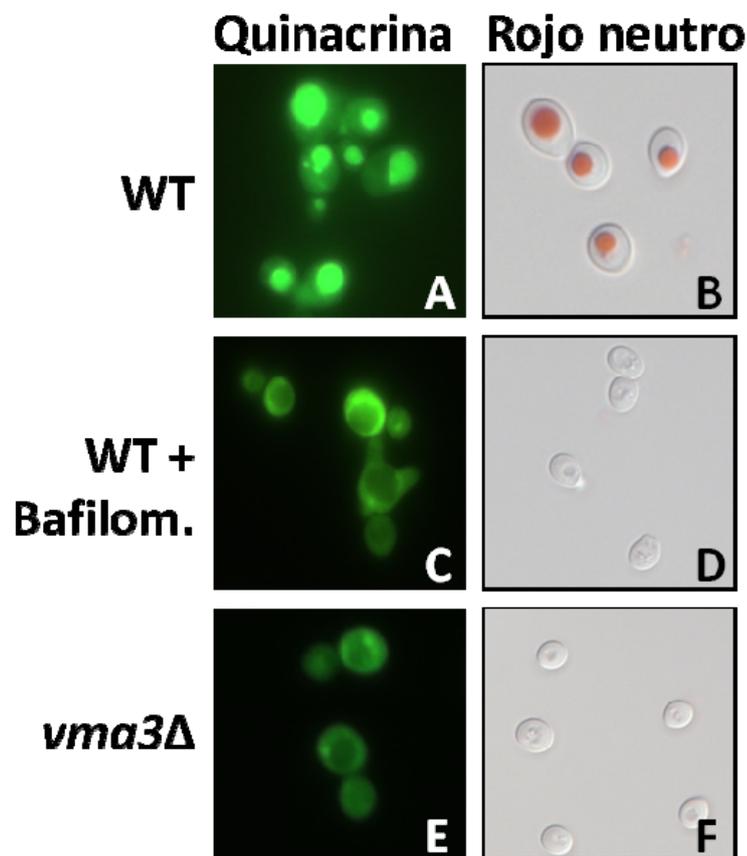


Figura III.2 Efecto de la bafilomicina sobre la acidificación de la vacuola en la cepa silvestre.

Estas mismas cepas fueron sometidas al test de unión a colorante azul alcian, para comprobar su fenotipo *ldb*. La Figura III.3 muestra el comportamiento de dichas cepas frente al colorante azul alcian. Como esperábamos, cuando la cepa silvestre se trata con bafilomicina la capacidad de unión a colorante de dicha cepa se ve reducida hasta un nivel similar al de la cepa *vma3Δ*. Estos datos apuntan que la deficiente acidificación de la vacuola está relacionada, de alguna manera, con el fenotipo *ldb*. Así

se confirma la relación directa entre la actividad de la V-ATPasa y el proceso de manosilfosforilación.

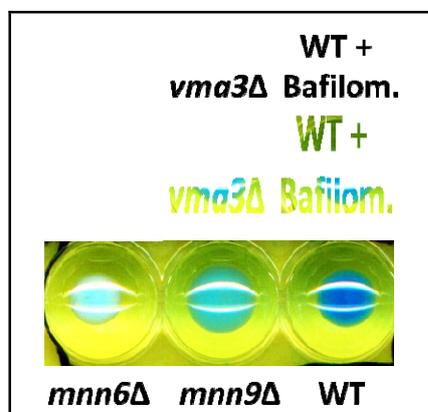


Figura III.3 Efecto de la inhibición de la V-ATPasa con bafilomicina sobre el fenotipo *ldb*.

2.3. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la elongación de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos en Golgi

Como se muestra en la Tabla III.1, sólo algunos de los mutantes delecionados en genes *VMA* secretan una invertasa periplásmica de tamaño reducido (Corbacho *et al.*, 2005). La Figura III.4 muestra los patrones de migración de la invertasa en distintos mutantes *vmaΔ*. No tenemos respuesta concreta a porqué en algunos casos el patrón de glicosilación sea indistinguible del silvestre y en otros se vea afectado en un grado no muy severo, pero pensamos que podría deberse a que las distintas subunidades de la V-ATPasa influyan en su actividad de manera diferente. Sin embargo, creemos que el hecho de que, en los mutantes *vmaΔ*, la manosilfosforilación se vea más afectada que la elongación de la cadena externa, podría estar relacionado con el hecho de que algunos autores han indicado que la V-ATPasa estaría en la zona *tardía* del Golgi (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a), precisamente donde se lleva a cabo fundamentalmente la transferencia de manosilfosfato.

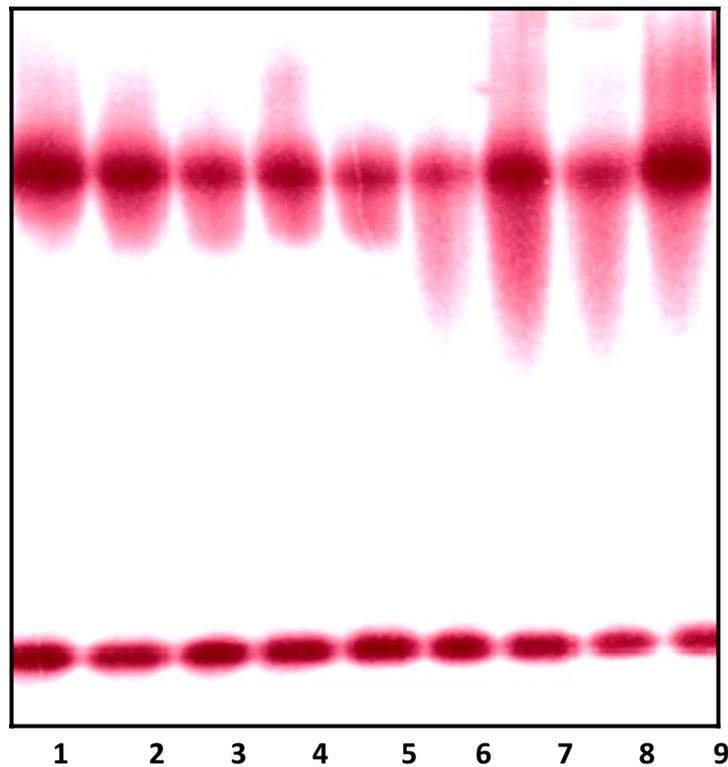


Figura III.4 Patrón de migración, en electroforesis en condiciones nativas, de la invertasa secretada por algunas de las cepas delecionadas en genes *VMA*, detectadas en la búsqueda a escala genómica de genes implicados en manosilfosforilación. **Calle 1**, WT; **Calle 2**, *vma1Δ*; **Calle 3**, *vma6Δ*; **Calle 4**, *vma8Δ*; **Calle 5**, *vma11Δ*; **Calle 6**, *vma3Δ*; **Calle 7**, *vma9Δ*; **Calle 8**, *vma13Δ*; **Calle 9**, *vma16Δ*. (Ver Tabla III.1 y Capítulo II).

2.4. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la adición de las manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$ a los *N*-oligosacáridos en Golgi

Entre los procesos de glicosilación que tienen lugar específicamente en el aparato de Golgi se encuentra la adición de las manosas terminales en $\alpha(1,3)$ a las ramificaciones de los *N*-oligosacáridos (Raschke *et al.*, 1973; Yip *et al.*, 1994; Lussier *et al.*, 1999). Esta actividad, llevada a cabo por Mnn1p es de muy fácil comprobación utilizando anticuerpos específicos. Utilizamos anticuerpos, obtenidos previamente en nuestro laboratorio, frente a la cepa silvestre y frente a manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$, para determinar el grado de reducción en la incorporación de estas manosas. La Tabla III.2 muestra el grado de aglutinación en cada caso, incluyendo como controles la cepa *mnn1Δ* y la cepa silvestre.

Tabla III.2 Aglutinación de las cepas *vma2Δ* y *vma3Δ* con anticuerpos anti-WT y anti-Manosas en $\alpha(1,3)$.

Cepa	Anticuerpo anti-silvestre	Anticuerpo anti-Man $\alpha(1,3)$
WT	+++	+++
<i>mnn1Δ</i>	-/+	-
<i>vma2Δ</i>	++	++
<i>vma3Δ</i>	+	+

La cepa *vma2Δ* mostró una disminución apreciable de la aglutinación con los anticuerpos anteriormente descritos, lo cual indica una un menor contenido de manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$ en los *N*-oligosacáridos. Dado que esta cepa tiene invertasa de tamaño silvestre, lo más probable es que la reducción en la aglutinación se deba a que la actividad manosiltransferasa de Mnn1p (localizada en el Golgi) se vea afectada por la ausencia de la actividad acidificante de la V-ATPasa, en lugar de por la ausencia de secuencias aceptoras de las manosas en $\alpha(1,3)$. En consecuencia, estos resultados indicarían la necesidad de acidificación del Golgi para la correcta actividad de la enzima codificada por el gen *MNN1*.

En el caso de la cepa *vma3Δ* la aglutinación es menor aún que en el caso de *vma2Δ*, pero al tener esta cepa una invertasa secretada con un tamaño menor que el de la cepa silvestre, la disminución del contenido en manosas $\alpha(1,3)$ podría deberse tanto a la disminución de la actividad de Mnn1p, como a la disminución en las secuencias aceptoras de dichas manosas. En cualquier caso, ambas posibilidades serían consecuencia de la disminución del pH *intra*-Golgi por la ausencia de actividad V-ATPasa.

2.5. Efecto de la actividad de la V-ATPasa sobre la maduración del factor α en Golgi

Tras analizar el efecto de la ausencia de la V-ATPasa sobre distintos procesos relacionados con la glicosilación en Golgi (elongación de la cadena externa, adición de manosas terminales, manosilfosforilación) decidimos probar otra actividad que se realiza en el aparato de Golgi pero no relacionada directamente con la ruta de glicosilación. Para ello, elegimos la secreción de factor α , que junto con el factor *a* son

las dos feromonas implicadas en el proceso de conjugación en *Saccharomyces cerevisiae*. El prepro-factor α es una proteína de 165 aminoácidos que tiene tres sitios potenciales de *N*-glicosilación. Este precursor se modifica y se procesa siguiendo la ruta clásica de secreción mediante una serie de etapas bien caracterizadas (Caplan *et al.*, 1991). El polipéptido pasa por el RE, donde se le transfiere el núcleo de los *N*-oligosacáridos, y posteriormente, en el aparato de Golgi, sufre la elongación de la cadena externa y su ramificación, antes de que actúen secuencialmente las proteasas Kex2p, Kex1p y Ste13p. La *N*-glicosilación de éste polipéptido es importante, pero no esencial, para su procesamiento proteolítico y su secreción (Caplan *et al.*, 1991).

Decidimos comprobar si la falta de acidificación en Golgi, debida a la ausencia de actividad V-ATPasa, afectaría al procesamiento proteolítico del factor α en los mutantes *vma* Δ . Para ello, sobre un césped sensible al factor α (cepa *sst1*; ver Materiales y Métodos, Sección 6.9) (Sprague, 1991), se dispusieron cantidades idénticas de células de las cepas *vma2* Δ , *vma3* Δ y silvestre, que se utilizó como control, todas ellas tipo *MAT* α . El resultado fue que las cepas *vma* Δ estudiadas producían un halo de inhibición ligeramente menor y más difuso que el producido por la cepa silvestre, indicando una cierta disminución en la producción del factor α (Fig. III.5).

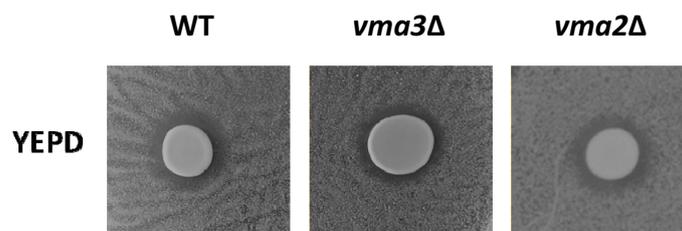


Figura III.5 Secreción de factor α en las cepas *vma2* Δ y *vma3* Δ comparadas con la cepa silvestre.

Por tanto, parece que el procesamiento proteolítico del prepro-factor α , llevado a cabo por Kex2p, Kex1p y Ste13p en el Golgi, se ve afectado por la acidificación deficiente de dicho orgánulo en las cepas *vma* Δ .

2.6. Efecto del pH extracelular sobre los mutantes *vma*

Una cuestión que se nos planteó al realizar los experimentos descritos anteriormente fue que quizás el pH del medio extracelular tuviera alguna influencia

sobre el pH del interior de los orgánulos como el Golgi y, por tanto, sobre las características fenotípicas estudiadas. Las células de levadura, al fermentar azúcares, bombean protones al exterior acidificando el medio de cultivo, de modo que el entorno de bajo pH en el que se encuentran podría paliar, de alguna forma, la deficiente acidificación de los orgánulos. Esto se apoya en el hecho demostrado de que los mutantes *vma* no son capaces de crecer en medios tamponados a pH 7,5 (Manolson *et al.*, 1994; Perzov *et al.*, 2002). Estudios previos habían puesto de manifiesto que la delección de *VMA2* producía una cepa capaz de crecer a pH 5 pero no a 7,5 (Nelson y Nelson, 1990) por lo que propusieron que la endocitosis de protones podría ayudar a mantener ácido el pH de los compartimentos celulares, en ausencia de la V-ATPasa. Posteriormente, Munn y Riezman (1994) encontraron que mutantes en endocitosis presentaban letalidad sintética con *vma2Δ*. Decidimos, por tanto, comprobar si al crecer las cepas *vma* en un medio tamponado a pH 7 se veían acrecentados, o no, los defectos fenotípicos estudiados anteriormente.

Comenzamos por la fosforilación de los *N*-oligosacáridos, responsable del fenotipo *ldb*. Como ya se mencionó en la Sección 2.1 de este Capítulo, los mutantes *vmaΔ* tienen fenotipo *ldb*. Se crecieron las cepas *vma2Δ* y *vma3Δ* como modelos de *vmaΔ*, y las cepas *mnn6Δ*, *mnn9Δ* y silvestre como controles, en medio YEPD tamponado a pH 7, cerca del límite máximo tolerado por los *vmaΔ*. La Figura III.6, Panel A, muestra cómo las cepas *vmaΔ*, cuando crecen en YEPD sin tamponar presentan un fenotipo *ldb*, que se ve acentuado notablemente cuando se crecen en medio tamponado a pH 7 (Panel B). Sin embargo, las cepas control, *mnn6Δ*, *mnn9Δ* y silvestre, no variaron su fenotipo *ldb* al cambiar las condiciones del medio.

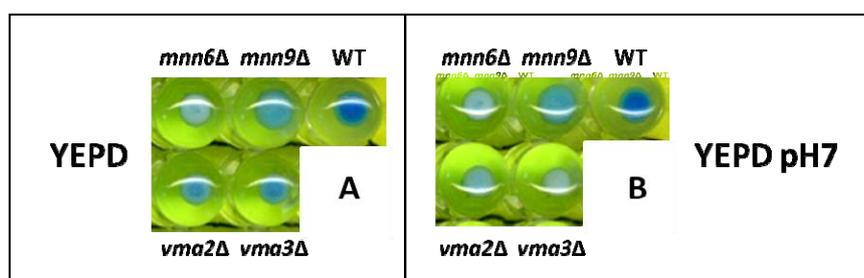
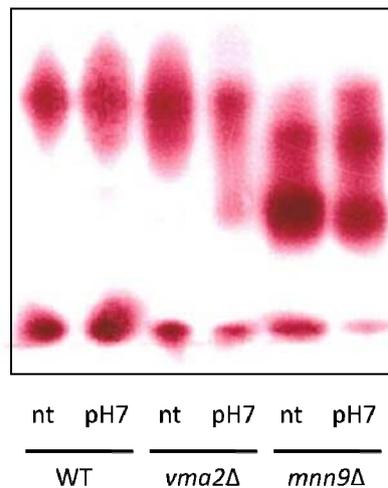


Figura III.6 Influencia del pH sobre el fenotipo *ldb*.

En el caso de la elongación de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos, como se indicó anteriormente, el mutante *vma2Δ* secreta una invertasa tipo silvestre. Para ver un posible efecto del pH del medio, *vma2Δ* se creció en medio YEPD y en YEPD tamponado a pH 7, junto con dos cepas control (WT y *mnn9Δ*). En la Figura III.7 se muestran los resultados obtenidos. La cepa silvestre creciendo en YEPD y en YEPD tamponado a pH 7, no presenta diferencias apreciables (calles 1 y 2). Las calles 3 y 4 muestran la cepa *vma2Δ* crecida en YEPD y en YEPD tamponado a pH 7 respectivamente. Se puede apreciar una variación sensible en el tamaño de la invertasa secretada, produciéndose una hipoglicosilación, que concuerda con la variación en el fenotipo *ldb* apreciado en la Figura III.6. Las calles 5 y 6 muestran la cepa control *mnn9Δ* que posee invertasa de tamaño muy reducido, y que, al igual que la cepa silvestre, no sufre ninguna variación al crecer en medio tamponado.

Figura III.7 Efecto de la acidificación de la vacuola sobre el tamaño de la invertasa secretada.

nt = YEPD no tamponado
pH 7 = YEPD tamponado a pH 7

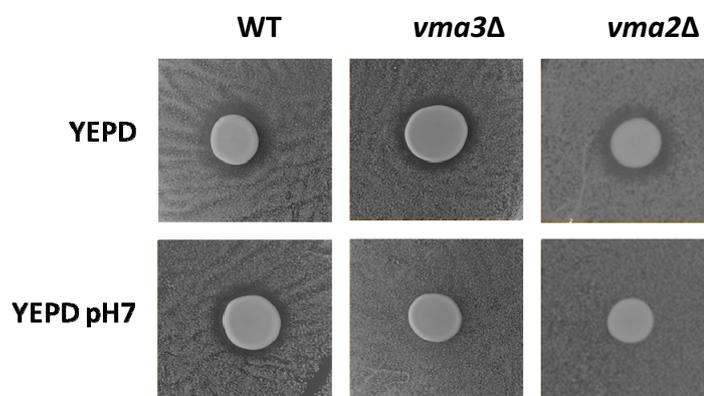


En cuanto a la adición de las manosas terminales en $\alpha(1,3)$ de los *N*-oligosacáridos, la Tabla III.3 recoge los resultados de la aglutinación con los anticuerpos descritos en la Sección 2.4, cuando las células se crecieron en YEPD y en YEPD tamponado a pH 7. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente para el fenotipo *ldb* e hipoglicosilación de la invertasa. Se puede apreciar una disminución en la aglutinación de ambas cepas *vmaΔ* crecidas en el medio tamponado a pH 7, con los dos anticuerpos probados. La adición de las manosas terminales se vería aun más reducida, por tanto, en los *vmaΔ* crecidos en medio tamponado a pH 7.

Tabla III.3 Aglutinación de las cepas *vma2Δ* y *vma3Δ* con anticuerpos anti-WT y anti-Manosas terminales en $\alpha(1,3)$, crecidas en YEPD y en YEPD tamponado a pH 7

Cepa	Anticuerpo anti-silvestre		Anticuerpo anti-Man $\alpha(1,3)$	
	YEPD	YEPD pH 7	YEPD	YEPD pH 7
WT	+++	+++	+++	+++
<i>mnn1Δ</i>	-/+	-/+	-	-
<i>vma2Δ</i>	++	+	++	+
<i>vma3Δ</i>	+	-/+	+	-/+

Por último, la Figura III.8 muestra el nivel de secreción de factor α en la cepa silvestre y en la cepa *vma2Δ* (ambas *MAT* α) cuando se crecieron las cepas en YEPD o en YEPD tamponado a pH 7 sobre un césped sensible de *sst1* (*Mat a*). Como se describió en la Sección 3.5, cuando la cepa silvestre se creció en YEPD produjo un halo de inhibición en el césped ligeramente mayor del que produjo la cepa *vma2Δ*. Sin embargo, cuando ambas cepas se crecen en medio YEPD tamponado a pH 7, la cepa *vma2Δ* ni tan siquiera produce halo de inhibición. La cepa *vma2Δ* es, por tanto, muy sensible al pH del medio en cuanto al procesamiento proteolítico del factor α en Golgi.

**Figura III.8** Producción de factor α en medio tamponado y sin tamponar.

3. CONSIDERACIONES SOBRE EL PAPEL DE LA V-ATPASA EN LA MANOSILFOSFORILACIÓN Y LA ELONGACIÓN DE LA CADENA EXTERNA DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS

Estudios anteriores sobre la V-ATPasa pusieron de manifiesto la existencia de un homólogo funcional de la proteína Vph1p (subunidad α de la V-ATPasa), Stv1p que tiene señales de retención en Golgi y que residiría en dicho orgánulo mayoritariamente (Manolson *et al.*, 1994; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001b). Estos estudios se centraron

exclusivamente en el efecto de Stv1p sobre la vacuola. Nuestros resultados, sin embargo, no apoyan la idea de que Stv1p se encuentre mayoritariamente en las moléculas de V-ATPasa presuntamente residentes en Golgi, mientras que Vph1p la sustituya en las que están presentes en la membrana vacuolar, puesto que ambos mutantes delecionados *stv1Δ* y *vph1Δ* se comportaron como silvestres. Si Stv1p estuviera presente en las moléculas de V-ATPasa localizada en Golgi, la cepa *stv1Δ* debería mostrar un fenotipo *ldb*. La sugerencia de que la V-ATPasa debe jugar un papel importante en el aparato de Golgi se ve apoyado por nuestros resultados. Hemos comprobado que la ausencia de actividad V-ATPasa influye negativamente en procesos específicos de Golgi como la glicosilación y la manosilfosforilación de *N*-oligosacáridos. Igualmente se ha demostrado que en mutantes *vmaΔ* la alteración de los procesos específicos de Golgi se ve acrecentada cuando éstos se crecen en medio tamponado a pH 7.

La inhibición específica y selectiva de la V-ATPasa, con el uso del inhibidor bafilomicina produjo un fenotipo *ldb* en la cepa silvestre, disminuyendo la capacidad de unión de colorante azul alcian hasta los niveles de las cepas *vmaΔ*. Esto indicaría que la causa del fenotipo *ldb* en los mutantes *vmaΔ* es la ausencia de actividad acidificante de la V-ATPasa, y no se debería por tanto a efectos secundarios de la deleción del gen *VMA* en esa cepa sobre otros genes de la misma. El hecho de que en los mutantes *vma* además de la manosilfosforilación se vean afectadas la elongación de la cadena externa o sus ramificaciones indica que todo el proceso de glicosilación que tiene lugar en el aparato de Golgi depende de esa actividad V-ATPasa. Esto justificaría la presencia de la V-ATPasa en la membrana de Golgi con una importante actividad, en lugar de deberse simplemente a que llega hasta allí accidentalmente en el tránsito de vesículas. Otros procesos importantes que tienen lugar en el Golgi, no relacionados con la glicosilación, como el procesamiento proteolítico del factor α también que se ven afectados por la ausencia de actividad V-ATPasa y apoya la idea de que este orgánulo necesita determinados niveles de acidificación para su correcto funcionamiento.

Además, hemos mostrado que el pH del medio extracelular tiene una influencia considerable sobre las funciones de Golgi consideradas en este trabajo, de

modo que podemos asumir que dicho pH influye sobre el grado de acidificación del interior celular y, aun más importante, sobre los orgánulos internos. El pH intracelular es regulado por la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática pero aun así, en medio acidificado, los H⁺ deben llegar hasta los orgánulos como el Golgi o la vacuola, que requieren un pH ácido para su correcto funcionamiento, o para la actividad de las enzimas contenidas en ellos. De este modo, cuando las células crecen en medio tamponado a pH 7 o superior ese efecto de acidificación debida al medio extracelular no se produce y las células delecionadas en genes *VMA* tienen además serias dificultades además para sobrevivir, llegando a morir a pH por encima de 7,5 (Manolson *et al.*, 1994). Nuestros datos están de acuerdo con estas propuestas y apoyan la existencia de un mecanismo de endocitosis de protones, que paliaría la falta de actividad de la V-ATPasa, predicho, de manera indirecta, por Munn y Riezman (1994). Una vez finalizados estos experimentos, se ha publicado un estudio donde proponen un modelo alternativo de acidificación de la vacuola, el endosoma y el aparato de Golgi basado en el transporte de H⁺ extracelulares a través de vesículas de endocitosis y transporte retrógrado endosoma//late-Golgi (Gustavsson *et al.*, 2008). Este trabajo apoya nuestra idea de la acidificación parcial alternativa independiente de la V-ATPasa.

Los resultados mostrados en nuestro trabajo indican que la falta de acidificación del aparato de Golgi tiene serias repercusiones sobre la glicosilación, y el hecho de que esas repercusiones se vean agravadas al inhibir el mecanismo alternativo de acidificación, llegando incluso a hacer inviables las células delecionadas en genes *VMA* a pH elevado, implica que el principal problema de la ausencia de la V-ATPasa es la alteración de los procesos de Golgi más que la ausencia de acidificación de la vacuola. Así mismo, el trabajo de Gustavsson *et al.* (2008) también apoya esta idea ya que ellos declaran que la falta de acidificación de la vacuola no es lo suficientemente grave como para comprometer la viabilidad de las células delecionadas en genes *VMA*.

4. REFERENCIAS

Bowers, K., Levi, B. P., Patel, F. I. and Stevens, T. H. (2000). "The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **11**(12): 4277-4294.

- Bowman, E. J., Graham, L. A., Stevens, T. H. and Bowman, B. J. (2004). "The Bafilomycin/Concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **279**(32): 33131-33138.
- Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**(21): 7972-7976.
- Caplan, S., Green, R., Rocco, J. and Kurjan, J. (1991). "Glycosylation and structure of the yeast MF alpha 1 alpha-factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway." *J. Bacteriol.* **173**(2): 627-635.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2004). "Identification of low-dye-binding (*ldb*) mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res.* **4**(4-5): 437-444.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2005). "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides." *Fungal Genet. Biol.* **42**(9): 773-790.
- Davis-Kaplan, S. R., Ward, D. M., Shiflett, S. L. and Kaplan, J. (2004). "Genome-wide analysis of iron-dependent growth reveals a novel yeast gene required for vacuolar acidification." *J. Biol. Chem.* **279**(6): 4322-4329.
- Graham, L. A., Powell, B. and Stevens, T. H. (2000). "Composition and assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex." *J. Exp. Biol.* **203**(1): 61-70.
- Gustavsson, M., Barmark, G., Larsson, J., Murén, E. and Ronne, H. (2008). "Functional genomics of monensin sensitivity in yeast: implications for post-Golgi traffic and vacuolar H+-ATPase function." *Mol. Genet. Genomics* **280**(3): 233-248.
- Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M. and Stevens, T. H. (2001a). "The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and *in vivo* dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis." *J. Biol. Chem.* **276**(50): 47411-47420.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. and Forgac, M. (2001b). "Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and *in vivo* dissociation." *J. Biol. Chem.* **276**(21): 17941-17948.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M. and Bussey, H. (1999). "The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 323-334.
- Manolson, M. F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A. and Jones, E. W. (1994). "STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p." *J. Biol. Chem.* **269**(19): 14064-14074.
- Morano, K. A. and Klionsky, D. J. (1994). "Differential effects of compartment deacidification on the targeting of membrane and soluble proteins to the vacuole in yeast." *J. Cell Sci.* **107**(10): 2813-2824.
- Munn, A. L. and Riezman, H. (1994). "Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new *END* genes." *J. Cell Biol.* **127**(2): 373-386.
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. and Takatsuki, A. (1993). "Folimyacin (Concanamycin A), a specific inhibitor of V-ATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus before arrival to the Golgi apparatus." *Cell Struct. Funct.* **18**(3): 139-149.
- Nelson, H. and Nelson, N. (1990). "Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H(+)-ATPase causes conditional lethality." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(9): 3503-3507.
- Nishi, T. and Forgac, M. (2002). "The vacuolar (H+)-ATPases - nature's most versatile proton pumps." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(2): 94-103.
- Perzov, N., Padler-Karavani, V., Nelson, H. and Nelson, N. (2002). "Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis." *J Exp Biol* **205**(9): 1209-1219.
- Raschke, W. C., Kern, K. A., Antalis, C. and Ballou, C. E. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4660-4666.
- Sprague, G. (1991). "Assay of yeast mating reaction." *Methods Enzymol.* **194**: 77-87.
- Yip, C. L., Welch, S. K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J. and MacKay, V. L. (1994). "Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *MNN9* and *MNN1* genes required for complex glycosylation of secreted proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(7): 2723-2727.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICACIÓN DEL GEN *MNN3* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y ANÁLISIS FUNCIONAL EN RELACIÓN CON EL FENOTIPO *LDB*

1. INTRODUCCIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Identificación del gen *MNN3*

2.2. Secuenciación y caracterización de la mutación *mnn3*

2.3. Sobreexpresión de *YPT6* y *VPS74*. Efecto sobre el fenotipo *ldb*

2.4. Sobreexpresión de *MNN6* en *vps74Δ* e *ypt6Δ*

2.5. Sobreexpresión de *YPT6* y *VPS74*. Efecto sobre la glicosilación

2.6. Función de *VPS74/MNN3*

3. REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

Los mutantes *mnn* de *Saccharomyces cerevisiae* fueron aislados por el grupo de Ballou como herramienta para el estudio de la estructura y biosíntesis de los oligosacáridos de las manoproteínas (ver Introducción General). De todos los genes *MNN*, el *MNN3* es el único que no figura todavía en las bases de datos asociado a una ORF del genoma de la levadura. El mutante *mnn3* fue descrito inicialmente como defectivo en la incorporación de manosas unidas por enlaces $\alpha(1,2)$ en las ramificaciones de los *N*-oligosacáridos (Ballou *et al.*, 1973; Raschke *et al.*, 1973). Más tarde se describió que el manano aislado de cepas con la mutación *mnn3* carecía de grupos fosfato, probablemente porque era incapaz de sintetizar las secuenciasceptoras en las mencionadas ramificaciones (Karson y Ballou, 1978). Utilizando la nomenclatura de los Capítulos I y II, el mutante *mnn3* tendría un “fenotipo *ldb* severo”. La conclusión de

estos estudios y otros posteriores fue que el defecto de la mutación *mnn3* no podía ser explicado por la pérdida de una única manosiltransferasa ya que análisis posteriores del fenotipo revelaron que presentaba una reducción general en el tamaño de las cadenas glucídicas de las manoproteínas, tanto las unidas por enlace *N*-glicosídico como a las unidas por enlace *O*-glicosídico. De hecho, se sugirió que la Mnn3p podía tener una función reguladora que afectara simultáneamente a la actividad de varias manosiltransferasas (Cohen *et al.*, 1980; Ballou, 1990).

A la vista de esta información y de los resultados obtenidos en los Capítulos I y II, en este Capítulo nos propusimos identificar el gen *MNN3*, que resultó ser el *VPS74*, y posteriormente realizar un estudio para intentar aclarar su función en relación con el proceso de glicosilación en general y más concretamente con la transferencia de grupos manosilfosfato a las cadenas glucídicas. Hemos utilizado dos aproximaciones experimentales:

En primer lugar viendo el efecto de la sobreexpresión de un gen funcionalmente relacionado con *MNN3/VPS74*, en una cepa con este gen deletado y viceversa. En un estudio de mapeo global de la red de interacciones genéticas en *Saccharomyces cerevisiae* (Tong *et al.*, 2004) se detectó una interacción entre *VPS74*, y los genes *RIC1*, e *YPT6*. Los dobles mutantes *vps74ric1* y *vps74ypt6* daban como resultado un fenotipo de inviabilidad. La interacción con *YPT6* y con *RIC1* es muy interesante desde nuestro punto de vista puesto que *YPT6* pertenece a la familia Rab/Ypt, que son reguladores clave del transporte intracelular en células eucariotas (Siniosoglou, 2005), mientras que *RIC1* es su factor intercambiador de guanín nucleótidos (Bensen *et al.*, 2001). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Ypt6p (homóloga de la humana Rab6p) es necesaria para el reciclaje de proteínas de membrana desde los endosomas hasta el aparato de Golgi (Bensen *et al.*, 2001; Luo y Gallwitz, 2003). La localización de las proteínas en los correspondientes orgánulos es crucial para la supervivencia y multiplicación de las células eucariotas. En consecuencia, existen multitud de factores y mecanismos que aseguran la compartimentación y que están altamente conservados desde levaduras a células de mamíferos (Segev, 2001; Markgraf *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). En el caso de las proteínas que funcionan en orgánulos de las rutas secretoras y endocíticas, la

localización requiere no solo la llegada al lugar correcto sino también mecanismos que aseguren la residencia de la proteína en ese lugar a pesar del enorme flujo de membranas y proteínas entre los orgánulos. Se han descrito mecanismos que restringirían la incorporación a vesículas de transporte que partan de un orgánulo, de proteínas residentes en el mismo, así como mecanismos que aseguran la residencia de proteínas en un compartimento concreto, mediante transporte reverso de las mismas desde compartimentos posteriores a los que son continuamente transportadas (Pelham y Munro, 1993; Rothman y Wieland, 1996; Spelbrink y Nothwehr, 1999).

La segunda aproximación fue el uso de *microarrays* de ADN para intentar detectar posibles cambios en el transcriptoma del *mnn3Δ*, comparados con la cepa silvestre, y así poder estudiar las posibles interacciones del gen *MNN3* con el resto de genes. Esta aproximación se trata ampliamente en el Capítulo V.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Identificación del gen *MNN3*

El mutante *mnn3*, con el marcador *ura3*, se transformó con la librería genómica CEN BANK y se seleccionaron los transformantes que recuperaron el fenotipo silvestre, como se describió en el Capítulo II para la identificación de los mutantes *ldb*. El fragmento que complementó el defecto de *mnn3* fue secuenciado y como resultado se vio que contenía un fragmento del cromosoma IV con 9 ORF completas y una incompleta (ver Figura IV.1). Tal como se explicó en el Capítulo II, primero se descartaron las ORF incompletas y aquellas cuya delección da como resultado un fenotipo inviable. De las ORF restantes, la única que mostraba un fenotipo *ldb* (además, tan severo como el de *mnn3*) era YDR372CΔ, que se corresponde con el gen *VPS74* (Fig. IV.2B).

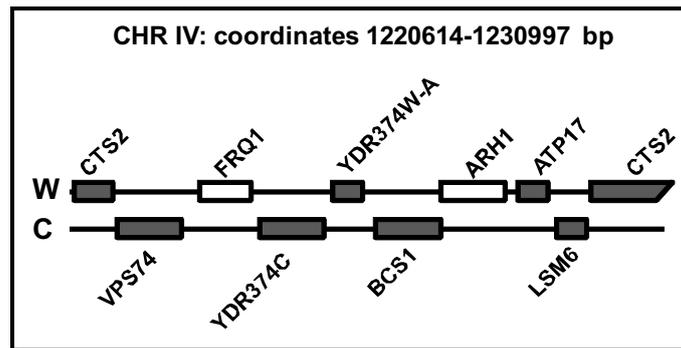
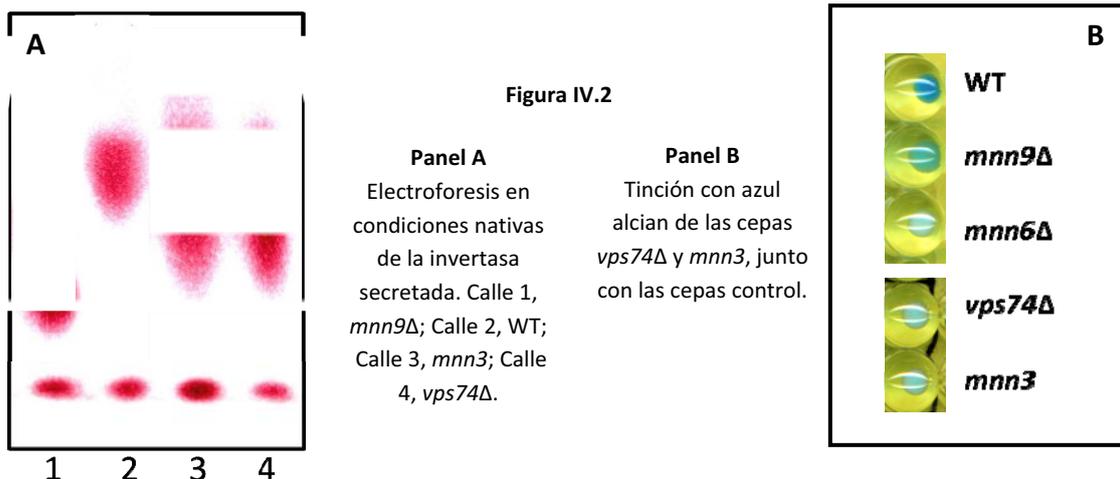


Figura IV.1 Representación esquemática del inserto de ADN en el plásmido YCp50 que causa la complementación del fenotipo de *mnn3*. Los rectángulos blancos representan genes esenciales.

Las Figuras IV.2, IV.3 y IV.4 ponen de manifiesto cuatro características fenotípicas de *vps74Δ* similares a las que presenta *mnn3*: algunas células se mantienen unidas tras la división celular formando agregados (Fig. IV.3); patrón electroforético heterogéneo de la invertasa secretada (Fig. IV.2A); fenotipo *ldb* severo (Fig. IV.2B) y cambios en la sensibilidad a vanadato con respecto a la cepa silvestre (Fig. IV.4). Los mutantes en glicosilación suelen ser resistentes a determinadas concentraciones de ortovanadato de sodio en el medio de cultivo, a las cuales es sensible la cepa silvestre. Sin embargo, *mnn3* se describió como más sensible al ortovanadato de sodio que la propia cepa silvestre (Ballou *et al.*, 1991). La Figura IV.4 muestra el comportamiento de ambas cepas frente a varias concentraciones de ortovanadato en el medio.



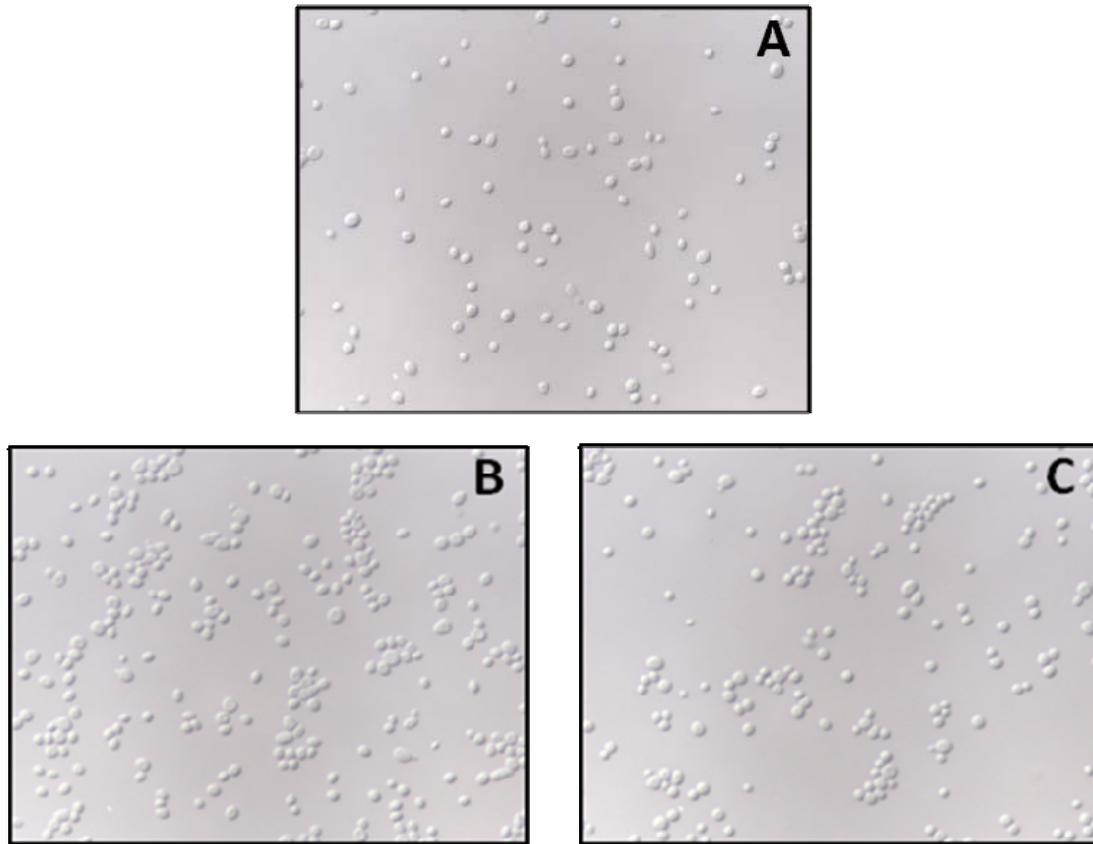


Figura IV.3 Microfotografías de las cepas: **A**, silvestre; **B**, *mnn3* y **C**, *vps74Δ*. Se puede apreciar cómo las cepas *mnn3* y *vps74Δ* crecen formando agregados.

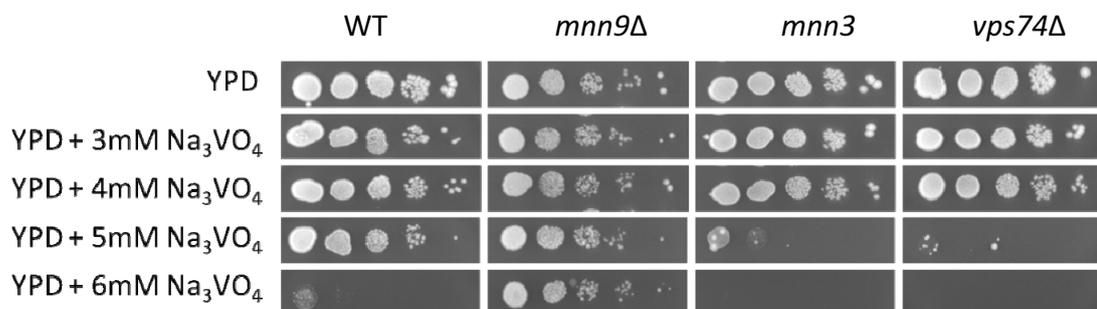


Figura IV.4 Hipersensibilidad de *mnn3* y *vps74Δ* frente a ortovanadato de sodio en el medio, en diversas concentraciones. Se muestran como controles la cepa silvestre y el mutante *mnn9*, que es resistente a altas concentraciones.

Todas estas similitudes hacían al gen *VPS74* el candidato más firme a ser el que complementaba el defecto de *mnn3*. Para comprobarlo se realizó el cruce *mnn3* x *vps74Δ*, se crecieron los diploides, se esporularon y las tétradas fueron diseccionadas para analizar las esporas. Se observó que todos los caracteres fenotípicos compartidos entre ambas cepas parentales estaban presentes en las 4 esporas de varias tétradas

analizadas. Adicionalmente, como se describe en la Sección 2.3, cuando la cepa *mnn3* se transformó con un plásmido con un inserto que contenía sólo la secuencia codificante de *VPS74* se producía la complementación del fenotipo mutante. A la vista de estos resultados podemos concluir que el gen *MNN3* puede ser considerado sinónimo de *VPS74*.

