



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Microbiología

APORTACIONES AL CONOCIMIENTO DEL PROCESO DE
GLICOSILACIÓN EN LEVADURAS.
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES
DE *Saccharomyces cerevisiae* CON DEFECTOS
EN DICHO PROCESO

PAULA INMACULADA MAÑAS NÚÑEZ

BADAJOS, 1997

Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones
c/ Caldereros 2, Planta 3ª
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.pcid.es/public.htm>

**"Aportaciones al conocimiento del proceso
de glicosilación en levaduras.
Aislamiento y caracterización de mutantes
de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos
en dicho proceso"**

por

Paula Inmaculada Mañas Núñez

Vº Bº El Director del Departamento

Fdo. Germán Larriba Calle
Catedrático de Microbiología
Director del Dpto. de Microbiología

Badajoz, 12 de Mayo de 1997

LUIS MIGUEL HERNÁNDEZ MARTÍN E ISABEL OLIVERO JIMÉNEZ,
Profesores
Titulares del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la
Universidad
de Extremadura,

CERTIFICAN: Que el presente trabajo "Aportaciones al conocimiento del proceso de glicosilación en levaduras. Aislamiento y caracterización de nuevos de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos en dicho proceso" presentado por Paula Inmaculada Mañas Núñez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura bajo nuestra dirección. Una vez revisado, estimamos como directores que puede ser presentado para su defensa ante el Tribunal nombrado al efecto.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, expedimos dicha certificación en Badajoz a 12 de Mayo de 1997.

Fdo. Luis Miguel Hernández Martín

Fdo. Isabel Olivero Jiménez

ÍNDICE

ACLARACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MEMORIA.

ABREVIATURAS.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

I.1. Glicoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*.

I.1.1. Tipos de unión carbohidrato proteína.

I.1.2. Funciones generales de los restos glucídicos de las glicoproteínas.

a) N-oligosacáridos.

b) O-oligosacáridos.

c) Restos de glicosil-fosfatidil-inositol.

I.1.3. Glicoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en estudios de glicosilación.

a) Manoproteínas de la pared celular.

b) Carboxipeptidasa Y (CPY).

c) Invertasa secretada.

d) Exoglucanasa mayoritaria secretada.

e) Quitinasa y factor a.

f) Factor α .

I.1.4. Técnicas de análisis de restos glucídicos.

I.1.4.1. Liberación de los restos glucídicos de la proteína.

I.1.4.2. Estudio de la composición de la porción glucídica.

I.1.4.3. Análisis estructurales de los restos glucídicos.

a) Métodos químicos.

b) Cromatografías.

c) Resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN).

d) Espectrometría de masas.

e) Digestión enzimática con glicosidasas de especificidad conocida.

- I.2. Estructura y biosíntesis de los restos O-glicosídicos en *Saccharomyces cerevisiae*.
 - I.2.1. Estructura.
 - I.2.2. Biosíntesis de O-oligosacáridos.
 - I.2.2.1. Aislamiento del gen DPM1.
 - I.2.2.2. Aislamiento de los genes PMT y pmt.
 - I.2.2.3. Aislamiento y caracterización del gen MNT1.
- I.3. Estructura y biosíntesis de N-oligosacáridos.
 - I.3.1. Estructura.
 - I.3.1.1. Primeros estudios estructurales.
 - I.3.1.2. Aislamiento y caracterización de los mnn.
 - I.3.1.3. Localización de los grupos fosfato en el núcleo interno.
 - I.3.2. Biosíntesis de los restos N-glicosídicos.
 - I.3.2.1. Etapas que suceden en el RE.
 - I.3.2.2. Etapas que suceden en el aparato de Golgi.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

- II.1. Cepas utilizadas.
- II.2. Medios y condiciones de cultivo.
- II.3. Medios y condiciones de esporulación.
- II.4. Conservación de los microorganismos.
- II.5. Aislamiento de deficientes en fosfato.
- II.6. Manipulaciones genéticas.
- II.7. Tinción de células de levadura con alcian blue.
- II.8. Electroforesis de la invertasa en condiciones nativas.
- II.9. Métodos cromatográficos.
 - II.9.1. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
 - II.9.2. Cromatografía de intercambio iónico convencional.
 - II.9.3. Cromatografía de filtración molecular.
 - II.9.4. Cromatografía de afinidad.
 - II.9.5. Cromatografía en capa fina.
- II.10. Concentración y diálisis.
- II.11. Extracción y purificación de manoproteínas. Liberación y fraccionamiento de N-oligosacáridos.

- II.12. Aislamiento de O-oligosacáridos.
- II.13. Obtención de anticuerpos.
- II.14. SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección (western blotting) de exoglucanasas.
 - II.14.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.
 - II.14.2. Electrotransferencia e inmunodetección de las glucanasas.
- II.15. Secuenciación del extremo amino de la exoglucanasa.
 - II.15.1. Purificación de la enzima y preparación de la muestra para secuenciación.
 - II.15.2. Secuenciación.
- II.16. Resonancia magnética nuclear.
- II.17. Otros métodos.
- II.18. Productos químicos y reactivos.

III. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DE *Saccharomyces cerevisiae* DEFECTIVOS EN EL PROCESO DE N-GLICOSILACIÓN.

- III.1. RESUMEN.
- III.2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS.
- III.3. RESULTADOS.
 - III.3.1. Mutagénesis y selección de los mutantes.
 - III.3.2. Afinidad por el colorante catiónico alcian blue.
 - III.3.3. Análisis de complementación.
 - III.3.4. Análisis de posibles defectos en la elongación y/o transferencia de los N-oligosacáridos a la proteína. Pruebas adicionales de complementación.
 - III.3.5. Resistencia a vanadato.
 - III.3.6. Análisis morfológico de células .
 - III.3.7. Estructura de los N-oligosacáridos del mutante ldb2.
 - III.3.8. Estructura de los N-oligosacáridos del mutante ldb1.