2.2. Secuenciación y caracterización de la mutación *mnn3*

Una vez conocido el gen afectado en el mutante *mnn3*, procedimos a la secuenciación del mismo para determinar la mutación responsable del fenotipo. En primer lugar se amplificó el gen *VPS74* a partir de ADN genómico de mutantes *mnn3*. Para ello se diseñaron un par de cebadores a ambos lados del gen *VPS74* (Ver Materiales y Métodos) y se amplificó con una polimerasa con actividad de corrección de errores (*TripeMaster PCR System*). El fragmento obtenido por PCR se introdujo directamente, mediante la técnica del *T-A Cloning*, en el plásmido pGEM-T. Se transformaron células competentes de *E. coli* y se secuenciaron los plásmidos de varias colonias de transformantes. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores universales de T7 y SP6. La secuenciación mostró que todas las muestras analizadas tenían un cambio de base en la posición 289 de la secuencia codificante de *VPS74*. Dicho cambio reemplazaba la C del codón CGT por una T resultando el codón TGT. En la secuencia de aminoácidos de la proteína, el cambio de codón da lugar a la sustitución de la Arg₉₇ por una Cys.

La proteína Vps74p pertenece a la familia GOLPH3/VPS74, con 13 miembros descritos hasta la fecha en mamíferos (*Homo sapiens*, *Rattus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*), anfibios (*Xenopus*) y otras levaduras (*Ashbya gossypii*, *Schizosaccharomyces pombe*). Todas estas proteínas mantienen un alto grado de homología e identidad, y el aminoácido Arg₉₇ está conservado en todos los miembros de la familia (Fig. IV.5). A su vez, se encuentra ubicado en una región de muy alta homología con las otras proteínas de la familia, lo que sugiere que debe ser un aminoácido importante dentro de la estructura de la proteína o quizás en su función.

sp Q9CRA5 GOLP3_MOUSE	MTS-LTQRSSGLVQRRTEASRNAADKERAAAGGGG-----GSGEDE	39
sp Q9ERE4 GOLP3_RAT	MTS-LTQRSSGLVQRRTEASRNAADKERAAAGGGG-----GNGEDE	39
sp Q9H4A6 GOLP3_HUMAN	MTS-LTQRSSGLVQRRTEASRNAADKERAAAGGGA-----GSSDED	39
sp Q5PPU5 GP3LA_XENLA	MTT-LIRRG-----RRAEEGQ--ERRADSE-----D	23
sp A0JPI4 GP3LB_XENLA	MTT-LIRRG-----RRAEEGQ--ERRADSE-----D	23
sp Q5U4Q6 GLP3L_XENTR	MTT-LTRRG-----RRADVQ--ENRVDSE-----D	23
sp Q8R088 GLP3L_MOUSE	MTT-LTHRT-----RRTEVSKSCKEKKIESE-----E	25
sp Q66H74 GLP3L_RAT	MTT-LTHRT-----RRTEVSKSCKEKKIESE-----E	25
sp Q9H4A5 GLP3L_HUMAN	MTT-LTHRA-----RRTEISKNSCKEKKIESE-----E	25
sp A6H7F6 GLP3L_BOVIN	MTT-LTHRA-----RRTEVSKNSCKEKKIESE-----E	25
sp P62583 VPS74_ASHGO	MS--LQRRR-----VNKT-AGNETVGGASLNRS-----DEEEGM	31
sp Q06385 VPS74_YEAST	MST-LQRRR-----VNRADSGDTSIHSSANNTKGDKIANIAVDGDDNGT	45
sp O14205 YDQD_SCHPO	MSGGLSRRR-----VAAASSDEERPEMRSVSHSKS-----HLEGYDD	37
	* : * : *	:
sp Q9CRA5 GOLP3_MOUSE	AQSRRDEQDDDDK--GDSKETRLTLMEEVLLLGLKDREGYTSFWNDCISS	87
sp Q9ERE4 GOLP3_RAT	AQSRRDEQDDDDK--GDSKETRLTLMEEVLLLGLKDREGYTSFWNDCISS	87
sp Q9H4A6 GOLP3_HUMAN	AQSRRDEQDDDDK--GDSKETRLTLMEEVLLLGLKDREGYTSFWNDCISS	87
sp Q5PPU5 GP3LA_XENLA	SIK---DKDEEES--ADSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	68
sp A0JPI4 GP3LB_XENLA	SIK---DKDEEES--ADSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	68
sp Q5U4Q6 GLP3L_XENTR	YIK---DKDEEES--ADSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	68
sp Q8R088 GLP3L_MOUSE	DTNQERSPDNEDP--GDSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	73
sp Q66H74 GLP3L_RAT	DTNQERSPDNEDP--GDSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	73
sp Q9H4A5 GLP3L_HUMAN	DSNWEKSPDNEDS--GDSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	73
sp A6H7F6 GLP3L_BOVIN	NVNQDRNQDNEDI--GDSKDIRLTLMEEVLLLGLKDKEGYTSFWNDCISS	73
sp P62583 VPS74_ASHGO	THKVAYDPEEQKL-RENTREPTLTLMEEVLLMGLKDKEGYLSFLNENISY	80
sp Q06385 VPS74_YEAST	NKKIAYDPEESKL-RDNIINPTLTLMEEVLLMGLDRDEGYLSFWNDSISY	94
sp O14205 YDQD_SCHPO	DHKIAFDPKDLEQGAEREKQPRLLTLMEEVLLLGLKDKQGYLSFWNDSISY	87
	. . . : . . . ***** : * : * : * : * : * : *	
sp Q9CRA5 GOLP3_MOUSE	GLNGCMLIELALRGRQLQLEACGMRRKS--LLTRKVICSDAPTGDVLLDEA	136
sp Q9ERE4 GOLP3_RAT	GLNGCMLIELALRGRQLQLEACGMRRKS--LLTRKVICSDAPTGDVLLDEA	136
sp Q9H4A6 GOLP3_HUMAN	GLNGCMLIELALRGRQLQLEACGMRRKS--LLTRKVICSDAPTGDVLLDEA	136
sp Q5PPU5 GP3LA_XENLA	GLNGGILIELFLRGRVLEPATIRKKR--LIDKKVLLKSDKLTGDVLLDET	117
sp A0JPI4 GP3LB_XENLA	GLNGGILIELFLRGRVLEPATIRKKR--LIDKKVLLKSDKLTGDVLLDET	117
sp Q5U4Q6 GLP3L_XENTR	GLNGGILIELFLRGRVLEPATIRKKR--LIDKKVLLKSDTPTGDVLLDET	117
sp Q8R088 GLP3L_MOUSE	GLNGGILIELAMRGRIYLEPPTMRKKR--LLDRKVLLKSDSPTGDVLLDET	122
sp Q66H74 GLP3L_RAT	GLNGGILIELAMRGRIYLEPPTMRKKR--LLDRKVLLKSDSPTGDVLLDET	122
sp Q9H4A5 GLP3L_HUMAN	GLNGGILIELAMRGRIYLEPPTMRKKR--LLDRKVLLKSDSPTGDVLLDET	122
sp A6H7F6 GLP3L_BOVIN	GLNGGILIELAMRGRIYLEPPTMRKKR--LLDRKVLLKSDSPTGDVLLDET	122
sp P62583 VPS74_ASHGO	ALNGCIIELALRGRIVVDDAMRRRFPDSERLIEVDGSKTGALLDEA	130
sp Q06385 VPS74_YEAST	ALNGCIIELALRGRIRILDDSAARKRFDLSERLIEVIDSSKTGEVLLDET	144
sp O14205 YDQD_SCHPO	SLNGCIIELALRGRIRILDDSAARKRFPDLSERLIEVIDSSKTGEVLLDEA	137
	. * * * : : * * : * : : * : : * : : * : : * * : * * * :	
sp Q9CRA5 GOLP3_MOUSE	LKHVKETQPPETVQNWIELLSGETWNPPLKHYQLRNVRERLAKNLVEKGV	186
sp Q9ERE4 GOLP3_RAT	LKHVKETQPPETVQNWIELLSGETWNPPLKHYQLRNVRERLAKNLVEKGV	186
sp Q9H4A6 GOLP3_HUMAN	LKHVKETQPPETVQNWIELLSGETWNPPLKHYQLRNVRERLAKNLVEKGV	186
sp Q5PPU5 GP3LA_XENLA	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	167
sp A0JPI4 GP3LB_XENLA	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	167
sp Q5U4Q6 GLP3L_XENTR	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	167
sp Q8R088 GLP3L_MOUSE	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	172
sp Q66H74 GLP3L_RAT	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	172
sp Q9H4A5 GLP3L_HUMAN	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	172
sp A6H7F6 GLP3L_BOVIN	LKHVKETQPPETVQSWIELLGTETWNPFLKQYQLRNVRERLAKNLVEKGI	172
sp P62583 VPS74_ASHGO	LTLMKGSSEPT-LTIVNWMDLSSGETWNPFLKINYLQVRERLAKGLVDKGV	179
sp Q06385 VPS74_YEAST	LQLMKNDEP-LSISNWDLLSGETWNPFLKINYLQVRERLAKGLVDKGV	193
sp O14205 YDQD_SCHPO	LQLMKNSSEPT-LTIVNWMDLSSGETWNPFLKINYLQVRERLAKGLVDKGI	186
	: : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp Q9CRA5 GOLP3_MOUSE	LTTEKQNFLLFDMTTHPLTNNNIKQRLIKKVQEAFLDKWVND-----PH	230
sp Q9ERE4 GOLP3_RAT	LTTEKQNFLLFDMTTHPLTNNNIKQRLIKKVQEAFLDKWVND-----PH	230
sp Q9H4A6 GOLP3_HUMAN	LTTEKQNFLLFDMTTHPLTNNNIKQRLIKKVQEAFLDKWVND-----PH	230
sp Q5PPU5 GP3LA_XENLA	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLVKKLQESLLEKRWVND-----PH	211
sp A0JPI4 GP3LB_XENLA	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLVKKLQESLLEKRWVND-----PH	211
sp Q5U4Q6 GLP3L_XENTR	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLVKKLQESLLEKRWVND-----PH	211
sp Q8R088 GLP3L_MOUSE	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLMKKLQDSVLERWVND-----PQ	216
sp Q66H74 GLP3L_RAT	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLMKKLQDSVLERWVND-----PQ	216
sp Q9H4A5 GLP3L_HUMAN	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLVKKLQDSVLERWVND-----PQ	216
sp A6H7F6 GLP3L_BOVIN	LTTEKQNFLLFDMTTHPVNTTTEKQRLVKKLQDSVLERWVND-----PQ	216
sp P62583 VPS74_ASHGO	LRTEMKNFFLDFMTPHVDTSCKESIKRRLSVLVPVPRNVELQYTELFP	229
sp Q06385 VPS74_YEAST	LRTEMKNFFLDFMATHPIADASCKEAIKRRVLSVLVSRNEMELSYNEYP	243
sp O14205 YDQD_SCHPO	LRNEKKNFFLDFMTPHPIADTSIKDSIKRVRVSVLTSRVIEIDNSPSPFP	236
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

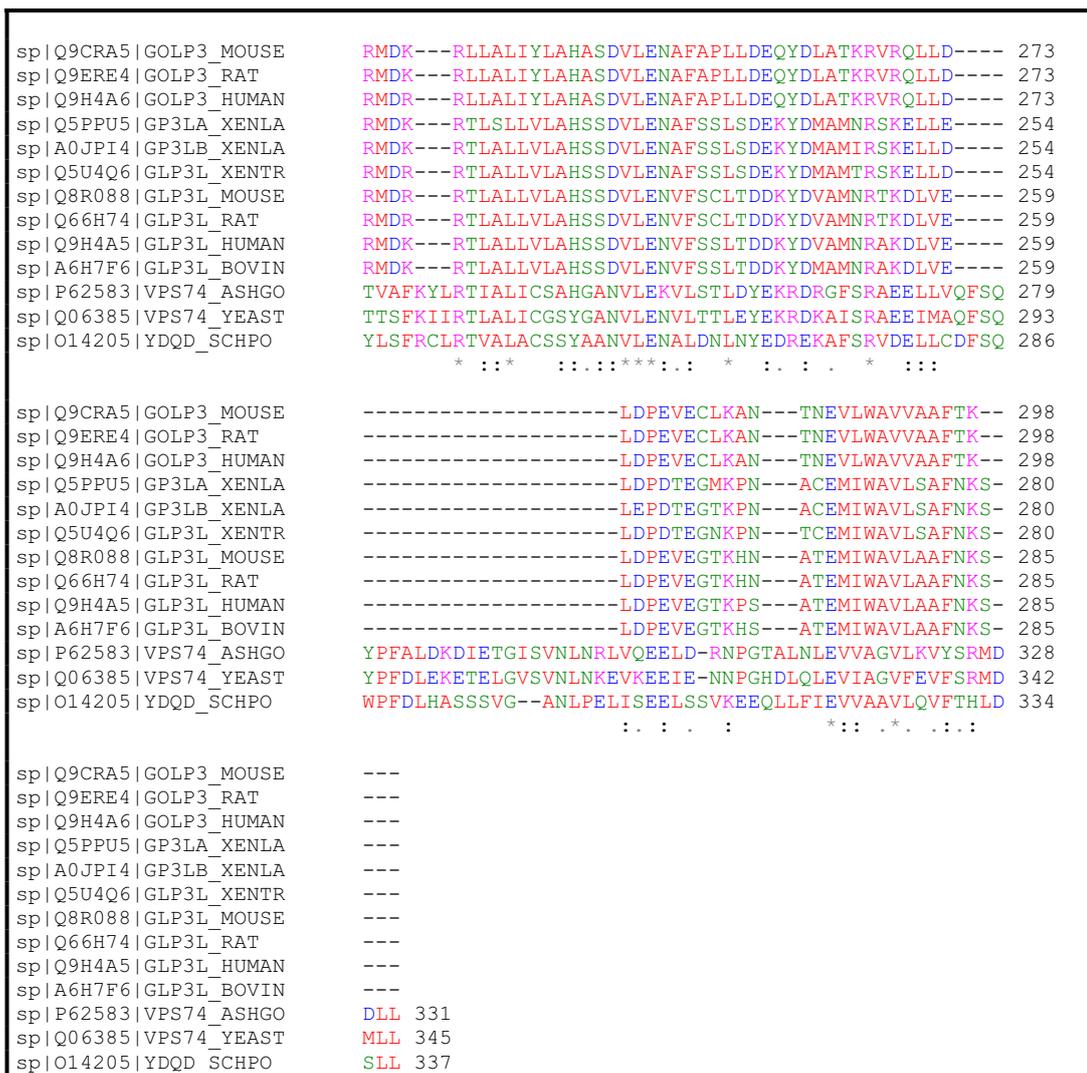


Figura IV.5 Alineamiento de todos los miembros descritos de la familia de *VPS74/GOLPH3*. Se puede apreciar la alta homología entre las distintas proteínas, y cómo el aminoácido Arg₉₇ (resaltado con amarillo) se encuentra conservado en todas ellas.

Recientemente se ha conseguido cristalizar y determinar la estructura de la proteína Vps74p de *S. cerevisiae* (Schmitz *et al.*, 2008) (Fig. IV.6). Esto nos permite localizar, en la proteína plegada, al aminoácido que ha sufrido el cambio y discutir su posible efecto sobre la estructura tridimensional. Los estudios llevados a cabo por el mismo grupo que la cristalizó, revelaron que dicha proteína forma tetrámeros, que son la forma activa de la misma. La Arg₉₇ se encuentra ubicada en el dominio α_2 , una larga α -hélice situada en el interior de la estructura de la molécula. A partir de los modelados tridimensionales de la proteína no parece que el cambio de Arg por Cys provoque un cambio serio en la conformación de la molécula, puesto que la Cys es de menor tamaño que la Arg y su radical estaría orientado en la misma dirección. La Cys, a

diferencia de la Arg, tiene un grupo –SH enormemente reactivo lo que podría llevar a esta nueva Cys a reaccionar con alguna de las otras dos Cys presentes en la molécula, especialmente con una que está situada en la misma hélice a tan solo un aminoácido de distancia. Desconocemos si la proteína Vps74p llega a una forma madura en los mutantes *mnn3* o ni siquiera pasa los controles de calidad del RE debido a un plegamiento incorrecto. En cualquier caso, la hélice $\alpha 2$ en la que se encuentra ubicada no participa activamente en la unión con los otros componentes del tetrámero ni tampoco en la unión a su sustrato (el dominio citosólico de las manosiltransferasas del lumen del aparato de Golgi) aunque sí participa en el lazo de unión $\alpha 1$ - $\alpha 2$ que es responsable de la interacción entre los monómeros. Es muy posible que cualquier alteración en cualquiera de esas dos hélices provocara un cambio de orientación o posición del lazo, impidiendo la polimerización, en caso de que la proteína se pliegue y llegue a la forma madura.

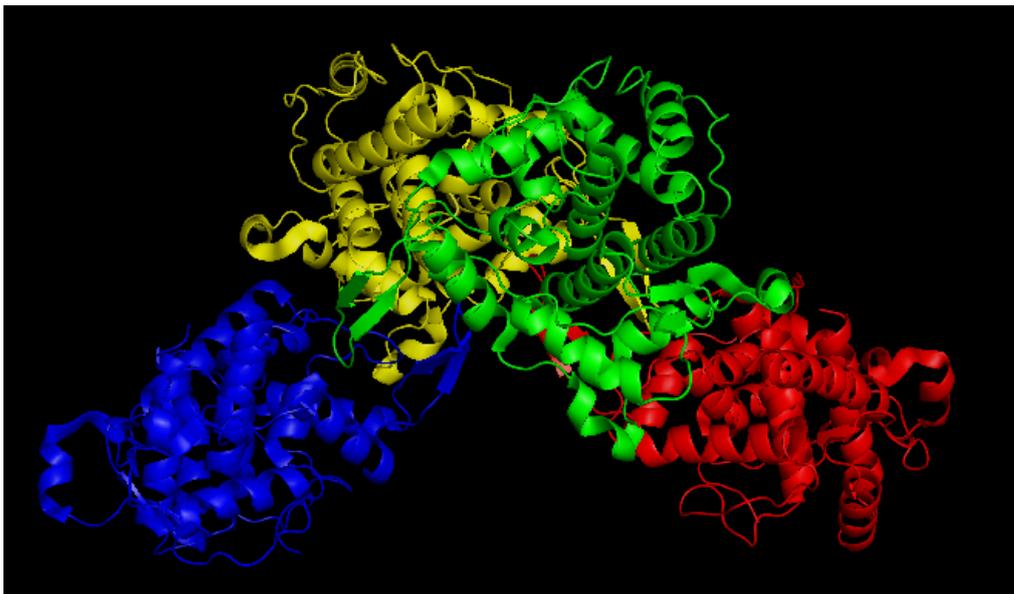


Figura IV.6 Modelado tridimensional de la estructura del tetrámero, realizado a partir de la secuencia publicada por Schmitz *et al.* (2008).

2.3. Sobreexpresión de *YPT6* y *VPS74*. Efecto sobre el fenotipo *ldb*.

YPT6 codifica una GTPasa de la familia Ras involucrada en el reciclaje de proteínas residentes en Golgi desde el endosoma (Li y Warner, 1998; Bensen *et al.*, 2001), mientras que el producto del gen *RIC1* es su factor intercambiador de guanín

nucleótidos (Bensen *et al.*, 2001). La delección de cualquiera de ellos, junto con *VPS74*, da como resultado un fenotipo inviable. Tales hechos parecen indicar que *VPS74* podría estar relacionado con el transporte o la localización de las proteínas de membrana de Golgi, como sería el caso de las responsables de la elongación de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos (*Mnn2p*, *Mnn5p*, *Mnn9p*,...) o de su fosforilación (*Mnn4p*, *Mnn6p*). Creímos, por tanto, de interés comprobar si la sobreexpresión de *YPT6* o *RIC1* producía algún efecto sobre el fenotipo de *vps74Δ*. En este estudio no incluimos finalmente a *RIC1* puesto que durante nuestra búsqueda a escala genómica de genes relacionados con la manosilfosforilación de *N*-oligosacáridos (Corbacho *et al.*, 2005) (ver Capítulo II) encontramos que la delección de *YPT6* producía un fenotipo *ldb* moderado, mientras que *RIC1* presentaba un fenotipo silvestre para esta característica. Este resultado hizo que nuestro interés se centrara exclusivamente en *YPT6* por lo que estudiamos el efecto de la sobreexpresión de *YPT6* en el mutante *vps74Δ*, y viceversa. Para ello utilizamos dos tipos de plásmidos. El primer tipo fueron los plásmidos multicopia de la serie pRS42X (Sikorski y Hieter, 1989). En concreto, utilizamos pRS426 en el cual clonamos, mediante la técnica *TA-Cloning*, los genes *YPT6* y *VPS74*. En ambos casos el inserto contenía las 1000 pb que flanqueaban la ORF a cada lado, con el fin de que se incluyeran los elementos reguladores necesarios para la expresión de la misma, ya que el plásmido no posee promotores ni ningún otro elemento regulador. El segundo tipo de plásmidos multicopia utilizados fueron los de la serie p42X (Mumberg *et al.*, 1994, 1995), muy parecidos a los pRS42X pero con la diferencia de que los P42X incluyen un promotor constitutivo o regulable y un terminador. En este tipo de vector, por tanto, la expresión será constitutiva y de alto rendimiento, a diferencia de los pRS42X en los que la expresión estará sujeta a la regulación de la expresión por parte de la célula. El uso de un vector con expresión constitutiva y uno que no la tiene, ofrece la ventaja de poder estudiar el hipotético efecto sobre la expresión del gen que tenemos clonado. En nuestro caso utilizamos los vectores p423 y p426, ambos con el fuerte promotor del gen de la gliceraldehído 3P deshidrogenasa dependiente de NAD (GPD) y el terminador del gen del citocromo C (*CYC1*). Dado que estos vectores poseen los elementos reguladores necesarios para la expresión constitutiva del gen insertado, sólo se clonó la secuencia codificante de los genes *VPS74* e *YPT6* sin incluir regiones flanqueantes.

Las dos características fenotípicas que se estudiaron eran las dos más relevantes desde nuestro punto de vista: el efecto sobre el fenotipo *ldb* y el efecto sobre la hipoglicosilación. La sobreexpresión del gen *YPT6* en *vps74Δ*, utilizando el vector pRS426-YPT6, no produjo ningún cambio en el fenotipo de las células transformantes (Fig. IV.7A) con respecto al comportamiento frente al colorante azul alcian (fenotipo *ldb*), indicando que o bien no habría interacción entre ellos o que la expresión del gen *YPT6* clonado se veía reprimida o inhibida por algún mecanismo de control celular. Para confirmar o descartar esta última posibilidad se utilizó el plásmido p423-YPT6. En este caso el resultado fue diferente puesto que se apreció una complementación parcial del fenotipo *ldb* en las células de *vps74Δ* transformadas con el plásmido (Fig. IV.7C). La disminución de la intensidad del fenotipo *ldb* indica que el alto grado de expresión que proporcionaba este último plásmido podría paliar en parte la ausencia de *VPS74* y permitir que los *N*-oligosacáridos en tránsito por el Golgi recibieran más grupos manosilfosfato que en las células transformadas con el vector pRS426-YPT6. En este último caso, el nivel de expresión podría ser insuficiente para detectar una mejora, o bien la expresión del gen insertado podría estar activamente reprimida por la célula. La complementación parcial del fenotipo *ldb* confirmaría que ambos genes están relacionados funcionalmente y que un incremento del reciclaje de Mnn6p por parte de Ytp6p, favorecería la fosforilación de las manoproteínas que atraviesan Golgi en la cepa afectada por la mutación/delección de *VPS74*.

Para determinar si la interacción entre ambos genes era bidireccional, realizamos los experimentos contrarios. El gen *VPS74* se sobreexpresó con el plásmido pRS426-VPS74 en células de *ypt6Δ* no detectándose cambio en el fenotipo *ldb* de *ypt6Δ* (Fig. IV.7B). Sin embargo, de igual modo que con el anterior, cuando se utilizó el plásmido p426-VPS74, se produjo una complementación parcial del fenotipo *ldb* mostrado por *ypt6Δ* (Figura IV.7D).

La sobreexpresión de ambos genes, *VPS74* e *YPT6* en la cepa silvestre, utilizando los dos tipos de plásmidos mencionados anteriormente, no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de unión de colorante azul alcian, indicando que el exceso de estas proteínas no interfiere negativamente sobre la propia maquinaria de manosilfosforilación.

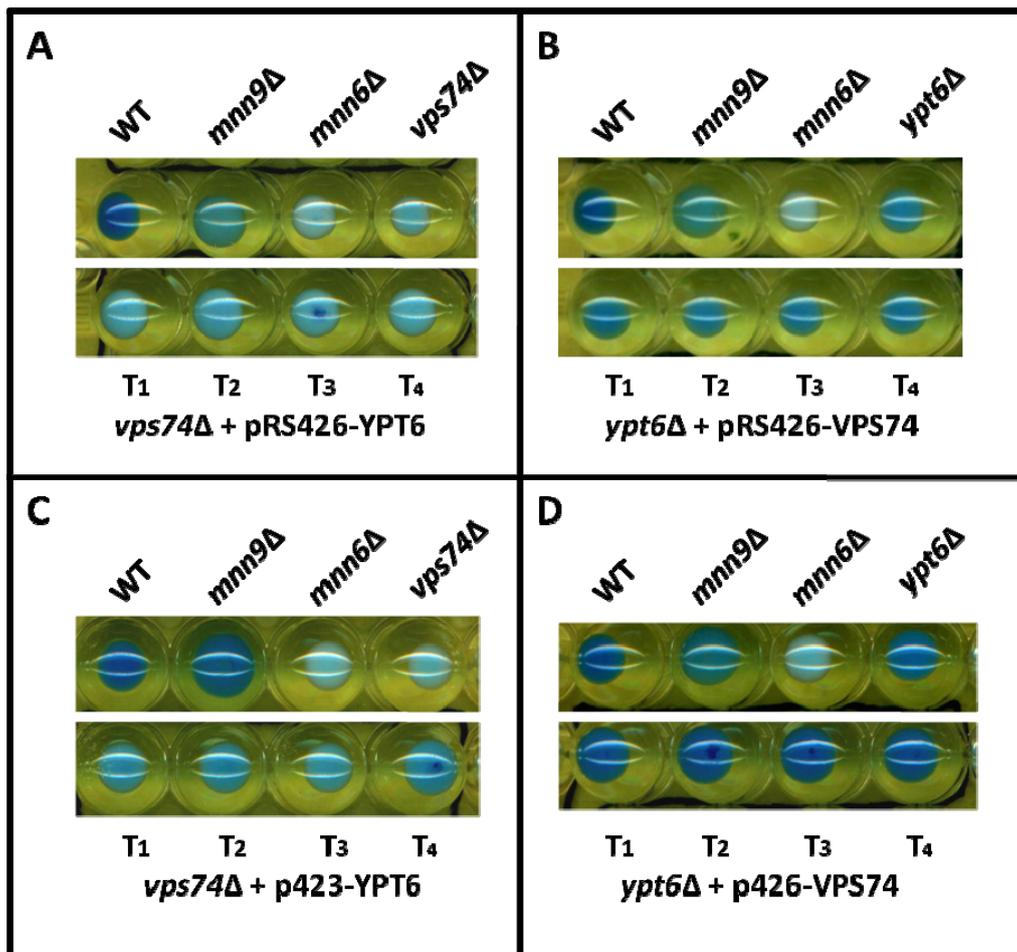


Figura IV.7 Efecto de la sobreexpresión de *YPT6* y *VPS74* sobre el fenotipo *ldb* de *vps74Δ* e *ypt6Δ*. Se muestran las cepas control (WT, *mnn9Δ* y *mnn6Δ*) y las cepas *vps74Δ* e *ypt6Δ* junto con 4 transformantes (T1-T4), en cada caso, con los plásmidos: A, pRS426-*YPT6*; B, pRS426-*VPS74*; C, p423-*YPT6*; y D, p426-*VPS74*.

En principio, estos resultados apuntaban a que *VPS74* podía tener una función similar o relacionada con la de *YPT6*, probablemente en el reciclaje de enzimas de las membranas de Golgi que se pierden a través de la ruta secretora.

2.4. Sobreexpresión de *MNN6* en *vps74Δ* e *ypt6Δ*

A la vista de los resultados expuestos más arriba, pensamos que sería interesante sobreexpresar el gen *MNN6* en *vps74Δ* y en *ypt6Δ* con el fin de comprobar si el incremento en la cantidad de Mnn6p, aunque fuese en tránsito, supliría las pérdidas por falta de reciclaje de la misma en la cepa *ypt6Δ* y, probablemente, también en *vps74Δ*.

En ambos casos y utilizando los dos tipos de plásmidos mencionados, los resultados fueron negativos, es decir, las transformaciones no modificaron el fenotipo *ldb* de ninguno de los dos mutantes (Fig. IV.8). Una posible explicación para estos resultados sería que los dos mutantes carecen de los mecanismos adecuados para retener exceso de Mnn6p producido que, por defecto, seguiría la ruta secretora, presumiblemente hasta la vacuola. En consecuencia, los niveles de Mnn6p en las cisternas apropiadas de Golgi, seguirían siendo más bajos que en la cepa silvestre, igual que ocurre con otras enzimas de Golgi.

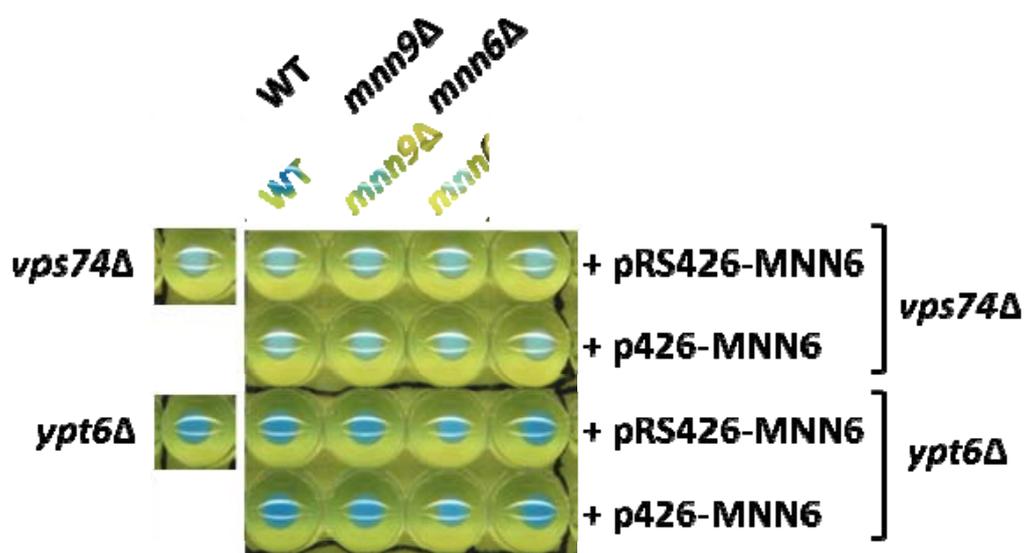


Figura IV.8 efecto de la sobreexpresión del gen *MNN6* en las cepas *vps74Δ* e *ypt6Δ* con respecto al fenotipo de unión al colorante azul alcian (fenotipo *ldb*).

2.5. Sobreexpresión de *YPT6* y *VPS74*. Efecto sobre la glicosilación.

El siguiente paso fue comprobar si la sobreexpresión de estos genes afectaba a la glicosilación en general en lugar de sólo a la manosilfosforilación. Al igual que en los capítulos previos, el grado de hipoglicosilación se midió determinando el tamaño de la invertasa secretada mediante electroforesis en condiciones nativas. El mutante *vps74Δ* presenta un patrón de migración de la invertasa de tipo heterogéneo (Fig. IV.9A) indicando la presencia de glicofomas de muy diverso tamaño, debido a un funcionamiento incorrecto de la maquinaria de glicosilación. El mutante *ypt6Δ* presenta un patrón de migración de la invertasa indistinguible del que muestra el

silvestre.

La sobreexpresión de *YPT6* en *vps74Δ* no produjo ningún cambio detectable en el patrón de glicosilación heterogéneo de las células transformadas, con ninguno de los dos tipos de plásmido (Fig. IV.9, Panel A). Tampoco se observaron cambios en el patrón de glicosilación de la invertasa de *ypt6Δ* cuando se sobreexpresó *VPS74* con cualquiera de los plásmidos utilizados (Fig. IV.9, Panel B). Estos resultados son lógicos ya que, a diferencia de lo que sucede con *vps74Δ*, el patrón de glicosilación de la invertasa de *ypt6Δ* es indistinguible del que exhibe la cepa silvestre.

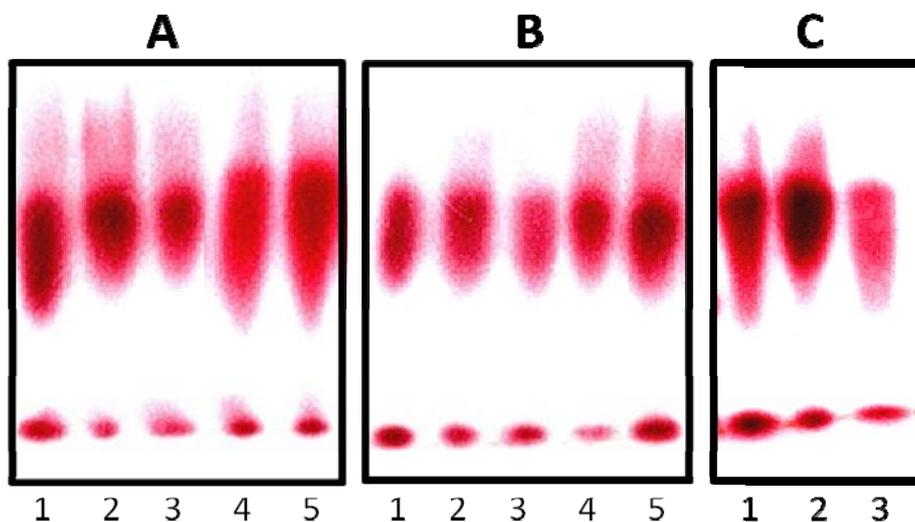


Figura IV.9 Electroforesis en condiciones nativas de la invertasa secretada en las cepas transformadas. **Panel A:** Calle 1, *vps74Δ*; Calle 2, *vps74Δ*+pRS316URA3-VPS74 transformante 1; Calle 3, *vps74Δ*+pRS426URA3-VPS74 transformante 2; Calle 4, *vps74Δ*+pRS316URA3-YPT6 transformante 1; Calle 5, *vps74Δ*+pRS426URA3-YPT6 transformante 2. **Panel B:** Calle 1, *ypt6Δ*; Calle 2, *ypt6Δ*+pRS316URA3-VPS74 transformante 1; Calle 3, *ypt6Δ*+pRS426URA3-VPS74 transformante 2; Calle 4, *ypt6Δ*+pRS316URA3-YPT6 transformante 1; Calle 5, *ypt6Δ*+pRS426URA3-YPT6 transformante 2. **Panel C:** Calle 1, WT+pRS426-VPS74 transformante 1; Calle 2, WT; Calle 3, WT+p426-VPS74

Un resultado inesperado fue que las células de la cepa silvestre, que se utilizaron como control, transformadas con plásmidos portando el gen *VPS74* producían una ligera modificación en el patrón de migración de la invertasa, apareciendo moléculas con un tamaño medio ligeramente inferior (Fig. IV.9, Panel C). Este resultado sugiere que el exceso de Vps74p produce un efecto negativo sobre la maquinaria de glicosilación en general aunque, como se vio en el apartado anterior, no fuimos capaces de detectar el mismo efecto específicamente sobre la maquinaria de manosilfosforilación, utilizando como prueba la tinción con azul alcian.

2.6. Función de *VPS74/MNN3*

La inviabilidad del mutante delecionado en *VPS74* e *YPT6* simultáneamente, incluso la inviabilidad del mutante delecionado en *VPS74* y en el gen del factor intercambiador de guanín nucleótidos de Ypt6p, *RIC1*, sugería una posible función paralela de Vps74p a la de Ypt6p. Ypt6p participa en la recuperación de enzimas y otras proteínas de las membranas de Golgi que se han ido perdiendo a través de la ruta secretora arrastradas en vesículas de secreción/transporte hacia otros compartimentos como el endosoma. Por otra parte, en este trabajo hemos visto que *vps74Δ* resulta más afectado en la unión al colorante azul alcian, así como en la glicosilación, que el *ypt6Δ*. Todo ello, nos llevó a pensar que la función de Vps74p sería, de alguna manera, redundante con la de Ypt6p, si bien, Vps74p debería actuar en un paso previo a aquél en el que está implicada la Ypt6p. La actividad de Vps74p se desarrollaría, probablemente en el aparato de Golgi ya que la carencia de Vps74p produce efectos más evidentes sobre los procesos de manosilfosforilación y, sobre todo, sobre la elongación de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos y sus ramificaciones.

Además, el hecho de que la mutación/delección de *VPS74* produzca glicofomas tan variadas de la invertasa (Fig. IV.9, Panel A, Calle 1) y la disminución de los niveles de fosfato de las glicoproteínas (Fig. IV.7, paneles A y C) indicaría que Vps74p afecta a actividades localizadas a lo largo de todo el aparato de Golgi, presumiblemente al transporte *intra*-Golgi.

Estas deducciones se fueron confirmando con los estudios de complementación cruzada de *YPT6* y *VPS74*. Cuando se transformaron las células *vps74Δ* con un plásmido de sobreexpresión constitutiva con el gen *YPT6*, no se detectaron cambios en el modelo de glicosilación de la invertasa (Fig. IV.9, Panel A) ya que las glicosidasas responsables de la elongación de la cadena externa se encuentran localizadas secuencialmente a lo largo de todo el Golgi, por lo que se verían muy poco (o nada) afectadas por la acción de Ypt6p. Sin embargo, sí se detectó complementación parcial del fenotipo *ldb* de las células *vps74Δ* transformadas. Esta complementación parcial se podría explicar porque la sobreexpresión de Ypt6p incrementaría el reciclaje de

proteínas de las cisternas distales de Golgi, desde el endosoma. Entre estas proteínas se encuentra la manosilfosfotransferasa Mnn6p. El aumento de los niveles de Mnn6p en las cisternas distales de Golgi, produciría un incremento de la manosilfosforilación, que no daría lugar a un fenotipo *ldb* silvestre, ya que estaría limitada por la escasez de sustrato correctamente glicosilado (con las secuencias aceptoras adecuadas) a su paso por las distintas cisternas de Golgi.

En el caso de la transformación del mutante *ypt6Δ* con un plásmido de sobreexpresión constitutiva con el gen *VPS74*, no se apreció cambio en el patrón de glicosilación de la invertasa (Fig. IV.9, Panel B). El resultado era esperable, ya que la mutación/delección de *YPT6* afectaría, principalmente, un paso posterior al transporte *intra*-Golgi. La localización de las manosiltransferasas en *ypt6Δ* no se ve afectada por la mutación y, por tanto, el patrón de glicosilación de la invertasa es indistinguible del que exhibe la cepa silvestre. En cuanto a la ligera complementación del fenotipo *ldb* de *ypt6Δ*, observada al sobreexpresar constitutivamente *Vps74p*, podría deberse a un incremento del transporte *intra*-Golgi, que determinaría el aumento del nivel de manosiltransferasas en la localización correcta, a lo largo de las cisternas. Esto traería como consecuencia un ligero incremento del aporte de sustrato correctamente glicosilado a Mnn6p permitiendo así que aumente, en cierta medida, su actividad.

En lo referente a la transformación de células *vps74Δ* con un plásmido de sobreexpresión constitutiva con el gen *MNN6*, el aumento de los niveles de Mnn6p no produjo cambios detectables sobre el fenotipo *ldb* del mutante. Este resultado podría explicarse porque si *Vps74p* afecta a la localización de las glicosiltransferasas, y glicosilfosfatotransferasas, en las cisternas de Golgi apropiadas, un aumento de la expresión de Mnn6p no tendría efecto, al menos detectable, en el mutante. Por un lado porque, como dijimos más arriba, la manosilfosforilación estaría limitada por la escasez de sustrato correctamente glicosilado y, por otro, porque al no haber mecanismos para retener el exceso de Mnn6p producido, ésta seguiría la ruta secretora, presumiblemente hasta la vacuola.

En cuanto a la transformación de *ypt6Δ* con un plásmido de sobreexpresión constitutiva con el gen *MNN6*, el que no se aprecien cambios en el fenotipo *ldb* se

explicaría en parte como en *vps74Δ*, porque el exceso de Mnn6p no sería retenido. En *ypt6Δ*, el paso del exceso de Mnn6p a la vacuola se agravaría aún más por el defecto que presenta el *ypt6Δ* en reciclaje de proteínas desde el endosoma a Golgi.

Los experimentos descritos anteriormente se realizaron antes de la publicación de la estructura y posible función de *VPS74* (Schmitz *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008). La publicación de esos trabajos complementa nuestros estudios y confirma nuestras deducciones, suponiendo un avance definitivo en el conocimiento de la función de Vps74p. Schmitz *et al.* (2008) propusieron que Vps74p se organiza en tetrámeros en el lado citosólico de la membrana del aparato de Golgi, para poder interactuar con el pequeño dominio citosólico que tienen las manosiltransferasas de *cis* y *medial*-Golgi. Los tetrámeros tendrían la función de retener dichas proteínas de membrana en las cisternas del aparato de Golgi en las que deben realizar su función. Se sabe que uno de los mecanismos de reciclaje de enzimas de Golgi desde las cisternas más distales hacia las de las zonas *cis*- o *media* podría producirse a través de vesículas COP I. Tu *et al.* (2008) han propuesto que Vps74p sería un componente de la maquinaria de transporte vesicular Golgi-RE, actuando como receptor para el transporte específico de glicosiltransferasas, mediante el reconocimiento de determinadas señales presentes en las colas citoplasmáticas de las mismas. Al mismo tiempo, Vps74p se uniría a determinadas subunidades de coatómero de las vesículas COP I, asegurando así el transporte específico, a través de dichas vesículas, de las glicosiltransferasas e impidiendo que abandonen Golgi. Una de las proteínas que presentan la señal de selección antedicha es Mnn6p. Por tanto, parece que Vps74p tiene un papel fundamental en la retención de Mnn6p en Golgi, probablemente mediante un mecanismo y en un paso diferente de aquel en el que actúa *YPT6*, pero que explicaría la redundancia en la actuación de ambas proteínas y la letalidad de ambas mutaciones cuando se producen en una misma célula.

3. REFERENCIAS

- Ballou, C. E. (1990). "Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects." *Methods Enzymol.* **185**: 445-470.
- Ballou, C. E., Kern, K. A. and Raschke, W. C. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Complementation studies and properties of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4667-4671.

- Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S. and Ballou, C. E. (1991). "Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(8): 3209-3212.
- Bensen, E. S., Yeung, B. G. and Payne, G. S. (2001). "Ric1p and the Ypt6p GTPase function in a common pathway required for localization of trans-Golgi network membrane proteins." *Mol. Biol. Cell* **12**(1): 13-26.
- Cohen, R. E., Ballou, L. and Ballou, C. E. (1980). "*Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein mutants. Isolation of the *mnn5* mutant and comparison with the *mnn3* strain." *J. Biol. Chem.* **255**(16): 7700-7707.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2005). "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides." *Fungal Genet. Biol.* **42**(9): 773-790.
- Karson, E. M. and Ballou, C. E. (1978). "Biosynthesis of yeast mannan. Properties of a mannosylphosphate transferase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **253**(18): 6484-6492.
- Li, B. and Warner, J. R. (1998). "Genetic interaction between *YPT6* and *YPT1* in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**(10): 915-922.
- Luo, Z. and Gallwitz, D. (2003). "Biochemical and genetic evidence for the involvement of yeast Ypt6-GTPase in protein retrieval to different Golgi compartments." *J. Biol. Chem.* **278**(2): 791-799.
- Markgraf, D. F., Peplowska, K. and Ungermann, C. (2007). "Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system." *FEBS Lett.* **581**(11): 2125-2130.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994). "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression." *Nucleic Acids Res.* **22**(25): 5767-5768.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." *Gene* **156**(1): 119-122.
- Pelham, H. R. B. and Munro, S. (1993). "Sorting of membrane proteins in the secretory pathway." *Cell* **75**(4): 603-605.
- Raschke, W. C., Kern, K. A., Antalis, C. and Ballou, C. E. (1973). "Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants." *J. Biol. Chem.* **248**(13): 4660-4666.
- Rothman, J. E. and Wieland, F. T. (1996). "Protein sorting by transport vesicles." *Science* **272**(5259): 227-234.
- Schmitz, K. R., Liu, J., Li, S., Setty, T. G., Wood, C. S., Burd, C. G. and Ferguson, K. M. (2008). "Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer." *Dev. Cell* **14**(4): 523-534.
- Segev, N. (2001). "Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions." *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**(4): 500-511.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **122**(1): 19-27.
- Siniossoglou, S. (2005). Affinity purification of Ypt6 effectors and identification of TMF/ARA160 as a Rab6 interactor. *Methods in Enzymology*, Academic Press. **Volume 403**: 599-607.
- Spelbrink, R. G. and Nothwehr, S. F. (1999). "The yeast *GRD20* gene is required for protein sorting in the trans-Golgi network/endosomal system and for polarization of the actin cytoskeleton." *Mol. Biol. Cell* **10**(12): 4263-4281.
- Tong, A. H. Y., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. F., Brost, R. L., Chang, M., Chen, Y., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D. S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson, J. N., Lu, H., Menard, P., Munyana, C., Parsons, A. B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A.-M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S. L., Zhang, L. V., Zhu, H., Burd, C. G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F. P., Brown, G. W., Andrews, B., Bussey, H. and Boone, C. (2004). "Global mapping of the yeast genetic interaction network." *Science* **303**(5659): 808-813.
- Tu, L., Tai, W. C. S., Chen, L. and Banfield, D. K. (2008). "Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi." *Science* **321**(5887): 404-407.
- Zhang, J., Schulze, K. L., Hiesinger, P. R., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R. A., Bellen, H. J. and Scott, M. P. (2007). "Thirty-one flavors of *Drosophila* Rab proteins." *Genetics* **176**(2): 1307-1322.

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LOS MUTANTES *MNN2* Δ Y *MNN3* Δ DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MEDIANTE MICROARRAYS DE ADN

1. INTRODUCCIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Análisis del transcriptoma de *mnn2* Δ

2.1.1. Metabolismo y energía

2.1.2. Transcripción

2.1.3. Transporte celular

2.1.4. Ciclo celular y procesamiento del ADN

2.1.5. Proteínas no clasificadas y otros grupos

2.1.6. Consideraciones sobre el análisis del transcriptoma de *mnn2* Δ

2.2 Análisis del transcriptoma de *vps74/mnn3* Δ

2.2.1. Biogénesis de componentes celulares

2.2.2. Comunicación celular/Transducción de señales

2.2.3. Ciclo celular y procesamiento del ADN

2.2.4. Destino de proteínas

2.2.5. Diferenciación celular

2.2.6. Interacción con el entorno

2.2.7. Metabolismo y energía

2.2.8. Rescate celular, defensa y virulencia

2.2.9. Transcripción

2.2.10. Transporte celular, sistemas y rutas de transporte

2.2.11. ORFs no caracterizadas

2.2.12. Consideraciones sobre el análisis del transcriptoma de *vps74/mnn3* Δ

3. REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han utilizado frecuentemente estudios de *microarrays* de ADN para analizar el efecto de diferentes condiciones externas sobre el transcriptoma de *S. cerevisiae* (Erasmus *et al.*, 2003; Boorsma *et al.*, 2004; Kleinschmidt *et al.*, 2005; Zakrzewska *et al.*, 2005). También se han utilizado para determinar posibles cambios en el transcriptoma de cepas con deleciones de un solo gen (Lagorce

et al., 2003). Mientras se llevaban a cabo los estudios descritos en los Capítulos I-IV, el doctorando tuvo acceso a la técnica de *microarrays* durante una estancia corta en el Centro de Levaduras de la Universidad de Gotemburgo (Suecia) gracias a una Beca Marie Curie de la Unión Europea. Los mutantes *mnn* seleccionados para el estudio son los que se indican a continuación.

Como ya se señaló en la Introducción general (Sección 3.3), el gen *MNN2* codifica una $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa que cataliza la transferencia de la primera manosa de las ramificaciones de la cadena externa en los *N*-oligosacáridos (Rayner y Munro, 1998) pero que no tiene efectos detectables en la región del núcleo interno. Al igual que *mnn3*, *mnn4* y *mnn6*, el mutante *mnn2* presenta un “fenotipo *ldb* severo” seguramente por un efecto indirecto consecuencia de la falta de las secuenciasceptoras de las ramificaciones (Hernández *et al.*, 1989a; Hernández *et al.*, 1989b). En un trabajo más reciente, encontramos que la transferencia de grupos manosilfosfato a uno de los dos posibles sitios de fosforilación en la región del núcleo interno estaba también afectada en *mnn2* lo cual sugería una cierta influencia del producto del gen *MNN2* en el proceso de fosforilación (Olivero *et al.*, 2000). Este resultado, además, difería de los obtenidos con otros mutantes con fenotipo *ldb* severo como *mnn4*, *mnn6*, *ldb1* y *ldb2*. En ninguno de estos casos se han observado diferencias detectables en la inhibición de la transferencia de grupos manosilfosfato a los dos sitios posibles de fosforilación en el núcleo interno (Hernández *et al.*, 1989a; Hernández *et al.*, 1989b; Mañas *et al.*, 1997). Los datos fenotípicos del *mnn2* sugerían, por tanto, una relación entre la función de Mnn2p y la transferencia de grupos manosilfosfato.

El mutante *mnn3*, estudiado en el Capítulo IV, era el único mutante *mnn* aislado en el que aun no se había identificado el gen mutado responsable del fenotipo. Una vez identificado el gen *MNN3* como sinónimo de *VPS74* y dado que Vps74p no tenía función conocida en aquel momento (Bonangelino *et al.*, 2002), decidimos analizar su transcriptoma con el fin de intentar aclarar su función y/o interacciones.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Análisis del transcriptoma de *mnn2Δ*

Al analizar el transcriptoma del mutante deleciónado *mnn2Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* encontramos un gran número de genes con niveles de expresión alterados con respecto al silvestre, pero sólo se consideraron aquellos con un nivel de expresión alterado al menos en un factor de dos con respecto al control. De ese modo seleccionamos 151 genes, 58 de los cuales tenían su expresión aumentada (Tabla V.1) y 93 la tenían reducida (Tabla V.2). Para facilitar el análisis y la interpretación, los genes se agruparon en categorías funcionales, de acuerdo con las bases de datos MIPS y SGD, teniendo en cuenta que algunos es posible asignarlos a más de una categoría.

Tabla V.1 Genes cuya expresión se ve aumentada en el mutante *mnn2Δ*.

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Biogénesis de componentes celulares			
YDL222C	<i>FMP45</i>	4,88	Proteína localizada en la mitocondria; proteína cortical; no requerida para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables; requerida para la viabilidad en fase estacionaria
YDR402C	<i>DIT2</i>	16,40	Enzima específica de esporulación necesaria para la maduración de la pared de la espora
Ciclo celular y procesamiento del ADN			
YBR186W	<i>PCH2</i>	2,24	Componente nucleolar del punto de control del paquiteno
YDR227W	<i>SIR4</i>	4,60	Regulador de la información silenciada junto con SIR2 y SIR3 en los telómeros
YEL032W	<i>MCM3</i>	2,49	Proteína involucrada en la replicación del ADN
YER111C	<i>SWI4</i>	2,00	Componente de unión a ADN del complejo SBF
YFL024C	<i>EPL1</i>	9,44	Componente del complejo de la acetiltransferasa de la NuA4
YGL045W	<i>RIM8</i>	9,48	Proteína de función desconocida
YGL201C	<i>MCM6</i>	6,52	Proteína involucrada en la replicación del ADN
YIL128W	<i>MET18</i>	9,15	Reparación del ADN y regulador TFIH
YJR094C	<i>IME1</i>	2,39	Regulador principal de meiosis activo sólo durante eventos mitóticos
YMR156C	<i>TPP1</i>	4,19	ADN 3'-fosfatasa que funciona en la reparación del ADN de doble cadena
YMR168C	<i>CEP3</i>	5,06	Proteína esencial del cinetocoro, componente del complejo CBF3
YOR005C	<i>DNL4</i>	6,95	ADN ligasa dependiente de ATP
YPL122C	<i>TFB2</i>	3,23	Subunidad de los complejos TFIH y del factor 3 de reparación de escisión de nucleótidos
Destino celular (<i>cell fate</i>)			
YGL169W	<i>SUA5</i>	2,28	Proteína necesaria para el crecimiento respiratorio
YMR212C	<i>EFR3</i>	2,46	Proteína no esencial de función desconocida
Destino de proteínas (<i>protein fate</i>)			
YPL227C	<i>ALG5</i>	2,75	UDP-glucosa:dolicol-fosfato glucosiltransferasa
Diferenciación celular			
YMR100W	<i>MUB1</i>	3,67	Regulación de la gemación
Metabolismo y energía			
YBL011W	<i>SCT1</i>	2,63	Glicerol 3-fosfato/dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa dual específica de sustrato
YBL068W	<i>PRS4</i>	6,13	5-fosfo-ribosil-1(α)-pirofosfato sintetasa
YBR006W	<i>UGA2</i>	9,83	Succinato semialdehído deshidrogenasa
YBR036C	<i>CSG2</i>	21,27	Proteína necesaria para la manosilación de inositolfosoceramida y el crecimiento a altas concentraciones de calcio
YFL018C	<i>LPD1</i>	2,81	Dihidrolipoamida deshidrogenasa componente de los complejos multienzimáticos de la piruvato deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa
YFR055W		2,92	ORF hipotética
YIL125W	<i>KGD1</i>	2,50	Componente del complejo mitocondrial de la α-cetoglutarato deshidrogenasa
YMR101C	<i>SRT1</i>	2,96	<i>cis</i> -preniltransferasa involucrada en la síntesis de dolicoles de cadena larga
YPL276W		4,33	Formato deshidrogenasa dependiente de NAD(+)
Proteína con función de unión o requerimiento de cofactor			
YPL074W	<i>YTA6</i>	3,32	Posible ATPasa
Síntesis de proteínas			
YDR429C	<i>TIF35</i>	7,04	Subunidad del factor iniciador de la transcripción eIF3
YHR091C	<i>MSR1</i>	4,92	Arginil-ARNt sintetasa mitocondrial
YJL136C	<i>RPS21B</i>	5,61	Proteína componente de la subunidad pequeña (40S) del ribosoma

Tabla V.1 Continuación

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Transcripción			
YBL074C	<i>AAR2</i>	4,99	Componente del snRNP U5
YDL209C	<i>CWC2</i>	2,48	Proteína involucrada en el procesamiento del pre-ARNm
YER068W	<i>MOT2</i>	3,95	Componente del complejo regulador de la transcripción CCR4-NOT
YGL254W	<i>FZF1</i>	2,72	Factor de transcripción involucrado en el metabolismo del sulfito
YJL138C	<i>TIF2</i>	3,20	Factor de iniciación de la traducción eIF4
YKL222C		4,50	ORF hipotética
YLR014C	<i>PPR1</i>	2,49	Factor de transcripción que regula positivamente la transcripción en la biosíntesis del uracilo
YML080W	<i>DUS1</i>	3,44	Dihidrouridina sintetasa
YPL011C	<i>TAF3</i>	8,62	Subunidad del TFIID
Transporte celular, sistemas y rutas de transporte			
YBR037C	<i>SCO1</i>	2,27	Posible función en el transporte de cobre a la citocromo C oxidasa
YCR010C	<i>ADY2</i>	2,36	Transportador de acetato necesario para la esporulación normal
YLL028W	<i>TPO1</i>	4,80	Transportador multidroga dependiente de fuerza protón-motriz
ORFs no clasificadas			
YBR270C	<i>BIT2</i>	3,67	ORF hipotética
YDL177C		5,88	ORF hipotética
YDR051C		2,00	ORF hipotética
YER156C		2,00	ORF hipotética
YER189W		3,93	ORF hipotética
YFL015C		15,51	ORF hipotética
YGL165C		2,25	ORF hipotética
YGR051C		2,07	ORF hipotética
YIL176C		2,14	ORF hipotética
YJR008W		6,62	ORF hipotética
YML083C		2,88	ORF hipotética
YMR144W		5,23	ORF hipotética
YOR228C		2,56	ORF hipotética
YOR366W		3,06	ORF hipotética

Tabla V.2 Genes cuya expresión se ve reducida en el mutante *mnn2Δ*

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Biogénesis de componentes celulares			
YDR077W	<i>SED1</i>	-3,49	Glicoproteína de la superficie celular
YFR049W	<i>YMR31</i>	-2,09	Proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial
YLR390W	<i>ECM19</i>	-2,04	Proteína no esencial de función desconocida
YLR390Wa	<i>CCW14</i>	-2,00	Proteína de respuesta a estrés secretorio
YLR453C	<i>RIF2</i>	-2,67	Ayuda a controlar la longitud de los telómeros y establecer el silenciamiento telomérico
YPR154W	<i>PIN3</i>	-2,00	Proteína que induce la aparición del prión [PIN+] cuando se sobreexpresa
Ciclo celular y procesamiento del ADN			
YBR211C	<i>AME1</i>	-2,49	Regulador de la estabilidad de los microtúbulos
YNR067C	<i>DSE4</i>	-2,67	Degrada la pared celular causando la separación de la célula madre de la hija
YOR351C	<i>MEK1</i>	-2,47	Proteín quinasa específica de meiosis
Comunicación celular / Transducción de señales			
YJL164C	<i>TPK1</i>	-2,83	Posible subunidad catalítica de proteín quinasa dependiente de AMPc
YKL159W	<i>RCN1</i>	-2,00	Proteína involucrada en la regulación de calcineurina durante la señalización de calcio
Rescate celular, defensa y virulencia			
YBR072W	<i>HSP26</i>	-2,25	Proteína de choque térmico inducida por calor, fase estacionaria y esporulación
YCL033C		-2,00	ORF hipotética
YJL159W	<i>HSP150</i>	-2,58	Proteína de choque térmico
YMR251Wa	<i>HOR7</i>	-2,60	Proteína de función desconocida
YPR093C	<i>ASR1</i>	-2,11	Proteína involucrada en una ruta putativa de señalización de alcohol
Destino de proteínas (proteín fate)			
YBR139W		-2,19	ORF hipotética
YDR247W	<i>VHS1</i>	-2,00	Serín/treonín proteín quinasa citoplasmática
YKL161C		-2,84	Proteín quinasa tipo Mpk1
YNL159C	<i>ASI2</i>	-2,84	Posible papel regulatorio negativo en la captación de aminoácidos
YOL133W	<i>HRT1</i>	-3,82	Subunidad de SCF
YOR285W		-2,00	ORF hipotética
YOR327C	<i>SNC2</i>	-2,00	Mediador en transporte y destino de proteínas secretorias
YPL148C	<i>PPT2</i>	-6,96	Fosfopanteteín:proteín transferasa (PPTasa)
YPR151C	<i>SUE1</i>	-3,07	Proteína mitocondrial necesaria para la degradación de formas inestables del citocromo C
Interacción con el entorno			
YNL160W	<i>YGP1</i>	-4,27	Glicoproteína sintetizada como respuesta a la limitación de nutrientes
YOR031W	<i>CRS5</i>	-3,82	Metalotioneína de unión a cobre, necesaria para la resistencia tipo silvestre a cobre
Metabolismo y energía			
YDL124W		-2,00	α -cetoamido reductasa dependiente de NADPH
YHR215W	<i>PHO12</i>	-2,04	Fosfatasa ácida represible
YJR034W	<i>PET191</i>	-4,30	Proteína necesaria para el ensamblaje de la citocromo C oxidasa
YJR159W	<i>SOR1</i>	-2,77	Sorbitol deshidrogenasa
YKR097W	<i>PCK1</i>	-2,00	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
YLR231C	<i>BNA5</i>	-2,53	Kinureinasa, necesaria para la biosíntesis de ácido nicotínico
YNL037C	<i>IDH1</i>	-2,21	Subunidad de la isocitrato deshidrogenasa mitocondrial dependiente de NAD(+)
YNL316C	<i>PHA2</i>	-2,00	Prefenato deshidratasa, cataliza la conversión de prefenato a fenolpiruvato
YNL332W	<i>THI12</i>	-2,08	Proteína involucrada en la síntesis del precursor de tiamina hidroximetilpirimidina
YNR002C	<i>FUN34</i>	-2,00	Proteína transmembrana putativa, involucrada en la producción de amoniaco
YOL165C	<i>AAD15</i>	-2,30	Putativa aril-alcohol deshidrogenasa
YOR280C	<i>FSH3</i>	-2,12	Serín hidrolasa
YPL017C		-2,02	Putativa metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
YPR167C	<i>MET16</i>	-2,40	3'-fosfoadenilsulfato reductasa

Tabla V.2 Continuación

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Transcripción			
YLR136C	<i>TIS11</i>	-3,48	Proteína de unión a ARNm expresada durante la escasez de hierro
YLR145W	<i>RMP1</i>	-2,82	Proteína componente del complejo ARNasa MRP
YIR017C	<i>MET28</i>	-2,59	Activador transcripcional, participa en la regulación del metabolismo de azufre
YLR438CA	<i>LSM3</i>	-2,42	Proteína snRNP
YOR380W	<i>RDR1</i>	-2,30	Represor transcripcional involucrado en el control de resistencia multidrogas
YKL099C	<i>UTP11</i>	-2,19	Proteína nucleolar, componente de la subunidad pequeña del procesoma
YLR418C	<i>CDC73</i>	-2,06	Sustituto del complejo Paf1
YNL282W	<i>POP3</i>	-2,04	Subunidad de la ARNasa MRP y la ANRasa P
YDR259C	<i>YAP6</i>	-2,00	Factor de transcripción bZIP
Transporte celular, sistemas y rutas de transporte			
YOR383C	<i>FIT3</i>	-7,12	Proteína celular involucrada en el transporte de hierro
YOR382W	<i>FIT2</i>	-4,71	Proteína celular involucrada en el transporte de hierro
YPL019C	<i>VTC3</i>	-3,93	Metabolismo del fosfato
YPL006W	<i>NCR1</i>	-3,69	Proteína de membrana vacuolar que transita a través de la ruta de biosíntesis y transporte de proteínas vacuolares
YOR153W	<i>PDR5</i>	-3,60	Transportador de membrana ABC multidroga
YKL041W	<i>VPS24</i>	-2,96	Involucrado en secreción
YOR348C	<i>PUT4</i>	-2,72	Permeasa de prolina
YOR045W	<i>TOM6</i>	-2,63	Componente del complejo de translocación de proteínas mitocondrial
YOR381W	<i>FRE3</i>	-2,42	Componente transmembrana de la reductasa férrica
YOR069W	<i>VPS5</i>	-2,21	Componente de la cobertura retromérica que recoge proteínas del endosoma tardío
YPR067W	<i>ISA2</i>	-2,20	Proteína necesaria para la maduración de las proteínas Fe/S citosólicas y mitocondriales
YOL082W	<i>ATG19</i>	-2,11	Proteína involucrada en la ruta de citoplasma a vacuola y en autofagia
YGR009C	<i>SEC9</i>	-2,08	Proteína t-SNARE importante para la fusión de vesículas secretoras con la memb. plásm.
ORFs no clasificadas			
YLR169W		-7,78	ORF hipotética
YHR209W		-4,19	Metiltransferasa putativa dependiente de S-adenosilmetionina
YPR195C		-3,47	ORF hipotética
YNL195C		-3,21	ORF hipotética
YPR152C		-2,86	ORF hipotética
YPR177C		-2,69	Proteína necesaria para la viabilidad celular
YPR197C		-2,62	ORF hipotética
YLR283W		-2,57	ORF hipotética
YPR170C		-2,55	ORF hipotética
YMR244Ca		-2,35	ORF hipotética
YDL057W		-2,26	ORF hipotética
YGR016W		-2,25	ORF hipotética
YNR004W		-2,23	ORF hipotética
YKL162C		-2,23	ORF hipotética
YOR081C	<i>STC2</i>	-2,22	Proteína de función desconocida, localizada en partículas lipídicas
YLR042C		-2,18	ORF hipotética
YPR153W		-2,17	ORF hipotética
YJL064W		-2,13	ORF hipotética
YNL140C		-2,11	ORF hipotética
YLR126C		-2,11	ORF hipotética
YNL279W	<i>PRM1</i>	-2,10	Proteína de membrana involucrada en la fusión durante la conjugación
YKL094W	<i>YJU3</i>	-2,09	Proteína de función desconocida, localiza en partículas lipídicas
YBR137W		-2,09	ORF hipotética
YOR044W		-2,07	ORF hipotética
YLR315W	<i>NKP2</i>	-2,05	Proteína no esencial del cinetocoro
YML053C		-2,01	ORF hipotética
YJL169W		-2,00	ORF hipotética
YDR157W		-2,00	ORF hipotética
YOR135C		-2,00	ORF hipotética
YPL067C		-2,00	ORF hipotética

Es interesante destacar que casi todos los genes inducidos por perturbaciones de la pared celular (Boorsma *et al.*, 2004), o involucrados en el CWI (Levin, 2005) no están representados en la Tabla V.1. La única excepción es *SWI4*, el cual tiene su expresión incrementada en un factor de 2 veces. *SWI4* codifica un factor de transcripción activado por Mkp1p. Además, Lagorce *et al.* (2003) encontraron bastantes genes involucrados en la biogénesis de la pared celular cuya expresión se veía incrementada como respuesta a mutaciones de la pared celular, pero ninguno de esos genes está representado en la Tabla V.1 incluso cuando una de las cepas analizadas en ese estudio fue *mnn9Δ* que, como *mnn2Δ*, se encuentra afectada en la construcción de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos. La diferencia entre los fenotipos de *mnn9Δ* y *mnn2Δ* es que en el primero la cadena externa está prácticamente ausente, mientras que en el segundo es deficiente en las ramificaciones pero mantiene el esqueleto constituido por una cadena lineal de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ (Ballou, 1990). Esta diferencia parece ser crítica para determinar la respuesta transcripcional desencadenada en las correspondientes cepas delecionadas. El defecto de *mnn9Δ* parece generar una perturbación en la integridad de la pared celular que es lo suficientemente fuerte para estimular la ruta de CWI, mientras que la presencia en el mutante *mnn2Δ* de la cadena lineal de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ parece estabilizar la estructura de la pared celular y evitar la estimulación de esa ruta.

El trabajo de Lagorce *et al.* (2003) mostró un grupo de 79 genes co-regulados que definen un grupo compensatorio de la pared celular, los cuales se veían inducidos en condiciones de daños en la pared. De nuevo, ninguno de ellos tiene la expresión aumentada en la cepa *mnn2Δ* (Tabla V.1) pero, curiosamente, 7 de ellos están reprimidos por un factor de 2 a 4,2 veces. Serán necesarios más estudios para determinar el posible significado de estos resultados inesperados.

2.1.1. Metabolismo y energía

En este grupo funcional se seleccionaron 9 genes con expresión aumentada (Tabla V.1) y 14 con expresión reprimida (Tabla V.2). Se ha sugerido que genes relacionados con el metabolismo y la generación de energía se estimulan en células

con defectos en la pared celular (Lagorce *et al.*, 2003). En la cepa *mnn2Δ* es notorio que 24 genes relacionados con esta función muestran una alteración significativa en su nivel de expresión. Aunque el número de genes reprimidos es mayor que el de inducidos, el nivel de alteración es mayor en el caso de los inducidos. *CSG2*, que codifica una proteína necesaria para la manosilación de inositolfosfoceramida y para el crecimiento en altas concentraciones de calcio, es el gen que muestra la mayor alteración: un aumento de 21,27 veces. El resto de genes inducidos muestran cambios que oscilan entre 2,5 y 9,83 veces. En el caso de los genes reprimidos, sólo *PET191*, *SOR1* y *BNA5* mostraron un cambio mayor de 2,5 veces, siendo *PET191* el más afectado con una reducción transcripcional de 4,3 veces, mientras que los restantes 11 genes apenas pasaron el umbral de 2 veces. Es difícil predecir el efecto global de la delección de *MNN2* en el metabolismo y la generación de energía, pero ese 15% de genes alterados dentro de esta categoría funcional sugiere que hay una relación próxima entre la expresión de *MNN2* y algunas de las rutas principales del metabolismo.

2.1.2. Transcripción

La maquinaria de transcripción de la célula es responsable del nivel de expresión del genoma completo. La delección de *MNN2* da como resultado la alteración de 18 genes, 9 inducidos y 9 reprimidos, incluidos en el grupo de genes relacionados con el proceso de transcripción. Como en el grupo anterior, el cambio global relativo es mayor en los genes inducidos, con factores de 2,48 a 8,62, mientras que los reprimidos muestran reducciones de 2 a 3,8 veces.

2.1.3. Transporte celular

La mayoría de los genes relacionados con el transporte celular que muestran una expresión alterada están reprimidos (Tabla V.2). Se incluyen genes que codifican proteínas involucradas en el transporte vesicular, como *VPS5*, *VPS25* y *SEC9*, y otros involucrados en el transporte de hierro, como *FIT1* y *FIT2*. Ya que sólo 3 genes de esta categoría funcional están inducidos, mientras que 13 están reprimidos, los datos sugieren que la delección de *MNN2* afecta de forma negativa algunas rutas de

transporte de la célula. También el hecho de que *VTC3*, que participa en el metabolismo del fosfato, mostró un nivel de expresión significativamente reducido, podría estar relacionado con la influencia propuesta de *MNN2* en la manosilfosforilación del núcleo interno de los *N*-oligosacáridos (Olivero *et al.*, 2000).

2.1.4. Ciclo celular y procesamiento del ADN

La situación en este grupo es opuesta a la del anterior. Sólo 3 genes están reprimidos mientras que 13 muestran inducción transcripcional. Además, 6 de los 13 genes inducidos muestran una inducción de más de 5 veces. Estos resultados sugieren que el metabolismo del ADN está significativamente acelerado en la cepa *mnn2Δ*.

2.1.5. ORFs no caracterizadas y otros grupos

El grupo de las ORFs no caracterizadas incluye 44 genes, 14 inducidos y 30 reprimidos, siendo el grupo más numeroso.

Algunos otros grupos también están representados entre los genes seleccionados, pero son cuantitativamente menos importantes (ver Tablas V.1 y V.2).

2.1.6. Consideraciones sobre el análisis del transcriptoma de *mnn2Δ*

En un trabajo previo (Lagorce *et al.*, 2003) se comunicó que las mutaciones en la pared celular desencadenan al menos tres grandes respuestas transcripcionales en *S. cerevisiae*: la cascada de señales de *MAPK PKC1-SLT2*, el sistema global de estrés mediado por los factores de transcripción *Msn2p/Msn4p* y *Hsf1p*, y la ruta mediada por calcio/calcineurina. Como se indica más arriba, la delección de *MNN2* conduce a la síntesis de cadenas externas no ramificadas en las manoproteínas de la pared celular, que podrían afectar a la integridad de la capa externa de la pared. Sin embargo, ninguno de los genes alterados en *mnn2Δ* estaba incluido en las respuestas transcripcionales anteriormente mencionadas, lo cual sugiere que la expresión del gen *MNN2* no está relacionada directamente con el grupo compensatorio de la pared celular. Además, la expresión de los genes cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb* severo (Corbacho *et al.*, 2005) no parece verse afectada. Esto no es

sorprendente ya que, en ese trabajo, se sugería que la falta de secuenciasceptoras para la fosforilación en el núcleo interno de los *N*-oligosacáridos no da como resultado la expresión de un fenotipo *ldb*. Este hallazgo sugiere que el efecto del gen *MNN2* en la transferencia de grupos manosilfosfato al núcleo podría estar mediado por un gen o genes que no estén íntimamente ligados a la transferencia de esos grupos a la cadena externa.

Según la información disponible en SGD, no se han descrito interacciones físicas para Mnn2p, aunque se muestran cinco interacciones genéticas. Los dobles mutantes *mnn2chs3*, *mnn2rvs161*, y *mnn2rvs167* mostraron un defecto de crecimiento (Tong *et al.*, 2004) mientras que *mnn2bkc1* y *mnn2slt2* mostraron letalidad sintética (Nakamura *et al.*, 1997). Curiosamente, el nivel de expresión de los cinco genes que muestran interacciones genéticas con *MNN2* no está alterado en el mutante *mnn2Δ*.

El alto número de ORFs con niveles de expresión alterados, pero que codifican proteínas no clasificadas hace difícil sacar conclusiones generales sobre las rutas celulares completas que se ven influenciadas directa o indirectamente por Mnn2p. Sin embargo, los resultados sugieren que la cepa *mnn2Δ* muestra una cierta activación del metabolismo del ADN y una reducción de algunos procesos relacionados con el transporte celular. En el caso de la maquinaria de transcripción, las rutas metabólicas centrales, y la producción de energía no encontramos una clara predominancia de genes activados o reprimidos. Serán necesarios, por tanto, experimentos de Northern-blot para validar los cambios detectados a nivel transcripcional.

2.2. Análisis del transcriptoma de *vps74/mnn3Δ*

Al analizar el transcriptoma de *vps74/mnn3Δ* encontramos un elevado número de genes cuya expresión estaba alterada de forma significativa ($p < 0,05$), pero inicialmente solo seleccionamos aquellos que tuviesen un cambio en su nivel de expresión de al menos un factor de 2. Sin embargo, al analizar los resultados creímos conveniente disminuir el umbral hasta 1,6 para así poder considerar otros genes que estaban relacionados con los incluidos en la selección inicial. Así se obtuvieron 112

genes, 49 de los cuales tenían su expresión aumentada (Tabla V.3), y 63 que la tenían reducida (Tabla V.4). Para facilitar el análisis y la interpretación, los genes se agruparon en categorías funcionales, de acuerdo con las bases de datos MIPS y SGD. Aunque algunos de esos genes podían incluirse en más de una categoría sólo se incluyeron en una de ellas. A continuación se revisa cada una de las categorías, comentando aquellos genes que nos parecieron más interesantes.

Tabla V.3 Genes cuya expresión se ve aumentada en el mutante *vps74/mnn3Δ*.

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Biogénesis de componentes celulares			
YKL051W	<i>SFK1</i>	1,74	Proteína de la membrana plasmática que podría actuar junto con Stt4p para generar PIP4
YLR342W	<i>FKS1</i>	1,91	Subunidad catalítica de la 1,3-β-D-glucano sintetasa
YMR238W	<i>DFG5</i>	1,64	Posible manosidasa necesaria para la biogénesis de pared celular en la formación de la espora
YOL155C	<i>HPF1</i>	1,67	Manoproteína protectora contra el enturbiamiento del vino
Comunicación celular/Transducción de señales			
YDL248W	<i>COS7</i>	1,7	Proteína de función desconocida, miembro de la subfamilia DUP380 de proteínas <i>COS</i>
YDR373W	<i>FRQ1</i>	2,59	Participa en señalización intracelular
YGL248W	<i>PDE1</i>	1,64	AMP fosfodiesterasa de baja afinidad
YKL159C	<i>RCN1</i>	1,81	Proteína relacionada con la regulación de calcineurina durante la señalización por calcio
YOR134W	<i>BAG7</i>	2,15	Activador de RhoGAP
Destino de proteínas (<i>protein fate</i>)			
YDR533C	<i>HSP31</i>	1,785	Posible chaperona y cisteín proteasa
YIR039C	<i>YPS6</i>	1,95	Posible proteasa aspártica anclada mediante GPI
YLR121C	<i>YPS3</i>	1,92	Proteasa aspártica, anclada a la membrana plasmática vía GPI
Diferenciación celular			
YDR055W	<i>PST1</i>	4,28	Proteína de la pared celular, inducida por daño en la pared
Metabolismo y energía			
YBR041W	<i>FAT1</i>	1,62	Transportador de ácidos grasos y acetil-CoA sintetasa
YGR256W	<i>GND2</i>	1,68	6-fosfogluconato deshidrogenasa
YIR035C		1,89	Posible proteína citoplasmática de función desconocida
YLR180W	<i>SAM1</i>	1,703	S-adenosilmetionina sintetasa
YMR118C		2,14	Proteína de función desconocida
YNL274C	<i>GOR1</i>	2,06	Glioxilato reductasa
YOL058W	<i>ARG1</i>	1,65	Arginosuccinato sintetasa de la biosíntesis de arginina; posible sustrato de Cdc28p
YOR388C	<i>FDH1</i>	1,64	Formato deshidrogenasa dependiente de NAD(+)
YPR160W	<i>GPH1</i>	1,788	Glucógeno fosforilasa; regulada por la vía de HOG
Rescate celular, defensa y virulencia			
YBR054W	<i>YRO2</i>	3,08	Proteína de función desconocida
YBR067C	<i>TIP1</i>	1,85	Manoproteína de la pared celular con posible actividad lipasa
YCR021C	<i>HSP30</i> <i>YRO1</i>	1,96	Proteína de la membrana plasmática que regula Pma1p
YGR138C	<i>TPO2</i>	2,12	Transporte de espermina
YGR213C	<i>RTA1</i>	1,97	Proteína involucrada en la resistencia a 7-aminocolesterol
YKL161C		1,88	Proteín quinasa implicada en la vía de la MAPK Slt2p, y asociada a Rlm1p
YKL163W	<i>PIR3</i>	2,78	Proteína necesaria para la estabilidad de la pared celular
YNL160W	<i>YGP1</i>	2,06	Proteína relacionada con la pared celular
Transcripción			
YBR182C	<i>SMP1</i>	2,16	Factor de transcripción
YMR136W	<i>GAT2</i>	1,61	Proteína con un domino de dedo de zinc, similar a Gln3p y Dal80p
Transporte celular, sistemas y rutas de transporte			
YDL048C	<i>STP4</i>	1,97	Proteína con un domino tipo Kruppel de dedo de zinc, similar a Stp1p, Stp2p, and Stp3p
YER060W	<i>FCY21</i>	1,794	Posible permeasa de purina y citosina
YGL008C	<i>PMA1</i>	1,67	H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática
YHR092C	<i>HXT4</i>	2,07	Transporte de hexosas
YPR194C	<i>OPT2</i>	2,53	Transportador de oligopéptidos

Tabla V.3 Continuación

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
ORF no caracterizadas			
YDL204W	<i>RTN2</i>	1,69	Proteína de función desconocida
YDL241W		1,81	Posible proteína de función desconocida
YDR250C		1,61	ORF dudosa
YFL053W	<i>DAK2</i>	4,64	Dihidroxiacetona quinasa
YHR209W	<i>CRG1</i>	2,03	Posible metiltransferasa
YIL169C		1,65	Posible proteína de función desconocida, similar a la α -1,4-glucosidasa YOL155C
YJL217W	<i>REE1</i>	1,64	Proteína citoplasmática involucrada en la regulación de la enolasa ENO1p
YMR173W-A		1,739	ORF dudosa; solapa el gen <i>DDR48/YML173W</i>
YNL024C		1,63	Posible proteína de función desconocida, con 7 dominios de metil transferasa
YOR102W		201,70	
YOR203W		1,65	ORF dudosa; solapa el extremo 5' del gen esencial <i>DED1</i>
YPL014W		1,87	Posible proteína de función desconocida

Tabla V.4 Genes cuya expresión se ve reducida en el mutante *vps74/mnn3Δ*.

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Biogénesis de componentes celulares			
YPL250C	<i>ICY2</i>	-1,66	Proteína de función desconocida, sustrato potencial de Cdc28p
Ciclo celular y procesamiento del ADN			
YBL097W	<i>BRN1</i>	-1,73	Proteína esencial necesaria para la condensación de los cromosomas y el agrupamiento de los genes de ARNt en el nucléolo
YGR230W	<i>BNS1</i>	-1,72	Proteína similar a Spo12p
YJR112W	<i>NNF1</i>	-1,88	Componente esencial del complejo MIND del cinetocoro
YMR117C	<i>SPC24</i>	-2,27	Componente del complejo Ndc80 asociado al cinetocoro
YMR198W	<i>CIK1</i>	-2,01	Proteína necesaria para la cariogamia y la organización del huso mitótico
YNL289W	<i>PCL1</i>	-1,89	Ciclina de Pho85, involucrada en la entrada en mitosis y regulación de morfogénesis
YOR073W	<i>SGO1</i>	-1,60	Componente del punto de control del huso
YPL255W	<i>BBP1</i>	-1,63	Proteína necesaria para la duplicación del cuerpo polar del huso
YPR119W	<i>CLB2</i>	-2,32	Ciclina de tipo B involucrada en la progresión del ciclo celular
Comunicación celular/Transducción de señales			
YDL214C	<i>PRR2</i>	-2,21	Serín/treonín quinasa que inhibe la señalización desencadenada por feromonas a través de MAPK, posiblemente a nivel del factor de transcripción Ste12p
YHR061C	<i>GIC1</i>	-1,82	Proteína de función desconocida involucrada en la iniciación de la gemación y la polarización celular
Destino de proteínas			
YDR372C	<i>VPS74</i>	-208,33	Ver Capítulo IV. Proteína necesaria para la localización y el reciclaje de las glucosiltransferasas de Golgi
YGL158W	<i>RCK1</i>	-1,80	Proteín quinasa involucrada en la respuesta a estrés oxidativo
YHR160C	<i>PEX18</i>	-2,16	Peroxina necesaria para la localización de proteínas de la matriz del peroxisoma
YLL009C	<i>COX17</i>	-1,63	Metalochaperona de cobre que transfiere cobre de Sco1p y Cox11p para la citocromo C oxidasa
Diferenciación de tipo celular			
YMR032W	<i>HOF1</i>	-2,49	Proteína localizada en el cuello de gemación, necesaria para la citoquinesis
YNL194C		-2,47	Proteína integral de membrana necesaria para la esporulación y el contenido en esfingolípidos de la membrana
YNL196C	<i>SLZ1</i>	-1,76	Proteína específica de esporulación con un dominio de cremallera de leucina
Interacción con el entorno			
YCL027W	<i>FUS1</i>	-1,77	Proteína de membrana de la prolongación de gemación, necesaria para la fusión celular
YDR179C	<i>CSN9</i>	-1,92	Subunidad del <i>señalosome</i> Cop9, involucrado en la señalización de feromonas
YNL145W	<i>MFA2</i>	-1,61	Feromona de conjugación <i>Factor a</i>
Metabolismo y energía			
YAR035W	<i>YAT1</i>	-1,73	Carnitina acetiltransferasa de la mitocondria
YHR033W		-3,28	Posible proteína de función desconocida
YHR216W	<i>IMD2</i>	-2,18	Inosina monofosfato deshidrogenasa
YIL160C	<i>POT1</i>	-3,61	3-cetoacil-CoA tiolasa
YIR027C	<i>KRE27</i>	-2,02	Proteína de función desconocida
YLR438W	<i>CAR2</i>	-2,19	L-ornitina transaminasa (OTAsa)
YNL009W	<i>IDP3</i>	-1,66	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP peroxisomal
YPL061W	<i>ALD6</i>	-2,87	Aldehído deshidrogenasa citosólica
YPL113C		-1,62	Glioxilato reductasa
Rescate celular, defensa y virulencia			
YOL151W	<i>GRE2</i>	-1,61	3-metilbutanal reductasa y metilglioxal reductasa dependiente de NADPH; inducida por estrés y regulada por la vía HOG
Síntesis de proteínas			
YCR003W	<i>MRPL32</i>	-1,76	Proteína ribosomal mitocondrial de la subunidad grande
YDR041W	<i>RSM10</i>	-1,75	Proteína ribosomal mitocondrial de la subunidad pequeña

Tabla V.4 Continuación.

ORF	Nombre	Cambio (x veces)	Descripción
Transcripción			
YNR009W	<i>NRM1</i>	-1,67	Correpressor transcripcional regulado por MBF
YOR315W	<i>SFG1</i>	-1,90	Posible factor de transcripción necesario para el crecimiento de pseudohifas
Transporte celular, sistemas y rutas de transporte			
YBR296C	<i>PHO89</i>	-2,12	Cotransportador Na ⁺ /Pi
YCR010C	<i>ADY2</i>	-3,34	Transportador de acetato necesario para la esporulación normal
YDR536W	<i>STL1</i>	-5,68	<i>Simporter</i> de glicerol/protones de la membrana plasmática
YEL065W	<i>SIT1</i>	-1,61	Transportador de ferroxiamina B; posible sustrato de Cdc28p
YIR028W	<i>DAL4</i>	-2,98	Permeasa de alantoína
YNL036W	<i>NCE103</i>	-2,01	Anhidrasa carbónica
YOR348C	<i>PUT4</i>	-2,28	Permeasa de prolina
YPL060W	<i>LPE10</i>	-1,69	Transportador de magnesio de la membrana interna de la mitocondria
ORFs no caracterizadas			
YAR075W		-2,41	Proteína no funcional con homología con la IMP deshidrogenasa
YDR281C	<i>PHM6</i>	-2,13	Proteína de función desconocida, regulada por niveles de fosfato
YGL007W	<i>BRP1</i>	-1,63	ORF dudosa que se localiza antes de <i>PMA1</i> , cuya delección conduce a la regulación negativa de <i>PMA1</i>
YGL072C		-1,70	ORF dudosa que solapa con <i>HSF1/YGL073W</i>
YGL262W		-202,02	Posible proteína de función desconocida
YGL263W	<i>COS12</i>	-4,85	Proteína de función desconocida
YGR035C		-3,57	Posible proteína de función desconocida
YGR066C		-1,92	Posible proteína de función desconocida
YGR206W	<i>MVB12</i>	-1,69	Subunidad de ESCRT-I necesaria para estabilizar los oligómeros del complejo
YIL057C		-2,70	Posible proteína de función desconocida
YIL158W		-1,77	Posible proteína de función desconocida; la sobreexpresión provoca detención o retraso del ciclo celular
YKL023W		-1,61	Posible proteína de función desconocida, posiblemente implicada en la degradación de ARNm
YLR108C		-2,05	Proteína de función desconocida
YML089C		-1,68	ORF dudosa
YMR144W		-1,82	Posible proteína de función desconocida
YNL195C		-2,18	Posible proteína de función desconocida
YOR062C		-1,82	Proteína de función desconocida; similar a YKR075Cp y Reg1p; expresión regulada por glucosa y Rgt1p
YOR161C	<i>PNS1</i>	-2,18	Proteína de función desconocida
YPL144W	<i>POC4</i>	-1,66	Componente de la chaperona heterodimérica Poc4p-Irc25p involucrada en el ensamblaje de las subunidades alfa del proteasoma 20S

2.2.1. Biogénesis de componentes celulares

Dentro de esta categoría funcional se seleccionaron 5 genes, 4 de los cuales (*DFG5*, *FKS1*, *HPF1* y *SKF1*) se encontraban con su nivel de expresión aumentado entre 1,5 y 1,9 veces (Tabla V.3). *ICY2*, el único reprimido tenía su nivel de expresión reducido 1,6 veces (Tabla V.4). Este gen codifica una proteína de función desconocida, posible sustrato de la quinasa dependiente de ciclina Cdc28p (Ubersax *et al.*, 2003).