III.4. DISCUSIÓN.

IV. ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO Y O-GLICOSILACIÓN DE MANOPROTEÍNAS EN EL MUTANTE LDB DE *Saccharomyces cerevisiae*.

IV. 1. RESUMEN.

IV.2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS .

IV.3. RESULTADOS.

IV.3.1. Perfil iónico de la exoglucanasa secretada en varios de *S. cerevisiae* afectados en las etapas de N-glicosilación que ocurren en el aparato de Golgi. Análisis de las dos formas secretadas por *ldb1*.

IV.3.2. Secuenciación del extremo amino-terminal de las dos formas iónicas secretadas por *ldb1*.

IV.3.3. Segregación del defecto en el procesamiento proteolítico dependiente de *Kex2p* el defecto en el proceso de N-glicosilación del mutante LDB-I.

IV.3.4. Análisis de los oligosacáridos sintetizados por el mutante LDB unidos a las manoproteínas por enlace O-glicosídico.

IV. 4. DISCUSIÓN.

V. EL MUTANTE *mnn2* DE *Saccharomyces cerevisiae* ESTÁ AFECTADO EN EL PROCESO DE FOSFORILACIÓN DE MANOPROTEÍNAS.

V.1. RESUMEN.

V.2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS.

V.3. RESULTADOS .

V.3.1. Análisis de la fosforilación en el núcleo interno en los N-oligosacáridos del mutante *mnn2*.

V.3.2. Análisis de los N-oligosacáridos del triple mutante *mnn1 mnn2 mnn9*.

V.4. DISCUSIÓN.

VI. CONCLUSIONES.

VII. APÉNDICE

VII.1. Composición y preparación de medios de cultivo.

VII.2. Mutagénesis y selección de con defectos en la incorporación de fosfato.

VII.3. Manipulaciones genéticas.

VII.4. Tinción de las células de levadura con el colorante alcian blue.

VII.5. Electroforesis de la invertasa en condiciones nativas.

VII.6. Solubilización y purificación de manoproteínas.

VII.7. SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección de exo-glucanasas.

VII.8. Determinación de proteína.

VII.9. Determinación de carbohidrato.

VII.10. Liofilización.

VII.11. Asignación de señales en un espectro de ^1H -RMN.

VII.12. Tampones utilizados.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

ACLARACIONES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

Entre las distintas posibilidades que existían a la hora de estructurar la presente Memoria, hemos decidido repartir los resultados en tres capítulos (III, IV y V) incluyendo en cada uno de ellos, datos que pudieran ser utilizados en la elaboración de una publicación independiente. De hecho, el capítulo III está ya en prensa en la revista GLYCOBIOLOGY. Con los datos de los capítulos IV y V se están preparando los manuscritos correspondientes en estos días (Mayo de 1997) con la idea de enviarlos a publicación antes de la fecha prevista para la defensa pública de la presente memoria (Julio de 1997).

Cada uno de estos tres capítulos reflejan fielmente lo que aparecerá en las publicaciones y constan de los siguientes apartados: Resumen, Planteamiento de objetivos, Resultados y Discusión. El apartado "Planteamiento de objetivos" se corresponde con la pequeña introducción al tema que se hace en las publicaciones, no obstante, y con el fin de facilitar la comprensión de esta memoria por personal menos especializado, se ha incluido una Introducción General (capítulo I) sobre glicosilación en *S. cerevisiae* común a los tres capítulos mencionados. Los Materiales y Métodos también se han estructurado como capítulo independiente común (capítulo II) ya que la metodología utilizada era muy similar en los tres capítulos y de otra forma se producirían repeticiones innecesarias.

Dado que en los artículos científicos el detalle en la metodología suele ser escasa, remitiendo frecuentemente a la BIBLIOGRAFÍA, nos ha parecido oportuno añadir un Apéndice (capítulo VII), en el que se describen con detalle algunos de los protocolos y reactivos utilizados con el mismo fin, apuntado anteriormente, de facilitar la comprensión y posible repetición de algunos experimentos a personal no demasiado especializado en el tema.

Con el fin de mantener la norma general en la presentación de las Tesis Doctorales, los resultados más relevantes de los tres capítulos de resultados se han resumido en unas conclusiones generales (capítulo VI de la Memoria).

Finalmente, debemos mencionar que los primeros resultados obtenidos en este tema de investigación (aislamiento de los y algunos estudios de complementación)

fueron presentados como Tesis de Licenciatura (Mañas, 1995). Con el fin de mantener una coherencia en la presentación de esta Memoria, un resumen de los resultados presentados en la Tesis de Licenciatura se ha incluido en las primeras páginas de resultados del capítulo III. La primera de las conclusiones corresponde a dichos resultados.

ABREVIATURAS

BSA: seroalbúmina bovina.

CPY: carboxipeptidasa Y.

DEAE: dietil aminoetil.

DMSO: dimetil sulfóxido.

Dol: dolicol.

Dol-P: dolicol fosfato.

Dol-PP: dolicol pirofosfato.

DPAP: dipeptidil aminopeptidasa

Endo H: endo-P-N-acetilglucosaminidasa H.

Endo F: endoglicosidasa F.

EMS: sulfonato de etil metano.

GlcNAc: N-acetilglucosamina.

GPI: glicosilfosfatidilinositol.

HPLC: cromatografía líquida de alta presión.

mA: miliamperios.

Man: manosa. En algunas figuras se utiliza M como abreviatura de manosa, por razones de espacio.

MHz: megahertzios.