El gen *HPF1* codifica una manoproteína, con función glucosidasa posiblemente relacionada con la organización de la pared celular (Brown *et al.*, 2007). El producto de *DFG5* es una proteína esencial anclada a membrana mediante GPI, con actividad posiblemente manosidasa y necesaria para la formación de pared celular, sobre todo en la gemación (Kitagaki *et al.*, 2004).

También en el grupo de los relacionados con la biogénesis y el mantenimiento de la pared está el gen *FKS1* que codifica la subunidad catalítica del complejo (1,3)- β -D-glucano sintetasa, funcionalmente redundante con Gsc2p (Inoue *et al.*, 1995). Fks1p participa en la formación y el mantenimiento de la pared celular, y además se ha visto que Rho1p copurifica con esa subunidad del complejo (1,3)- β -D-glucano sintetasa *in vivo*. Ambas proteínas se localizan predominantemente en sitios donde está teniendo lugar remodelación de la pared celular, y por tanto se propuso que Rho1p era una subunidad reguladora del complejo (1,3)- β -D-glucano sintetasa (Qadota *et al.*, 1996). Curiosamente, el gen que codifica la proteína redundante con Fks1p, *GSC2*, no fue seleccionado en nuestro estudio, lo cual concuerda con lo postulado por Lesage y Bussey (2006) sobre los mecanismos de regulación diferenciales para cada uno de ellos.

En un estudio previo (Terashima *et al.*, 2000) se detectó que la delección de *FKS1* producía la alteración en los niveles de expresión de distintas proteínas relacionadas con la pared celular que poseían anclajes tipo GPI (*YLR194C*, *YPS3*, *CRH1*, *PST1* e *YKL096W*). En nuestro trabajo hemos detectado tanto *FKS1* como *YPS3*, *CRH1* y *PST1* todos ellos con nivel de expresión aumentado. También hemos encontrado sobreexpresadas otras proteínas con anclaje tipo GPI: Dfg5p, Yps6p y Tip1p.

Por último, el gen *SFK1*, cuya expresión estaba inducida, codifica una proteína de la membrana plasmática, que podría actuar antes o simultáneamente con Stt4p para generar los niveles necesarios del fosfolípido fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P); además mediaría, al menos parcialmente, en la localización de Stt4p en la membrana plasmática (Audhya y Emr, 2002). La producción de PI4P en el aparato de Golgi es necesaria para la secreción de proteínas, y para la activación de la cascada de la MAPK mediada por Rho1/Pkc1. En condiciones normales de crecimiento, los componentes de la ruta de PKC y del citoesqueleto de actina están polarizados en el sitio de gemación. Sin embargo, tras un choque térmico, estrés osmótico o daño en la pared celular, ambos se despolarizan. Los componentes de la ruta de PKC, como Rho1p, se redistribuyen por toda la periferia celular, probablemente para reparar el daño en la pared (Audhya y Emr, 2002).

2.2.2. Comunicación celular y transducción de señales

De los genes relacionados con la comunicación celular y la transducción de señales seleccionamos siete genes (Tabla V.3 y Tabla V.4) con el nivel de expresión alterado en al menos 1,6 veces: 5 con expresión aumentada (*BAG7*, *COS7*, *FRQ1*, *PDE1*, y *RCN1*), y 2 con la expresión reducida (*PRR2* y *GIC1*).

BAG7 codifica una proteína activadora de la GTPasa Rho1p, estimulando la actividad GTPasa intrínseca de Rho1p, que como se indicó antes, participa en la organización del citoesqueleto y el control de la síntesis de la pared celular (Roumanie *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2002). Rho1p, controlador clave en la vía de señalización de daños en la pared celular, actúa sobre otra de las proteínas con expresión aumentada en *vps74/mnn3Δ*, Fks1p.

COS7 es miembro de la subfamilia DUP380 de proteínas conservadas codificadas a menudo subteloméricamente. Se ha propuesto que esas proteínas no esenciales podrían facilitar procesos de tráfico de membranas (Despons *et al.*, 2006). Además, otro de los miembros de esa familia, *COS8*, parece estar relacionado con Sko1p y con Hac1p (Spode *et al.*, 2002). Sko1p es uno de los promotores activados en la cascada de *HOG1* de respuesta a estrés, y la relación con Hac1 podría indicar que las

proteínas tipo *COS* podrían estar involucradas en la respuesta a proteínas defectuosas en su plegamiento.

El gen *FRQ1* codifica una proteína *N*-miristoilada con capacidad de unión a calcio, que podría tener un papel en la señalización intracelular a través de su regulación de la fosfatidilinositol-4-quinasa Pik1p (Hendricks *et al.*, 1999; Ames *et al.*, 2000; Huttner *et al.*, 2003). Pik1p, junto con la mencionada anteriormente Stt4p, son responsables de la mayor parte de la importante actividad, a nivel fisiológico, fosfatidilinositol quinasa (PI4K) en las células silvestres (Audhya *et al.*, 2000). Pik1p se localiza en el núcleo y en el aparato de Golgi, donde regula la secreción, además de regular la dinámica de las membranas de Golgi y vacuola, y la endocitosis (Hama *et al.*, 1999; Walch-Solimena y Novick, 1999; Audhya *et al.*, 2000; Sciorra *et al.*, 2005; Strahl *et al.*, 2005). Pik1p se ve activada por Frq1p, que se une al extremo amino de Pik1 y ayuda a su unión con Golgi (Hendricks *et al.*, 1999; Strahl *et al.*, 2005; Strahl *et al.*, 2007). Pik1p también se une a las chaperonas Bmh1p y Bmh2p, principalmente en el citoplasma, para controlar la disponibilidad de Pik1p para su reclutamiento en el Golgi (Demmel *et al.*, 2008). Los mutantes *pik1Δ* son inviables y los mutantes condicionales muestran defectos en la citoquinesis, endocitosis, la secreción de proteínas y la dinámica vacuolar (Flanagan *et al.*, 1993; García-Bustos *et al.*, 1994; Audhya *et al.*, 2000; Shelton *et al.*, 2003). Los mutantes *pik1* termosensibles tienen una morfología de Golgi aberrante (Audhya *et al.*, 2000) y presentan fallos en meiosis y formación de esporas (Cameroni *et al.*, 2006). Podemos suponer que la cepa *vps74/mnn3Δ*, al tener niveles de Frq1p más elevados que el silvestre (2,6 veces), podría estar potenciando la acción de Pik1p, que parece estar relacionada con la correcta fisión de vesículas desde el *trans*-Golgi en una cepa con problemas en dicho orgánulo. La ineficiente glicosilación de proteínas que tiene lugar en dicha cepa podría perturbar la correcta secreción de las proteínas que viajan a través de la ruta secretora, y Pik1p podría estar ayudando a que continúen su camino.

Los dos últimos genes con expresión aumentada seleccionados fueron *PDE1* y *RCN1*. Pde1p es una fosfodiesterasa de AMPc de baja afinidad, que controla la glucosa y la acidificación intracelular inducida por señalización por AMPc. Además, es sustrato de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (Ma *et al.*, 1999). *RCN1* codifica una

proteína involucrada en la regulación de calcineurina durante la señalización por calcio; tiene además similitud con la humana DSCR1 que está en la zona candidata para el síndrome de Down (Kingsbury y Cunningham, 2000).

PRR2, gen cuya expresión estaba reducida 2,21 veces en la cepa *vps74/mnn3Δ* con respecto a la cepa silvestre, codifica una serín/treonín quinasa que inhibe la señalización inducida por feromonas posteriormente a la MAPK, posiblemente a nivel del factor de transcripción Ste12p (Burchett *et al.*, 2001), el cual regula a Fks3p.

GIC1 codifica una proteína de función desconocida involucrada en la iniciación de la gemación y en la polarización celular, interaccionando con Cdc42p, una GTPasa tipo Rho (Brown *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2003; Orlando *et al.*, 2008).

2.2.3. Ciclo celular y procesamiento del ADN

En esta categoría se han seleccionado 9 genes (*BBP1*, *BNS1*, *BRN1*, *CIK1*, *CLB2*, *NNF1*, *PCL1*, *SGO1*, y *SPC24*), todos con su expresión reducida entre 1,6 y 2,27 veces. Varios de estos genes están relacionados con la organización del citoesqueleto y el huso mitótico. *NNF1* es un componente del complejo MIND del cinetocoro (Shan *et al.*, 1997; Euskirchen, 2002). Asimismo, *SPC24* codifica un componente del complejo conservado Ndc80 del cinetocoro, implicado en la segregación de los cromosomas, la actividad del punto de control del huso y el agrupamiento del cinetocoro (Janke *et al.*, 2001). El producto de *CIK1* es una proteína asociada con la quinesina necesaria para la cariogamia y la organización del huso mitótico (Shanks *et al.*, 2001). *SGO1* codifica un componente del punto de control del huso, implicado en el control de la tensión sobre los cromosomas mitóticos, siendo necesario para la correcta segregación de los cromosomas y su estabilidad (Indjeian *et al.*, 2005). La proteína codificada por *BBP1* es necesaria para la duplicación del cuerpo polar del huso, localizada en la periferia de la placa central, formando un complejo con la proteína Mps2p y los componentes del cuerpo polar del huso Spc29 y Kar1p (Schramm *et al.*, 2000). Con una función relacionada con los anteriores genes, *BRN1* codifica una proteína necesaria para la condensación de los cromosomas y el agrupamiento de los genes codificantes de ARNt en el nucléolo, posiblemente funcionando como componente intrínseco de la

maquinaria de condensación influyendo sobre diversos aspectos de la transmisión de los cromosomas (Lavoie *et al.*, 2000). *BNS1* codifica una proteína relacionada con la meiosis (Grether y Herskowitz, 1999).

PLC1 codifica una fosfolipasa C que hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) para generar las moléculas señalizadoras diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) (Flick y Thorner, 1993; Yoko-o *et al.*, 1993). IP₃ se libera de la membrana plasmática y es el precursor de todos los otros inositolfosfato, importante clase de moléculas de señalización que regulan numerosos procesos celulares (York, 2006). La actividad de Plc1p está relacionada con la detección de nutrientes en el medio, el crecimiento filamentoso, la exportación de ARNm, la organización de la actina, la síntesis de proteínas, la función del cinetocoro, la regulación transcripcional, la fusión vacuolar y las respuestas a estrés mediadas por PKA (Rebecchi y Pentyala, 2000). No se conoce mucho sobre la regulación de *PLC1* pero se sabe que tiene secuencias consenso de unión para los factores de transcripción Hsf1p y Rap1p (Flick y Thorner, 1993).

Por último, *CLB2* es una ciclina de tipo B relacionada con la progresión del ciclo celular, activando Cdc28p para promover la transición de las fases G₂ a M (Mendenhall y Hodge, 1998).

2.2.4. Destino de proteínas (*protein fate*)

En esta categoría funcional hemos seleccionado 7 genes, 3 de ellos con su nivel de expresión aumentado (*HSP31*, *YPS6*, *YPS3*) en un rango de 1,78 a 1,95 veces (Tabla V.3), y 4 con el nivel reducido (*VPS74/MNN3*, *RCK1*, *PEX18*, *COX17*) en un rango 1,63 a 1,16 excepto *VPS74/MNN3* que estaba reducido 208,33 veces (Tabla V.4).

Los tres genes seleccionados con nivel de expresión aumentado codifican proteínas con actividad proteasa. El producto de *HSP31* es una posible chaperona y cisteín proteasa, similar a Hsp31 de *E. coli*, miembro de la superfamilia DJ-1/ThiJ/Pfpl, que incluye la humana DJ-1 involucrada en la enfermedad de Parkinson (Wilson *et al.*, 2004). Por otro lado, *YPS3* e *YPS6* codifican proteasas tipo aspártico. Ambas proteínas están ancladas a la membrana mediante restos GPI, y aunque no se conoce con

exactitud su función podrían estar implicadas en la organización de la pared celular (Olsen *et al.*, 1999).

Entre los genes cuyo nivel de expresión estaba reducido encontramos *VPS74/MNN3*, gen deletado en la cepa estudiada, y que nos da un nivel de expresión unas 200 veces más bajo que en la cepa silvestre, lo que corresponde con la delección del mismo.

RCK1 codifica una proteína activada por MAPK, que junto con Rck2p, participa en la ruta de resistencia a estrés oxidativo, implicando por tanto a *HOG1* en dicha resistencia (Bilsland *et al.*, 2004).

2.2.5. Diferenciación celular

En este apartado hemos incluido 4 genes con niveles de expresión alterados en la cepa *vps74/mnn3Δ*. Uno de ellos, *PST1*, tiene uno de los mayores incrementos en el nivel de expresión puesto que está aumentada 4,18 veces con respecto a la cepa silvestre (Tabla V.3). En los tres cuya expresión estaba reducida, los niveles de expresión fueron de 1,79 veces para *SLZ1*, y de 2,47 y 2,49 para *YNL194C* y *HOF1* respectivamente (Tabla V.4).

La Pst1p es una proteína de la pared celular, posiblemente implicada en su organización, con un sitio potencial de anclaje GPI. Pstp1 es secretada por protoplastos que están regenerando su pared celular (Pardo *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que su nivel de expresión se ve aumentado mediante la ruta de señalización de la integridad de la pared celular, mediado por Rlm1p (Jung y Levin, 1999), y aumentado también por daños en la pared celular debido a la falta de Fsk1p (Terashima *et al.*, 2000). Como se describió anteriormente, el nivel de expresión de Fks1p está aumentado en la cepa estudiada.

HOF1 codifica una proteína con dominio SH3, localizada en el cuello de gemación, necesaria para la citocinesis (Kamei *et al.*, 1998). Regula la dinámica del anillo de actina-miosina y la localización de la septina. Además interacciona con las forminas Bni1p y Bnr1p, y con las proteínas Cyk3p, Vrp1p, y Bni5p.

El producto de *SLZ1* es una proteína de función desconocida, específica de esporulación, y que tiene una cremallera de leucina (Briza *et al.*, 2002), de modo que es posible que pueda unirse a ADN.

La ORF YNL194C codifica una proteína integral de membrana necesaria para la esporulación y el contenido en esfingolípidos de la membrana (Young *et al.*, 2002). Esta ORF comparte promotor con la ORF YNL195C, también seleccionada en nuestro estudio, como se indica más adelante, en el grupo de las ORFs no caracterizadas.

2.2.6. Interacción con el entorno

En este grupo, los genes *FUS1*, *CSN9* y *MFA2* fueron seleccionados, con su nivel de expresión reducido con respecto a la cepa silvestre, entre 1,61 y 1,71 veces. *FUS1* es un gen que codifica una proteína localizada en la prolongación que se emite para la conjugación (*shmoo tip*). Su expresión está regulada por la feromona de conjugación, y se ha propuesto que coordina la señalización y la polarización necesarias para la fusión celular (Trueheart *et al.*, 1987). Es también, un substrato potencial para Cdc28p, además de interaccionar con la cascada de *HOG1* (Nelson *et al.*, 2004).

El factor *a*, feromona de conjugación de las células *MAT a* en *S. cerevisiae*, es el producto del gen *MFA2* (Chen *et al.*, 1997). Y *CSN9* es una subunidad del *señalosome* Cop9, que es necesario para la eliminación de la proteína tipo ubiquitina Rub1p de Cdc53p, y está implicada en la adaptación a la señalización por feromonas.

2.2.7. Metabolismo y energía

Este es uno de los grupos más numerosos, con 18 genes seleccionados, 9 de ellos cuya expresión está aumentada, y otros tantos con su expresión reducida. El nivel de aumento de expresión no fue en ningún caso mayor de 2,14 (YMR118C), ni en el caso de los reducidos mayor de 3,61 veces (*POT1*).

De entre los genes con expresión aumentada, queremos resaltar *ARG1* y *GPH1*. *ARG1* codifica una arginosuccinato sintetasa, miembro de la ruta de biosíntesis de

arginina (Crabeel *et al.*, 1988), y que es además un sustrato potencial de Cdc28p. Por otro lado, *GPH1* codifica una glucógeno fosforilasa necesaria para la movilización del glucógeno (Hwang *et al.*, 1989). Su actividad está regulada por los elementos de respuesta a estrés de la ruta de la MAPK HOG (Sunnarborg *et al.*, 2001). Otros genes seleccionados incluían relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos (*FAT1*), vía de las pentosas fosfato (*GND2*), metabolismo de la metionina (*SAM1*), el glioxilato (*GOR1*), etc.

En el grupo de los de expresión reducida encontramos genes relacionados con el metabolismo de la carnitina (*YAT1*), biosíntesis y degradación de aminoácidos (*IMD2*, *CAR2*), metabolismo de ácidos grasos (*POT1*, *IDP3*), del glioxilato (YPL113C), etc. Así mismo encontramos un gen de función desconocida, *KRE26*, cuya delección confiere resistencia a la toxina K1 de *S. cerevisiae*.

2.2.8. Rescate celular, defensa y virulencia

Un total de 9 genes fueron seleccionados en esta categoría, 8 de los cuales tenían su nivel de expresión aumentado en la cepa *vps74/mnn3Δ*, con respecto a la cepa silvestre, y sólo 1 lo tenía reducido.

En este grupo encontramos una serie de genes (*YRO2*, *TPO2* e *YGP1*) cuya expresión está regulada por el factor de transcripción Haa1p (Keller *et al.*, 2001). Estos tres genes no son los únicos bajo el control de Haa1p seleccionados en nuestro estudio. En la categoría de metabolismo y energía, la ORF YIR035C, de función desconocida, también está bajo el control del promotor Haa1. Además, otra ORF controlada por Haa1p, YPL157W, fue detectada en nuestro estudio con un nivel de expresión aumentado 1,5 veces, aunque no se incluye en la Tabla V.3 debido a que el umbral elegido de cambio en la expresión fue de 1,6 veces. *YRO2* codifica una proteína de función desconocida; *TPO2* codifica un transportador multidroga, de la familia MCS (Keller *et al.*, 2001) y el producto de *YGP1* es una proteína de la pared celular, de función desconocida, pero posiblemente relacionada con la respuesta a nutrientes y a estrés (Destruelle *et al.*, 1994).

Queremos reseñar que de los 10 genes que están bajo el control del promotor Haa1p, en nuestro trabajo hemos seleccionado 5, todos ellos con niveles de expresión aumentados con respecto a la cepa silvestre (*TPO2*, *YRO2*, *YGP1* y las ORFs YPR157W e YIR035W) (Tabla V.3). El promotor Haa1p ha sido descrito en los últimos años como el que controla la expresión de un grupo de genes poco caracterizados (Keller *et al.*, 2001). Aunque se ha encontrado que dichos genes podrían participar en la resistencia de *S. cerevisiae* a ácidos orgánicos débiles (Fernandes *et al.*, 2005) no se ha establecido su función biológica. Con los datos que se presentan aquí, podríamos pensar que dichos genes están también relacionados con el estrés de la pared celular provocado por la delección del gen *vps74/mnn3*, y que tal vez el promotor Haa1p interaccione de alguna manera con las rutas de señalización implicadas en nuestro estudio (PKC, HOG,...). Se están llevando a cabo otros experimentos que podrán dilucidar si este grupo de genes también se ve alterado cuando se delecionan otros genes relacionados con la glicosilación o la secreción de proteínas glicosiladas, componentes fundamentales de la pared celular. Tan solo 3 de ellos (*TPO2*, *PHM8* e *YGP1*) fueron detectados como componentes del mecanismo de compensación de la pared, de Lagorce *et al.* (2003), y sólo dos de ellos coinciden con los que hemos encontrado nosotros (*TPO2* e *YGP1*). De todos modos, como se comenta más adelante, apenas hay coincidencias entre el listado de genes que componen ese mecanismo de compensación y los genes que hemos seleccionado en nuestro estudio.

La proteína codificada por *HSP30/YRO1* se localiza en la membrana plasmática, está considerada como una proteína de respuesta a estrés que regularía Pma1p (H⁺-ATPasa), y estaría inducida en las siguientes condiciones: choque térmico, tratamiento con etanol o ácidos orgánicos débiles, limitación de glucosa o entrada en fase estacionaria (Piper *et al.*, 1997; Seymour y Piper, 1999). Recientemente se ha descrito además que *HSP30/YRO1* interaccionaría con *TPO2*, otro de los genes seleccionados en este grupo, y con *FKS1*, seleccionado en la categoría de Biogénesis de componentes celulares (Tarassov *et al.*, 2008).

TIP1 codifica una proteína muy abundante de la pared celular, con anclaje tipo GPI, con posible actividad lipasa, y transcripción inducida por choque térmico (Kondo y Inouye, 1991; Fujii *et al.*, 1999).

El producto de YKL161C es una proteína quinasa implicada en la cascada de señalización de la MAPK Slt2p, asociada con Rlm1p (Watanabe *et al.*, 1997). Rlm1p es un factor de transcripción tipo MADS-*box*, componente de la ruta de señalización de MAPK mediada por PKC involucrada en el mantenimiento de la integridad celular; es fosforilada y activada mediante la MAPK Slt2p (Jung *et al.*, 2002). Curiosamente, el gen que codifica Slt2p, YHR030C/*SLT2* ha sido detectado en nuestro análisis con un nivel de expresión aumentado 1,56 veces en la cepa *vps74/mnn3Δ* con respecto a la cepa silvestre. Slt2p es, como ya se ha dicho antes, una serín/treonín MAPK involucrada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular y la progresión del ciclo celular, a su vez regulada por la vía de señalización de *PKC1* (Watanabe *et al.*, 1995; Madden *et al.*, 1997; Martin-Yken *et al.*, 2003). Pkc1p es una serín/treonín quinasa esencial para el remodelado de la pared celular durante el crecimiento, asociada a Rho1p, y que se suele localizar en los sitios de crecimiento polarizado y en el cuello de gemación (Levin *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994; Andrews y Stark, 2000).

Slt2p tiene un claro papel en la regulación de la señal de estrés en la pared celular. Se han detectado al menos 25 genes involucrados en el ensamblaje de la pared celular cuya expresión depende de Rlm1p cuando Slt2p está activo de forma constitutiva (Jung y Levin, 1999). Esto indica que muchos de los cambios producidos por la Slt2p activada son llevados a cabo a través de la acción de Rlm1p. Slt2p regula además otros procesos celulares importantes como son: progresión del ciclo celular a través de Swi4p y Swi6p (Madden *et al.*, 1997), la propia regulación independiente de Swi4p y Swi6p (Levin, 2005), la homeostasis de calcio implicada en la vía de la calcineurina (Bonilla y Cunningham, 2003), regulación del ensamblaje del citoesqueleto de actina (Mazzoni *et al.*, 1993) y desencadenando el punto de control (*checkpoint*) en G2 (Harrison *et al.*, 2001).

PIR3 es un gen que codifica una O-glicoproteína de la pared celular unida covalentemente, necesaria para la estabilidad de la pared celular. Su expresión está

regulada por el ciclo celular y por la ruta de integridad de la pared celular (CWI) (Toh-E *et al.*, 1993; Jung y Levin, 1999; Mrscarona y Tanner, 1999)

El único gen de expresión reducida seleccionado en este grupo es *GRE2*. Su producto es una 3-metilbutanal reductasa y metilglioxal reductasa dependiente de NADPH (D-lactaldehído deshidrogenasa), inducida por estrés (osmótico, oxidativo, iónico, térmico y por metales pesados) y regulada por la ruta de HOG (Rep *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

2.2.9. Transcripción

En este grupo sólo se seleccionaron 4 genes, dos de ellos con expresión aumentada (*SMP1* y *GAT2*) y otros dos con expresión reducida (*NRM1* y *SFG1*).

SMP1 codifica un factor de transcripción involucrado en la regulación de la respuesta osmótica a estrés, miembro de la familia de factores de transcripción MADS-box como el comentado anteriormente Rlm1p, con el que incluso puede formar heterodímeros (Dodou y Treisman, 1997; de Nadal *et al.*, 2003). Smp1 está bajo el control de *HOG1*, y actúa sobre genes como *STL1* (de Nadal *et al.*, 2003), también seleccionado en nuestro trabajo pero con un nivel de expresión reducido en la cepa *vps74/mnn3Δ* con respecto a la cepa silvestre.

El producto de *GAT2* es una proteína con dominios de dedo de zinc como en la familia GATA, similar a Gln3p y Dal80p; se ha propuesto que tendría actividad de factor de transcripción aunque no se conocen aun sus substratos (Cox *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 2001).

NRM1 codifica un co-represor de la expresión génica regulada por MBF (MCB *Binding Factor*); Nrm1p se asocia de forma estable con promotores vía MBF para reprimir la transcripción una vez pasada la fase G1 (de Bruin *et al.*, 2006). En el caso de *SFG1* su producto es una proteína nuclear, posible factor de transcripción necesario para el crecimiento de pseudohifas superficiales, que podría actuar junto con Phd1p y ser además substrato de Cdc28p (Ubersax *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2005).

2.2.10. Transporte celular, sistemas y rutas de transporte

En este grupo, otro de los más numerosos, hemos incluido 13 genes con niveles de expresión alterados. Cinco de ellos (*STP4*, *FCY21*, *PMA1*, *HXT4*, *OPT2*) tenían niveles de aumento de su expresión entre 1,67 y 2,53 veces. En el caso de los que tenían su nivel de expresión reducido (*PHO89*, *ADY2*, *STL1*, *SIT1*, *DAL4*, *NCE103*, *PUT4* y *LPE10*), los niveles oscilaban entre 1,61 y 5,68 veces.

STP4 codifica una proteína de función desconocida, pero muy similar a *Stp1*, *Stp2* y *Stp3*, que son elementos de la cascada de señalización de aminoácidos en el medio extracelular (Abdel-Sater *et al.*, 2004), donde quizás tuviese alguna relación con el producto de *GAT2*, seleccionado en nuestro estudio y ya comentado en el apartado 2.2.9.

Anteriormente (ver 2.2.8) hemos comentado que encontramos *Hsp30p/Yro1p*, un regulador negativo de *Pma1p*, con su nivel de expresión aumentado en la cepa delecionada en *vps74/mnn3* con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, el nivel de expresión de *PMA1* está aumentado también en la cepa estudiada. Como ya se indicó, *Pma1p* es la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Serrano *et al.*, 1986).

Con su nivel de expresión aumentado también se seleccionaron transportadores de purina-citosina (*FCY21*), de oligopéptidos (*OPT2*), y de hexosas (*HXT4*).

En el grupo de los genes con nivel de expresión reducida encontramos *NCE103*, que codifica una anhidrasa carbónica, involucrada en secreción no convencional de proteínas (Cleves *et al.*, 1996).

Los genes *PUT4* y *DAL4* codifican respectivamente una permeasa de prolina y una de alantoína. Ambos están sujetos a regulación por factores de transcripción de tipo DAL. *Gat2p*, seleccionado en nuestro estudio y comentado anteriormente podría pertenecer a dicha familia y estar, por tanto, relacionado con éstos de alguna manera.

STL1 es un gen que codifica un transportador tipo *simporter* de glicerol y

protones de la membrana plasmática (Ferreira *et al.*, 2005). Como se indicó en el apartado correspondiente a factores de transcripción (2.2.9), Smp1p, factor de transcripción que encontramos con nivel de expresión aumentado en la cepa *vps74/mnn3Δ*, podría tener carácter regulador sobre *STL1* (de Nadal *et al.*, 2003). Sin embargo, hemos encontrado *STL1* con su nivel de expresión reducido en la cepa estudiada.

Otros genes con nivel de expresión reducido incluyen transporte de magnesio (*LPE10*), de acetato (*ADY2*), un cotransportador Na^+/Pi (*PHO89*), y por último, un transportador de ferroxiamina B, substrato potencial de Cdc28p (*SIT1*) (Ubersax *et al.*, 2003).

2.2.11. ORFs no caracterizadas

Finalmente, el grupo de las ORFs no caracterizadas es el más numeroso. Incluye 31 genes/ORFs con niveles de expresión alterados. En el caso de los que mostraron aumento, éste varió entre 1,61 y 201,7 veces, mientras que en los de expresión reducida, ésta varió entre 1,61 y 202,02 veces.

De entre los genes/ORFs con nivel de expresión aumentado destacaremos los siguientes:

RTN2 codifica una proteína de función desconocida, pero similar a las proteínas de la familia de las *reticulonas* (*reticulon proteins*), proteínas de eucariotas residentes en el retículo endoplasmático (RE) donde podrían controlar el tráfico RE-Golgi, la formación de vesículas y la morfogénesis de membranas (Yang y Strittmatter, 2007).

DAK2 codifica una dihidroxiacetona quinasa, necesaria para la detoxificación de dihidroxiacetona, involucrada además en la adaptación a estrés (Molin *et al.*, 2003).

YIL169C es una ORF que codificaría una posible proteína rica en serina y treonina, y muy similar a la glucosidasa codificada por *YOL155C/HPF1* (Brown *et al.*, 2007), también seleccionada en nuestro estudio y comentada en la categoría de Biogénesis de componentes celulares.

YOR102W mostró el mayor aumento en el nivel de expresión de todos los genes estudiados, 201,70 veces más en la cepa *vps74/mnn3Δ* que en la cepa silvestre. Es una ORF dudosa que posiblemente no codifique una proteína, pero que solapa con el gen *OST2*, que codifica una de las subunidades del complejo de la oligosacariltransferasa (OST). Sin embargo, los niveles de *OST2* no se vieron alterados en la cepa estudiada.

PHM6 codifica una proteína de función desconocida, pero que parece estar regulada por los niveles de Pi en la célula (Ogawa *et al.*, 2000).

BRP1 es una ORF dudosa, pero se ha comprobado que su delección provoca la disminución del nivel de expresión del gen situado a continuación de éste, *PMA1* (Porat *et al.*, 2005). Como ya se ha comentado anteriormente, *PMA1* ha sido seleccionado en nuestro estudio por tener un nivel reducido de expresión en la cepa estudiada en comparación con la cepa silvestre.

YGL072C es otra ORF dudosa, que solapa parcialmente con el gen *HSF1*. *Hsf1p* es un factor de transcripción, que activa múltiples genes en respuesta a estreses, como por ejemplo por calor.

Otro de los genes con un cambio muy drástico en su nivel de expresión fue YGL262W, ya que mostró una reducción de 202,02 veces en la cepa *vps74/mnn3Δ* con respecto a la cepa silvestre. Dicha ORF codificaría una proteína hipotética, no esencial, de función desconocida. Curiosamente, la ORF situada a continuación en el mismo cromosoma, YGL263W/*COS12*, también mostró una reducción en su nivel de expresión. En este caso, la reducción fue sólo de 4,85 veces con respecto al nivel de la cepa silvestre. YGL263W/*COS12* es miembro de la subfamilia DUP380 de proteínas conservadas codificadas a menudo subteloméricamente (Spode *et al.*, 2002; Despons *et al.*, 2006). Como ya se comentó previamente para otro de los miembros de esta familia, *COS7*, se ha propuesto que esas proteínas no esenciales podrían facilitar procesos de tráfico de membranas (Despons *et al.*, 2006), y algunos de sus miembros parecen estar relacionados con Sko1p y con Hac1p y, por tanto, con la cascada de *HOG1* de respuesta a estrés y la respuesta a proteínas defectuosas en su plegamiento, respectivamente.

YGR035C codificaría una proteína hipotética, de función desconocida, substrato potencial de Cdc28p (Ubersax *et al.*, 2003). Su transcripción está activada por los factores Yrm1p e Yrr1p relacionados con genes de resistencia multidroga (Lucau-Danila *et al.*, 2003).

La ORF YGR206W codifica una subunidad del complejo ESCRT-I necesario para estabilizar los oligómeros del núcleo del complejo (Stp22p, Vps28p, Srn2p), el cual está implicado en el envío al endosoma de proteínas dependiente de ubiquitina (Chu *et al.*, 2006; Curtiss *et al.*, 2007).

YIL057C codifica una posible proteína de función desconocida, cuya expresión se ve inducida bajo condiciones de limitaciones en la fuente de carbono, y reprimida con altos niveles de glucosa (Boer *et al.*, 2003). YIL158W, ORF contigua a YIL057C podría codificar una proteína de función desconocida. Se sabe que la sobreexpresión de esta ORF provoca un retraso en el ciclo celular o incluso una detención, y que el hipotético producto de esta ORF podría localizarse en la vacuola (Huh *et al.*, 2003; Hess, 2008; Niu *et al.*, 2008).

La ORF no caracterizada YNL195C comparte promotor con YNL194C, otra ORF seleccionada en nuestro estudio, y comentada previamente en la categoría de Diferenciación celular (2.2.5). Ambas ORFs tienen la expresión reducida en niveles muy similares, 2,47 y 2,18 para YNL194C e YNL195C respectivamente.

YOR062C codifica una proteína de función desconocida, similar a YKR075Cp y Reg1p. Reg1p es la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa de tipo I Glc7p, involucrada en la regulación negativa de los genes reprimibles por glucosa (Tu y Carlson, 1995). La expresión de YOR062C e YKR075C está regulada por Rgt1p (Kaniak *et al.*, 2004). Rgt1p es un factor de transcripción que regula el nivel de expresión de varios transportadores de glucosa (*HXT*) en respuesta a glucosa, pudiendo actuar como activador o represor transcripcional (Ozcan *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2003).

Finalmente, YPL144W codifica un componente de la chaperona heterodimérica Poc4p-Irc25p involucrada en el ensamblaje de las subunidades alfa en el proteasoma 20S (Kusmierczyk *et al.*, 2008).

2.2.12 Consideraciones sobre el análisis del transcriptoma de *vps74/mnn3Δ*

Las perturbaciones en la pared celular de las levaduras desencadenan un mecanismo de defensa que reconfigura su estructura molecular para preservar la integridad celular y prevenir su lisis (Smits *et al.*, 1999; Lagorce *et al.*, 2003). En el estudio de Lagorce *et al.* (2003) se analizó el efecto de la delección de cinco genes que afectaban a la pared celular, encontrando un grupo de unos 80 genes, con expresión aumentada, que consideraron como la respuesta típica del “mecanismo de compensación de la pared celular”. Entre ellos había un alto número de genes implicados en la construcción y mantenimiento de la pared celular, además de otros relacionados con el metabolismo y obtención de energía y la defensa celular. Sin embargo, hubo poca representación de genes implicados en transcripción, síntesis de proteínas y crecimiento celular. Se vio además que esos genes presentaban secuencias de unión para factores de transcripción implicados en la respuesta a estrés y a choque térmico, especialmente para Rlm1p y Swi4p. Ambos factores de transcripción, mediados por *PKC1*, están relacionados con la activación de genes con funciones en la síntesis de pared celular y en el paso de G1a S del ciclo celular. Los datos que presentaron llevaron a la conclusión de que el mecanismo compensatorio de la pared celular integraba tres vías reguladoras: la vía de las MAPK *PKC1-SLT1*, la respuesta global a estrés de Msn2/4p y la vía dependiente de Ca^{2+} /Calcineurina. Distintos estudios han mostrado que la vía de PKC y la de HOG interaccionan de alguna manera en distintos puntos (Lesage y Bussey, 2006).

A diferencia del estudio de Lagorce *et al.* (2003), nosotros sólo encontramos uno de los genes relacionados con la síntesis de quitina con niveles de expresión aumentados (*YGR189C/CRH1*) y además con un nivel muy bajo (1,59 veces). Por tanto, los resultados sugieren que en el caso de la cepa *vps74/mnn3Δ* no se está recurriendo tanto al incremento en la proporción de quitina en la pared celular como mecanismo de reforzamiento y defensa de la misma. De hecho, en nuestro caso sólo hemos coincidido con el estudio de Lagorce *et al.* (2003) en 13 genes: *YDR055W/PST1*, *YGL248W/PDE1*, *YGR138C/TPO2*, *YGR189C/CRH1*, *YHR030C/SLT2*, *YKL159C/RCN1*, *YKL161C/MLP1*, *YLR121C/YPS3*, *YLR438W/CAR2*, *YMR173W/DDR48*, *YMR238W/DFG5*,

YNL036W/*NCE103*, YNL160W/*YGP1*. Además, en nuestro estudio, dos de ellos (*CAR2*, *NCE103*) mostraron un nivel de expresión reducido con respecto a la cepa silvestre, al contrario que en el estudio de Lagorce *et al.* (2003). El hecho de que la delección de *MNN2* no produjera cambios significativos en los genes relacionados con los daños en la pared, las cascadas de señalización de estrés, etc... y sin embargo, la delección de *vps74/mnn3* sí lo produjera, podría deberse a que el defecto de *vps74/mnn3Δ* con respecto a la glicosilación de proteínas es mayor que en el caso de *mnn2Δ*. Esto implicaría la secreción de componentes de la pared celular altamente defectuosos o incompletos, comprometiendo por tanto la integridad y estabilidad de la misma.

En nuestro estudio, la vía de *HOG1* está claramente implicada, debido al número de genes relacionados con esa vía que han sido seleccionados. Hog1p es una MAPK implicada en numerosos procesos adaptativos en *S. cerevisiae* (Pascual-Ahuira *et al.*, 2006). En condiciones de estrés, Hog1p puede inhibir la progresión del ciclo celular mediante el inhibidor de CDKs Sic1p (Escoté *et al.*, 2004) y puede regular las eficiencias de transcripción mediante la quinasa Rck2p (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001). Sic1p inhibe complejos Cdc28p-Cdb quinasa, que controlan la transición de G1 a S. Esto es interesante puesto que en nuestro estudio todos los genes relacionados con el ciclo celular mostraron reducción en su nivel de expresión, como se muestra en la Tabla V.4. Además, fueron seleccionados varios genes que codificaban substratos comprobados o potenciales de Cdc28p con niveles de expresión reducido (y uno aumentado) en la cepa estudiada con respecto a la cepa silvestre. Con respecto a Rck2p, ésta no fue seleccionada pero sí una proteína relacionada con ella, *RCK1*, y con un nivel de expresión reducido, como ya se comentó anteriormente en el apartado correspondiente.

Una vez activado, Hog1p es transportado al núcleo donde activa un complejo mecanismo de transcripción. Esta MAPK interacciona y fosforila al menos tres factores de transcripción: Sko1p, Hot1p, y Smp1p (de Nadal *et al.*, 2003). Como se indicó anteriormente, el nivel de expresión de Smp1p estaba aumentado en *vps74/mnn3Δ*. *SKO1* y *HOT1* no fueron detectados, implicando quizás que no están tan relacionados con la respuesta a la inestabilidad de la pared como *SMP1*.

La mayor vía de señalización para regular la integridad de la pared celular es la vía de PKC (Levin, 2005). Esta vía posee un módulo sensor que activa Rho1p, la cual dispara una cascada de MAPKs en la que participan la proteína quinasa C Pkc1p, la MEKK Bck1p, las MEKs redundantes Mkk1p y Mkk2p, y la MAPK Slt2p. La versión activada de Slt2p fosforila factores de transcripción como Rlm1p y las subunidades SBF de Swi4 y Swi6 (Lesage y Bussey, 2006). Como se comentó anteriormente, nuestra cepa *vps74/mnn3Δ* tiene unos niveles aumentados de Slt2p. Además, otra proteína quinasa, la codificada por YKL161C, relacionada con Slt2p y Rlm1p, también mostró niveles de expresión aumentados.

La función de detección de daño en la pared (*sensing*) la llevan a cabo las proteínas, probablemente mecanosensores (Philip y Levin, 2001) Slg1p/Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p, Mid2p y Mtl1p, que posteriormente activan Rho1p mediante el reclutamiento de la Rho1-GEF, Rom2p (Philip y Levin, 2001). Ninguna de estas 5 parece tener alterado su nivel de expresión en la cepa estudiada, *vps74/mnn3Δ*.

Rho1p tiene al menos cuatro efectores, Pkc1p, Fks1p, Bni1p y Sec3p. Uno de esos efectores ha sido seleccionado en nuestro estudio con valores de nivel de transcripción alterados. Fks1p fue detectada con su nivel de expresión aumentado, con respecto a la cepa silvestre. Pkc1p actúa como regulador del ensamblaje de la pared al menos de tres maneras (Lesage y Bussey, 2006), siendo una de ellas en la que transmite la señalización de Rho1p a la ruta de las MAPK. Además seleccionamos Bag7p, también con nivel de expresión aumentado, que es un activador de Rho1p; así mismo Sfk1p, involucrada en el inicio de la cascada de señalización de Rho1p, también fue seleccionada y afectada en el mismo modo. Rho1p es, por tanto, una encrucijada de varias rutas de señalización, y actúa como un integrador de señales.

Dado que sus componentes están relacionados con muchas funciones celulares, la vía de señalización de la integridad de la pared de PKC, coordina el ensamblaje de la pared con el ciclo celular, la polaridad celular y la secreción. La compartimentación de la señalización, y las moléculas reguladoras explicarían cómo esas proteínas llevarían a cabo sus diversas funciones en armonía (Lesage y Bussey, 2006).

Uno de los hallazgos curiosos de nuestro estudio fue el encontrar 11 pares de genes/ORFs y un trío, que se encontraban contiguos en el genoma y estaban regulados de la misma forma. Es el caso de los pares YAL054C/ACS1-YAL055W/PEX22, YCL027C-A-YCL027W/FUS1, YDR372C/VPS74-YDR373W/FRQ1, YGL007W/BRP1-YGL008C/PMA1, YGL262W-YGL263W/COS12, YIR027C/DAL1-YIR028W/DAL4, YLR437C/DIF1-YLR438W/CAR2, YML052W/SUR7-YML053C, YMR117C/SPC24-YMR118C, YMR173W/DDR48-YMR173W-A, YNL194C-YNL195C-YNL196C, e YPL060W/LPE10-YPL061W/ALD6 (Ver Tablas V.3 y V.4; algunos de los genes previamente indicados no se encuentran en dichas tablas pues su nivel de expresión se encontraba entre 1,5 y 1,6 veces alterado con respecto a la cepa silvestre). Dentro de este grupo quisiéramos destacar el caso de YGL008C/PMA1 e YGL007W/BRP1 que como se indicó en el apartado correspondiente, el primero de ellos codifica la protón ATPasa de membrana plasmática, mientras que el segundo parece influir sobre su expresión. Otro par interesante es el formado por YIR027C/DAL1 e YIR028W/DAL4 que codifican una alantoinasa y una alantoín-permeasa. Ambos genes tienen funciones relacionadas y su nivel de expresión está reducido en ambos de forma similar (ver Tablas V.3 y V.4). Al igual que con el par anterior, es muy probable que su posición en el genoma esté relacionada con su regulación. Por último, queremos mencionar el trío YNL194C-YNL195C-YNL196C/SLZ1 formado por tres proteínas de función desconocida, cuyos genes están contiguos en el cromosoma XIV, y con su nivel de expresión reducido en torno a 2 veces con respecto a la cepa silvestre (Tablas V.3 y V.4). Ya se comentó en el apartado correspondiente que YNL194C e YNL195C compartían promotor, y además YNL196C/SLZ1 codifica una proteína con cremallera de leucina, que quizás tuviese capacidad de unión a ADN (Briza *et al.*, 2002).