Medio K: medio de cultivo sintético (ver composición en apéndice I).

Medio YEPD: medio de cultivo complejo (ver composición en apéndice I).

P: fosfato.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

PMSF: fluoruro de fenilmetil sulfonilo.

RE: retículo endoplásmico

RMN: resonancia magnética nuclear

¹H RMN: resonancia magnética nuclear de protones

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

TEMED: tetrametiletilendiamina.

Tris: tris-hidroximetil aminometano.

TBP: tampón tris- barbiturato.

TBS: tampón tris-salino.

TBST: TBS con un 0.05% de tween 20.

TGN: trans Gogi network

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

El proceso de glicosilación es la principal modificación covalente que modula la estructura y función de proteínas de membrana y de secreción en células eucariotas.

Dependiendo de la proteína, el carbohidrato puede contribuir a distintas funciones de aquélla

en el organismo en el que se expresa (ver más adelante). Los mecanismos de adición de carbohidrato a las proteínas están bastante conservados a lo largo de la evolución, manteniéndose determinados procesos básicos en un amplio rango de seres vivos, aunque existen variaciones específicas en los distintos organismos.

Los mecanismos de glicosilación de proteínas en organismos eucariotas se han estudiado extensamente en levaduras utilizando diferentes procedimientos bioquímicos, genéticos y de biología molecular y celular. La levadura más utilizada como modelo ha sido y es *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganismo unicelular recubierto de una pared celular cuya superficie externa contiene largas cadenas de manano. El manano está constituido casi exclusivamente por manosa y es el carbohidrato que forma parte de las manoproteínas, las cuales son un complejo de glicopéptidos con una alta proporción de restos glucídicos unidos N- y O-glicosídicamente. La facilidad para el cultivo de *S. cerevisiae*, la abundancia de las manoproteínas y su fácil extracción y purificación, así como el hecho de que algunas etapas de la biosíntesis de los oligosacáridos sean similares a las establecidas para eucariotas superiores, ha hecho que este organismo sea ampliamente utilizado en estudios sobre la síntesis y procesamiento de la porción glucídica de las glicoproteínas en células eucariotas (Kukuruzinska y cols, 1987; Tanner y Lehie, 1987; Ballou, 1990; Herscovics y Orlean, 1993). Las manoproteínas de la pared celular contienen algunos grupos manosa-fosfato y manobiosa- fosfato unidos a través del fosfato al carbono 6 de determinadas manosas de los N-oligosacáridos. La función de estos grupos fosfato en *S. cerevisiae* se desconoce, pero son los principales responsables de la carga negativa de la superficie celular.

I.1 GLICOPROTEÍNAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

I.1.1. TIPOS DE UNIÓN CARBOHIDRATO PROTEÍNA.

En *Saccharomyces cerevisiae* existen tres tipos de unión covalente entre las porciones glucídica y proteica de las glicoproteínas (ver Fig. 1.1).

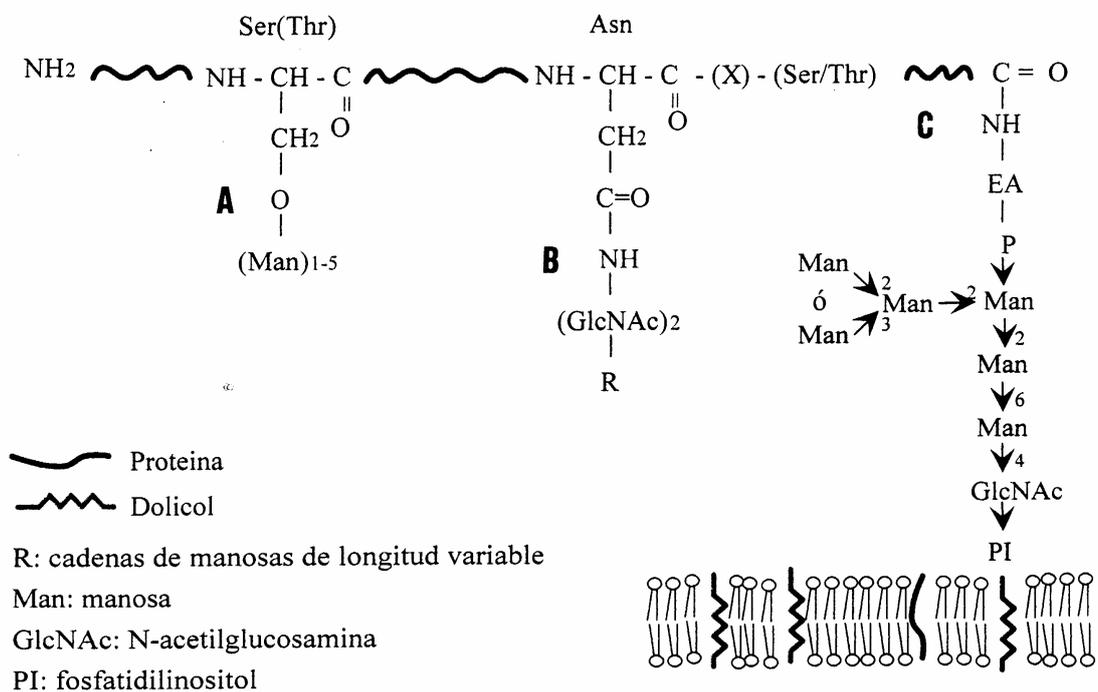


Figura.I.1. Diferentes tipos de unión covalente entre las porciones glucídica y proteica de las glicoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (se indican en rojo) (A) enlace O-glicosídico, (B) enlace N-glicosídico y (C) enlace a través de etanolamina fosfato (EA-P). La EA-P sirve de puente de unión entre el extremo carboxilo de la proteína y el extremo no reductor de la cadena glucídica, la cual, por su extremo reductor, se une a la membrana a través de fosfatidil inositol.

El enlace O-glicosídico se produce entre un grupo hidroxilo del carbono anomérico (C1) de una manosa y el grupo hidroxilo de los hidroxiaminoácidos Ser o Thr de la proteína. Con este tipo de enlace se unen cadenas lineales cortas de 1 -5 manosas unidas,

a su vez, entre ellas por enlaces $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$. No se ha descrito la existencia de grupos fosfato en este tipo de oligosacáridos.

El enlace N-glicosídico se establece entre el grupo amino libre de un residuo de Asn que forme parte de la secuencia: Asn-X-Ser/Thr y el C₁ de la primera N-acetilglucosamina (GlcNAc).

En el tercer tipo de unión, un residuo de glicosilfosfatidilinositol (GPI) se une por el extremo no reductor de su cadena de carbohidrato a la proteína a través de una etanolamina-fosfato (EA). Es decir, el grupo carboxilo de la proteína se une al grupo amino de una EA y ésta se une a la posición 6 de una manosa a través de un grupo fosfato (extremo no reductor). Por el extremo reductor, la cadena corta de manosas se une al inositol-P, que sirve de anclaje de la proteína a la membrana (ver revisiones: Thomas y cols, 1990; Cross, 1990; Fergusson, 1991).

La estructura de los restos GPI mostrada en la Fig. I.1 ha sido tomada de Fankhauser y cols (1993).

I.1.2. FUNCIONES GENERALES DE LOS RESTOS GLUCÍDICOS DE LAS GLICOPROTEÍNAS.

En los últimos años se ha comenzado a entender el significado biológico de la glicosilación de proteínas y, como consecuencia de ello, se han asignado numerosas funciones a los restos glucídicos de las glicoproteínas. A continuación se resumen las más representativas de cada uno de los tipos:

a) N-oligosacáridos:

- Pueden funcionar como receptores en la superficie de la célula, sirviendo de señal de reconocimiento para otras células con las que interactúan (Sharon y Lis, 1993).

- Confieren estabilidad y/o control sobre la conformación de la proteína. En muchos casos la ausencia de glicosilación interfiere con la actividad de la proteína. Esto se debe probablemente a que la proteína "no glicosilada" es mucho menos estable en la célula y puede ser degradada más rápidamente (Elbein, 1991).

- En ocasiones son los principales determinantes antigénicos de las glicoproteínas (Sharon, 1984, Ballou, 1990).

b) O-oligosacáridos (Jentof, 1990):

- Protegen a las glicoproteínas de la acción de proteasas.
- Colaboran en la conformación tridimensional de la glicoproteína.
- Actúan en fenómenos de reconocimiento celular.

Estos O-oligosacáridos suelen aparecer concentrados en determinados dominios de las proteínas ricos en serina, treonina y prolina.

c) Restos de glicosil-fosfatidil-inositol.

Como ya se indicó anteriormente, constituyen un sistema de unión de las proteínas a las membranas a través de su extremo carboxilo (ver revisiones: Thomas y cols, 1990; Cross, 1990; Fergusson, 1991).

I.1.3. GLICOPROTEÍNAS DE *S. cerevisiae* UTILIZADAS EN ESTUDIOS DE GLICOSILACIÓN.

Los estudios de glicosilación en *S. cerevisiae*, se centran sobre todo en el modelo de glicosilación de distintas glicoproteínas que, por ser muy abundantes en la célula, por presentar un patrón de glicosilación particularmente interesante, o porque pueden analizarse con relativa facilidad por métodos específicos, permiten sacar conclusiones importantes sobre el funcionamiento de la maquinaria de glicosilación de la levadura. Entre ellas, las más utilizadas son las siguientes:

a) Manoproteínas de la pared celular.

La pared celular representa aproximadamente el 30% del peso seco de la levadura. Las manoproteínas que forman parte de la pared celular pueden extraerse y purificarse con relativa facilidad obteniéndose cantidades apreciables de oligosacáridos cuya estructura puede dar una idea bastante precisa del funcionamiento de la maquinaria general de glicosilación en la levadura. Estas glicoproteínas han sido utilizadas fundamentalmente por el grupo de C. E. Ballou en la caracterización de las mutaciones *mn* (revisado por Ballou, 1990; ver más adelante).

b) Carboxipeptidasa Y (CPY).

La CPY es una glicoproteína vacuolar bien caracterizada, utilizada como marcador en estudios de transporte y localización de proteínas. Su secuencia de aminoácidos

revela la existencia de cuatro sitios potenciales de N-glicosilación que incorporan, cada uno de ellos, un oligosacárido con estructura y sitios de fosforilación idénticos a los descritos para las manoproteínas de pared celular pero de menor tamaño, debido seguramente a impedimentos estéricos (Ballou y cols, 1990). Esto sugiere que todas las manoproteínas de *S. cerevisiae* poseen la misma estructura general del carbohidrato, incluidos los sitios de fosforilación, independientemente de su localización en la célula.

c) Invertasa secretada.

La invertasa de *S. cerevisiae* posee catorce sitios potenciales de N-glicosilación. Atendiendo a la presencia o ausencia de cadenas glucídicas, existen dos tipos de invertasa: una forma externa glicosilada con 9-11 restos glucídicos de tamaño variable (el carbohidrato representa el 50% del peso total), y una forma interna no glicosilada (Trimble y Maley, 1977; Reddy y cols, 1988). La invertasa externa es la glicoproteína más utilizada para poner de manifiesto de manera rápida y simple, defectos en el proceso glicosilación de distintos de *S. cerevisiae*. Su análisis se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, revelando los geles por actividad. La migración de la invertasa en un gel nativo depende del número y/o tamaño de las cadenas de N-oligosacáridos de la enzima. En la cepa silvestre la invertasa migra como una banda difusa de alto peso molecular, en algunos migra como una banda bien delimitada de menor peso molecular y en otros presenta un comportamiento intermedio entre los dos citados anteriormente (Ballou, 1990).

d) Exoglucanasa mayoritaria secretada.