Con el fin de resumir y aclarar la multitud de cambios, provocados por la delección de *VPS74/MNN3*, en el transcriptoma de *S. cerevisiae*, hemos creído conveniente hacer el siguiente balance de los resultados:

- Se desencadenaron distintas respuestas al daño en la pared celular, concretamente las relacionadas con MAPKs, HOG, Rho1 y Pkc1.
- El “mecanismo de compensación de la pared celular” no parece desencadenarse en la cepa estudiada y tampoco la vía de calcio/calcineurina.

- Las funciones de reparación o mantenimiento de la pared recaen sobre la actividad glucosidasa y glucanosintetasa más que en las relacionadas con el contenido en quitina.
- Ciertos genes relacionados con el control de calidad en proteínas parecen estar involucrados. Esto es especialmente interesante si tenemos en cuenta que la función del gen deletado en la cepa estudiada es la del reciclaje de las enzimas relacionadas con la glicosilación.
- Los mecanismos de control y organización del citoesqueleto se ven alterados en la cepa estudiada, especialmente aquellos relacionados con los microtúbulos, el huso mitótico, el cuerpo polar del huso, etc...
- La producción y respuesta a feromonas parece estar reducida en esta cepa.
- No se ha visto alteración en el nivel de expresión de ninguna de las enzimas de glicosilación del aparato de Golgi que dependen de la actividad de Vps74p/Mnn3p para su correcto funcionamiento.

3. REFERENCIAS

- Abdel-Sater, F., Iraqui, I., Urrestarazu, A. and Andre, B. (2004). "The external amino acid signaling pathway promotes activation of Stp1 and Uga35/Dal81 transcription factors for induction of the *AGP1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **166**(4): 1727-1739.
- Ames, J. B., Hendricks, K. B., Strahl, T., Huttner, I. G., Hamasaki, N. and Thorner, J. (2000). "Structure and Calcium-Binding Properties of Frq1, a Novel Calcium Sensor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochemistry* **39**(40): 12149-12161.
- Andrews, P. D. and Stark, M. J. (2000). "Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth." *J Cell Sci* **113**(15): 2685-2693.
- Audhya, A. and Emr, S. D. (2002). "Stt4 PI 4-Kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP Kinase Cascade." **2**(5): 593-605.
- Audhya, A., Foti, M. and Emr, S. D. (2000). "Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p y Pkc1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics." *Mol. Biol. Cell* **11**(8): 2673-2689.
- Ballou, C. E. (1990). "Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects." *Methods Enzymol.* **185**: 445-470.
- Bilsland-Marchesan, E., Arino, J., Saito, H., Sunnerhagen, P. and Posas, F. (2000). "Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1." *Mol. Cell. Biol.* **20**(11): 3887-3895.

- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A. and Sunnerhagen, P. (2004). "Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance." *Mol. Microbiol.* **53**(6): 1743-1756.
- Boer, V. M., de Winde, J. H., Pronk, J. T. and Piper, M. D. W. (2003). "The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur." *J. Biol. Chem.* **278**(5): 3265-3274.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. and Bonifacio, J. S. (2002). "Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **13**(7): 2486-2501.
- Bonilla, M. and Cunningham, K. W. (2003). "Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast." *Mol. Biol. Cell* **14**(10): 4296-4305.
- Boorsma, A., Nobel, H. d., Riet, B. t., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K. J. and Klis, F. M. (2004). "Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **21**(5): 413-427.
- Briza, P., Bogengruber, E., Thür, A., Rützler, M., Münsterkötter, M., Dawes, I. W. and Breitenbach, M. (2002). "Systematic analysis of sporulation phenotypes in 624 non-lethal homozygous deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **19**(5): 403-422.
- Brown, J. L., Jaquenoud, M., Gulli, M.-P., Chant, J. and Peter, M. (1997). "Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast." *Genes Dev.* **11**(22): 2972-2982.
- Brown, S., Stockdale, V., Pettolino, F., Pocock, K., de Barros Lopes, M., Williams, P., Bacic, A., Fincher, G., Høj, P. and Waters, E. (2007). "Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**(6): 1363-1376.
- Burchett, S. A., Scott, A., Errede, B. and Dohlman, H. G. (2001). "Identification of novel pheromone-response regulators through systematic overexpression of 120 protein kinases in yeast." *J. Biol. Chem.* **276**(28): 26472-26478.
- Cameroni, E., De Virgilio, C. and Deloche, O. (2006). "Phosphatidylinositol 4-phosphate is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **281**(50): 38139-38149.
- Cleves, A. E., Cooper, D. N., Barondes, S. H. and Kelly, R. B. (1996). "A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Cell Biol.* **133**(5): 1017-1026.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2005). "A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides." *Fungal Genet. Biol.* **42**(9): 773-790.
- Cox, K. H., Pinchak, A. B. and Cooper, T. G. (1999). "Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization." *Yeast* **15**(8): 703-713.
- Crabeel, M., Seneca, S., Devos, K. and Glansdorff, N. (1988). "Arginine repression of the *Saccharomyces cerevisiae* ARG1 gene." *Curr. Genet.* **13**(2): 113-124.
- Curtiss, M., Jones, C. and Babst, M. (2007). "Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12." *Mol. Biol. Cell* **18**(2): 636-645.
- Chen, C.-N., Porubleva, L., Shearer, G., Svrakic, M., Holden, L. G., Dover, J. L., Johnston, M., Chitnis, P. R. and Kohl, D. H. (2003). "Associating protein activities with their genes: rapid identification of a gene encoding a methylglyoxal reductase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **20**(6): 545-554.
- Chen, P., Sapperstein, S. K., Choi, J. D. and Michaelis, S. (1997). "Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone a-Factor." *J. Cell Biol.* **136**(2): 251-269.
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S. and Emr, S. D. (2006). "New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly." *J. Cell Biol.* **175**(5): 815-823.
- de Bruin, R. A. M., Kalashnikova, T. I., Chahwan, C., McDonald, W. H., Wohlschlegel, J., Yates, J., Russell, P. and Wittenberg, C. (2006). "Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: The MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback." *Mol. Cell* **23**(4): 483-496.
- de Nadal, E., Casadomé, L. and Posas, F. (2003). "Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase." *Mol. Cell Biol.* **23**(1): 229-237.
- Demmel, L., Beck, M., Klose, C., Schlaitz, A.-L., Gloor, Y., Hsu, P. P., Havlis, J., Shevchenko, A., Krause, E., Kalaidzidis, Y. and Walch-Solimena, C. (2008). "Nucleocytoplasmic shuttling of the Golgi phosphatidylinositol 4-kinase Pik1 is regulated by 14-3-3 proteins and coordinates Golgi function with cell growth." *Mol. Biol. Cell* **19**(3): 1046-1061.

- Despons, L., Wirth, B., Louis, V. L., Potier, S. and Souciet, J.-L. (2006). "An evolutionary scenario for one of the largest yeast gene families." *Trends Genet.* **22**(1): 10-15.
- Destruelle, M., Holzer, H. and Klionsky, D. J. (1994). "Identification and characterization of a novel yeast gene: the *YGP1* gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation." *Mol. Cell. Biol.* **14**(4): 2740-2754.
- Dodou, E. and Treisman, R. (1997). "The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway." *Mol. Cell. Biol.* **17**(4): 1848-1859.
- Erasmus, D. J., Merwe, G. K. and Vuuren, H. J. J. (2003). "Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress." *FEMS Yeast Res.* **3**(4): 375-399.
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J. and Posas, F. (2004). "Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1." *Nat Cell Biol* **6**(10): 997-1002.
- Euskirchen, G. M. (2002). "Nnf1p, Dsn1p, Mtw1p, and Nsl1p: a new group of proteins important for chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot. Cell* **1**(2): 229-240.
- Fernandes, A. R., Mira, N. P., Vargas, R. C., Canelhas, I. and Sá-Correia, I. (2005). "*Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**(1): 95-103.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Lucas, C. and Brandt, A. (2005). "A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **16**(4): 2068-2076.
- Flanagan, C. A., Schnieders, E. A., Emerick, A. W., Kunisawa, R., Admon, A. and Thorner, J. (1993). "Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability." *Science* **262**(5138): 1444-1448.
- Flick, J. S. and Thorner, J. (1993). "Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **13**(9): 5861-5876.
- Forsberg, H., Gilstring, C. F., Zargari, A., Martínez, P. and Ljungdahl, P. O. (2001). "The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids." *Mol. Microbiol.* **42**(1): 215-228.
- Fujii, T., Shimoi, H. and Imura, Y. (1999). "Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1427**(2): 133-144.
- Fujita, A., Hiroko, T., Hiroko, F. and Oka, C. (2005). "Enhancement of superficial pseudohyphal growth by overexpression of the *SFG1* gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* **363**: 97-104.
- García-Bustos, J. F., Marini, F., Stevenson, I., Frei, C. and Hall, M. N. (1994). "PIK1, an essential phosphatidylinositol 4-kinase associated with the yeast nucleus." *EMBO J.* **13**(10): 2352-2361.
- Grether, M. E. and Herskowitz, I. (1999). "Genetic and biochemical characterization of the yeast Spo12 protein." *Mol. Biol. Cell* **10**(11): 3689-3703.
- Hama, H., Schnieders, E. A., Thorner, J., Takemoto, J. Y. and DeWald, D. B. (1999). "Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **274**(48): 34294-34300.
- Harrison, J. C., Bardes, E. S. G., Ohya, Y. and Lew, D. J. (2001). "A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint." *Nat Cell Biol* **3**(4): 417-420.
- Hendricks, K. B., Qing Wang, B., Schnieders, E. A. and Thorner, J. (1999). "Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase." *Nat Cell Biol* **1**(4): 234-241.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Gillece-Castro, B. L., Burlingame, A. L. and Ballou, C. E. (1989a). "A new *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutant *N*-linked oligosaccharide structure." *J. Biol. Chem.* **264**(20): 11849-11856.
- Hernández, L. M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P. K. and Ballou, C. E. (1989b). "Structure of the phosphorylated *N*-linked oligosaccharides from the *mnn9* and *mnn10* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13648-13659.
- Hess, D. (2008). Comunicación personal a Saccharomyces Genome Database
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* **425**(6959): 686-691.
- Huttner, I. G., Strahl, T., Osawa, M., King, D. S., Ames, J. B. and Thorner, J. (2003). "Molecular Interactions of Yeast Frequenin (Frq1) with the Phosphatidylinositol 4-Kinase Isoform, Pik1." *J. Biol. Chem.* **278**(7): 4862-4874.

- Hwang, P. K., Tugendreich, S. and Fletterick, R. J. (1989). "Molecular analysis of *GPH1*, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **9**(4): 1659-1666.
- Indjeian, V. B., Stern, B. M. and Murray, A. W. (2005). "The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes." *Science* **307**(5706): 130-133.
- Inoue, S. B., Takewakt, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y. and Watanabe, T. (1995). "Characterization and gene cloning of 1,3-β-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur. J. Biochem.* **231**(3): 845-854.
- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C. and Schiebel, E. (2001). "The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control." *EMBO J.* **20**: 777-791.
- Jung, U. S. and Levin, D. E. (1999). "Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway." *Mol. Microbiol.* **34**(5): 1049-1057.
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J. and Levin, D. E. (2002). "Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase." *Mol. Microbiol.* **46**(3): 781-789.
- Kamei, T., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Imamura, H., Kikyo, M., Ozaki, K. and Takai, Y. (1998). "Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **273**(43): 28341-28345.
- Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J.-H. and Johnston, M. (2004). "Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot. Cell* **3**(1): 221-231.
- Kawasaki, R., Fujimura-Kamada, K., Toi, H., Kato, H. and Tanaka, K. (2003). "The upstream regulator, Rsr1p, and downstream effectors, Gic1p and Gic2p, of the Cdc42p small GTPase coordinately regulate initiation of budding in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Cells* **8**(3): 235-250.
- Keller, G., Ray, E., Brown, P. O. and Winge, D. R. (2001). "Haa1, a protein homologous to the copper-regulated transcription factor Ace1, is a novel transcriptional activator." *J. Biol. Chem.* **276**(42): 38697-38702.
- Kim, J.-H., Polish, J. and Johnston, M. (2003). "Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1." *Mol. Cell. Biol.* **23**(15): 5208-5216.
- Kingsbury, T. J. and Cunningham, K. W. (2000). "A conserved family of calcineurin regulators." *Genes Dev.* **14**(13): 1595-1604.
- Kitagaki, H., Ito, K. and Shimo, H. (2004). "A temperature-sensitive *dcw1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle arrested with small buds which have aberrant cell walls." *Eukaryot. Cell* **3**(5): 1297-1306.
- Kleinschmidt, M., Grundmann, O., Blüthgen, N., Mösch, H.-U. and Braus, G. (2005). "Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* cells under adhesion-inducing conditions." *Mol. Genet. Genomics* **273**(5): 382-393.
- Kondo, K. and Inouye, M. (1991). "*TIP 1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **266**(26): 17537-17544.
- Kusmierczyk, A. R., Kunjappu, M. J., Funakoshi, M. and Hochstrasser, M. (2008). "A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes." *Nat Struct Mol Biol* **15**(3): 237-244.
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D. and Francois, J. (2003). "Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **278**(22): 20345-20357.
- Lavoie, B. D., Tuffo, K. M., Oh, S., Koshland, D. and Holm, C. (2000). "Mitotic chromosome condensation requires Brn1p, the yeast homologue of barren." *Mol. Biol. Cell* **11**(4): 1293-1304.
- Lesage, G. and Bussey, H. (2006). "Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(2): 317-343.
- Levin, D. E. (2005). "Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**(2): 262-291.
- Levin, D. E., Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y. and Watanabe, M. (1994). "Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**(3): 229-239.
- Lucau-Danila, A., Delaveau, T., Lelandais, G., Devaux, F. and Jacq, C. (2003). "Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon." *J. Biol. Chem.* **278**(52): 52641-52650.

- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M. (1999). "The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling." *Mol. Biol. Cell* **10**(1): 91-104.
- Madden, K., Sheu, Y.-J., Baetz, K., Andrews, B. and Snyder, M. (1997). "SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway." *Science* **275**(5307): 1781-1784.
- Mañas, P., Olivero, I., Avalos, M. and Hernandez, L. M. (1997). "Isolation of new nonconditional *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in asparagine-linked glycosylation." *Glycobiology* **7**(4): 487-497.
- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., Basmaji, F., Lagorce, A. and Francois, J. (2003). "The interaction of Slr2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Microbiol.* **49**(1): 23-35.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A. and Mann, C. (1993). "The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Cell Biol.* **123**(6): 1821-1833.
- Mendenhall, M. D. and Hodge, A. E. (1998). "Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(4): 1191-1243.
- Molin, M., Norbeck, J. and Blomberg, A. (2003). "Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone." *J. Biol. Chem.* **278**(3): 1415-1423.
- Mrsarona, V. and Tanner, W. (1999). "Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall." *Yeast* **15**(10A): 813-820.
- Nakamura, T., Ohmoto, T., Hirata, D., Tsuchiya, E. and Miyakawa, T. (1997). "Yeast Crv4/Ttp1, a predicted type II membrane protein, is involved in an event important for growth, functionally overlapping with the event regulated by calcineurin- and Mpk1-mediated pathways." *Mol. Gen. Genet.* **256**(5): 481-487.
- Nelson, B., Parsons, A. B., Evangelista, M., Schaefer, K., Kennedy, K., Ritchie, S., Petryshen, T. L. and Boone, C. (2004). "Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating." *Genetics* **166**(1): 67-77.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V. R. and Marcotte, E. M. (2008). "Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*." *PLoS Genet.* **4**(7): e1000120.
- Ogawa, N., DeRisi, J. and Brown, P. O. (2000). "New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis." *Mol. Biol. Cell* **11**(12): 4309-4321.
- Olivero, I., Mañas, P. and M. Hernández, L. (2000). "The *mnn2* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is affected in phosphorylation of N-linked oligosaccharides." *FEBS Lett.* **475**(2): 111-116.
- Olsen, V., Cawley, N. X., Brandt, J., Egel-Mitani, M. and Loh, Y. P. (1999). "Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the *YPS3* gene." *Biochem. J.* **339**: 407-411.
- Orlando, K., Zhang, J., Zhang, X., Yue, P., Chiang, T., Bi, E. and Guo, W. (2008). "Regulation of Gic2 localization and function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate during the establishment of cell polarity in budding yeast." *J. Biol. Chem.* **283**(21): 14205-14212.
- Ozcan, S., Leong, T. and Johnston, M. (1996). "Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription." *Mol. Cell. Biol.* **16**(11): 6419-6426.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sánchez, M., Gil, C. and Nombela, C. (1999). "Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall." *Yeast* **15**(6): 459-472.
- Pascual-Ahuira, A., Struhlb, K. and Proft, M. (2006). "Genome-wide location analysis of the stress-activated MAP kinase Hog1 in yeast." *Methods* **40**(3): 272-278.
- Philip, B. and Levin, D. E. (2001). "Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1." *Mol. Cell. Biol.* **21**(1): 271-280.
- Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P. and Cole, M. (1997). "Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase." *Cell Stress Chaperones* **2**(1): 12-14.

- Porat, Z., Wender, N., Erez, O. and Kahana, C. (2005). "Mechanism of polyamine tolerance in yeast: novel regulators and insights." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **62**(24): 3106-3116.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. and Ohya, Y. (1996). "Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-β-glucan synthase." *Science* **272**(5259): 279-281.
- Rayner, J. C. and Munro, S. (1998). "Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **273**(41): 26836-26843.
- Rebecchi, M. J. and Pentylala, S. N. (2000). "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific Phospholipase C." *Physiol. Rev.* **80**(4): 1291-1335.
- Rep, M., Proft, M., Remize, F., Tamás, M., Serrano, R., Thevelein, J. M. and Hohmann, S. (2001). "The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage." *Mol. Microbiol.* **40**(5): 1067-1083.
- Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, I., Crouzet, M. and Doignon, F. (2001). "Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett.* **506**(2): 149-156.
- Sciorra, V. A., Audhya, A., Parsons, A. B., Segev, N., Boone, C. and Emr, S. D. (2005). "Synthetic genetic array analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p identifies components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase signaling pathway." *Mol. Biol. Cell* **16**(2): 776-793.
- Schmidt, A., Schmelzle, T. and Hall, M. N. (2002). "The RHO1-GAPs *SAC7*, *BEM2* and *BAG7* control distinct *RHO1* functions in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Microbiol.* **45**(5): 1433-1441.
- Schramm, C., Elliott, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Schiebel, E. (2000). "The Bbp1p-Mps2p complex connects the SPB to the nuclear envelope and is essential for SPB duplication." *EMBO J.* **19**: 421-433.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R. (1986). "Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases." *Nature* **319**(6055): 689-693.
- Seymour, I. J. and Piper, P. W. (1999). "Stress induction of *HSP30*, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors." *Microbiology* **145**: 231-239.
- Shan, X., Xue, Z., Euskirchen, G. and Melese, T. (1997). "NNF1 is an essential yeast gene required for proper spindle orientation, nucleolar and nuclear envelope structure and mRNA export." *J Cell Sci* **110**(14): 1615-1624.
- Shanks, R. M. Q., Kamieniecki, R. J. and Dawson, D. S. (2001). "The Kar3-interacting protein Cik1p plays a critical role in passage through meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **159**(3): 939-951.
- Shelton, S. N., Barylko, B., Binns, D. D., Horazdovsky, B. F., Albanesi, J. P. and Goodman, J. M. (2003). "*Saccharomyces cerevisiae* contains a Type II phosphoinositide 4-kinase." *Biochem. J.* **371**(2): 533-540.
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., Ende, H. v. d. and Kli, F. M. (1999). "Cell wall dynamics in yeast." *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(4): 348-352.
- Spode, I., Maiwald, D., Hollenberg, C. P. and Suckow, M. (2002). "ATF/CREB sites present in subtelomeric regions of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes are part of promoters and act as UAS/URS of highly conserved *COS* genes." *J. Mol. Biol.* **319**(2): 407-420.
- Strahl, T., Hama, H., DeWald, D. B. and Thorner, J. (2005). "Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus." *J. Cell Biol.* **171**(6): 967-979.
- Strahl, T., Huttner, I. G., Lusin, J. D., Osawa, M., King, D., Thorner, J. and Ames, J. B. (2007). "Structural insights into activation of phosphatidylinositol 4-Kinase (Pik1) by yeast Frequentin (Frq1)." *J. Biol. Chem.* **282**(42): 30949-30959.
- Sunnarborg, S. W., Miller, S. P., Unnikrishnan, I. and LaPorte, D. C. (2001). "Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway." *Yeast* **18**(16): 1505-1514.
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C. R., Radinovic, S., Molina, M. M. S., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H. and Michnick, S. W. (2008). "An *in vivo* map of the yeast protein interactome." *Science* **320**(5882): 1465-1470.

- Teige, M., Scheickl, E., Reiser, V., Ruis, H. and Ammerer, G. (2001). "Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(10): 5625-5630.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K. and Kitada, K. (2000). "Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of *FKS1* in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and General Genetics MGG* **264**(1): 64-74.
- Toh-E, A., Oguchi, T., Matsui, Y., Yasunaga, S., Nisogi, H. and Tanaka, K. (1993). "Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock." *Yeast* **9**(5): 481-494.
- Tong, A. H. Y., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. F., Brost, R. L., Chang, M., Chen, Y., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D. S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson, J. N., Lu, H., Menard, P., Munyana, C., Parsons, A. B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A.-M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S. L., Zhang, L. V., Zhu, H., Burd, C. G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F. P., Brown, G. W., Andrews, B., Bussey, H. and Boone, C. (2004). "Global mapping of the yeast genetic interaction network." *Science* **303**(5659): 808-813.
- Trueheart, J., Boeke, J. D. and Fink, G. R. (1987). "Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein." *Mol. Cell. Biol.* **7**(7): 2316-2328.
- Tu, J. and Carlson, M. (1995). "REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J.* **14**(23): 5939-5946.
- Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M. and Morgan, D. O. (2003). "Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1." *Nature* **425**(6960): 859-864.
- Walch-Solimena, C. and Novick, P. (1999). "The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase *pik1* regulates secretion at the Golgi." *Nat. Cell Biol.* **1**(8): 523-525.
- Watanabe, M., Chen, C. Y. and Levin, D. E. (1994). "*Saccharomyces cerevisiae* *PKC1* encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC." *J. Biol. Chem.* **269**(24): 16829-16836.
- Watanabe, Y., Irie, K. and Matsumoto, K. (1995). "Yeast *RLM1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway." *Mol. Cell. Biol.* **15**(10): 5740-5749.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K. and Matsumoto, K. (1997). "Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *Rlm1*, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway." *Mol. Cell. Biol.* **17**(5): 2615-2623.
- Wilson, M. A., Amour, C. V. S., Collins, J. L., Ringe, D. and Petsko, G. A. (2004). "The 1.8-Å resolution crystal structure of YDR533Cp from *Saccharomyces cerevisiae*: A member of the DJ-1/Thi1/Pfpl superfamily." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(6): 1531-1536.
- Yang, Y. and Strittmatter, S. (2007). "The reticulons: a family of proteins with diverse functions." *Genome Biology* **8**(12): 234.
- Yoko-o, T., Matsui, Y., Yagisawa, H., Nojima, H., Uno, I. and Toh-e, A. (1993). "The putative phosphoinositide-specific phospholipase C gene, *PLC1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is important for cell growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(5): 1804-1808.
- York, J. D. (2006). "Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1761**(5-6): 552-559.
- Young, M. E., Karpova, T. S., Brugger, B., Moschenross, D. M., Wang, G. K., Schneiter, R., Wieland, F. T. and Cooper, J. A. (2002). "The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation." *Mol. Cell. Biol.* **22**(3): 927-934.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K. J. and Klis, F. M. (2005). "Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan." *Eukaryot. Cell* **4**(4): 703-715.

EFICIENCIA DE LA OLIGOSACARILTRANSFERASA PARA GLICOSILAR SITIOS ESPECÍFICOS BAJO CONDICIONES LIMITANTES DE SUBSTRATO

1. INTRODUCCIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Hipoglicosilación dependiente de sitio en condiciones de limitación de LLO

2.2. Características de los secuencias con eficiencia de glicosilación variable

2.3. Introducción de secuencias en una glicoproteína modelo

2.4. Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDGs)

3. CONSIDERACIONES FINALES

4. REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

La *N*-glicosilación es una modificación post-traducciona común y esencial en las proteínas de eucariotas. Los *N*-oligosacáridos de las glicoproteínas juegan papeles muy importantes, entre los que cabe destacar la ayuda al plegamiento correcto y la modulación de su actividad, en el caso de algunas proteínas enzimáticas (Varki, 1993; Sharon y Lis, 1995; Helenius y Aebi, 2004; Ohtsubo y Marth, 2006).

Una etapa fundamental en el proceso de *N*-glicosilación es la transferencia en bloque del oligosacárido desde un dolicol-fosfato donante a determinadas asparaginas en los polipéptidos sustrato. Este paso se produce en el lumen del retículo endoplasmático (RE) y es catalizado por la enzima oligosacariltransferasa (OST) (Helenius y Aebi, 2004).

La OST es un complejo multiproteico formado por hasta ocho subunidades en los eucariotas superiores, incluyendo los vertebrados y *S. cerevisiae* (Kelleher y Gilmore, 2006). Para poder ser glicosiladas, las asparraginas deben estar situadas en un secuencia de glicosilación (N-x-S/T; x≠P), pero no todos esos secuencias en las proteínas translocadas al RE se glicosilan (Gavel y von Heijne, 1990). Además, no todos los sitios se ven afectados de la misma forma por las alteraciones genéticas de las subunidades de la OST (Schulz y Aebi, 2008; Schulz *et al.*, *en prensa-b*), o en los desórdenes congénitos de glicosilación (CDG) (Mills *et al.*, 2003; Hulsmeier *et al.*, 2007). De todos modos, los factores precisos que determinan la alta eficiencia de la OST para glicosilar determinados sitios y no otros, todavía no han sido esclarecidos. En algunos estudios anteriores se ha intentado determinar qué características de los secuencias son las responsables de su eficiente glicosilación. En estos análisis se utilizaron glicoproteínas modelo en sistemas *ex vivo* o *in vitro*, o se llevaron a cabo comparaciones bioinformáticas de glicoproteínas de muchos sistemas diferentes, y se encontró que, en general, (a) los secuencias NxT se glicosilan con mayor eficiencia que los NxS (Bause y Legler, 1981; Kasturi *et al.*, 1995; Petrescu *et al.*, 2004b); (b) los aminoácidos en la proximidad de los secuencias pueden influir en la eficiencia de su glicosilación (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996; Kasturi *et al.*, 1997; Mellquist *et al.*, 1998; Petrescu *et al.*, 2004b), y (c) que el plegamiento de la proteína compite con la glicosilación (Allen *et al.*, 1995; Holst *et al.*, 1996).

Gracias a becas de FEMS (Federación Europea de Sociedades Microbiológicas) y EMBO (Organización Europea de Biología Molecular), el Doctorando tuvo la oportunidad de realizar una estancia de 6 meses en el Instituto Tecnológico Federal Suizo (ETH) de Zúrich (Suiza), en el grupo del Dr. Aebi. Durante ese tiempo tuvo acceso a un método analítico, descrito recientemente, para medir el nivel de ocupación de N-oligosacáridos en sitios específicos, en muchos secuencias de proteínas de pared de levaduras (Schulz y Aebi, 2008). Con este método hemos analizado las diferencias en eficiencias de glicosilación en numerosos sitios de glicosilación naturales en las proteínas de *S. cerevisiae*, utilizando la cepa silvestre y mutantes que presentaban alteraciones en la disponibilidad del sustrato de la OST. Nos preguntamos si proporcionando a la OST una concentración limitante de sustrato, o bien un sustrato

de estructura sub-óptima, se produciría un efecto general sobre todos los sitios de glicosilación, o uno específico en cada sitio, con respecto a su ocupación por N-oligosacáridos (Fig. VI.1). Como se indica más adelante, se han utilizado varias cepas mutantes de *S. cerevisiae* con diferentes defectos en la síntesis de oligosacárido unido a lípido (*lipid-linked oligosaccharide*, LLO). La biosíntesis de LLO (revisado en Burda y Aebi, 1999) comienza en el lado citoplasmático de la membrana del RE, con la adición secuencial de monosacáridos hasta que el LLO $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2$ se transloca al lumen del RE, un proceso que requiere Rft1p (Helenius *et al.*, 2002). En el RE, el LLO se alarga secuencialmente hasta alcanzar la estructura madura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$, la cual es el sustrato preferido del complejo de la OST (Turco *et al.*, 1977; Trimble *et al.*, 1980; Bosch *et al.*, 1988; Burda y Aebi, 1998; Karaoglu *et al.*, 2001; Kelleher *et al.*, 2003).

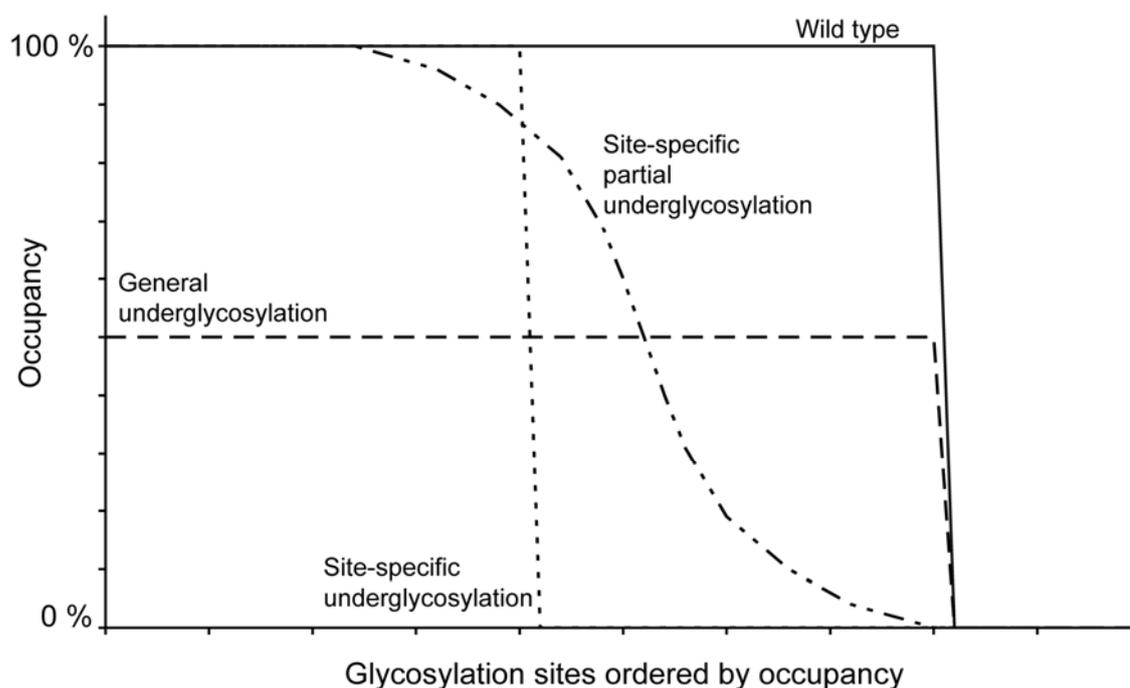


Figura VI.1. Diversos fenotipos hipotéticos de hipoglicosilación específicos de sitio. Las células silvestres glicosilan completamente la mayoría de los secuencias, mientras que otros no son ocupados. La hipoglicosilación podría ser: general, con todos los sitios afectados por igual, específica de sitio, con algunos sitios fuertemente afectados; y parcialmente específica de sitio, con una combinación de efectos. (Schulz y Aebi, 2008)

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hemos analizado la ocupación de determinados sitios de *N*-glicosilación en dos grupos diferentes de mutantes de *S. cerevisiae*. Uno de estos grupos acumulaba un determinado LLO incompleto, mientras que el otro presentaba un LLO completo, pero a concentraciones reducidas. Dentro del grupo que sintetizaba el LLO incompleto utilizamos los mutantes *alg9Δ*, que acumula el LLO $\text{Man}_6\text{NAcGlc}_2$, y *alg10Δ* que acumula $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$, (Burda *et al.*, 1996; Burda y Aebi, 1998; Frank y Aebi, 2005). Estos LLO son el más pequeño sensible a endoH, un requerimiento del método analítico que utilizamos (Schulz y Aebi, 2008) (ver Materiales y Métodos, Sección 9.4), y el que presentaba un cambio estructural mínimo comparado con la estructura madura. Además, ambos mutantes no presentan defectos en las primeras etapas biosintéticas del LLO que ocurren en la cara citoplasmática del RE, ni tampoco en la maquinaria de translocación hacia el interior de este orgánulo, por lo que la concentración de LLO en el interior del RE es la misma que en la cepa silvestre. En el otro grupo, se han utilizado mutantes *rft1Δ*, transformados cada uno de ellos con diferentes supresores de alto número de copia (*high-copy suppressors*, HCS) de la delección *rft1Δ*, por lo que acumulan $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2$ presumiblemente en la cara citoplasmática de la membrana del RE. Este LLO se transloca con diferentes eficiencias en cada una de las cepas al interior del lumen del RE, y una vez en el interior sigue la maduración hasta la estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ (Neupert y Aebi, *en preparación*). Por tanto, las distintas cepas, acumulan diferentes concentraciones del LLO maduro. De los muchos posibles HCS de la delección de *RFT1* (Neupert y Aebi, *en preparación*), seleccionamos varias cepas con fenotipo de hipoglicosilación variable, oscilando desde severo hasta cercano al silvestre. El fenotipo se determinaba mediante análisis del tamaño de la carboxipeptidasa Y (CPY) por SDS-PAGE revelado por *immunoblot* (Fig. VI.2).

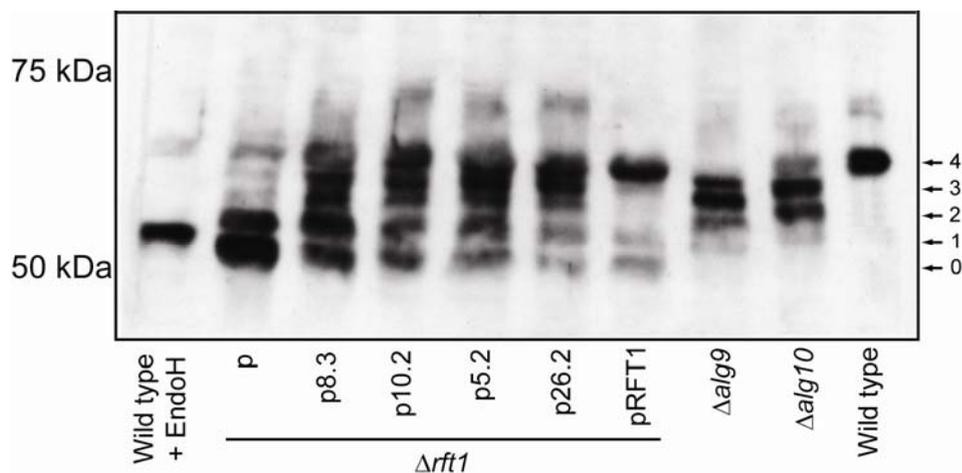


Figura VI.2. Eficiencias de glicosilación de las cepas con LLOs incompletos o con baja concentración de LLO (ver texto). Los extractos celulares crudos de las distintas cepas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), seguidamente fueron electrotransferidos a nitrocelulosa y revelados con anticuerpos anti-CPY. Las flechas indican las diferentes glicofomas con diferente número de *N*-oligosacáridos. **p8.3**, **p10.2**, **p5.2**, **p26.2**: cepas con distintos HCS de la delección de *RFT1*; **p**, plásmido sin inserto; **pRFT1**, plásmido con la secuencia de *RFT1*

2.1. Hipoglicosilación dependiente de sitio en condiciones de limitación de LLO

El análisis de los sitios de *N*-glicosilación ocupados en las proteínas de la pared celular, mediante espectrometría de masas (MS), mostró que todas las cepas deficientes en la biosíntesis de LLO exhibían un fenotipo de hipoglicosilación parcial dependiente de sitio (Fig. VI.3 y Tabla VI.1). Algunos de los sitios no se vieron afectados y siguieron completamente glicosilados, mientras que otros sitios estaban afectados en diversos grados, desde los levemente hipoglicosilados hasta los completamente desocupados. El grado de ocupación de los sitios de glicosilación de las proteínas es un reflejo de la actividad de la OST. Precisamente la medida de este parámetro en las proteínas maduras de la pared celular se ha utilizado como una medida de la actividad de la OST específica de sitio. Por este método es difícil analizar los sitios que deben ser necesariamente glicosilados para que la proteína se pliegue correctamente y pueda ser secretada. De todos modos, la mayoría de los sitios fueron detectados como parcialmente glicosilados (Fig. VI.3, Tabla VI.1) (Parsaie-Nasab *et al.*, 2008; Schulz y Aebi, 2008; Schulz *et al.*, *en prensa-a*; Schulz *et al.*, *en prensa-b*), sugiriendo que ese requerimiento absoluto no es una propiedad general de sitios de glicosilación individuales. Sólo unos pocos secuencias nunca se detectaron en forma

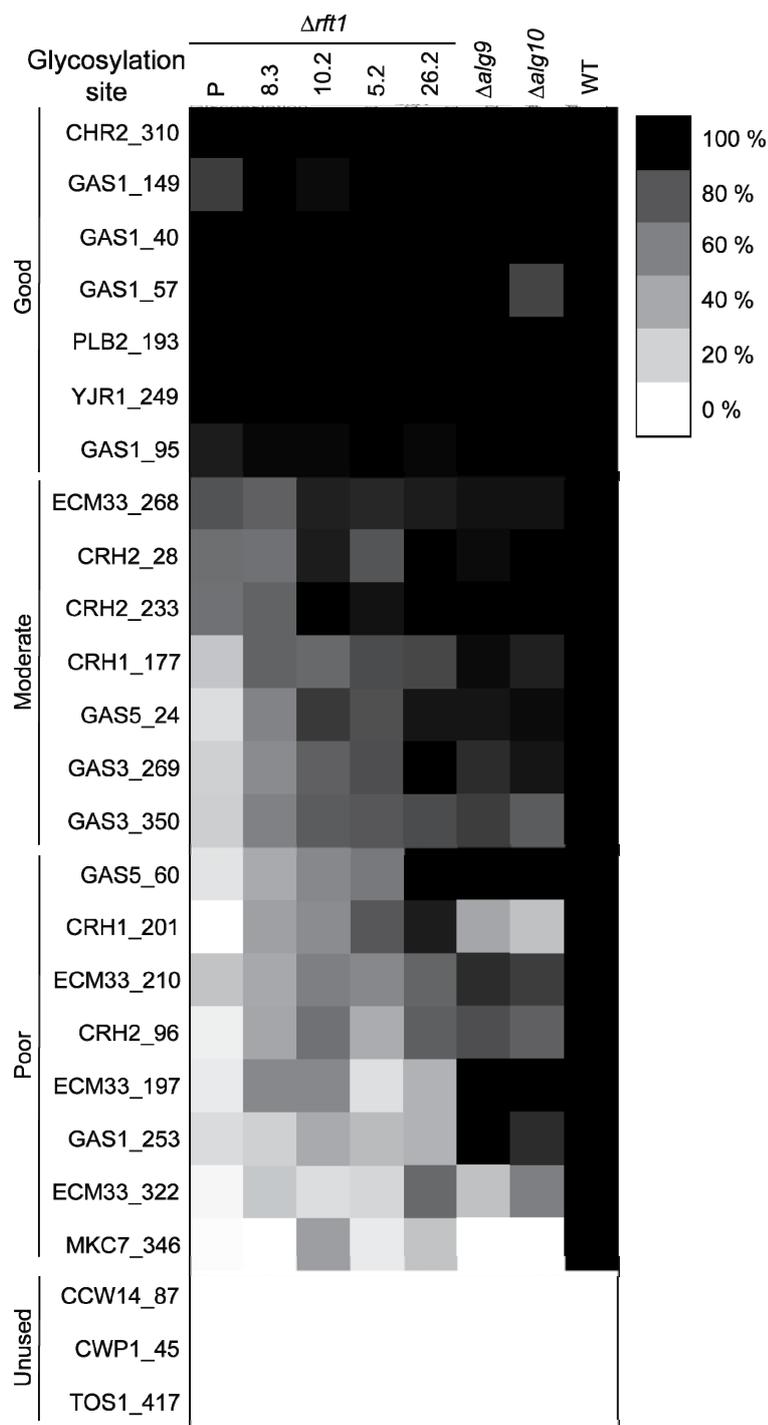


Figura VI.3. Ocupación de N-oligosacáridos específica de sitio en cepas con limitación de LLO. Las proteínas unidas covalentemente a la matriz polisacáridica de la pared celular se prepararon a partir de las células, se desglicosilaron con endoH, fueron digeridas con tripsina y AspN, y se analizaron por LC-ESI-MS/MS. La glicosilación de sitios concretos se determinó a partir de las intensidades de las formas no glicosiladas y las anteriormente glicosiladas del mismo péptido. La ocupación en cada sitio se muestra desde 100% ocupado (negro) hasta 0% ocupado (blanco). Los sitios se clasifican basándose en la eficiencia de glicosilación en las células supresoras de *rft1Δ*.

hipoglicosilada. Es posible que la glicosilación en esos sitios sea esencial para el plegamiento correcto, secreción o localización de la glicoproteína en la pared celular. Aun así, ninguno de estos secuencias está estrictamente conservado en proteínas homólogas, lo cual sería razonable si la presencia de un *N*-oligosacárido en esas posiciones fuese esencial. No obstante, no fue posible distinguir formalmente entre secuencias que estaban siempre ocupadas porque la presencia de un *N*-oligosacárido era esencial, de aquellos en los que la glicosilación es muy eficiente.

Tabla VI.1. N-glicosilación en específica de sitio en células de levadura con limitaciones en el sustrato oligosacárido unido a lípido (LLO).