S. cerevisiae secreta al medio de cultivo dos glicofomas de una enzima con actividad exoglucanasa. Ambas poseen la misma porción proteica pero difieren en la longitud de una de sus dos cadenas de N-oligosacáridos (Ramírez y cols, 1989; Basco y cols, 1994). Con esta enzima se ha puesto de manifiesto que algunas mutaciones como la *mnn9*, definidas para las manoproteínas de pared, afectan también a las manoproteínas secretadas al medio de cultivo (Hernández y cols, 1992), corroborando el hecho de que la maquinaria de glicosilación de la levadura, no discrimina ninguna proteína en base a su localización final. Los defectos en la glicosilación pueden ponerse de manifiesto por su comportamiento en SDS-PAGE o en cromatografía de intercambio iónico.

Además, esta enzima presenta la particularidad de que es procesada por la enzima Kex2 (Basco y cols, 1990), localizada en la región tardía del aparato de Golgi (trans-Golgi). Las formas procesada y no procesada son fácilmente identificables por cromatografía de intercambio iónico por lo que la exoglucanasa secretada puede utilizarse también como modelo para determinar el funcionamiento de la mencionada región trans-Golgi.

e) Quitinasa y factor a.

Presentan un alto número de restos O-glicosídicos y han sido utilizadas en el análisis de la maquinaria de O-glicosilación de distintos (Kuranda y Robbins, 1991; Strahi-Bolsinger y cols, 1993; Immervoll y cols, 1995; Lussier y cols, 1995a).

f) Factor α .

Presenta residuos N-glicosídicos en su molécula y se encuentra unido a la membrana por su extremo carboxilo mediante un residuo de glicosilfosfatidilinositol (Wojciechowicz y cols, 1993).

I.1.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE RESTOS GLUCÍDICOS.

El análisis de la porción glucídica de las glicoproteínas de distintos de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido y es un método muy eficaz para determinar las distintas rutas bioquímicas implicadas en los procesos de síntesis y transporte a través de la ruta de secreción.

Para llevar a cabo el análisis de los restos glucídicos (composición, estructura y posible función) se utilizan diferentes procedimientos químicos y/o enzimáticos que se resumen a continuación (ver revisiones de Ballou, 1990 y Orlean y cols, 1991). Nos referiremos solamente a los utilizados en el estudio de los restos N- y O-glicosídicos por ser el objeto del presente trabajo.

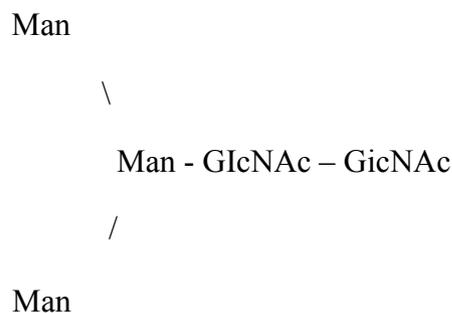
I.1.4.1. Liberación de los restos glucídicos de la proteína.

En primer lugar se procede a la extracción y purificación de la glicoproteína objeto de estudio. Generalmente se hace necesario liberar los restos glucídicos separándolos de la proteína, para evitar los inconvenientes que supone el trabajar con una molécula

de elevado peso molecular y para poder utilizar distintas técnicas que podrían interferir con la porción proteica. Para este fin, se pueden usar diferentes procedimientos siempre que cumplan los siguientes requisitos:

- Deben preservar la estructura intacta de los oligosacáridos liberados.
- Deben poderse aplicar a un amplio rango de proteínas.
- Hay que tener en cuenta el rendimiento y la facilidad del proceso.

La enzima más utilizada para la liberación de los restos N-glicosídicos de las glicoproteínas es la endo-B-N-acetilglucosaminidasa H (endo H), que hidroliza el enlace entre las dos moléculas de GlcNAc (Trimble y Maley, 1984). La endo H es activa sobre oligosacáridos de alto contenido en manosa y requiere la presencia de al menos tres manosas unidas de la siguiente forma:



Otras enzimas que liberan restos N-glicosídicos son las siguientes:

Endoglicosidasa F (endo F). Presenta una especificidad similar a la endo H, hidrolizando el enlace entre las dos moléculas de GlcNAc pero es activa también sobre glicoproteínas con oligosacáridos de tipos híbrido y complejo (Eider y Alexander, 1982; Tarentino y cols, 1992).

N-glicosidasa F (PNGasa F). Se diferencia de las anteriores en que hidroliza el enlace N-glicosídico entre la GlcNAc y la Asn. Es activa sobre todo tipo de cadenas unidas N-glicosídicamente a glicopéptidos o glicoproteínas (Lemp y cols, 1990).

A veces, cuando la proteína se pliega y los restos glucídicos quedan en el interior, la enzima no puede acceder a los oligosacáridos. Por esta razón, la proteína debe desnaturalizarse previamente al tratamiento enzimático añadiendo detergente, calentando la muestra, o utilizando ambos procesos simultáneamente.

No se han encontrado enzimas específicas que liberen los O-oligosacáridos de las manoproteínas de *S. cerevisiae*.

La liberación de los restos glucídicos de las glicoproteínas puede realizarse también por métodos químicos. Entre ellos, destacan como los más usados los siguientes:

- β -eliminación, consiste en un tratamiento alcalino suave de las manoproteínas (NaOH 0.1 N, 30°C, 48 horas), con el que se consigue la liberación de los restos O-glicosídicos intactos.
- Hidrazinolisis, es un tratamiento más drástico, con hidrazina, que provoca la liberación de los restos N-glicosídicos.

La desventaja de este tipo de métodos es que suelen dañar la porción proteica de la manoproteína y, en ocasiones, pueden provocar también determinadas modificaciones a las cadenas glucídicas.

I.1.4.2. Estudio de la composición de la porción glucídica.

La composición del carbohidrato se determina mediante hidrólisis total de los oligosacáridos e identificación de los monosacáridos liberados. El método de hidrólisis más utilizado es la hidrólisis ácida total. Los monosacáridos liberados se identifican por distintos tipos de cromatografías u otros métodos específicos, según los casos.

La hidrólisis ácida puede ser también parcial. Esta hidrólisis rompe preferencialmente un determinado tipo de enlace, resultando muy útil en el análisis estructural de polisacáridos.

I.1.4.3. Análisis estructurales de los restos glucídicos.

En los estudios encaminados a la determinación de la posición de los enlaces glicosídicos, se han utilizado distintos procedimientos. A continuación nos referiremos exclusivamente a los que pueden resultar de interés para el presente trabajo.

a) Métodos químicos.

- *Hidrólisis ácida suave*. Es una hidrólisis parcial que separa específicamente las manosas que diesterifican a los grupos fosfato de los N- oligosacáridos. En el caso de no existir fosfato, no se liberaría ninguna manosa.

- *Acetolisis*. Consiste en la acetilación completa de los grupos hidroxilo libres del polisacárido y en la escisión selectiva de los enlaces glicosídicos dependiendo de las condiciones del tratamiento. Los enlaces $\alpha(1,6)$ son altamente susceptibles de ser cortados, mientras que los enlaces $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$ son bastante resistentes. En *S. cerevisiae*, esta técnica permitió establecer que la cadena externa de los N-oligosacáridos está constituida por una cadena lineal de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ con ramificaciones en $\alpha(1,2)$.

- *Metilación*. Consiste en la metilación exhaustiva del oligosacárido, seguida de hidrólisis total y análisis de los monosacáridos metilados por cromatografía de gases.

Lógicamente, los monosacáridos aparecerán metilados en todas las posiciones excepto aquellas implicadas en el enlace glicosídico. Esta técnica permite por tanto determinar la posición de los enlaces entre las distintas manosas.

b) Cromatografías.

En los análisis de los restos glucídicos de las glicoproteínas de *S. cerevisiae*, se han utilizado distintos tipos de cromatografías de forma rutinaria (ver revisión de Ballou, 1990).

- *Cromatografías en papel y en capa fina*: Se utilizan principalmente para la identificación de monosacáridos.

- *Cromatografía de filtración*: Separa los distintos componentes según su peso molecular. Se han utilizado mucho, y se siguen utilizando, resinas comercializadas por los laboratorios Bio-Rad con el nombre comercial Bio-Gel. Existen distintos tipos: P-2, P-4, P-6, P-10, etc. que se diferencian en el límite de exclusión.

- *Cromatografía de intercambio iónico convencional*. Permite la separación de distintas moléculas por carga.

- *Cromatografía de intercambio iónico específica de carbohidratos* acoplada a un detector amperométrico de pulso (PAD). Es un sistema de HPLC específico para carbohidratos. Los análisis se realizan a un elevado pH utilizando solventes como el NaOH 0.1N. Al trabajar con un alto pH, los grupos hidroxilo de los carbohidratos se ionizan de forma que hasta los neutros adquieren carga negativa. Mediante este sistema, se pueden separar, cuantificar e identificar mezclas complejas de carbohidratos en cantidades extremadamente pequeñas (10-100 pmol) (Hardy y Townsend, 1988; Hernández y cols, 1990).

- *Cromatografía de afinidad*: Es el único medio de separación que permite el aislamiento de determinadas moléculas según su capacidad de interaccionar con un ligando inmovilizado. Como ligando se utilizan proteínas afines por restos glucídicos específicos (lectinas y anticuerpos) que permiten la separación de complejas mezclas de carbohidrato. La elución se lleva a cabo con agua o tampones determinados.

- *Cromatografía de gases*. Suele utilizarse en combinación con la metilación. Permite identificar las manosas metiladas en posiciones específicas.

c) Resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN).

Es un método muy útil y no destructivo para la determinación de la estructura de los restos glucídicos. La muestra de carbohidrato purificada se resuspende en agua deuterada y se somete a un campo magnético potente (400-600 MHz) que genera una serie de tensiones en la molécula. Posteriormente se emite un sonido de frecuencia variable, vibrando (resonando) cada protón (H^+) a una frecuencia diferente a la del resto. Esta vibración, a una determinada frecuencia, es lo que registra el aparato de RMN. Las frecuencias registradas de los H^+ de los grupos hidroxilo del carbono anomérico (C_1) (H^+ anoméricos) son las que generalmente se usan para dilucidar la estructura de la molécula ya que aparecen en una zona aislada del espectro que no interfiere con las señales de otros protones. En determinados casos, los espectros en una dimensión no permiten extraer la información suficiente, por lo que hay que recurrir a espectros bidimensionales, mucho más complejos pero más informativos que los anteriores (Cohen y Ballou, 1980; Vliegthart y cols, 1983; Bax y Davis, 1985; Derome, 1987; Alvarado y cols, 1990).

d) Espectrometría de masas.

Se utiliza para determinar la masa exacta de distintos fragmentos glucídicos. Un tipo especial llamado Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS) (Webb y cols, 1988), resultó determinante en el establecimiento del punto de unión de la cadena externa al núcleo en los N-oligosacaridos de *S. cerevisiae* (Hernández y cols, 1989a).

e) Digestión enzimática con glicosidasas de especificidad conocida.