Sitio de glicosilación	Cepa							
	p	<i>rft1Δ</i>				<i>alg9Δ</i>	<i>alg10Δ</i>	WT
		8.3	10.2	5.2	26.2			
CRH2_310	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
GAS1_149_165	89%	100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%
GAS1_40	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
GAS1_57	100%	100%	100%	100%	100%	100%	88%	100%
PLB2_193	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
YJR1_249	100%	100%	100%	100%	100%	nd	nd	100%
GAS1_95	95%	99%	99%	100%	99%	100%	100%	100%
ECM33_268	82%	76%	94%	93%	95%	97%	97%	100%
CRH2_28	69%	68%	95%	81%	100%	98%	100%	100%
CRH2_233_237	66%	75%	100%	97%	100%	100%	100%	100%
CRH1_177	26%	75%	72%	85%	87%	98%	94%	100%
GAS5_24	15%	59%	90%	83%	96%	96%	98%	100%
GAS3_269	21%	55%	76%	84%	100%	92%	96%	100%
GAS3_350	22%	60%	78%	80%	85%	89%	78%	100%
GAS5_60	12%	39%	56%	64%	100%	100%	100%	100%
CRH1_201	0%	44%	54%	80%	95%	41%	28%	100%
ECM33_210	27%	40%	61%	56%	74%	92%	89%	100%
CRH2_96	7%	41%	68%	38%	77%	84%	76%	100%
ECM33_197	9%	56%	56%	14%	35%	100%	100%	100%
GAS1_253	16%	21%	39%	31%	35%	100%	92%	100%
ECM33_322	4%	25%	15%	18%	72%	28%	61%	100%
MKC7_346	0.5%	0%	45%	9%	27%	0%	nd	100%
CCW14_87	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CWP1_45	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
TOS1_417	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Media*	48%	65%	77%	73%	85%	86%	90%	100%

*Ocupación media de los secuencias glicosiladas en células silvestres. nd Sin determinar. Los datos son la media de tres medidas independientes.

El fenotipo general de hipoglicosilación de cada cepa, medido como media de todas las ocupaciones de los sitios individuales, presentaba una alta correspondencia (Tabla VI.1) con el grado de hipoglicosilación de la CPY (Fig. VI.2). La ocupación media de cada sitio de glicosilación en particular generalmente decrecía en paralelo con la media de la hipoglicosilación global de cada cepa (Fig. VI.3 y Tabla VI.1). La mayoría de los sitios se vieron afectados más severamente en las células de los supresores de alto número de copia de *rft1Δ* que en las células de *alg9Δ* o *alg10Δ*, en consonancia con la mayor severidad del defecto de las primeras. Sin embargo, unos pocos sitios se glicosilaron con menor eficiencia en las células *algΔ*. Dado que las diferencias en la ocupación y el número de sitios fue bajo, tal fenotipo podría implicar una regulación compleja y específica de la actividad de la OST en función de la abundancia de LLO maduro. Esta circunstancia no sería extraña, ya que la OST discrimina eficientemente el $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ maduro de los precursores variables en tamaño, desde $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2$ hasta $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$, los cuales están también siempre presentes en el lumen del RE en levaduras silvestres. Además, las levaduras a menudo encuentran condiciones de reducida disponibilidad de nutrientes, y especialmente en el caso de limitación de glucosa, los precursores para la adición de las tres glucosas finales del LLO $\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ podrían estar ausentes. La OST podría, por tanto, haber desarrollado mecanismos específicos para medir y modular su actividad frente a determinados LLOs. Las estructuras más definidas de LLOs en las células *alg* permiten, por tanto, diseccionar los mecanismos por los cuales las células silvestres pueden discriminar entre una mezcla de LLOs. Por el contrario, las concentraciones muy reducidas de LLO maduro, como se da en los supresores de alto número de copias de *rft1Δ*, serían muy difíciles de encontrar de forma natural.

Las diferencias observadas respecto a la ocupación de los sitios de *N*-glicosilación, podrían representar una respuesta fisiológica en el caso de las células *alg* y diferentes especificidades de la OST en su actuación sobre diferentes sitios en el caso de los supresores de alto número de copia de *rft1Δ*. Tal regulación de la actividad de la OST estaría de acuerdo con la modulación de la afinidad para la unión de sustratos peptídicos, descrita previamente, mediada por la estructura del LLO, y con las interacciones alostéricas entre las subunidades de la OST que regulan su actividad

(Karaoglu *et al.*, 2001; Kelleher *et al.*, 2003; Kelleher *et al.*, 2007) para los diferentes niveles de disponibilidad de sustrato.

2.2. Características de los secuones con eficiencia de glicosilación variable

Una vez obtenida una escala de sitios de glicosilación, basada en su nivel de ocupación bajo limitación de sustrato LLO, estudiamos las características de los sitios de *N*-glicosilación, que podrían explicar los diferentes grados de reactividad mostrados por la OST hacia ellos. Se ha descrito que las características de los aminoácidos cercanos a los secuones influyen en la eficiencia de glicosilación (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996; Kasturi *et al.*, 1997; Mellquist *et al.*, 1998; Petrescu *et al.*, 2004b). Debido al tamaño relativamente pequeño de la muestra, agrupamos los residuos aminoacídicos como ácidos, básicos, polares y apolares. Los polares y apolares fueron suficientemente abundantes como para permitir el análisis, por tanto examinamos si había anomalías en la frecuencia de aparición de aminoácidos polares y apolares en las regiones que rodeaban los secuones con nivel de ocupación alto, moderado o bajo (Fig. VI.4A). La tendencia más fuerte se encontró en la proximidad inmediata del secuón, con la posición +1 de los secuones enriquecida en aminoácidos no polares (Fig. VI.4B). Los aminoácidos en la posición +3 mostraron una tendencia similar, pero más débil. La presencia de aminoácidos polares podría potenciar directamente la actividad de la OST, y podría incluso incrementar la solubilidad o accesibilidad de un secuón, reduciendo sus interacciones hidrofóbicas con chaperonas u otras porciones de proteínas no plegadas, y así incrementar su reactividad hacia la OST.

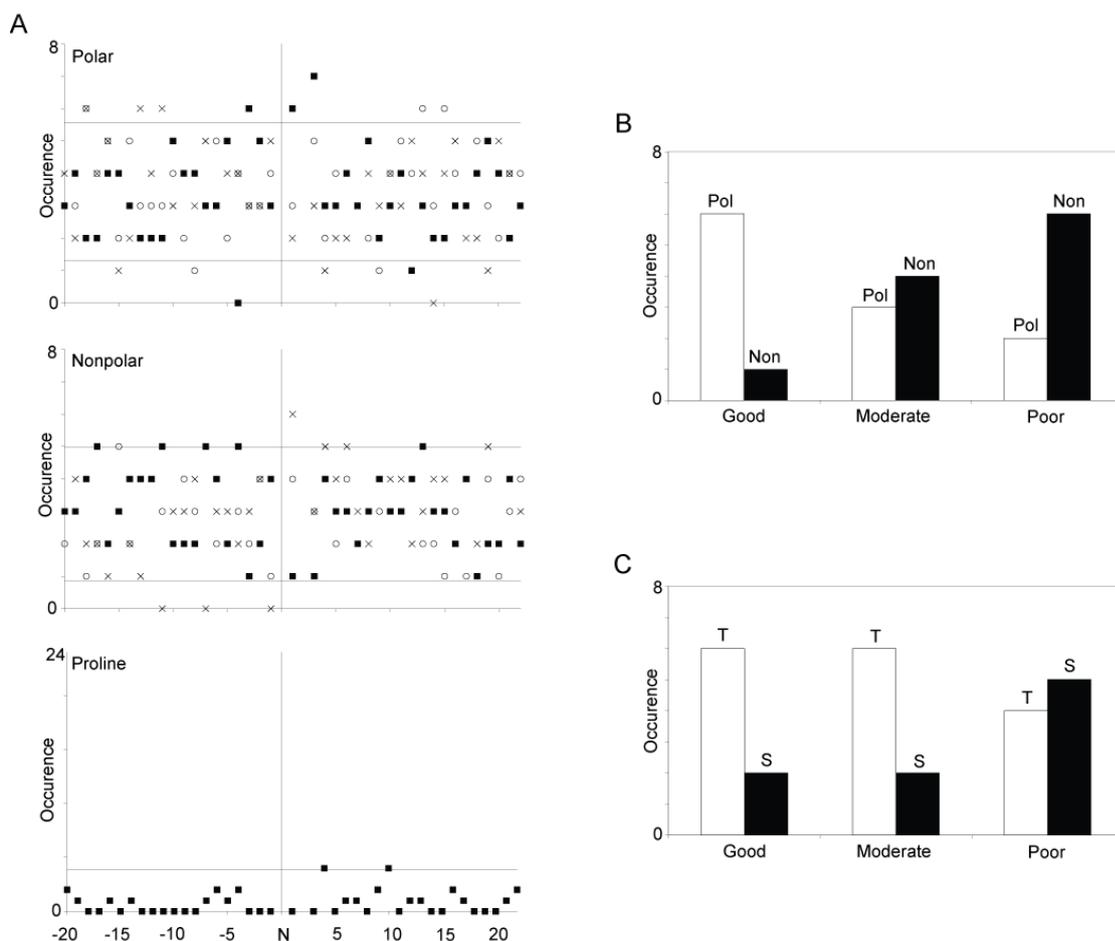


Figura VI.4. Características de los aminoácidos que rodean a secuencias glicosiladas de diferente manera bajo condiciones de concentraciones reducidas de LLO maduro. **(A)** Frecuencia de residuos polares y apolares alrededor de secuencias con nivel de ocupación alto (■), moderado (o), y bajo (x), y la prolina en todos los secuencias. Las líneas horizontales representan ± 3 veces la desviación estándar. La línea vertical indica la asparragina glicosilada. **(B)** Frecuencia de aminoácidos polares (Pol) y apolares (Non) en la posición +1, y **(C)** frecuencia de serina (S) o treonina (T) en la posición +2 de los secuencias con ocupación alta, moderada o baja.

Normalmente se considera que los secuencias NxT se glicosilan con más eficiencia que los secuencias NxS (Bause y Legler, 1981; Kasturi *et al.*, 1995; Petrescu *et al.*, 2004b). Esta tendencia se hizo aparente también en nuestros resultados, ya que en el grupo de secuencias pobremente glicosilados eran más abundantes los de tipo NxS, mientras que en el grupo de los más eficientemente glicosilados la proporción de NxT era mayor (Fig. VI.4C).

La prolina inhibe la glicosilación cuando aparece en las posiciones -1, +1 o +3. Sin embargo, observamos un incremento de la presencia de prolinas en posiciones ligeramente desplazadas de los secuencias glicosilados (4 a 10 residuos) (Fig. VI.4A). Esto se debe, probablemente, a las fuerzas que ejercen las prolinas sobre la estructura

Aunque se observaron diferentes patrones que correlacionaban con el nivel de ocupación en diferentes secuencias bajo limitaciones de sustrato LLO, ninguno de ellos servía individualmente para hacer predicciones. De hecho probamos si estos factores independientemente podrían proporcionar más información cuando se combinaban. Cada efecto asociado con la potenciación de la eficiencia de la glicosilación se ponderó: 1 para un aminoácido polar en +1 ó +3, una treonina en +2 o una región no estructurada; -1 para un aminoácido apolar en las posiciones +1 ó +3, una serina en +2 o una región estructurada.

Individualmente, estos parámetros mostraron algunos patrones significativos. La presencia de un aminoácido polar en la posición +1 permitía la diferenciación entre sitios con alta y baja ocupación en células con limitación de LLO ($p=0.04$, *2 sided Mann-Whitney test*, $n=8$). Por otra parte, la puntuación combinada permitió distinguir entre secuencias con alta y baja ocupación, con alta fiabilidad ($p=0.0039$, *2 sided Mann-Whitney test*, $n=8$) (Fig. VI.6). Aunque los sitios de alta ocupación eran diferentes de los de baja ocupación, no se pudo encontrar diferencias claras entre ellos y los sitios que no se ocupaban nunca en células silvestres. Esto se debe, probablemente, al pequeño tamaño de la muestra ($n=3$) y a la complejidad de los factores que controlan la selección de los sitios por la OST. La puntuación combinada es descriptiva, basada en un tamaño de muestra pequeño, y no ha sido validada con un grupo de muestras independientes. A pesar de ello, estos análisis indican que la eficiencia de la glicosilación en un sitio particular depende de la combinación de muchos factores que compiten, incluyendo, entre otros, las características de los secuencias, la secuencia de aminoácidos del entorno, y su localización en elementos de estructura secundaria o terciaria.

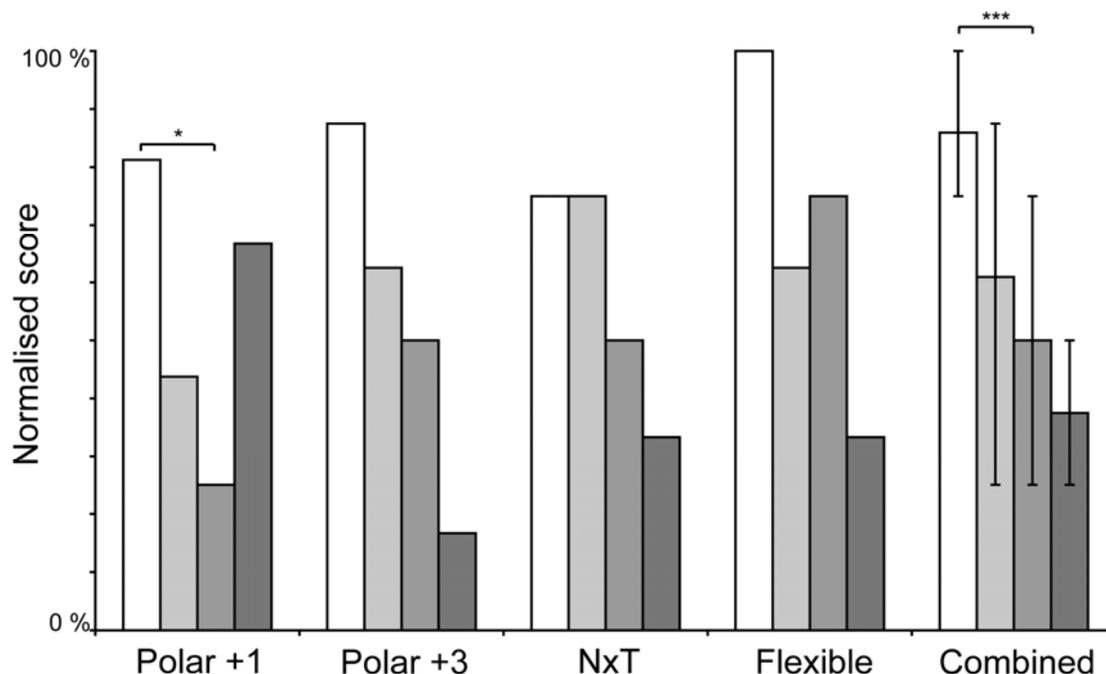


Figura VI.6 Características de los secuones glicosilados con diferente eficiencia. Los secuones con una ocupación alta (blanco), moderada (gris claro), o baja (gris) a concentración limitante de LLOs ($n=8$ en todos los casos), y los que nunca se glicosilaban (gris oscuro) se compararon basándose en los patrones identificados: la eficiencia de glicosilación se potenciaba por un aminoácido polar en el residuo +1 (Polar +1) o +3 (Polar +3), una treonina en +2 (NxT), y la ausencia de una estructura secundaria (Flexible). Las puntuaciones normalizadas se obtuvieron a partir de las características medias de cada secuón en cada grupo, y se sumaron para obtener la puntuación combinada. Las barras de error en la puntuación combinada (*Combined*) muestran el rango, y podrían ser de 0-100% en los otros valores. * y *** indican $p<0.05$ y $p<0.01$ en un 2 sided Mann-Whitney Test.

Nuestros análisis mostraron que la mayoría de los sitios están completamente glicosilados en las levaduras silvestres en crecimiento logarítmico. No está claro si las diferencias en la eficiencia de glicosilación entre los diferentes secuones bajo condiciones de LLO no óptimo o limitado son relevantes desde un punto de vista fisiológico. De todos modos, SAG1_79 está ocupado en un ~80 % en células silvestres (Parsaie-Nasab *et al.*, 2008; Schulz y Aebi, 2008), lo que sugiere que se trata de un secuón poco eficiente para ser glicosilado de forma inherente. Es probable que haya otros muchos secuones glicosilados de forma parcial entre las muchas glicoproteínas de la levadura. Sin embargo, no está claro si esta glicosilación parcial es relevante para la función de cada una de esas proteínas. Es posible que la ocupación parcial de determinados sitios, proporcione un *pool* de versiones heterogéneas de una proteína con actividades y propiedades biológicas ligeramente diferentes, como en el caso de las glicofórmulas de la ribonucleasa B pancreática bovina (Joao y Dwek, 1993; Rudd *et*

al., 1994). Es posible y razonable que, el sistema de *N*-glicosilación haya evolucionado de forma que las características de los sitios que son más importantes para la función de la proteína, sean también los glicosilados más eficientemente.

2.3. Introducción de secuencias en una glicoproteína modelo

Tras haber identificado diversas tendencias en lo referente a la estructura secundaria y a la secuencia de aminoácidos que rodea a un secuón con una buena ocupación, utilizamos una glicoproteína modelo para investigar si las particularidades estructurales locales podrían influir directamente en la eficiencia de glicosilación. Con tal propósito, hicimos uso de la familia de alta homología Gas, β -(1,3)-glucanosiltransferasas (Ragni *et al.*, 2007) de levaduras. Mediante espectrometría de masas (MS) de las proteínas de la pared celular pudimos medir la ocupación de seis secuencias en Gas1p, cinco de los cuales eran de alta ocupación, incluso en células *rft1* Δ , mientras que otro, GAS1_253 se convertía en hipoglicosilado cuando se producía un pequeño descenso en la disponibilidad de LLO (Fig. VI.3 y Tabla VI.1). Se ha descrito que el dominio del extremo amino-terminal de todas las proteínas Gas de *S. cerevisiae* tiene el mismo patrón de plegamiento (Ragni *et al.*, 2007), y todos los secuencias detectados de Gas1p estaban en ese dominio. Gas2p tiene la mayor homología con Gas1p, con un 47% de identidad sobre el total de la secuencia de la proteína, y además sólo tiene un secuón de glicosilación, que no está en el dominio glicosiltransferasa amino-terminal. La secuenciación de GAS2 clonado a partir del ADN genómico de la cepa silvestre SS328 reveló varios polimorfismos, sinónimos y no sinónimos, al comparar con la cepa de referencia de la *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) (Tabla VI.2). Muchos de estos polimorfismos han sido descritos previamente en varias cepas de *S. cerevisiae*, y la mayoría dan como resultado mutaciones conservativas.

Tabla VI.2 Polimorfismos detectados en SS328 GAS2.

Cambios en el par de bases	Cambios en los aminoácidos
T ₆₉ C	
G ₁₄₃ A	S ₄₈ N
G ₁₈₆ A	
T ₁₉₂ C	
C ₂₃₀ G	T ₇₇ R
C ₃₀₆ T	
A ₃₂₇ C	
G ₅₁₀ A	
T ₅₅₅ C	
A ₈₂₅ G	
C ₈₇₃ T	
T ₈₈₅ A	N ₂₉₅ K
A ₉₅₁ G	
A ₁₀₂₃ G	
A ₁₀₉₀ G	S ₃₆₄ G
G ₁₀₉₃ A	V ₃₆₅ I
C ₁₁₃₄ G	N ₃₇₈ K
A ₁₁₈₆ G	I ₃₉₆ V
T ₁₂₅₂ A	L ₄₁₈ M
T ₁₂₈₃ A	L ₄₂₈ H
G ₁₃₇₀ A	C ₄₅₇ Y
G ₁₄₃₂ C	E ₄₇₈ Q
C ₁₄₉₄ T	

Tabla VI.3 Secuones de glicosilación de Gas1p introducidos en la correspondiente posición en Gas2p. Los residuos en **negrita** se cambiaron en las variantes de Gas2p.

Secuón	Secuencia
GAS1_40	FFYSNNGSQFYIR
Gas2p	FFDSENGEQFFIK
GAS2_48-S	FFDSENG S QFFIK
GAS2_48-T	FFDSENG T QFFIK
GAS1_95	RVYAIN T TLDHSE
Gas2p	RVYAI D P T KS H DI
GAS2_110-S	RVYAI N T S K SHDI
GAS2_110-T	RVYAI N T KS H DI
GAS1_253	TAEFK N LSIPVFF
Gas2p	TKEFEGY P IPVFF
GAS2_266-S	TKEF E N Y SIPVFF
GAS2_266-T	TKEF E N Y T IPVFF

Con el fin de conocer si las particularidades estructurales también tenían una importancia en la determinación de la eficiencia de glicosilación, introdujimos secuones de glicosilación en Gas2p correspondientes con los secuones GAS1_40 (GAS2_48), GAS1_95 (GAS2_110) y GAS1_253 (GAS2_266) (Tabla VI.3) con el menor número posible de cambios en la secuencia original de Gas2p. Aunque las secuencias cercanas a los secuones de Gas1p y Gas2p son muy similares, no son idénticas. Ninguno de los 10 secuones de glicosilación de Gas1p estaba presente en la correspondiente posición en Gas2p. Sin embargo, en su lugar estaban presentes

aminoácidos poco comunes como la prolina o parches de residuos ácidos. Es posible que estos aminoácidos localizados en el lugar de un sitio de glicosilación pudieran funcionar ayudando al plegamiento, proveyendo una fuerza estructural. Ya que la presencia de una serina o treonina en la posición +2 influye sobre la eficiencia de glicosilación (Fig. VI.4C y (Bause y Legler, 1981; Kasturi *et al.*, 1995; Petrescu *et al.*, 2004b)), hicimos 2 versiones de cada secuencia, uno con serina y otro con treonina. Todos los sitios introducidos tienen aminoácidos polares en la posición +1, otro importante determinante de glicosilación (Fig. VI.4B y Shakin-Eshleman *et al.*, 1996). Decidimos entonces, medir el nivel de glicosilación de los secuencias introducidas en cada variante de Gas2p en células silvestres de *S. cerevisiae* mediante detección por inmuno-transferencia en las glicofomas separadas por SDS-PAGE (Fig. VI.7).

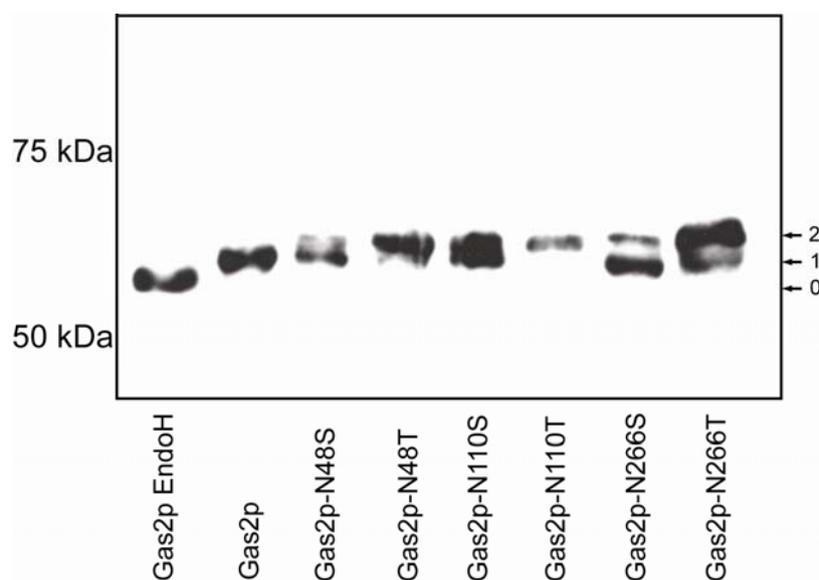


Figura VI.7 Secuencias de glicosilación introducidas en Gas2p. Extractos crudos totales de proteínas de células silvestres, expresando las diferentes variantes de Gas2p, se separaron por SDS-PAGE, se electrotransferieron a nitrocelulosa y se detectaron con anticuerpo anti-FLAG. Las flechas indican las glicofomas con diferente número de N-oligosacáridos.

Los tres secuencias de Gas1p introducidos en la correspondiente posición de Gas2p fueron, al menos parcialmente, glicosilados. Con la introducción de los secuencias NxS, Gas2p-N₁₁₀ se ocupó completamente, mientras que Gas2p-N₄₈ y Gas2p-N₂₆₆ fueron ocupados parcialmente. Con los secuencias NxT sin embargo, ambos Gas2p-N₄₈ y Gas2p-N₁₁₀ fueron totalmente ocupados, mientras que Gas2p-N₂₆₆ mostró una ocupación incrementada pero no total. Esto confirmó que la glicosilación de los

secuencias NxT era más eficiente que la de los NxS. Sin embargo, siguió habiendo diferencias entre las eficiencias de glicosilación de los tres secuencias, que fueron transferidos desde sitios existentes naturalmente en Gas1p a secuencias no naturales en las correspondientes posiciones en Gas2p. Los secuencias GAS1_253 y GAS2_266 fueron los dos glicosilados con menos eficiencia en cada proteína. Es de resaltar que el dominio *N*-terminal de las proteínas GAS tiene 3 puentes disulfuro predichos, y la glicosilación eficiente de GAS1_253, pero no la de GAS1_40 ni GAS1_95, requiere la actividad disulfuro reductasa de las subunidades de la OST Ost3p o Ost6p (Schulz y Aebi, 2008). En células silvestres, la actividad reductasa de Ost3/6p podría reducir el plegamiento oxidativo suficientemente para permitir una glicosilación eficiente de este secuencia, sin embargo, esto parece no ocurrir cuando la actividad OST se reduce en condiciones de limitación de LLO. Esta competencia entre la formación de puentes disulfuro por un lado, y la actividad de la OST por otro, es también probable que ocurra en el secuencia introducido GAS2_N266, y podría explicar su reducida eficiencia de glicosilación. En resumen, estos datos sugieren que la eficiencia de glicosilación en un sitio determinado se debe a la combinación de la secuencia de aminoácidos de la zona y unas características estructurales definidas con menos precisión.

2.4. Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDGs)

En los Desórdenes Congénitos humanos de Glicosilación Tipo I (CDG-I), la OST transfiere ineficientemente los glicanos, conduciendo a una hipoglicosilación de varios sustratos proteicos. El análisis de las glicoproteínas de los pacientes de CDG-I ha mostrado que esta hipoglicosilación es específica de sitio (Mills *et al.*, 2003; Hulsmeier *et al.*, 2007), en consonancia con los datos que presentamos aquí. En concreto, la transferrina sérica de pacientes con este síndrome estaba completamente glicosilada en el primer sitio de glicosilación pero mostró una reducción en la ocupación del segundo sitio, que se correlacionaba con la severidad de la enfermedad (Hulsmeier *et al.*, 2007). Las células de levadura con mutaciones en los genes que codifican proteínas responsables de la biosíntesis de LLO y la transferencia a proteína han sido muy útiles en el trazado de las bases bioquímicas de este grupo de enfermedades (Freeze y Aebi, 2005). Investigaciones más detalladas sobre el fenotipo de hipoglicosilación específica

de sitio que presentamos aquí podrían ser útiles para definir, con más detalle, los tipos de secuencias de glicosilación susceptibles de verse afectados en pacientes humanos de CDG-I.

3. CONSIDERACIONES FINALES

El análisis que presentamos en este capítulo ha identificado diversas tendencias que, de forma combinada, describen algunas características de secuencias glicosiladas eficientemente en sustratos nativos de la OST de *S. cerevisiae*. Estos datos han corroborado muchas tendencias descritas previamente a partir de análisis de una amplia variedad de sistemas *in vitro* o *in silico*. De todos modos, la complejidad y la diversidad de los sitios de glicosilación hace que sea muy difícil definir con precisión reglas simples de predicción de eficiencia de glicosilación. No obstante, el sistema de N-glicosilación es una maquinaria general de modificación de proteínas, que actúa sobre un gran número de sustratos polipeptídicos muy diversos. Por tanto, un completo entendimiento del sistema requerirá una aproximación de Biología de Sistemas para ampliar los resultados descritos aquí. Nuestra idea es continuar con estos estudios en la etapa posdoctoral.

La realización de este trabajo supuso que el doctorando recibiera uno de los *ESCMID/FEMS Research Fellowship Awards 2007*.

4. REFERENCIAS

- Allen, S., Naim, H. Y. and Bulleid, N. J. (1995). "Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion." *J Biol Chem* **270**(9): 4797-804.
- Bause, E. and Legler, G. (1981). "The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis." *Biochem J* **195**(3): 639-644.
- Bosch, M., Trombetta, S., Engstrom, U. and Parodi, A. J. (1988). "Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa." *J. Biol. Chem.* **263**(33): 17360-17365.
- Burda, P. and Aebi, M. (1998). "The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the alpha-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation." *Glycobiology* **8**(5): 455-462.
- Burda, P. and Aebi, M. (1999). "The dolichol pathway of N-linked glycosylation." *Biochim Biophys Acta* **1426**(2): 239-57.
- Burda, P., te Heesen, S., Brachat, A., Wach, A., Dusterhoft, A. and Aebi, M. (1996). "Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*:

- Identification of the ALG9 gene encoding a putative mannosyl transferase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(14): 7160-7165.
- Frank, C. G. and Aebi, M. (2005). "ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis." *Glycobiology* **15**(11): 1156-1163.
- Freeze, H. H. and Aebi, M. (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**(5): 490-498.
- Gavel, Y. and von Heijne, G. (1990). "Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering." *Protein Eng* **3**(5): 433-42.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-49.
- Helenius, J., Ng, D. T., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A. and Aebi, M. (2002). "Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein." *Nature* **415**(6870): 447-50.
- Holst, B., Bruun, A. W., Kielland-Brandt, M. C. and Winther, J. R. (1996). "Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum." *EMBO J* **15**(14): 3538-46.
- Hulsmeier, A. J., Paesold-Burda, P. and Hennet, T. (2007). "N-glycosylation site occupancy in serum glycoproteins using multiple reaction monitoring liquid chromatography-mass spectrometry." *Mol. Cell. Proteomics* **6**(12): 2132-2138.
- Joao, H. C. and Dwek, R. A. (1993). "Effects of glycosylation on protein structure and dynamics in ribonuclease B and some of its individual glycoforms." *Eur J Biochem* **218**(1): 239-44.
- Karaoglu, D., Kelleher, D. J. and 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**(40): 12193-206.
- Kasturi, L., Chen, H. and Shakin-Eshleman, S. H. (1997). "Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors." *Biochem J* **323**(Pt 2): 415-9.
- Kasturi, L., Eshleman, J. R., Wunner, W. H. and Shakin-Eshleman, S. H. (1995). "The Hydroxy Amino Acid in an Asn-X-Ser/Thr Sequon Can Influence N-Linked Core Glycosylation Efficiency and the Level of Expression of a Cell Surface Glycoprotein." *J. Biol. Chem.* **270**(24): 14756-14761.
- Kelleher, D. J., Banerjee, S., Cura, A. J., Samuelson, J. and Gilmore, R. (2007). "Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms." *J Cell Biol* **177**(1): 29-37.
- Kelleher, D. J. and Gilmore, R. (2006). "An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase." *Glycobiology* **16**(4): 47R-62R.
- Kelleher, D. J., Karaoglu, D., Mandon, E. C. and Gilmore, R. (2003). "Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties." *Mol Cell* **12**(1): 101-11.
- Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L. and Shakin-Eshleman, S. H. (1998). "The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency." *Biochemistry* **37**(19): 6833-7.
- Mills, K., Mills, P. B., Clayton, P. T., Milan, N., Johnson, A. W. and Winchester, B. G. (2003). "The underglycosylation of plasma alpha 1-antitrypsin in congenital disorders of glycosylation type I is not random." *Glycobiology* **13**(2): 73-85.
- Neupert, C. and Aebi, M. (*en preparación*).
- Ohtsubo, K. and Marth, J. D. (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." *Cell* **126**(5): 855-67.
- Parsaie-Nasab, F., Schulz, B. L., Gamarro, F., Parodi, A. J. and Aebi, M. (2008). "All in One: *Leishmania major* STT3 proteins substitute for the whole oligosaccharyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Biol. Cell* **19**(9): 3758-3768.
- Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A. and Wormald, M. R. (2004a). "Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding." *Glycobiology* **14**(2): 103-114.
- Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A. and Wormald, M. R. (2004b). "Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding." *Glycobiology* **14**(2): 103-14.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latgè, J. P. and Popolo, L. (2007). "The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis." *Yeast* **24**(4): 297-308.

- Rudd, P. M., Joao, H. C., Coghill, E., Fiten, P., Saunders, M. R., Opdenakker, G. and Dwek, R. A. (1994). "Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme." *Biochemistry* **33**(1): 17-22.
- Schulz, B. L. and Aebi, M. (2008). "Analysis of glycosylation site occupancy reveals a role for Ost3p and Ost6p in site-specific N-glycosylation efficiency." *Mol Cell Proteomics*: M800219-MCP200.
- Schulz, B. L., Izquierdo, L., Ferguson, M. A. and Aebi, M. (*en prensa-a*). "Trypanosoma brucei Stt3p paralogues have different protein substrate specificities."
- Schulz, B. L., Stirnimann, C. U., Grimshaw, J. P. A., Fritsch, F., Brozzo, M. S., Capitani, G., Glockshuber, R., Grutter, M. G. and Aebi, M. (*en prensa-b*). "Oligosaccharyltransferase subunits link protein folding and N-glycosylation."
- Shakin-Eshleman, S. H., Spitalnik, S. L. and Kasturi, L. (1996). "The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency." *J Biol Chem* **271**(11): 6363-6.
- Sharon, N. and Lis, H. (1995). "Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition." *Essays Biochem* **30**: 59-75.
- Trimble, R. B., Byrd, J. C. and Maley, F. (1980). "Effect of glucosylation of lipid intermediates on oligosaccharide transfer in solubilized microsomes from *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **255**(24): 11892-11895.
- Turco, S. J., Stetson, B. and Robbins, P. W. (1977). "Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(10): 4411-4.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology* **3**(2): 97-130.

CONCLUSIONES

1. Se han identificado los genes *LDB1-LDB15* cuya mutación/delección produce un fenotipo *ldb* en los correspondientes mutantes de *S. cerevisiae* aislados previamente por nuestro grupo. Estos genes pertenecen a distintas familias funcionales sugiriendo que varias rutas metabólicas contribuyen directa o indirectamente a la incorporación de los grupos manosilfosfato a los oligosacáridos de la superficie celular. (Capítulo I)
2. Uno de estos genes corresponde a la ORF YBL006C, que ha quedado registrada en las bases de datos con el nombre estándar *LDB7*. El resto de los genes correspondían a ORFs caracterizadas previamente y los nombres *LDB* han sido incluidos como sinónimos. (Capítulo I)
3. El análisis fenotípico de las 4813 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, delecionadas en genes no esenciales, representadas en la colección EUROSCARF, ha permitido identificar 199 genes no esenciales del genoma de *S. cerevisiae* cuya delección da como resultado un fenotipo *ldb*. (Capítulo II)
4. Aparte del ya conocido *MNN6*, entre los 199 genes no se encontró ninguno más que codificara una manosilfosfatotransferasa. Cuatro de los genes correspondían a ORFs no caracterizadas y las denominaciones *LDB16*, *LDB17*, *LDB18* y *LDB19*, se han incorporado a las bases de datos como sus nombres estándar. La pertenencia de los 199 genes a distintas familias funcionales, confirma la conexión de la ruta de manosilfosforilación con otros procesos celulares importantes. (Capítulo II)
5. La descripción de las nuevas características fenotípicas de las cepas delecionadas, especialmente las correspondientes a las ORFs no caracterizadas, representa una contribución interesante a la caracterización funcional del genoma de *S. cerevisiae*. (Capítulos I y II)
6. Los grupos manosilfosfato localizados en la cadena externa de los *N*-oligosacáridos son los principales responsables de la carga negativa de la superficie celular en *S. cerevisiae*. Los presentes en el núcleo interno y/o en los *O*-oligosacáridos quedan enmascarados por aquéllos. (Capítulo II)
7. La contribución de los genes pertenecientes a la familia de manosiltransferasas *KRE2/MNT1*, a la síntesis de las ramificaciones de la cadena externa de los *N*-oligosacáridos en *S. cerevisiae*, es indetectable en ausencia de *MNN2* y/o *MNN5*. (Capítulo II)
8. Todos los genes que codifican subunidades de la V-ATPasa (excepto los dos que codifican isoformas complementarias) y los que colaboran en su ensamblaje,

están incluidos entre los 199 seleccionados. Estos resultados indican una relación directa entre la fosforilación de *N*-oligosacáridos y la función acidificadora de la mencionada V-ATPasa. (Capítulo II)

9. El hecho de que varias funciones del aparato de Golgi estén alteradas en los mutantes delecionados en alguna de las subunidades de la V-ATPasa indica un papel fundamental de la enzima en el control del pH de dicho orgánulo en *S. cerevisiae*. Efectos similares se producen mediante la inhibición selectiva de la V-ATPasa en la cepa silvestre. (Capítulo III)
10. La influencia del pH extracelular sobre el fenotipo de los mutantes delecionados en los genes que codifican subunidades de la V-ATPasa sugiere que la V-ATPasa no es la única vía de acidificación en el aparato de Golgi. (Capítulo III)
11. El mutante de glicosilación de *S. cerevisiae mnn3*, aislado en los primeros estudios de glicosilación, y no identificado anteriormente, está afectado en el gen *VPS74*. Se propone, por tanto, *MNN3* como alias de *VPS74*. La mutación *mnn3* en el gen *VPS74* se encuentra en una zona conservada en todas las proteínas de la familia, indicando que se trata de una zona importante para la función o el plegamiento de dicha proteína. (Capítulo IV)
12. La complementación parcial entre *YPT6* y *VPS74/MNN3* sugiere que ambos genes participarían en el reciclaje de enzimas del aparato de Golgi, aunque en diferentes etapas. *VPS74/MNN3* llevaría a cabo su función, a diferencia de *YPT6*, en el reciclaje *intra*-Golgi. (Capítulo IV)
13. La deleción del gen *VPS74/MNN3* desencadena la activación de las vías de respuesta a daño en la pared celular, concretamente las relacionadas con HOG, Rho1p y Pkc1p, influyendo sobre genes relacionados con la síntesis y mantenimiento de la pared. Así mismo, esta deleción altera los niveles de expresión de otros genes como los relacionados con el control de calidad de proteínas, organización del citoesqueleto, producción y respuesta a feromonas,... Esta deleción no provocó la alteración en el nivel de expresión de ningún gen directamente relacionado con la glicosilación. (Capítulo V)
14. La deleción del gen *MNN2* no produjo alteración en el nivel de expresión de los genes implicados en las respuestas transcripcionales a daños en la pared celular, de los genes que producen un fenotipo *ldb* severo ni de los genes para los que se ha descrito que tienen letalidad sintética con *MNN2*. En ese sentido, la deleción de *MNN2* parece producir efectos diferentes a la deleción de otros genes implicados en la construcción de la pared celular. (Capítulo V)
15. Algunos de los sitios potenciales de glicosilación de las proteínas de pared, siempre se encuentran glicosilados, otros muestran niveles de glicosilación variable, y en otros nunca se detectó glicosilación. Ello implica que los sitios potenciales de glicosilación de las proteínas de pared en *S. cerevisiae* no son equivalentes respecto a su nivel de glicosilación. (Capítulo VI)

16. El nivel de glicosilación de los sitios potenciales de glicosilación se ve alterado, de forma variable, cuando se modifica la actividad de la OST por limitación de sustrato o por sustratos defectuosos. En la mayoría de los sitios, el efecto de ambas modificaciones es el mismo, existiendo un pequeño grupo donde parece haber diferencias entre estos dos efectos. (Capítulo VI)
17. La presencia de treonina en lugar de serina, la presencia de un aminoácido polar en la posición X, y estar ubicado en una zona sin estructura secundaria contribuyen a que un secúon sea más fácilmente glicosilable. (Capítulo VI)
18. La inserción de sitios de glicosilación de Gas1p en las posiciones equivalentes de una de sus homólogas, Gas2p, da como resultado sitios glicosilables, al menos parcialmente. El nivel de glicosilación de dichos sitios se ve influido por la presencia de treonina en el secúon, por un aminoácido polar en la posición X, y por la ausencia de estructura secundaria, tal y como hemos descrito anteriormente. (Capítulo VI)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS
2. MEDIOS DE CULTIVO
3. CEPAS
4. PLÁSMIDOS
5. OLIGONUCLEÓTIDOS
6. TÉCNICAS DE CULTIVO Y MANEJO DE LAS CÉLULAS
 - 6.1. Crecimiento
 - 6.2. Conjugación y selección de diploides
 - 6.3. Esporulación
 - 6.4. Disección de tétradas
 - 6.5. Tinción con azul alcian
 - 6.6. Inhibición de la V-ATPasa
 - 6.7. Tinción vital con quinacrina
 - 6.8. Tinción vital con rojo neutro
 - 6.9. Prueba del factor α
 - 6.10. *Drop-test* o *spotting assay*
 - 6.11. Microscopía
 - 6.12. Medición del crecimiento
 - 6.13. Conservación de las cepas
 - 6.14. Ensayos de aglutinación con anticuerpos
7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS
 - 7.1. Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*
 - 7.2. Extracción de ARN total de *S. cerevisiae*
 - 7.3. Extracción de plásmidos de *E. coli*
 - 7.4. Extracción de plásmidos de *S. cerevisiae*
 - 7.5. Transformación de *E. coli*
 - 7.6. Transformación de *S. cerevisiae*
 - 7.7. Selección de transformantes por afinidad
 - 7.8. Producción de células competentes de *E. coli*
8. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
 - 8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa, visualización y recuperación de bandas
 - 8.2. Reacciones de amplificación (PCR)
 - 8.3. Reacciones de restricción
 - 8.4. Reacciones de ligamiento y *TA-Cloning*
 - 8.5. Reacciones de secuenciación
 - 8.6. Mutagénesis dirigida
 - 8.7. Precipitación de ácidos nucleicos
 - 8.8. Cuantificación y determinación de la pureza de ácidos nucleicos
 - 8.9. Fabricación de microarrays
 - 8.10. Síntesis de ADNc a partir de ARNm y marcaje fluorescente
 - 8.11. Hibridación de microarrays
9. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS
 - 9.1. Extracción y electroforesis de invertasa en condiciones nativas
 - 9.2. Extracción y *SDS-PAGE* de carboxipeptidasa Y
 - 9.3. *Western-blot*
 - 9.4. Preparación de muestras para espectrometría de masas
10. TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS
 - 10.1. MALDI-TOF/TOF o desorción/ionización láser asistida por matriz *Time-of-flight/Time-of-flight*
 - 10.2. LC-ESI-MS/MS o técnica combinada de Cromatografía líquida-Ionización de electroespray-Espectrometría de masas en tándem
 - 10.3. Análisis de datos e identificación de péptidos
11. TÉCNICAS INFORMÁTICAS
 - 11.1. Adquisición de imágenes de geles con bromuro de etidio
 - 11.2. Escaneado y lectura de *microarrays*
 - 11.3. Análisis de los resultados de los *microarrays*
 - 11.4. Visualización de estructuras proteicas en 3D
 - 11.5. Asistencia en clonaciones
 - 11.6. Bases de datos
 - 11.7. Predicción
 - 11.8. Alineamiento de secuencias
 - 11.9. Análisis estadístico
12. REFERENCIAS

1. REACTIVOS

Los reactivos se obtuvieron principalmente de los siguientes proveedores:

Reactivos generales: PANREAC, grado analítico.

Reactivos para Biología Molecular: SIGMA-ALDRICH, grado Biología Molecular.

Reactivos para cultivos celulares: MERCK y SIGMA-ALDRICH, grado cultivo celular.

Enzimas: PROMEGA, ROCHE, BIOTOOLS, SIGMA-ALDRICH, STRATAGENE, NEW ENGLAND BIOLABS. Para más detalles ver los apartados y Protocolos correspondientes.