La susceptibilidad de los polisacáridos para ser degradados con enzimas de especificidad conocida, es un método útil para determinar la configuración de los enlaces glicosídicos. Las enzimas más utilizadas en levaduras son:

- $\alpha(1,2)$ *exomanosidasa*, que hidroliza específicamente enlaces $\alpha(1,2)$ separando manosas individuales a partir del extremo no reductor. Esta enzima es obtenida a partir del medio de cultivo de *Aspergillus phoenicis* (Ichisima y cols, 1981)
- $\alpha(1,6)$ *endomanosidasa*. Hidroliza específicamente enlaces $\alpha(1,6)$ pero, a diferencia de la anterior, puede cortar también enlaces internos de la cadena glucídica. Es producida por una bacteria aislada del suelo y secretada al medio de cultivo (Nakajima y cols, 1976).
- *Exo- α -manosidasa inespecífica*, rompe cualquier tipo de enlaces α entre manosas pero siempre a partir del extremo no reductor (Jones y Ballou, 1969).
- *α -manosidasa de Jack bean*, hidroliza enlaces $\alpha(1,6)$, $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$ de oligomanósidos (Li, 1967).
- *Fosfatasa*s, hidrolizan los grupos fosfato pero sólo cuando son monoésteres. Así, se puede someter la muestra a un proceso de hidrólisis ácida suave para obtener fosfato monoéster y a continuación se puede tratar con la fosfatasa.

I.2. ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS DE RESTOS O-GLICOSÍDICOS EN *S. cerevisiae*.

I.2.1. ESTRUCTURA.

Muchas proteínas de levadura contienen cadenas lineales de carbohidrato unidas O-glicosídicamente. Esta cadena contiene residuos de 1-5 manosas unidos a Ser o Thr (Fig.I.2). Algunas de estas glicoproteínas son: aglutinina del tipo sexual "a" (Lipke y Kurjan, 1992), quitinasa (Kuranda y Robbins, 1991), la proteasa Kex2 (Wilcox y Fuller, 1991).

Para determinar su estructura, las manoproteínas purificadas se someten a β -eliminación con álcali diluido, se separan los restos O-glicosídicos y se fraccionan mediante una cromatografía de filtración en gel en mono-, di-, tri-, tetra- y pentasacáridos. La estructura de estos fragmentos se determina por los métodos señalados anteriormente (Orleans y cols, 1991).

I.2.2. BIOSÍNTESIS DE O-OLIGOSACÁRIDOS.

El estudio de la biosíntesis de los restos O-oligosacáridos se llevó a cabo mediante el aislamiento y caracterización de bloqueados en distintas etapas del proceso, apoyados por la información obtenida de los estudios estructurales. En la Fig. 1.2 se muestra un esquema de la ruta biosintética.