2. MEDIOS DE CULTIVO

YEPD
<ul style="list-style-type: none"> • 2% Glucosa • 2% Peptona • 1% Extracto de levadura • 2% Agar (sólo para medio sólido)
Medio de Luria-Bertani (LB)
<ul style="list-style-type: none"> • 1% Triptona • 1% Cloruro sódico • 0,5% Extracto de levadura • 1,5% Agar (sólo para medio sólido) • Ajustar a pH 7 • Cuando se desee suplementar el medio con ampicilina 100 µg/ml, añadir 1ml, por cada litro de medio, de una solución de concentración 100 mg/ml.
Medio de Luria-Bertani (LB) con ampicilina 100 µg/ml
<ul style="list-style-type: none"> • Igual que el medio LB pero justo antes de repartir las placas, cuando el medio no esté demasiado caliente, adicionar 1 ml por cada litro de medio, de una solución 1000x de ampicilina estéril.
Medio de preesporulación
<ul style="list-style-type: none"> • 0,6% YNB • 0,5% Extracto de levadura • 1% Acetato potásico • Ajustar a pH 5,5 con NaOH
Medio de esporulación
<ul style="list-style-type: none"> • 1% Acetato potásico
Medio SD (Synthetic Defective)
<ul style="list-style-type: none"> • 0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base) • 2% Glucosa • 1,5% Agar (para medio sólido)
Medio SOC
<ul style="list-style-type: none"> • 2% Triptona • 0,55 % Extracto de levadura • 1ml de NaCl 1M (para 100 ml de medio) • 0,25ml de KCl 1M (para 100 ml de medio) • Agitar hasta disolver, autoclavar y dejar enfriar • Añadir 1 ml de Mg²⁺ 2M (1M MgCl₂, 1M MgSO₄) • Añadir 1 ml de glucosa 2M • Esterilizar por filtración

Medio SOB

- 0,5% Extracto de levadura
- 2% Triptona
- 10mM Cloruro de sodio
- 2,5mM Cloruro de potasio
- 10mM Cloruro de magnesio
- 10mM Sulfato de magnesio

Todos los medios, a excepción del SOC, se esterilizaron en autoclave

3. CEPAS**3.1. *Saccharomyces cerevisiae***

BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>)	EUROSCARF (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YBR127C::kanMX4)	EUROSCARF
BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YDR372C::kanMX4)	EUROSCARF
BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YIL015W::kanMX4)	EUROSCARF
BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YPL050C::kanMX4)	EUROSCARF
BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YPL053C::kanMX4)	EUROSCARF
BY4742 (MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>)	EUROSCARF (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4741 (MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YBR015C::kanMX4)	EUROSCARF
BY4742 (MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YDR372C::kanMX4)	EUROSCARF
FY1679-14C (MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>LEU2</i> ; <i>trp1Δ63</i> ; <i>HIS3</i> ; <i>GAL2</i>)	EUROSCARF (Fred Winston, 1995)
FY1679-11D (MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>LEU2</i> ; <i>trp1Δ63</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>GAL2</i>)	EUROSCARF (Fred Winston, 1995)
IO66-1B (MATα <i>ldb2ura3</i>)	Construida para este estudio
IO55-11C (MATα <i>ldb4ura3</i>)	Construida para este estudio
IO64-2C (MATα <i>ldb5ura3</i>)	Construida para este estudio
IO58-4A (MATα <i>ldb6ura3</i>)	Construida para este estudio
IO60-7c (Mat a <i>ldb7ura3</i>)	Construida para este estudio
IO63-1C (MATα <i>ldb9ura3</i>)	Construida para este estudio
IO59-8B (MATα <i>ldb10ura3</i>)	Construida para este estudio
IO57-6B (MATα <i>ldb11ura3</i>)	Construida para este estudio
IO56-7C (MATα <i>ldb12ura3</i>)	Construida para este estudio
IO53-1C (MATα <i>ldb13ura3</i>)	Construida para este estudio
IO67-1C (MATα <i>ldb14ura3</i>)	Construida para este estudio
IO65-15C (MATα <i>ldb15ura3</i>)	Construida para este estudio
IO62-1A (MATa <i>mnn3ura3</i>)	Construida para este estudio
IO62-9A (MATα <i>mnn3ura3</i>)	Construida para este estudio
LB2246-5C (MATa <i>mnn1ura3</i>)	ATCC
LH4-5B (MATa <i>mnn1ldb1ura3</i>)	Construida para este estudio
PM41-5C (MATa <i>mnn1ldb1</i>)	Colección del laboratorio
PM41-5A (MATα <i>mnn1ldb1</i>)	Colección del laboratorio
YG0122 (SS328) (MATα; <i>ade2-101</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>ura3-52</i>)	(Vijayraghavan <i>et al.</i> , 1989)
YG0428 (MATα; <i>ade2-101</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>ura3-52</i> ; YGR227W::kanMX)	(Burda y Aebi, 1998)
YG0847 (MATα; <i>ade2-101</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>ura3-52</i> ; YNL219C::kanMX4)	(Burda <i>et al.</i> , 1996)
YNC1 (MATa; <i>ade2-101</i> ; <i>his3Δ200</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>ura3-52</i> ; YBL020W::kanMX4)	(Neupert y Aebi, in preparation)

Además de las cepas indicadas, también se utilizó la colección completa de cepas delecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, tanto en MATa como MATα, obtenida de EUROSCARF.

3.2. *Escherichia coli*

DH5α F⁻ φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*) *phoA supE44 λ⁻ thi⁻1 gyrA96 relA1*

JM109 *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*), *relA1, supE44*, Δ(*lac-proAB*), [F⁻ *traD36, proAB, laq1*^qΔM15]

4. PLÁSMIDOS

Plásmido	Descripción	Referencia
Librería genómica CEN-BANK	Librería genómica de <i>S. cerevisiae</i> construida en el plásmido CEN-BANK.	Rose <i>et al.</i> , 1987
pRS426	Plásmido multicopia basado en pBluescript II SK+, con: - <i>ori</i> (<i>E. coli</i>) - <i>ori</i> del plásmido de 2 μ (<i>S. cerevisiae</i>) - Amp ^R (resistencia a ampicilina) - marcador <i>URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS426-VPS74	pRS426 con un inserto <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI en el sitio <i>Bam</i> HI del MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>VPS74</i> , con aprox. 1000 pb flanqueantes a ambos lados.	Este estudio
pRS426-YPT6	pRS426 con un inserto <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI en el sitio <i>Bam</i> HI del MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>YPT6</i> , con aprox. 1000 pb flanqueantes a ambos lados.	Este estudio
pRS426-MNN6	pRS426 con un inserto de extremos romos en el sitio <i>Sma</i> I del MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>YPT6</i> , con aprox. 1000 pb flanqueantes a ambos lados, mediante la técnica <i>TA-Cloning</i> ^(*) .	Teixidó <i>et al.</i> , (en preparación)
p426-GPD-CYC	Plásmido multicopia basado en pBluescript II SK+ y la serie pRS con: - <i>ori</i> (<i>E. coli</i>) - <i>ori</i> del plásmido de 2 μ (<i>S. cerevisiae</i>) - Amp ^R (resistencia a ampicilina) - marcador <i>URA3</i> - promotor constitutivo <i>GPD</i> - terminador de <i>CYC1</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p426-VPS74	Plásmido p426-GPD-CYC con un inserto <i>Xho</i> I- <i>Spe</i> I en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>VPS74</i> .	Este estudio
p426-MNN6	Plásmido p426-GPD-CYC con un inserto de extremos romos en el sitio <i>Sma</i> I del MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>MNN6</i> , mediante la técnica <i>TA-Cloning</i> ^(*) .	Teixidó <i>et al.</i> , (en preparación)
p423-GPD-CYC	Plásmido multicopia basado en pBluescript II SK+ y la serie pRS con: - <i>ori</i> (<i>E. coli</i>) - <i>ori</i> del plásmido de 2 μ (<i>S. cerevisiae</i>) - Amp ^R (resistencia a ampicilina) - marcador <i>HIS3</i> - promotor constitutivo <i>GPD</i> - terminador de <i>CYC1</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p423-YPT6	Plásmido p423-GPD-CYC con un inserto <i>Xho</i> I- <i>Spe</i> I en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>YPT6</i> .	Este estudio
pGEM-T Easy	Plásmido de clonación comercial de Promega Corp.	Promega Corp.
pGEM-T-MNN3	Plásmido pGEM-T con un inserto de la secuencia codificante del gen <i>MNN3</i> (<i>VPS74</i>), amplificado del ADN genómico del mutante <i>mnn3</i> y clonado mediante la técnica <i>TA-Cloning</i> ^(*) .	Este estudio
p426-GAS2-N48	Plásmido p426-GPD-CYC con un inserto <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>GAS2</i> con la mutación N48, y la cola FLAG.	Este estudio
p426-GAS2-RN48	Plásmido p426-GPD-CYC con un inserto <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>GAS2</i> con la mutación RN48, y la cola FLAG.	Este estudio

p426-GAS2-N110	Plásmido p426- <i>GPD-CYC</i> con un inserto <i>XhoI-BamHI</i> en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>GAS2</i> con la mutación N110, y la cola FLAG.	Este estudio
p426-GAS2-RN110	Plásmido p426- <i>GPD-CYC</i> con un inserto <i>XhoI-BamHI</i> en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>GAS2</i> con la mutación RN110, y la cola FLAG.	Este estudio
p426-GAS2-N266	Plásmido p426- <i>GPD-CYC</i> con un inserto <i>XhoI-BamHI</i> en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>GAS2</i> con la mutación N266, y la cola FLAG.	Este estudio
p426-GAS2-R266	Plásmido p426- <i>GPD-CYC</i> con un inserto <i>XhoI-BamHI</i> en el MCS, conteniendo la secuencia codificante de <i>GAS2</i> con la mutación RN266, y la cola FLAG.	Este estudio
YE _{pHis} PMR1	Plásmido YE _p con el marcador <i>HIS3</i> y un inserto con la secuencia de <i>PMR1</i> .	Wei <i>et al.</i> , 1999

(*) Ver Sección 8.4

5. OLIGONUCLEÓTIDOS

5.1. Para secuenciación

Nombre	Secuencia 5'-3'
MNN3SEQD1	TCTAAAAAATACAAAGCAAAAATC
MNN3SEQR1	AGAGAGGATTTTTGTTGTTATTTTC
SEQCYC	GATGTGGGGGGAGGGCG
SEQGPD	ATTATCCCCTACTTGAC
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7 Fwd	TAATACGACTCACTATAGG
YCP50D	CAATTTCTATCCGCACCCGTTT
YCP50R	CGGTGATGTCGGCGATATAGG

5.2 Para clonación

Nombre	Secuencia 5'-3'
GAS2D1	CATATGGGATCCATGAACAAGAAACAAAA
GAS2R1	ATCGATCTCGAGCTATTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCACTCGATGGGTACTTTAC
MNN3SEQD1	TCTAAAAAATACAAAGCAAAAATC
MNN3SEQR1	AGAGAGGATTTTTGTTGTTATTTTC
MNN6D1	CCAGATTTGATGGGTCCTCTATGAGCCTC
MNN6R1	GTGCTGCCAAATGGGTTCAAGATGAACAG
MNN6D3	ATGCATGCACTAGTATGCACGTACTGCTGAGCAA
MNN6R3	ATGCATGCCTCGAGTTATGGTAACCTATCCCAAC
VPS74D2	ATGCATGCGGATCCATAAACACTCGCCACAATGGTTAG
VPS74D3	ATGCACTAGTATGTCTACTTTACAACGTCG
VPS74R2	ATGCATGCGGATCCATAGATAAAGCTGATGGCAAGGAGG
VPS74R3	ATGCCTCGAGTCATAATAGCATATCCATTC
YPT6D2	ATGCATGCGGATCCTTGGTTTATTCTTTCTGTCTGAGA
YPT6D3	ATGCACTAGTATGAGCAGATCCGGGAAATC
YPT6R2	ATGCATGCGGATCCACGAAACCGAAAACGAAGATGAAG
YPT6R3	ATGCCTCGAGCTAACACTGACAAGCGCTTT

5.3 Para mutagénesis dirigida

Nombre	Secuencia 5'-3'
GAS2N48F	CAAATTCCTTGACTCTGAGAATGGGTCACAGTTCTTCATCAAGGGC
GAS2N48R	GCCCTTGATGAAGAAGTGTGACCCATTCTCAGAGTCAAAGAATTTG
GAS2N110F	CACTGCGTGTTTATGCAATAAATACGACAAAATCACATGATATATGTATGG
GAS2N110R	CCATACATATATCATGTGATTTTGTTCGTATTATTGCATAAACACGCAGTG
GAS2N266F	GGGAAAGAACGAAAGAATTTGAAAATTATTCAATCCCGTGTTTTTTTCGGAATTCG
GAS2N266R	CGAATTCGGAAAAAACACGGGAATTGAATAATTTTCAAATTCCTTCGTTCTTCCC
GAS2RN48F	TGACTCTGAGAATGGGACACAGTTCTTCATCAAGG
GAS2RN48R	CCTTGATGAAGAAGTGTGCCATTCTCAGAGTCA
GAS2RN110F	TGTGTGTTTATGCAATAAATACGTCAAATCACATGATATATGTATGG
GAS2RN110R	CCATACATATATCATGTGATTTTGACGTATTATTGCATAAACACGCA
GAS2RN266F	GAACGAAAGAATTTGAAAATTATACAATCCCGTGTTTTTTTCGGAATTCG
GAS2RN266R	CGAATTCGGAAAAAACACGGGAATTGTATAATTTTCAAATTCCTTCGTTCC

6. TÉCNICAS DE CULTIVO Y MANEJO DE LAS CÉLULAS

6.1. Crecimiento

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* se crecieron normalmente en YEPD a 30°C en estufa (Mammert y P-Selecta), cuando se utilizó medio sólido, o con agitación vigorosa cuando el medio era líquido en agitadores orbitales (Forma Scientific y Comecta) cuando el medio era líquido. En determinados protocolos y con algunas cepas las condiciones variaron, según se indica en los respectivos apartados.

Las células de *Escherichia coli* se crecieron en LB a 37°C en estufas y/o agitadores orbitales (200 rpm). Al igual que con *S. cerevisiae*, en algunos casos se utilizaron condiciones diferentes. En los correspondientes protocolos se indican las variaciones o condiciones particulares de crecimiento de las mismas.

6.2. Conjugación y selección de diploides

Para cruzar cepas de *S. cerevisiae*, se depositaba una cantidad equivalente de cada una (de distinto tipo sexual) con un palillo sobre una placa de YEPD, se mezclaban y se incubaban a 30°C en un medio selectivo para los diploides. Cuando no era posible utilizar medio selectivo, se seguía la aparición de los zigotos por observación al microscopio durante 3-5 horas después de la mezcla y se recogían con un micromanipulador.

6.3. Esporulación

Protocolo A

Esporulación de *Saccharomyces cerevisiae* (Kassir *et al.*, 1991)

Reactivos:

- Medio de preesporulación
- Medio de esporulación

Procedimiento:

- Sembrar poca cantidad de células en un tubo de diámetro ancho con 3 ml de medio de preesporulación.
- Incubar a 30°C con agitación durante 24 horas.
- Pasar las muestras a tubos de centrifuga y centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Lavar 2 veces consecutivas con 1 ml de medio de esporulación.
- Resuspender en 30 ml de medio de esporulación.
- Incubar a 30°C el tiempo necesario (8-10 días) hasta que se visualicen tétradas al microscopio.

6.4. Disección de tétradas

Protocolo B

Disección de tétradas de *Saccharomyces cerevisiae*

Reactivos:

- Agua estéril
- Glusulasa (Sigma-Aldrich)

Procedimiento:

- Centrifugar 0,5-1 ml de un cultivo esporulado de *S. cerevisiae* y lavarlo con agua estéril.
- Resuspender en 200 µl de agua estéril añadir 10 µl de glusulasa.
- Incubar a 37°C durante 15-20 minutos.
- Parar la reacción con 800 µl de agua y guardar a 4°C hasta su disección.
- Extender con un palillo las células en líneas sobre una placa de YEPD.
- Llevar al micromanipulador, apartar las ascas y separar las ascosporas.

6.5 Tinción con azul alcian

Protocolo C

Tinción con azul alcian

(Ballou, 1990; Mañas *et al.*, 1997; Corbacho *et al.*, 2002)

Reactivos:

- Solución de azul alcian 0,1% en ácido acético 50mM
- Ácido acético 50mM
- Agua destilada

Procedimiento para células crecidas en placas de microtitulación:

- Crece las células en placas de microtitulación con 200 µl de YEPD en cada pocillo durante 48 horas.
- Mantener las placas otras 48 horas a 4°C.
- Centrifugar la placa en una centrifuga para placas a 3000 rpm 3 minutos.
- Tirar el sobrenadante y lavar las células con 200 µl de agua.

- Centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender en 200 μ l de solución de azul alcian.
- Centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender en 200 μ l de ácido acético 50mM.
- Centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender de nuevo en 200 μ l de ácido acético 50mM.
- Centrifugar, pero no tirar el sobrenadante.
- Las placas pueden ser examinadas por su parte inferior a simple vista o bien escaneadas para su almacenaje y posterior análisis.

Procedimiento para células crecidas en medio sólido o en tubos con medio líquido:

- Crecer las células 48 horas y mantenerlas a 4°C otras 48 horas.
- Depositar en un tubo de vidrio pequeño una cantidad de células del tamaño de una esfera de 3 mm de diámetro, si las células han crecido en una placa; o bien 1 ml del cultivo si crecieron en medio líquido.
- Centrifugar el tubo a 3500 rpm 5 minutos.
- Tirar el sobrenadante y lavar las células con 1 ml de agua.
- Centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de solución de azul alcian.
- Centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de ácido acético 50mM.
- Centrifugar, tirar el sobrenadante y resuspender de nuevo en 1 ml de ácido acético 50mM.
- Centrifugar, pero no tirar el sobrenadante.
- Examinar los tubos por la parte inferior.

6.6. Inhibición de la V-ATPasa

Para los experimentos que implicaban la inhibición de la V-ATPasa (Capítulo III) se crecían las células en presencia del inhibidor bafilomicina (Bowman *et al.*, 1988) como se explica a continuación:

Protocolo D

Inhibición de la V-ATPasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Reactivos:

- Medio YEPD 2x
- Bafilomicina 50mM
- Agua estéril

Procedimiento:

- En una placa de microtitulación repartir en cada pocillo 120 μ l de YEPD 2x.
- En los pocillos donde se vayan a crecer células con la bafilomicina adicionar 80 μ l de bafilomicina 50mM, dando una concentración final de la misma de 20mM; en los que no vayan a ser sometidas al inhibidor (controles) completar el volumen con 80 μ l de agua estéril.
- Inocular los pocillos con las cepas correspondientes y dejar crecer a 30°C en una estufa 48 horas.
- Medir la densidad óptica de los pocillos y calcular el volumen necesario para tener $5 \cdot 10^6$ células de cada uno.
- Centrifugar dichos volúmenes y retirar el sobrenadante.
- Resuspender en un volumen de 25 μ l añadiendo 15 μ l de YEPD 2x, y 10 μ l de bafilomicina 50mM o 10 μ l de agua estéril según corresponda.
- Incubar a 30°C durante 4 horas.
- Dividir cada cultivo en dos partes, una para la tinción con quinacrina (Apartado 6.7) y la otra para la tinción de rojo neutro (Apartado 6.8).

6.7. Tinción vital con quinacrina

La quinacrina es un compuesto fluorescente que tiende a acumularse en orgánulos o compartimentos ácidos de la célula. Éstas se crecieron, por tanto, en medio tamponado por encima del pH del citoplasma consiguiendo con ello que el colorante se acumulase en el interior de la vacuola, cuyo pH es inferior. Así, cuando la vacuola está correctamente acidificada se observará una tinción fluorescente de la misma, y la casi ausencia de fluorescencia en el citoplasma. Sin embargo, cuando la acidificación es ineficiente o inexistente las vacuolas y el citoplasma se tiñen por igual.

Protocolo E

Tinción vital con quinacrina

(Modificado de Umemoto *et al.*, 1990)

Reactivos:

- Bafilomicina 50mM
- Agua estéril
- Quinacrina (Sigma-Aldrich) 12,5 mg/ml
- Tampón fosfato 2x (100mM pH7,6 + glucosa 4%)
- Tampón fosfato 1x (50mM pH7,6 + glucosa 2%)

Procedimiento:

- Tomar 1,25 μ l de la suspensión de células obtenida en el Protocolo D (ver Apartado 6.6).
- Añadir 20 μ l de bafilomicina 50mM o de agua según corresponda a cada muestra.
- Completar el volumen con 25 μ l de tampón fosfato 2x en cada muestra.
- Añadir 0,4 μ l de quinacrina 12,5 mg/ml a cada muestra.
- Incubar 15 minutos a 30°C.
- Lavar 4 veces rápidamente con tampón fosfato 1x.
- Resuspender en 10 μ l y observar al microscopio de fluorescencia (verde).

6.8. Tinción vital con rojo neutro

El rojo neutro es un colorante y un indicador de pH utilizado en técnicas histológicas que tiende a acumularse en orgánulos o estructuras ácidas. Al igual que con la quinacrina, se crecen y se mantienen las células a pH tamponado superior al del citoplasma, con lo cual se consigue la acumulación de los colorantes en la vacuola, que tiene un pH inferior al del citoplasma. Llevamos a cabo diferentes pruebas con el rojo neutro, en diferentes condiciones hasta obtener un método muy simple y efectivo para observar la acidificación de la vacuola en *Saccharomyces cerevisiae*.

Protocolo F

Tinción vital con rojo neutro

(Corbacho *et al.*, en preparación)

Reactivos:

- Rojo neutro 2x
 - Rojo neutro 2 g/l
 - Tampón fosfato 100mM
 - Glucosa 4%
- Bafilomicina 50mM
- Agua estéril

Procedimiento:

- Centrifugar la suspensión de células obtenida en el Protocolo D (ver Apartado 6.6) y retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 10 μ l de bafilomicina 50mM o de agua estéril según corresponda.
- Adicionar 15 μ l de rojo neutro 2x.
- Incubar 5-10 minutos a 30°C observando periódicamente al microscopio hasta ver las vacuolas teñidas de color rojo intenso.

6.9. Prueba del factor α

Protocolo G

Prueba del factor α en medio con pH definido

(Modificación del Protocolo de Sprague, 1991)

Cepas:

- Cepa sensible al factor α *sst1(bar1) MAT α*
- Cepa/s a probar *MAT α*
- Placas de YEPD tamponado al pH a probar
- Placas de YEPD sin tamponar como control

Procedimiento:

- Extender un césped con $5 \cdot 10^5$ células de la cepa *sst1(bar1) MAT α* en una placa de YEPD y en otra de YEPD tamponado.
- Tomar 10^8 células de cada cultivo a probar por duplicado (para la placa de YEPD y para la placa de YEPD tamponado), lavarlas con YEPD o YEPD tamponado según corresponda.
- Centrifugar y retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 10 μ l del mismo medio con el que se ha lavado.
- Depositar los 10 μ l sobre la placa correspondiente.
- Dejar crecer a 48 horas a 30°C.

6.10. Drop-test o spotting assay

Esta prueba sirve para visualizar diferencias de crecimiento de distintas cepas en medios con características específicas, como por ejemplo con adición de tóxicos, con diferentes fuentes de carbono, etc... Para ello se crecen las cepas a probar en medio líquido hasta fase exponencial. Se recogen mediante centrifugación y se lavan

con agua destilada estéril. Se prepara una suspensión en agua de densidad óptica conocida (p.e. $DO=1$), y a partir de esa suspensión se preparan otras cuatro mediante diluciones seriadas, teniendo en ellas concentraciones de $1/10$, $1/100$, $1/1000$ y $1/10000$ de la original. Por último se siembran $7,5-10 \mu\text{l}$ de cada una de ellas en la superficie de una placa sólida, disponiéndolas en una cuadrícula, como se muestra en la Figura M.0.

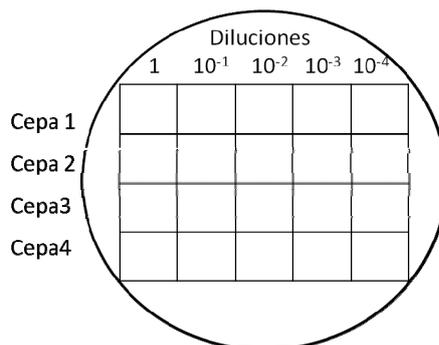


Figura M.0 Ejemplo de distribución de cuatro cepas con sus correspondientes diluciones en una misma placa en un *drop-test*.

Las placas se incuban a la temperatura adecuada y durante el tiempo necesario en cada caso, según las condiciones que se vayan a probar.

6.11. Microscopía

Las microfotografías que se muestran en este trabajo se tomaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600, equipado con óptica de Nomarski y una cámara digital Zeiss AxioCam. Cuando fue necesario se utilizaron los filtros de fluorescencia oportunos.

6.12. Medición del crecimiento

Para medir el crecimiento de los cultivos o calcular el número de células en un volumen determinado se siguieron los métodos siguientes:

- Recuento en Cámara de Neubauer Improved.
- Medición de la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro.
- Realización de diluciones seriadas, siembra y recuento en placa.

6.13. Conservación de las cepas

Las cepas que se utilizaban frecuentemente se conservaban en medio líquido o sólido a 4°C.

Para la conservación a largo plazo, las cepas se mantenían a -80°C en un congelador (Forma Scientific) con glicerol al 20% (para bacterias) o DMSO al 10% (para levaduras).

6.14. Ensayos de aglutinación con anticuerpos

Para los ensayos de aglutinación de células con anticuerpos descritos en el Capítulo IV, se utilizaron los anticuerpos anti-silvestre y anti-manosas terminales en $\alpha(1,3)$. Ambos anticuerpos fueron obtenidos, para trabajos anteriores, en nuestro laboratorio. Se preparaban diluciones de dichos anticuerpos y se les añadía una cantidad fija de células control (WT y *mnn1Δ*), hasta encontrar la dilución más apropiada. Para el lote que se usó en estos experimentos estaba en 1/64. Una vez determinada la dilución se repartía en pocillos de una placa de microtitulación 100 μ l de disolución de anticuerpos, y se adicionaban las células a probar. Se agitaba varias veces, y se observaba a intervalos regulares, cada 5 minutos, para monitorizar la aglutinación.

7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS

7.1 Extracción de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

Protocolo H

Extracción rápida de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

(Sambrook y Russell, 2001)

Reactivos:

- Etanol
- Fenol:cloroformo (1:1)
- Acetato sódico 3M pH 5,2
- Tampón STES
 - 0,2M Tris-Cl pH 7,6
 - 0,5M pH 5,2
 - 0,1% SDS (p/v)
 - 0,01M EDTA
- Tampón TE pH 7,6
- Bolas de vidrio (0,4 mm \varnothing) lavadas con ácido

Procedimiento:

- Si se parte de células frescas crecidas en una placa de medio sólido, recoger una colonia grande y transferirla a un vial de microcentrífuga con 50 µl de tampón STES. Si se parte de células crecidas durante la noche en medio líquido, transferir 1,5 ml del cultivo a un vial de microcentrífuga, centrifugar para eliminar el sobrenadante y resuspender en 50 µl de tampón STES.
- Añadir aproximadamente 50 µl de bolas a cada tubo junto con 20 µl de tampón TE.
- Añadir 60 µl de fenol:cloroformo, cerrar los tubos y agitar vigorosamente durante 1 minuto.
- Centrifugar los tubos en la microcentrífuga a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo, y precipitar el ADN mediante etanol (ver Protocolo O, Sección 8.7).
- Recoger el precipitado centrifugando 10 minutos a máxima velocidad a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar con 100 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente, retirar el sobrenadante y dejar los tubos abiertos hasta que se haya evaporado todo el líquido residual.
- Resuspender en 40 µl de tampón TE.

7.2. Extracción de ARN total de *Saccharomyces cerevisiae***Protocolo I****Extracción de ARN total de *Saccharomyces cerevisiae***(Modificado de Hauser *et al.*, 1998)**Reactivos:**

- Tampón de lisis
 - 1mM EDTA
 - 0,1M Cloruro de litio
 - 0,1M Tris-HCl pH 7,5
- Acetato potásico 40%, pH 5,5
- SDS 10%
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1
- Etanol absoluto
- Agua tratada con DEPC

Procedimiento:

- Crecer las células en un matraz con 50 ml de YEPD hasta la densidad óptica necesaria, en función de si se desea que estén en fase exponencial o estacionaria.
- Enfriar el cultivo añadiendo 50 ml de agua helada y dejando el matraz en hielo durante 10 minutos.
- Centrifugar las células en frío y transferirlas a un vial de microcentrífuga con 1 ml de agua helada.
- Resuspender en 0,5 ml de tampón de extracción y añadir 0,5 ml de bolas de vidrio ($\varnothing = 0,4$ mm).
- Añadir 0,5 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico con 1% SDS.
- Agitar 20 segundos a 5 m/s con un *fastprep*.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos, a 4°C, y transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo.
- Añadir 25 µl de acetato potásico 40% y 0,5 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (sin SDS).
- Agitar vigorosamente durante 30 segundos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C; transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo.
- Añadir 0,5 ml de cloroformo, agitar vigorosamente y centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 4°C.
- Añadir 1 ml de etanol absoluto, mezclar bien e incubar a -20°C durante una hora.
- Centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos, eliminar el sobrenadante.
- Centrifugar de nuevo y retirar el líquido residual.
- Añadir agua tratada con DEPC y dejar disolver durante varias horas.
- Medir Abs260nm y Abs280nm para cuantificar pureza y concentración.

7.3. Extracción de plásmidos de *Escherichia coli*

Para las extracciones de plásmidos rutinarias, como la comprobación de transformantes, PCRs de comprobación, etc. se utilizó el Protocolo J, que se describe más abajo. Para las extracciones de plásmidos que iban destinadas a secuenciación o a manipulaciones genéticas que requerían una alta pureza se utilizaron los kits comerciales High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Protocolo J

Minipreparación de plásmidos mediante lisis alcalina con SDS

(Sambrook y Russell, 2001)

Reactivos:

- Solución de lisis alcalina I (Sol I)
 - 50mM Glucosa
 - 25mM Tris-HCl pH 8
 - 10mM EDTA
- Solución de lisis alcalina II (Sol II) (preparar fresca y mantener a temperatura ambiente)
 - 0,2N Hidróxido sódico
 - 1% SDS
- Solución de lisis alcalina III (Sol III)
 - 5M Acetato potásico
 - 11,5 % Ácido acético glacial
- Etanol
- Tampón TE

Procedimiento:

- Inocular 2 ml de medio rico (LB, TB, etc. con el antibiótico apropiado), con una colonia de bacterias transformadas e incubar durante la noche a 37°C con agitación vigorosa.
- Transferir 1,5 ml del cultivo a un vial de microcentrífuga y centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos a 4°C; guardar la parte no utilizada del cultivo a 4°C.
- Eliminar el medio dejando el precipitado tan seco como sea posible.
- Resuspender completamente en 100 µl de Sol I fría (4°C).
- Añadir 200 µl de Sol II y mezclar por inversión del tubo varias veces; mantener el tubo en hielo.
- Añadir 150 µl de Sol III fría, mezclar bien por inversión del tubo varias veces y mantener en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar el lisado a máxima velocidad a 4°C; transferir el sobrenadante a otro tubo.
- Precipitar el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, agitar y dejar durante 2 minutos a la misma temperatura.
- Recoger el ADN precipitado centrifugando a máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y dejar el precipitado lo más seco posible.
- Lavar con 1 ml de etanol al 70%; centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos
- Eliminar el sobrenadante tanto como sea posible.
- Dejar los tubos abiertos a temperatura ambiente hasta que los precipitados estén secos.
- Disolver en 50 µl de tampón TE pH 8 y almacenar congelados.

7.4. Extracción de plásmidos de *Saccharomyces cerevisiae*

Protocolo K

Extracción de plásmidos de *Saccharomyces cerevisiae*

Reactivos:

- Tampón de lisis
 - 2% Tritón
 - 1 % SDS
 - 100mM NaCl
 - 10mM Tris (pH 8)
 - 1mM EDTA
- Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1)
- Acetato sódico 3M
- Etanol absoluto
- Etanol 70%
- Agua estéril

Procedimiento:

- Crecer las células durante 8 horas en 2 ml de medio selectivo.
- Transferir los cultivos a viales de microcentrífuga.
- Centrifugar durante 5 segundos y retirar el sobrenadante.
- Agitar las células para resuspender en el líquido residual.
- Añadir 200 µl de tampón de lisis y 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.
- Añadir 0,4 g de bolas de vidrio y agitar durante 2 minutos.
- Centrifugar durante 5 minutos, y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Añadir 30 µl de acetato sódico 3M y 700 µl de etanol absoluto.
- Centrifugar a 14000 rpm 5 minutos, retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 270 µl de agua estéril, añadir 30 µl de acetato potásico 3M y 750 µl de etanol absoluto.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos, retirar el sobrenadante.
- Lavar con 500 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar y retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 30 µl de agua.

7.5. Transformación de *Escherichia coli*

Protocolo L

Transformación de alta eficiencia de *Escherichia coli*

(Sambrook y Russell, 2001)

Reactivos:

- Medio SOC
- ADN para transformar
- Medio LB con ampicilina

Procedimiento:

- Pre-enfriar en hielo tubos tipo Falcon de 15 ml, uno por reacción.
- Descongelar al mismo tiempo las bacterias en hielo, sin agitar ni calentar.
- Depositar en el fondo de cada tubo el ADN plasmídico o la mezcla de ligamiento.
- Transferir 20-100 µl de bacterias al fondo de tubo de 15 ml, mezclar cuidadosamente con el ADN previamente dispuesto y dejar en hielo durante 30 minutos.
- Dar un choque térmico a 42°C en baño de agua durante 50 segundos.
- Dejar en hielo durante 2 minutos más.

- Añadir 0,9 ml de medio SOC a temperatura ambiente.
- Incubar con agitación vigorosa a 37°C durante 1 hora.
- Si se prevé una alta eficiencia, sembrar directamente 100 µl en placas de medio LB con ampicilina. Si, por el contrario, se prevé una baja eficiencia centrifugar, retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de medio SOC. Sembrar todo el volumen en una placa de LB con ampicilina.
- Incubar 16-24 horas hasta obtener colonias de transformantes.

7.6 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Protocolo M

Transformación de alta eficiencia de *Saccharomyces cerevisiae*

(Gietz y Woods, 2003)

Reactivos:

- Agua estéril
- Acetato de litio 100mM
- Acetato de litio 1M
- ADN de cadena sencilla (*carrier*) 2 mg/ml hervido
- Polietilenglicol (PEG) 50% p/v

Procedimiento:

- Crecer durante la noche un pre-cultivo de las levaduras a transformar.
- Inocular 50 ml de YEPD a 30°C a una concentración de $5 \cdot 10^6$ células/ml (aproximadamente D.O.= 0,2).
- Incubar el cultivo a 30°C en un agitador a 200 rpm hasta alcanzar $2 \cdot 10^7$ células/ml (aproximadamente D.O.=0,8); el proceso dura unas 3-5 horas, y proporciona material para 10 transformaciones.
- Recoger las células centrifugando a 3000 g (5000 rpm) durante 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 25 ml de agua estéril; centrifugar de nuevo.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de acetato de litio 100mM.
- Transferir a viales de microcentrífuga y centrifugar a máxima velocidad durante 15 segundos. Retirar el acetato de litio del sobrenadante con una micropipeta.
- Resuspender a un volumen final de 500 µl ($2 \cdot 10^9$ células/ml) con aproximadamente 400 µl de acetato de litio 100mM.
- Agitar la suspensión y hacer una alícuota de 50 µl para cada transformación en un tubo nuevo.
- Centrifugar y retirar el sobrenadante.
- Añadir la mezcla de transformación en el orden se que se indica (resultando un total de 360 µl):
 - 240 µl de PEG (50% p/v)
 - 50 µl de *carrier*
 - X µl de plásmido (0,1 – 10 µg)
 - 34-X µl de agua estéril
- Agitar cada tubo vigorosamente hasta la total resuspensión.
- Incubar durante 30 minutos a 30°C.
- Dar un choque térmico a 42°C en un baño de agua durante 30 minutos.
- Centrifugar a 6000-8000 rpm durante 15 segundos y retirar el sobrenadante.
- Resuspender cuidadosamente en 1 ml de agua estéril con una micropipeta.
- Sembrar distintas diluciones en placas de medio selectivo e incubar de 2 a 4 días para recoger las colonias de transformantes.

7.7. Selección de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* por afinidad

En el Capítulo I, los mutantes *ldb* se transformaron con la librería genómica CEN BANK para buscar los insertos que complementaban el defecto de cada mutación. Aquellos mutantes *ldb* que recuperaban el fenotipo silvestre recuperaban la carga negativa global de la superficie de la célula. Esta característica se utilizó para seleccionar esos transformantes por un método similar al descrito por Mañas *et al.* (1997), para la selección inicial de los mutantes *ldb*.

Para este experimento fue necesario introducir el marcador *ura3* en las cepas *ldb* a estudiar. Para ello se cruzaron con la cepa FY *MAT α* , se obtuvieron zigotos y se esporularon. Las ascas fueron analizadas para seleccionar aquellas esporas que mantenían el fenotipo *ldb* junto con el marcador *ura3*. Esas cepas se transformaron con la librería genómica y se sembraron en placas de medio selectivo sin URA. Para cada experimento se necesitaron un mínimo de 12 placas con aproximadamente 4000 colonias por placa (unas 48000 colonias en total). Las colonias se resuspendieron vertiendo 2,5 ml de ácido acético 50mM y la suspensión se recogió con un asa de vidrio y una micropipeta y se centrifugó descartando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de ácido acético 50mM y se transfirieron a un matraz de 25 ml. Las células que quedaban en los tubos de centrifuga se recogieron con 2 ml adicionales de ácido acético 50mM y se mezclaron con las demás. A estos 3 ml de suspensión celular se adicionaron 9 ml de bolas de QAE en ácido acético 50mM. La mezcla se incubó a 30°C durante 2,5 horas con una agitación de 150 rpm (Fig. M.1, A).

Seguidamente se transfirió a tubos de ensayo grandes y se dejaron decantar las bolas. Las células que hubieran recuperado el fenotipo silvestre (en azul oscuro en la figura), y por tanto la carga negativa de la pared celular se unieron a las bolas de resina cargadas positivamente (Fig. M.1, B). Las células con fenotipo *ldb*, y que por tanto no habían complementado el defecto, tenían menor carga negativa (o ninguna) en su pared celular y tendieron a unirse menos (o no unirse) a las bolas de resina (Fig. M.1, C). Las bolas se lavaron repetidas veces con un volumen del tubo de ácido acético 50mM tantas veces como fuera necesario hasta que en el sobrenadante no se apreciaran apenas células en suspensión mediante observación al microscopio (Fig.

M.1, D). Por último, para liberar las células unidas a las bolas (Fig. M.1, E) se lavaban con 20 ml de NaCl 2N dos veces. Esos dos volúmenes de lavado se transfirieron a un tubo nuevo y se centrifugaron (5000 rpm, durante 3 minutos) para recoger las células. Por último, se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico y se sembraron en 10 placas de medio selectivo con 100 μ l cada una.

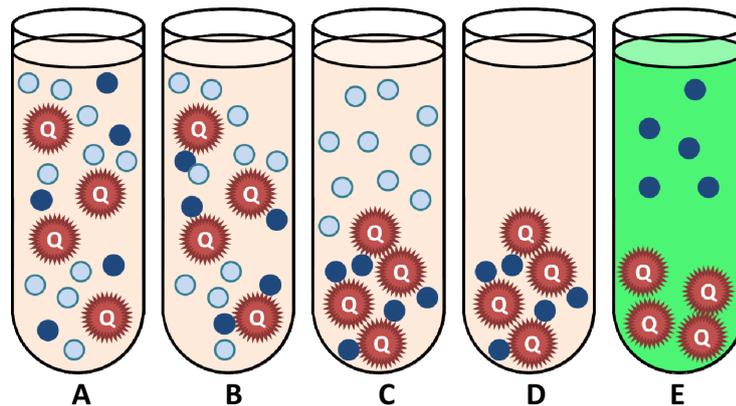


Figura M.1. Representación esquemática del proceso de selección de transformantes descrito en el texto.

De cada grupo de 10 placas se recogieron 72 colonias como mínimo, y se crecieron en placas de microtitulación con YEPD líquido para realizar una tinción de azul alcian (ver Sección 6.5). Eso permitió reconocer a los transformantes que habían complementado para someterlos al resto de pruebas necesarias para comprobar sus diferentes características fenotípicas. Este método de selección fue muy eficiente puesto que en general la tasa de células con fenotipo silvestre estaba por encima del 85% (Fig. M.2).

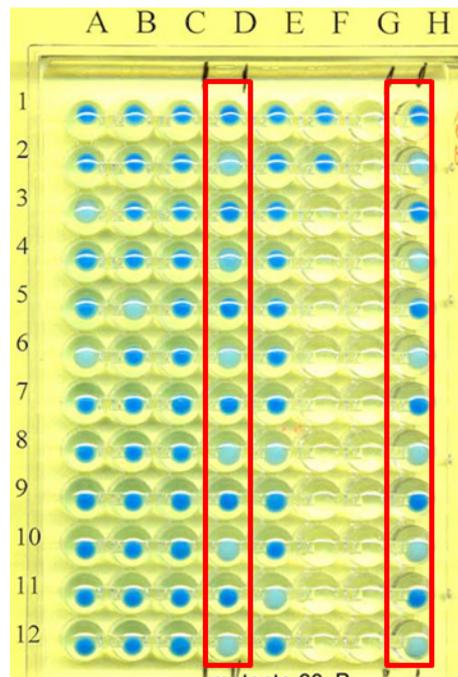


Figura M.2. Eficiencia del método de selección. Las columnas indicadas en rojo son de control, y muestran la cepa silvestre (azul oscuro) y la cepa *ldb* (azul claro). El resto son células recuperadas tras haberse unido a las bolas de resina. Como se aprecia en la figura, el 90% de las células recuperadas tenían fenotipo silvestre.

7.8. Producción de células competentes de *E. coli*

Para las transformaciones utilizando mezclas de ligamiento donde se esperaba baja eficiencia de transformación se utilizaron las células competentes comerciales MAX Efficiency DH5 α (Invitrogen) y JM109 $>10^8$ cfu/ μ g (Promega).

Para las transformaciones utilizando plásmidos se utilizaron células competentes obtenidas en nuestro laboratorio, mediante el procedimiento que se describe a continuación, que tenían generalmente una eficiencia superior a 10^7 cfu/ μ g ADN.

Protocolo N

Producción de células ultracompetentes de *Escherichia coli*

(Inoue *et al.*, 1990)

Reactivos:

- Medio SOB
- Solución TB
 - 10mM PIPES
 - 15mM Cloruro de calcio
 - 250mM Cloruro de potasio
 - Disolver en agua, ajustar el pH a 6,7 con hidróxido de potasio o ácido clorhídrico y añadir cloruro de manganeso 55mM
 - Esterilizar por filtración y almacenar en frío
- DMSO

Procedimiento:

- Crecer las bacterias en una placa de LB a 37°C toda la noche.
- Recoger 10-12 colonias grandes y crecerlas en un matraz de 1000 ml con 250 ml de medio SOB a 18°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5 (normalmente tarda unas 24-36 horas).
- Introducir los matraces en hielo 10 minutos.
- Transferir el cultivo a frascos grandes de centrifuga pre-enfriados.
- Centrifugar las células a 4000 rpm 10 minutos a 4°C.
- Con cuidado resuspender las células en 80 ml de solución TB muy fría y dejar en hielo 10 minutos.
- Transferir a tubos tipo Falcon de 50 ml pre-enfriados y centrifugar 10 minutos a 4°C; retirar el sobrenadante.
- Resuspender las células cuidadosamente en 20 ml de TB muy frío y añadir 1,4 ml de DMSO pre-enfriado.
- Hacer alícuotas de 50-500 μ l en tubos de microcentrifuga y almacenar a -80°C.
- Determinar la eficiencia de transformación.

8. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en agarosa, visualización y recuperación de bandas

Las electroforesis de ADN se llevaron a cabo en mini-geles de agarosa de baja EEO (Pronadisa) al 0,7% en tampón TAE en cubetas RunOne (Embitec). Cuando se deseaban recuperar las bandas la agarosa utilizada fue de bajo punto de fusión (Pronadisa), en geles al 1%. El voltaje aplicado en las cubetas RunOne varió de 25V a 100V según las necesidades.

Para las electroforesis de ARN, las cubetas y moldes del gel se lavaron previamente con NaOH 1N y agua Milli-Q, y los geles de agarosa al 1% se prepararon en tampón NBC (1M ácido bórico, 20mM citrato sódico, 100mM NaOH, pH 7,5), al que previamente antes de solidificarse se le adicionaba formaldehído hasta una concentración final de 0,925%. Los geles se corrieron en vacío antes de cargar las muestras durante 15 minutos.

A las muestras antes de cargarlas se les adicionó tampón de carga 6x (0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol).

Para teñir las bandas, los geles se incubaron durante 30 minutos en una solución de bromuro de etidio 10 μ g/100 ml, y se visualizaron utilizando un documentador de geles GelDoc (Bio-Rad), equipado con transiluminador UV, cámara fotográfica, y el software QuantityOne (Bio-Rad).

Cuando se necesitaba recuperar una banda a partir del gel teñido con bromuro de etidio, se cortaba la banda de interés tratando de exponer el gel el menor tiempo posible a la luz UV, y se purificaba el ADN del fragmento de agarosa utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

8.2. Reacciones de amplificación (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en microtubos de 0,2 ml en un termociclador TGradient (Biometra). Para las PCR rutinarias la polimerasa utilizada fue *GoTaq Flexy DNA Polymerase* (Promega) utilizando la siguiente mezcla de reacción (50 µl) y el programa estándar que se muestra.

GoTaq Flexy DNA Polymerase

<i>GoTaq Flexy Buffer</i>	1x
MgCl ₂	2mM
dNTPs	0,2mM de cada uno
Cebador directo	5µM
Cebador reverso	5µM
<i>GoTaq DNA Pol.</i>	1,25 U
ADN molde	Variable

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnat. Inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Hibridación	X°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min/kb	
Extensión final	72°C	5 min	1
Pausa	4°C	pausa	

X= 5°C menos de la T_m del primer con la T_m menor

Las PCR que requerían una alta fidelidad en la copia se hicieron con ADN polimerasas con actividad correctora. En función de la disponibilidad se utilizaron dos distintas: TripeMaster PCR System (Eppendorf) para el Capítulo IV y *Pfu* DNA Polymerase (recombinante, preparada *in situ*) para el Capítulo VI. Las mezclas de reacción y los programas estándar se indican a continuación:

TripeMaster PCR System

<i>High Fidelity Buffer</i>	1x
MgCl ₂	2,5mM (incluido en el <i>HF Buffer</i>)
dNTPs	0,2mM de cada uno
Cebador directo	4μM
Cebador reverso	4μM
<i>TripleM. DNA Pol.</i>	2,5 U
ADN molde	Variable

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnat. Inicial	94°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	30
Hibridación	X°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min/kb	
Pausa	4°C	pausa	

X= 5°C menos de la T_m del primer con la T_m menor

Pfu DNA Polymerase

Tampón 10x	1x
MgCl ₂	incluido en el tampón (*)
dNTPs	0,2mM de cada uno
Cebador directo	4μM
Cebador reverso	4μM
<i>Pfu DNA Pol.</i>	1 μl (*)
ADN molde	Variable

(*) La enzima no era comercial, se preparaba en el laboratorio, y por tanto se desconocía el número de unidades.

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnat. Inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Hibridación	X°C	30 s	
Extensión	68°C	2 min/kb	
Extensión final	68°C	10 min	1
Pausa	4°C	pausa	

X= 5°C menos de la T_m del primer con la T_m menor

Quando se necesitaba purificar el producto de una reacción de PCR se utilizó el *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

8.3. Reacciones de restricción

Para las reacciones de restricción se utilizaron las siguientes enzimas de restricción:

XhoI (Promega, Roche, New England Biolabs)
SpeI (Promega, Roche)
BamHI (Promega, Roche, New England Biolabs)
SmaI (Promega)
EcoRI (Promega)
Sall (Promega)
XbaI (Promega)
DpnI (New England Biolabs)

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones suministradas con cada una de las enzimas, en volúmenes de 20 μ l, con el tampón correspondiente y 10 U de enzima, incubándolas a 37°C (*SmaI*, 25°C) durante 2 horas.

8.4. Reacciones de ligamiento y TA-Cloning

Los ligamientos se hicieron mediante la enzima *LigaFast T4 DNA Ligase* (Promega), incubando en un volumen de 10 μ l, con el tampón adecuado, 50 ng de vector cortado y purificado, con la máxima cantidad posible de inserto cortado y purificado. La mezcla se mantenía un mínimo de 12 horas a 4°C, y posteriormente se desnaturalizaba la enzima a 70°C durante 10 minutos.

En el caso de la técnica *TA-Cloning*, los fragmentos amplificados y purificados, sin restricción previa, junto con un *vector T*, se llevaban directamente a la reacción de ligamiento. El *vector T* es un vector cortado que posee un extremo cohesivo de sólo una *T* (timina) en 3', que permite clonar directamente productos de PCR generados con una *Taq* polimerasa que no tenga actividad exonucleasa y, por tanto, deje prolongaciones de una sola *A* (adenina) en el extremo 3'.

8.5. Reacciones de secuenciación

Los plásmidos con insertos para secuenciar se purificaron mediante el kit comercial indicado en el apartado correspondiente, y se enviaron a secuenciar a Biomers (Ulm, Alemania) y StabVida (San Antonio de Oeiras, Portugal), en los Capítulos

I y IV, y a Microsynth (Balgach, Suiza) en el Capítulo VI. En función de las necesidades, la secuenciación se hizo con cebadores diseñados para la ocasión (ver Sección 5) o bien utilizando cebadores estándar (T7, SP6,...).

8.6. Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones en determinados genes, que produjeran cambios conocidos en la secuencia se utilizaron dos métodos: PCR solapadas y *QuickChange*. En ambos casos, la primera fase consistía en clonar el gen de interés en un plásmido, utilizando las técnicas comunes de clonación. Una vez que se obtenía la construcción, se diseñaban cebadores de 25 a 45 pb, con $T_m \geq 78^\circ\text{C}$, que incluyesen la mutación en el centro de su secuencia y solapasen entre sí pero en cadenas distintas (Fig. M.3).

En el método de PCR solapadas, la primera PCR consistía en un par de reacciones paralelas en las que se utilizaba uno de los cebadores con la mutación junto con un cebador de los utilizados para clonar el gen. Así se generaban dos productos, uno en cada reacción, que incluían una parte del gen a mutar, con una zona del mismo con la mutación incorporada, y que era complementaria del otro fragmento generado en la reacción paralela. Ambos productos, tras purificarlos de un gel de agarosa, se combinaban como cebadores y molde a la vez en la segunda reacción de PCR. En este caso el producto obtenido era ya el gen completo con la mutación incorporada. Nuevamente este producto se purificaba y se utilizaba como molde, junto con los cebadores utilizados para su clonación, con el fin de amplificarlo en la tercera reacción de PCR. En todas estas reacciones se utilizó el programa y las condiciones descritos en la Sección 8.2.

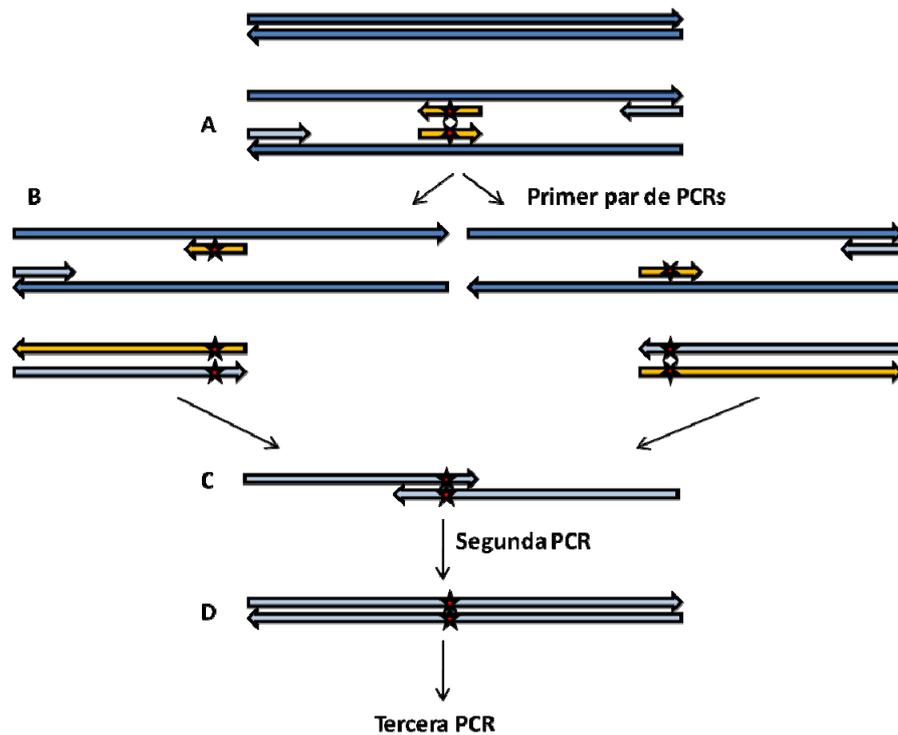


Figura M.3 Diagrama explicativo de la mutagénesis dirigida mediante PCR solapadas. **A**, diseño de cebadores solapados con la mutación insertada; **B**, primer par de PCRs, cada una con uno de los cebadores modificados y un cebador sin mutagenizar; **C**, combinación de los productos purificados de las PCR anteriores y segunda ronda de PCR con dichos productos como cebadores; **D**, generación del fragmento completo con la mutación insertada, el cual será molde para la tercera PCR (de amplificación).

El método del *QuickChange* consistía en utilizar directamente el plásmido con el gen clonado como molde para la reacción de PCR que se hacía con la enzima *PfuTurbo* (Stratagene), capaz de amplificar el plásmido completo (Fig. M.4).

PfuTurbo DNA Polymerase

Tampón 10x	1x
MgCl ₂	(incluido en el tampón)
dNTPs	0,2mM de cada uno
Cebador directo	10μM
Cebador reverso	10μM
<i>PfuTurbo</i> DNA Pol.	2,5 U
ADN molde	10 ng

Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnat. Inicial	95°C	1 min	1
Desnaturalización	95°C	50 s	17
Hibridación	60°C	50 s	
Extensión	68°C	1 min/kb	
Extensión final	68°C	7 min	1
Pausa	4°C	pausa	

X= 5°C menos de la Tm del primer con la Tm menor

Con esta enzima se realizaba una PCR corta, para obtener un producto igual al plásmido original, pero con dos discontinuidades, una a cada lado de los cebadores, y con una zona solapada que permite la formación de una molécula circular con dos muescas. Para eliminar el plásmido molde, que no contiene la mutación, se incubaba el resultado de la PCR con la enzima de restricción *DpnI*, que es capaz de destruir el ADN metilado (amplificado en bacterias) pero no el ADN sin metilar (procedente de PCR). De éste modo podemos utilizar el plásmido recién sintetizado para transformar bacterias, las cuales cerrarán las muescas del mismo y lo amplificarán.

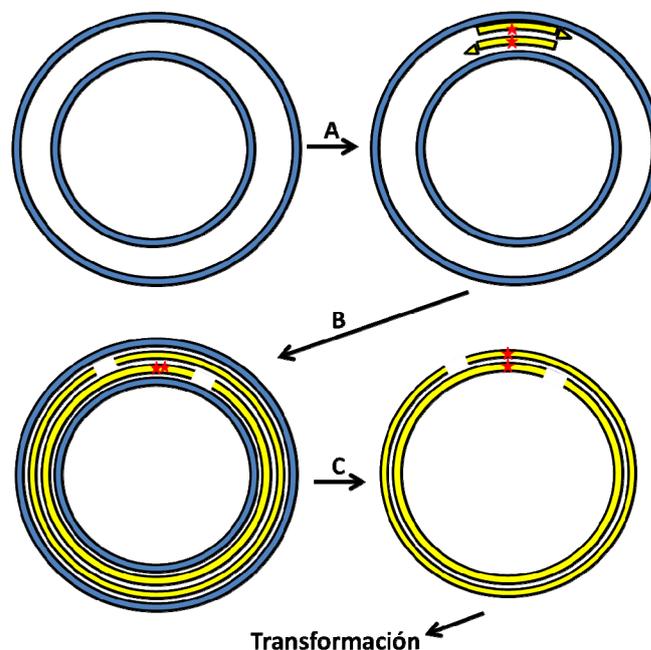


Figura M.4. Esquema del sistema de introducción de mutaciones directamente en el plásmido, o *QuickChange*. **A**, PCR con los cebadores modificados solapados; **B**, el producto obtenido incluye los plásmidos molde sin mutar y los nuevos con la mutación incorporada; **C**, los plásmidos molde se eliminan con *DpnI*, y se utilizan para transformar.

8.7. Precipitación de ácidos nucleicos

Protocolo O

Precipitación de ácidos nucleicos

(Sambrook y Russell, 2001)

Reactivos:

- Acetato sódico 3M
- Agua destilada estéril
- Etanol absoluto (a -20°C)
- Etanol 70%

Procedimiento:

- Estimar el volumen de la solución de ácidos nucleicos y añadir acetato sódico 3M hasta tener una concentración final de acetato sódico 0.3M.
- Mezclar bien y adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto (a -20°C).
- Dejar la mezcla en hielo o a -20°C durante 15-30 minutos.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos (preferiblemente en frío).
- Retirar el sobrenadante.
- Lavar con 500 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 2 minutos (preferiblemente en frío), y retirar el sobrenadante.
- Dejar secar el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el líquido residual se haya evaporado.
- Disolver el precipitado en agua destilada estéril o bien en tampón TE.

8.8. Cuantificación de ácidos nucleicos y determinación de la pureza

Para cuantificar la concentración de ADN o ARN de una preparación, se siguieron dos métodos:

- Espectrofotometría (Sambrook y Russell, 2001): Para ello se prepararon diluciones 1/250 por duplicado de cada muestra y se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm y 280 nm. Para convertir el valor de absorbancia en concentración se siguieron las siguientes reglas:

$$\begin{array}{l}
 \text{Abs}_{260\text{nm}} = 1 \\
 \text{aproximadamente son}
 \end{array}
 \left\{ \begin{array}{l}
 50 \mu\text{g/ml para ADN de doble cadena} \\
 40 \mu\text{g/ml para ADN de cadena simple y ARN} \\
 20 \mu\text{g/ml para oligonucleótidos de cadena simple}
 \end{array} \right.$$

- Tinción con bromuro de etidio: Las muestras de corrieron en geles de acrilamida junto con un patrón de bandas de tamaño y cantidad conocidos. Mediante un programa informático (Quantity One, Bio-Rad) se cuantificaron las intensidades de las bandas comparándolas con las del patrón.

8.9. Fabricación de los *microarrays* de ADN

Los *microarrays* de ADN utilizados en este trabajo fueron fabricados en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Gotemburgo (Suecia). Se explica de forma resumida cómo se procedió a su fabricación. Las ORFs de *Saccharomyces cerevisiae* se amplificaron mediante PCR a partir de moldes de las ORF suministrados por Research Genetics. Para obtener el ADN para imprimir los *microarrays* se hizo una segunda PCR con la segunda generación de ORFs como molde. Las reacciones se precipitaron con etanol en placas de microtitulación y posteriormente disueltas en solución de impresión (SSC 3x). Las sondas se imprimieron sobre los soportes usando un robot Cartesian Robot PixSis 5500 de cuatro puntas con forma de pluma. Las puntas dispensaron aproximadamente 2 nl por punto (*spot*) en portas de vidrio cubiertos con aldehído sililados (Corning CMT-GAPS).

8.10. Síntesis del ADNc a partir de ARNm y marcaje fluorescente

La síntesis de ADNc se hizo a partir de ARN total extraído como se explica en el Protocolo I (ver Apartado 7.2).

Protocolo P

Síntesis de ADNc

Reactivos:

- Oligo-d(T) (Invitrogen)
- Cebadores aleatorios (*random primers*, Invitrogen)
- NaOH 0,1N
- HCl 0,1N
- Tampón TE
- ADN Cot-1 de ratón (Invitrogen)
- *DIG Easy Hyb Buffer* (Sigma-Aldrich)

Procedimiento:

- Empezar con 20-25 µg de ARN total en un volumen de 5 µl.
- Añadir 5 µg de oligo-d(T) y 5 µg de cebadores aleatorios, quedando un volumen final de 15 µl.
- Desnaturalizar 10 minutos a 70°C y enfriar en hielo 10 minutos.
- Añadir 6 µl de tampón *First Strand Buffer 5x*.
- Añadir 3 µl de DTT 0,1M.
- Añadir 0,6 µl de mezcla de dNTPs (10mM dTTP, 25mM para los demás).
- Añadir 3 µl del fluoróforo 1mM correspondiente: Cy3-dUTP y Cy5-dUTP (Amersham) para ARN control y problema respectivamente.
- Añadir 3 µl (1200 U) de la transcriptasa reversa *SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase* (Invitrogen).

- El volumen de reacción debe ser de 30 μ l.
- Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Incubar en baño de agua a 50°C durante 5 horas.
- Eliminar el ARN mediante la adición de 30 μ l de NaOH 0,1N.
- Inactivar la transcriptasa reversa mediante desnaturalización a 70°C durante 10 minutos.
- Neutralizar con 30 μ l de HCl 0,1N.
- Añadir 440 μ l de tampón TE y 20 μ g de ADN Cot-1 de ratón.
- Filtrar 5 minutos en un Microcon 30 (Millipore), recuperar las sondas, y combinar ambas reacciones.
- Transferir a un nuevo Microcon 30, añadir TE hasta llenar el receptáculo de la muestra; centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
- Lavar dos veces más con TE y centrifugando.
- Recoger las muestras con 50 μ l de TE y desecar completamente en una centrífuga de vacío.
- Disolver en 45 μ l de *DIG Easy Hyb Buffer*.
- Tomar 2 μ l de la mezcla, llevarlos a 500 μ l y medir la Ab_{5260} , Ab_{550} y Ab_{650} para cuantificar y medir el grado de incorporación de los fluoróforos.

8.11. Hibridación de los *microarrays*

Protocolo Q

Hibridación de los *microarrays*

Reactivos:

- BSA 1% (Sigma-Aldrich) en *DIG Easy Hyb Buffer* (Sigma-Aldrich)
- Tampón de Lavado A
 - SSC 2x
 - SDS 0,1%
- Tampón de Lavado B
 - SSC 1x (150mM cloruro sódico, 15mM citrato sódico, pH 7)
- Tampón de Lavado C
 - SSC 0,1x

Prehibridación:

- Incubar el *microarray* en la solución de BSA durante 1 hora, a 42°C.
- Lavar el *microarray* con agua destilada estéril hasta eliminar completamente la BSA no unida.
- Transferir a agua destilada estéril limpia.
- Secar soplando nitrógeno gaseoso sobre el *microarray*.

Hibridación:

- Desnaturalizar la sonda de ADNc marcado fluorescentemente a 93°C durante 5 minutos.
- Enfriar la sonda pipeteándola a un tubo nuevo y centrifugándolo al aire.
- Introducir el *microarray* en la cámara de hibridación y depositar unas gotas de tampón *DIG Easy Hyb Buffer* en los agujeros de humectación.
- Depositar la sonda sobre el *microarray* y cubrir con una lámina de hibridación (*Hybri-slips* 22x60mm, Sigma-Aldrich) usando unas pinzas y evitando la formación de burbujas.
- Cerrar la cámara de hibridación, introducirla en una lámina de plástico y termosellarla; introducir posteriormente en dos bolsas consecutivas de plástico.
- Sumergir la cámara en un baño de agua precalentada a 42°C, minimizando la exposición del baño a la luz mediante papel de aluminio.
- Incubar durante 12 horas.

Lavado:

- Sacar la cámara del baño y retirar el *microarray*.
- Rápidamente ponerlo en una placa de Petri con Tampón de Lavado A.
- Mover cuidadosamente la placa hasta que la lámina de hibridación se desprenda, y entonces

quitarla con pinzas.

- Dejar el *microarray* en la solución durante 5 minutos en un agitador basculante a velocidad lenta.
- Cambiar el *microarray* a una placa nueva, con Tampón de Lavado B, evitando arrastrar la solución A; dejar agitando durante 5 minutos.
- Transferir el *microarray* a una placa con Tampón de Lavado C y dejarlo incubando con agitación durante 5 minutos más.
- Secar el *microarray* con corriente de nitrógeno gaseoso y escanear tan pronto como sea posible (Ver apartado 11.2 para detalles sobre el escaneado).

9. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

9.1. Extracción y electroforesis de invertasa en condiciones nativas

Protocolo R

Electroforesis de invertasa en gel de poli(acrilamida) en condiciones nativas

(Ballou, 1990; Mañas *et al.*, 1997)

Reactivos:

- PMSF 100 mM (0,174 g en 10 ml de etanol absoluto)
- Tampón TBP pH 7 (5,52 g de ácido dietil-barbitúrico + 1 g Tris para un volumen de 1 litro)
- Tampón TBP-Glicerol-ABF pH 7 (0,552 g ácido dietil-barbitúrico + 0,1 g Tris + 15 g glicerol + 15 mg azul de bromofenol)
- Solución de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 (30 g de acrilamida, 0,8 g de *N'-N'*-bis-metilén-acrilamida para 100 ml; mantener en frío)
- Tampón Tris/HCl 0,8M pH 7,3 para el gel (9,69 g de Tris, añadir HCl hasta pH 7,3 y llevar a 100 ml; mantener en frío)
- Persulfato amónico 10% (0,1 g en 1 ml de agua; mantener en frío)
- TEMED
- Tampón de corrida Tris/Borato 0,008M pH 7,5 (1 g de Tris + 5,02 g de ácido bórico para un volumen de un litro)
- Sacarosa 0.1 M en tampón acetato pH 5,1
- Cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio en NaOH 0,5N (preparar fresco cada vez)
- Ácido acético 10%

Preparación de las muestras:

- Crecer las células en el medio correspondiente durante 4-10 días.
- Centrifugar las células y lavar con 3 ml de TBP con PMSF 1mM (añadir el PMSF justo antes de utilizarlo).
- Centrifugar y resuspender en 1 ml de TBP con PMSF 1mM.
- Transferir a viales de 1,5 ml.
- Centrifugar y retirar el sobrenadante.
- Resuspender con 40 µl de TBP con PMSF 1mM + 50 µl de TBP-Glicerol-ABF.
- Añadir bolas de vidrio (0,45 mm Ø) hasta 1 mm por debajo del menisco.
- Agitar en un agitator durante 14 minutos.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.
- Recoger los sobrenadantes en tubos nuevos.
- Mantener congelados hasta su uso.

Preparación de los geles:

Para dos geles de Mini-Protean II (9x10 cm y 0,75 mm de grosor) preparar:

- 7,3 ml de agua destilada
- 1,66 ml de solución acrilamida/bisacrilamida
- 1 ml del tampón del gel 10x

- 35 µl de persulfato amónico 10%
- 7 µl de TEMED
- Mezclar bien y cargar en los moldes
- Esperar al menos una hora

Corrida de las muestras:

- Cargar 1-20 µl de cada muestra en los pocillos.
- Llenar las cubetas con tampón de corrida.
- Conectar una corriente de voltaje constante de 120-180 V para Mini-Protean II.

Revelado de los geles por actividad:

- Incubar los geles durante 10 minutos a 4°C en una cubeta con tampón acetato pH 5.1 con sacarosa 0,1 M previamente enfriado a 4°C.
- Incubar los geles durante 15 minutos a 37°C en una cubeta con tampón acetato pH 5.1 con sacarosa 0,1 M previamente calentado a 37°C.
- Lavar con agua.
- Pasar los geles a una cubeta de vidrio con cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio en NaOH 0,5N (preparado fresco) e incubar sobre una placa calefactora hasta que las bandas se hagan visbles.
- Para detener la reacción, añadir 500 ml de agua destilada, y después lavar con más agua.
- Guardar los geles a 4°C en una cubeta cerrada con una solución de ácido acético al 10%.
- Para secar y conservar los geles: lavarlos con agua destilada, depositarlos sobre un rectángulo de papel Whatman Nº1, y secarlos usando un secador de geles (GelDrier, Bio-Rad).

9.2. Extracción y SDS-PAGE de carboxipeptidasa Y**Protocolo S****Extracción de la Carboxipeptidasa Y****Reactivos:**

- Tampón de lisis
 - Tris-HCl 50mM pH 7,5
 - SDS 1%
 - PMSF 2mM
- Tampón *Laemmli* de muestra (4x):
 - 0,25M Tris-HCl pH 6.8
 - 8% SDS (v/p)
 - 20% β-Mercaptoethanol (v/v)
 - 40% Glicerol (v/v)
 - 0,04 % Azul de bromofenol (w/v)

Procedimiento:

- Comenzar con 50 unidades ópticas (600nm) de células creciendo en fase exponencial.
- Centrifugar y eliminar el medio, resuspender en 200 µl de tampón de lisis y 150 µl de bolas de vidrio.
- Agitar en el agitator a 4°C durante 10 minutos.
- Centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm.
- Desnaturalizar durante 5 minutos a 95°C.
- Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm.
- Tomar 100 µl del sobrenadante y pasarlos a un tubo nuevo.
- Añadir 35 µl de tampón *Laemmli* 4x.
- Desnaturalizar a 95°C durante 5 minutos.
- Cargar las muestras en el gel.

Protocolo T**SDS-PAGE de la Carboxipeptidasa Y****Reactivos:**

- Mezcla para gel separador (*resolving gel*), 2 minigeles
 - 7,52 ml agua
 - 3,38 ml acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)
 - 3,8 ml Tris-HCl 1,5M pH 8,8
 - 150 µl SDS 10%
 - 100 µl persulfato amónico 10%
 - 10 µl TEMED
- Mezcla para gel compactador (*stacking gel*), 2 minigeles
 - 4,51 ml agua
 - 0,94 ml acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)
 - 1,9 ml Tris-HCl 0,5M pH 6,8
 - 75 µl SDS 10%
 - 75 µl persulfato amónico 10%
 - 3,75 µl TEMED
- Marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards Dual Color*, Bio-Rad)
- Tampón de corrido pH 8,3 (10x)
 - 0,25M Tris
 - 2M Glicina
 - 1% SDS
 - Agua destilada hasta 1 litro

Procedimiento:

- Preparar la mezcla del gel separador y cargar 6 ml del mismo en los moldes.
- Añadir sobre el gel 200 µl de isopropanol saturado con agua y dejar polimerizar al menos durante 30 minutos.
- Retirar el isopropanol, lavar con agua destilada y secar.
- Preparar la mezcla del gel compactador y cargarlo sobre el separador; colocar los peines.
- Dejar durante otra media hora como mínimo polimerizando.
- Cargar los pocillos con las muestras, incluyendo el marcador de peso molecular.
- Correr a voltaje constante de 100-180 V hasta que la banda de 37 KDa casi alcance el final del gel.

9.3. Western-blot**Protocolo U****Western-blot****Reactivos:**

- Tampón de transferencia
 - 100 ml 10x Laemmli-Running buffer (Tampón de corrida)
 - 200 ml Metanol
 - 700 ml agua destilada
- Membrana de nitrocelulosa para transferencia S&S PPROTRAN BA 83/85 (Perkin Elmer)
- Anticuerpo primario:
 - Ratón anti-CPY, para la carboxipeptidasa Y (fabricado en el laboratorio)
 - Conejo anti-FLAG, para las proteínas con *FLAG-tag* (Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo secundario:
 - Cabra anti-ratón IgG-HRP 400 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology)
 - Cabra anti-conejo IgG-HRP 400 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology)
- Reactivos para detección ECL Plus (Amersham/GE Healthcare)
 - Solución A
 - Solución B

- Papel radiográfico (Kodak)
- Tampón de bloqueo
 - PBS
 - 1% Tween 20
 - 5% Leche en polvo

Procedimiento:

- Realizar la transferencia semi-seca a membrana de nitrocelulosa con un Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), durante 30 minutos a voltaje constante de 24V.
- Bloquear la membrana con tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave.
- Incubar con el anticuerpo primario diluido 1/5000 en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave.
- Lavar la membrana 5 veces, durante 5 minutos cada vez, con tampón de bloqueo.
- Añadir el anticuerpo secundario diluido 1/10000 en tampón de bloqueo.
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave.
- Lavar 5 veces, durante 5 minutos cada vez, con tampón de bloqueo sin leche, con agitación suave.
- Transferir la membrana a una funda de plástico.
- Mezclar 250 µl de Solución A y 250 µl Solución B y repartir sobre la membrana.
- Sellar la funda y colocar en la placa de exposición con papel radiográfico.

9.4. Preparación de muestras para espectrometría de masas

Protocolo V**Preparación de muestras para espectrometría de masas**

(Schulz y Aebi, 2008)

Reactivos:

- Tampón de lisis
 - Tris-HCl 10mM pH 7,4
 - Cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-Free*, Roche)
 - PMSF 2mM
- Tris-HCl 10mM pH 7,4
- Tampón de desnaturalización (preparar fresco)
 - Tiourea 2M
 - Urea 7M
 - SDS 2%
 - Tris-HCl 50mM pH 8
 - DTT 10mM
- Acrilamida 1M
- SDS 20%
- Tampón de endoH
 - SDS 2%
 - *G5 Reaction Buffer* 1x
- EndoH y *G5 Reaction Buffer* (New England Biolabs)
- Hidrógenocarbonato amónico 50mM
- Endoproteasa Asp-N, 5 µg en 50 µl (Calbiochem)
- Tripsina, 40 µg/ml (Sigma-Aldrich)
- ACN 90% + TFA 0,1%
- ACN 70% + TFA 0,1%
- ACN 2% + ácido fórmico 0,2%
- TFA 0,1%

Lisis de las células:

- Crecer un cultivo de células en medio apropiado con sorbitol 1M hasta mitad de la fase logarítmica.
- Centrifugar las células.
- Tomar 100 unidades de densidad óptica en un vial de microcentrífuga.
- Centrifugar a 5000 g durante 1 minuto, y congelar si no se van a procesar inmediatamente.

Reducción, alquilación y digestión con endoH:

- Resuspender el precipitado de las 100 unidades de densidad óptica en 1 ml de tampón de lisis.
- Añadir el mismo volumen de bolas de vidrio lavadas con ácido.
- Agitar en agitatuos a 4°C durante 10 minutos, o bien pasar por el *Fastprep* 3 veces 30 segundos a 6,5 m/s.
- (Dentro de la cámara fría) Dejar los tubos reposando durante 1 minuto para que las bolas se vayan al fondo.
- (Dentro de la cámara fría) Transferir el lisado a un tubo nuevo de baja adsorción, centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad y retirar el sobrenadante.
- (Dentro de la cámara fría) Lavar las bolas con 500 µl de tampón Tris-HCl 10mM pH 7,4 y pasar el líquido al tubo que tenía el precipitado del paso anterior; resuspender y centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad, retirar el sobrenadante.
- (Dentro de la cámara fría) Lavar las bolas por segunda vez como antes.
- En el tubo de baja adsorción tendremos los precipitados de los 3 centrifugados (inicial + 2 lavados); resuspender en 1ml de tampón de desnaturalización.
- Agitar a 1400 rpm durante 0,5-2 horas a 30°C.
- Añadir 25 µl de acrilamida 1M.
- Agitar a 1400 rpm durante 1 hora a 30°C.
- Lavar 5 veces de la siguiente forma: centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto, retirar el sobrenadante, resuspender en tampón de desnaturalización sin DTT, agitar a 30°C durante 5 minutos.
- Lavar 6 veces de la siguiente forma: centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto, retirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua destilada con 2% de SDS.
- Añadir a cada precipitado 200 µl de tampón de endoH y 2 µl de endoH (1000 U).
- Incubar durante toda la noche a 37°C con agitación de 1400 rpm.

Digestión proteolítica:

- Lavar 6 veces de la siguiente forma: centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto, retirar el sobrenadante, resuspender en 1 ml de agua destilada.
- Resuspender en 100 µl de hidrógenocarbonato amónico 50 mM.
- Transferir la mitad de la suspensión a un nuevo tubo de baja adsorción.
- Añadir a uno de los tubos 2 µl de AspN, y al otro 20 µl de tripsina; agitar a 1400 rpm durante toda la noche a 37°C.

Preparación de las muestras para la espectrometría:

- Centrifugar a máxima velocidad 1 minuto.
- Purificar usando puntas C-18 (no µC-18), 3 veces por cada muestra, usando la misma punta y juntando los eluidos:
 - Prelavar la punta con 10 µl de ACN 90% + TFA 0,1%.
 - Equilibrar la punta con 10 µl de TFA 0,1%.
 - Pipetear dentro de la muestra 10 veces arriba-abajo 10 µl.
 - Lavar la punta con 10 µl de 0,1% TFA.
 - Eluir con 10 µl de ACN 70% + TFA 0,1% pipeteando arriba-abajo 5 veces en un tubo nuevo de baja adsorción.
- Secar las muestras en centrifuga de vacío.
- Resuspender en 20 µl de ACN 2% + ácido fórmico 0,2%; pasar por el agitatuos, sonicar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Almacenar congelado hasta su análisis.

10. TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

10.1. MALDI TOF/TOF: Espectrometría de masas con fuente de ionización tipo MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem (*TOF/TOF, Time-of-flight/Time-of-flight*)

Los péptidos purificados y desalinizados (ver sección 9.4) se analizaron con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en el modo *positive ion reflectron* con un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Analyzer 4700 (Applied Biosystems). Esta técnica permitía comprobar la calidad de las muestras como paso previo al análisis con LC-ESI-MS/MS (Schulz y Aebi, 2008).

10.2. LC-ESI-MS/MS o técnica combinada de Cromatografía líquida-Ionización de electroespray-Espectrometría de masas en tándem

El análisis se llevó a cabo con un LTQ-FT-ICR-MS (Thermo Scientific) en el Centro de Genómica Funcional conjunto de la Universidad de Zúrich y el Instituto Tecnológico Federal Suizo. Esta combinación de espectrometría de masas con cromatografía líquida e ionización por electroespray permite la identificación de péptidos con un altísimo nivel de sensibilidad y precisión (Schulz y Aebi, 2008).

10.3. Análisis de datos e identificación de péptidos

La identidad de los péptidos basada en los datos de la espectrometría de masas en tándem se determinó con el sistema MASCOT (Matrix Science) junto con la base de datos SwissProt de *S. cerevisiae*. La abundancia de los distintos péptidos se determinó por los datos de LC-ESI-MS sumando las intensidades de las bases de los picos en el cromatograma para toda la distribución isotópica de cada péptido-ion sobre el pico de elución. La ocupación de cada sitio de glicosilación concreto se determinó por la abundancia del péptido *N*- modificado sobre el total de ese péptido en forma modificada y sin modificar.

11. TÉCNICAS INFORMÁTICAS

11.1. Adquisición de imágenes de geles con bromuro de etidio

Las imágenes de los geles teñidos con bromuro de etidio se tomaron mediante una cámara de vídeo de un documentador de geles GelDoc 2000 (Bio-Rad) acoplado a un ordenador con el software QuantityOne (Bio-Rad).

11.2. Escaneado y lectura de *microarrays*

Para el escaneado de los *microarrays* se utilizó el escáner Virtek ChipReader (Virtek) junto con el software propio integrado. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImaGene 4.0 (BioDiscovery Inc.) para obtener la lectura de las intensidades de fluorescencia en cada uno de los puntos del *microarray*.

11.3. Análisis de los resultados de los *microarrays*

Los valores de intensidad obtenidos para cada punto en los *microarrays* se analizaron con el programa específico de análisis de datos de *microarrays* GeneSpring 7 (Silicon Genetics/Agilent Technologies). Sólo se utilizaron las 6 mejores réplicas en cada experimento. En primer lugar se sometieron los datos a una normalización Loweess. Después se eliminaron los puntos con baja calidad. Seguidamente se filtraron por nivel de confiabilidad para elegir sólo aquellos con un valor $p < 0,05$. Finalmente se eligieron aquellos genes con un cambio en el nivel de expresión de al menos el doble. Los genes resultantes se ordenaron por nivel de expresión y/o por categorías funcionales, como se describe en los capítulos correspondientes.

11.4. Visualización de estructuras proteicas en 3D

Para visualizar las estructuras terciarias proteicas descritas en las bases de datos, o bien obtenidas por software de predicción, en formato PDB se utilizó el programa PyMol 1.0 (DeLano Scientific LLC).

11.5. Asistencia en clonaciones

Como asistente en el diseño de las clonaciones, y en otras manipulaciones genéticas como inserción de mutaciones, etc... se utilizó el programa CloneManager 7.0 (Sci-Ed Software).

11.6. Bases de datos

Para obtener información sobre cepas, ORFs y genes, secuencias de proteínas, y modelos 3D se utilizaron las siguientes bases de datos:

Nombre	URL
Yeast Genome Database	http://www.yeastgenome.org
European Saccharomyces cerevisiae Archives for Functional Analysis (EUROSCARF)	http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/
Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS)	http://mips.gsf.de/
Expert Protein Analysis System, proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (ExPaSy)	http://expasy.org/

11.7. Predicción

Para la predicción de estructuras secundarias en función de la estructura primaria y su similitud con otras proteínas de estructura conocida se utilizó el software *on-line* Jpred (Cuff *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2008).

<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>

Para la predicción de sitios de glicosilación, presencia de péptido señal, y localización se utilizaron las aplicaciones *on-line* del Center for Biological Sequence Analysis, Biology Technical University of Denmark (CBS) (Emanuelsson *et al.*, 2000; Dyrlov Bendtsen *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, in preparation)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

11.8. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas se hizo mediante los programas:

-ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

-KAlign (Lassmann y Sonnhammer, 2006)

<http://msa.sbc.su.se/cgi-bin/msa.cgi>

11.9. Análisis estadístico

En los análisis de resultados de microarrays, el tratamiento estadístico estaba integrado en el programa de análisis GeneSpring 7 (Silicon Genetics/Agilent Technologies).

En el Capítulo VI, el tratamiento estadístico se hizo utilizando la aplicación *on-line*:

VassarStats: Statistical Computation Web Site

<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>

12. REFERENCIAS

- Ballou, C. E. (1990). "Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects." *Methods Enzymol.* **185**: 445-470.
- Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**(21): 7972-7976.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J. D. (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." *Yeast* **14**(2): 115-132.
- Burda, P. and Aebi, M. (1998). "The *ALG10* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the α -1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient *N*-linked glycosylation." *Glycobiology* **8**(5): 455-462.
- Burda, P., te Heesen, S., Brachat, A., Wach, A., Dusterhoft, A. and Aebi, M. (1996). "Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the *ALG9* gene encoding a putative mannosyl transferase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(14): 7160-7165.
- Cole, C., Barber, J. D. and Barton, G. J. (2008). "The Jpred 3 secondary structure prediction server." *Nucleic Acids Res.* **36**(suppl_2): W197-201.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (2002). Improving the alcian blue dye-binding test in *Saccharomyces cerevisiae*. 7th Annual Conference of The Society for Glycobiology, Glycobiology. **12**: 691.
- Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. M. (en preparación).
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M. and Barton, G. J. (1998). "JPred: a consensus secondary structure prediction server." *Bioinformatics* **14**(10): 892-893.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. and Hieter, P. (1992). "Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors." *Gene* **110**(1): 119-122.
- Dyrlov Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J. Mol. Biol.* **340**(4): 783-795.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their *N*-terminal amino acid sequence." *J. Mol. Biol.* **300**(4): 1005-1016.
- Fred Winston, C. D. S. L. R.-H. (1995). "Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C." *Yeast* **11**(1): 53-55.
- Gietz, R. and Woods, R. (2003). "Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method." *Methods Enzymol.* **350**: 87-96.

- Gupta, R., Jung, E. and Brunak, S. (in preparation). "Prediction of N-glycosylation sites in human proteins."
- Hauser, N. C., Vingron, M., Scheideler, M., Krems, B., Hellmuth, K., Entian, K.-D. and Hoheisel, J. D. (1998). "Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**(13): 1209-1221.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-28.
- Kassir, Y., Simchen, G., Christine, G. and Gerald, R. F. (1991). Monitoring meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, Academic Press. **Volume 194**: 94-110.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Lassmann, T. and Sonnhammer, E. L. L. (2006). "Kalign, Kalignv and Mumsa: web servers for multiple sequence alignment." *Nucleic Acids Res.* **34**(suppl_2): W596-599.
- Mañas, P., Olivero, I., Avalos, M. and Hernandez, L. M. (1997). "Isolation of new nonconditional *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in asparagine-linked glycosylation." *Glycobiology* **7**(4): 487-497.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." *Gene* **156**(1): 119-122.
- Neupert, C. and Aebi, M. (in preparation).
- Rose, M. D., Novick, P., Thomas, J. H., Botstein, D. and Fink, G. R. (1987). "A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector." *Gene* **60**(2-3): 237-243.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schulz, B. and Aebi, M. (2008). "Analysis of glycosylation site occupancy reveals a role for Ost3p and Ost6p in site-specific N-glycosylation efficiency." *Mol. Cell. Proteomics* **(en prensa)**.
- Sprague, G. (1991). "Assay of yeast mating reaction." *Methods Enzymol.* **194**: 77-87.
- Teixidó, F., Corbacho, I., Olivero, I. and Hernández, L. ((*en preparación*)).
- Umamoto, N., Yoshihisa, T., Hirata, R. and Anraku, Y. (1990). "Roles of the VMA3 gene product, subunit c of the vacuolar membrane H(+)-ATPase on vacuolar acidification and protein transport. A study with VMA3-disrupted mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **265**(30): 18447-18453.
- Vijayraghavan, U., Company, M. and Abelson, J. (1989). "Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev.* **3**(8): 1206-16.
- Wei, Y., Marchi, V., Wang, R. and Rao, R. (1999). "An N-terminal EF hand-like motif modulates ion transport by Pmr1, the yeast Golgi Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase." *Biochemistry* **38**(44): 14534-14541.