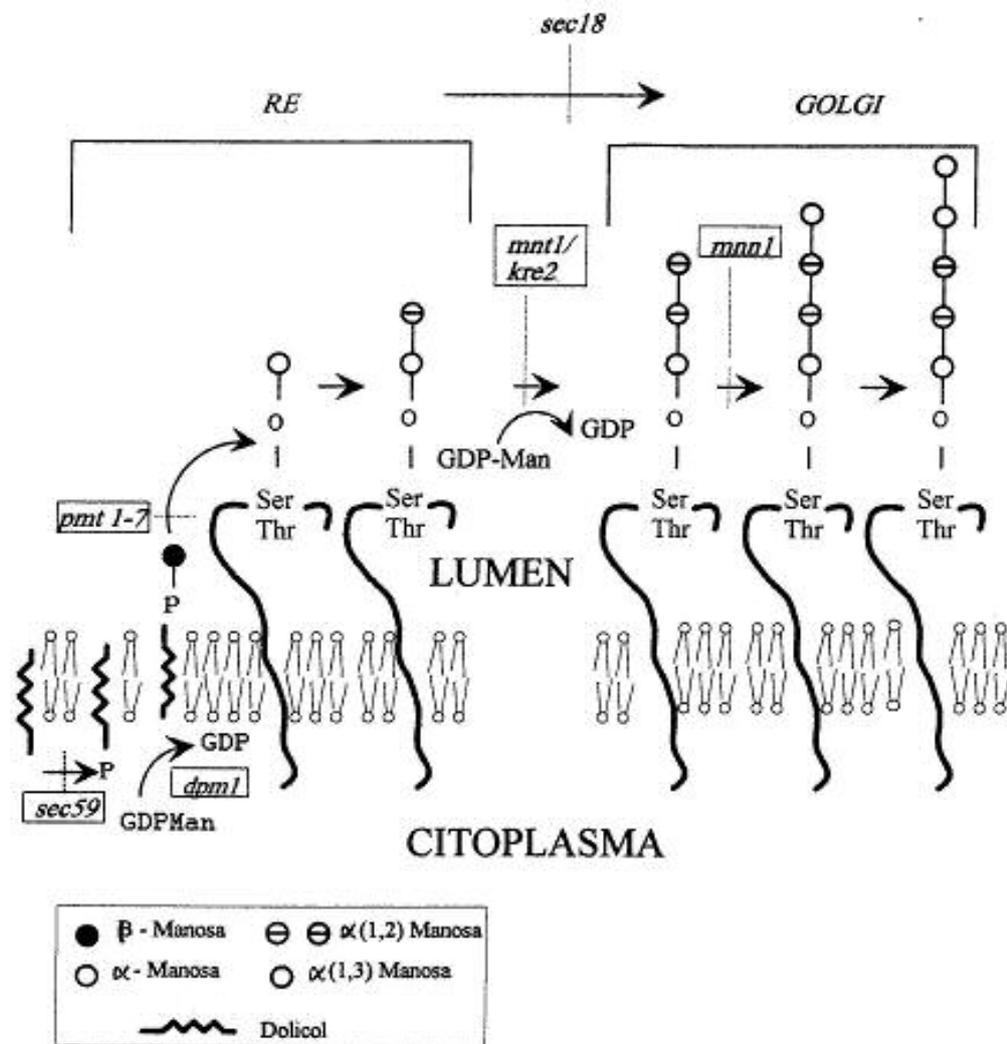


Figura 1.2. Proceso de biosíntesis de los restos O-glicosídicos. En rojo se muestran las manosas que se adicionan en el RE y en negro las que se unen en Golgi. En cursiva se indican los mutantes bloqueados en las distintas etapas, señalándose con un recuadro verde aquéllos cuyos genes responsables del fenotipo ya han sido clonados.

1.2.2.1 Aislamiento del gen-DPM1.

El *dpm1* es un mutante termosensible de *S. cerevisiae* que a temperatura restrictiva se encuentra bloqueado en la síntesis de dolicol-fosfatomanosa (Dol-P-Man) (Orlean, 1990). El primer

residuo de manosa de los O-oligosacáridos se añade en el RE, siendo el donador Dol-P-Man que se encuentra en la membrana del RE y se sintetiza en la cara citoplasmática del mismo. El donador de manosa para la síntesis del Dol-P-Man es GDP-Man. En la síntesis del Dol-P interviene la proteína Sec59p que, como ya sugirieron Heller y cols (1992), es una dolicol-quinasa.

El gen DPM1 codifica la enzima que cataliza la síntesis de Dol-P-Man. Este gen se clonó en una cepa de *S. cerevisiae* que poseía una baja actividad Dol-P-Man sintetasa (Orlean, 1990). Esta cepa se transformó con una librería de la estirpe silvestre, seleccionándose los transformantes superproductores de esa actividad enzimática.

Los autores encontraron 7 clones superproductores, aislaron los plásmidos, analizaron los insertos y vieron que todos tenían una secuencia común que posteriormente clonaron en *E. coli*, comprobando que era la responsable de la actividad Dol-P-Man sintetasa.

Una vez clonado el gen, obtuvieron el mutante *dpml* por interrupción génica, para conocer si era imprescindible o no para la viabilidad celular. La destrucción del gen resultaba letal para la célula y este efecto revertía si la célula se transformaba usando un plásmido con una copia del gen silvestre. La necesidad de este gen para la viabilidad celular se debe a que la Dol-P-Man es imprescindible para la síntesis de O-oligosacáridos, N-oligosacáridos y de restos glucídicos unidos al fosfatidilinositol de la membrana.

1.2.2.2. Aislamiento de los genes PMT y *pmt*.

Los *pmt* están afectados en la transferencia del primer residuo de manosa de los restos O-glicosídicos a la proteína. Como ya se ha indicado, la Dol-P-Man es el donador de manosas en las reacciones de O-glicosilación que suceden en el RE de *S. cerevisiae*. En 1993, Strahl-Bolsinger y cols, purificaron una proteína de 92 Kdalton con actividad Dol-P-Man:O-manosiltransferasa, la secuenciaron y a partir de esta secuencia sintetizaron oligonucleótidos radioactivos que más tarde utilizaron como sonda. Mezclaron los oligonucleótidos radioactivos con una librería de la cepa silvestre y seleccionaron aquellos clones con los que hibridaban. Posteriormente aislaron su ADN y

lo clonaron en *E. coli* denominándolo PMT1. Cuando llevaron a cabo la disrupción del gen en el plásmido, este no se expresaba en *E. coli*. Sin embargo, si la disrupción la hacían "in vivo" en células de levadura, estas mantenían un 50% de la actividad encontrada en la cepa silvestre. Por tanto, debería existir en la célula, al menos, otro gen que codificase otra enzima con una actividad similar.

En 1995, Lussier y cols, secuenciando el cromosoma I de *S. cerevisiae*, encontraron una secuencia con un 30% de homología a PMT1. Este nuevo gen denominado PMT2, codifica una proteína con igual actividad a la anterior.

Dichos autores comprobaron que el doble mutante pmt 1/pmt2 conservaba todavía algo de actividad que hacía a la célula viable. Pensaron entonces que podría existir al menos otro gen implicado en la actividad O-manosiltransferasa. Para comprobar esta posibilidad, construyeron de nuevo oligonucleótidos radiactivos con las secuencias conocidas y los mezclaron con ADN de una librería de la estirpe silvestre, el "primer" sólo se uniría a aquellas secuencias homologas que reconociesen. De esta forma aislaron dos nuevos genes (PMT3 y PMT4).

Gentzsch y Tanner, (1996) encontraron que la transferencia de la primera manosa a residuos de Ser o Thr está catalizada por una familia de manosiltransferasas codificadas por siete genes (PMT 1-7). Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que la O-glicosilación de proteínas es esencial para conservar la rigidez de la pared celular así como la integridad de la célula y algunas otras funciones que, en conjunto, resultan ser vitales para *S.cerevisiae*.

Aún no se ha identificado la enzima que transfiere la segunda manosa, pero parece que se adiciona en el RE. El donador de los siguientes residuos de manosas es GDP-Man, donador característico de enzimas que actúan en Golgi. Además, en el RE no existe GDP-Man libre, con lo cual parece claro que estas manosas se adicionan en Golgi. El mutante *secl8* que se encuentra bloqueado en el transporte de vesículas entre el RE y Golgi, posee dos residuos de manosas en los O-oligosacáridos de las proteínas acumuladas en el RE a la temperatura restrictiva (Kuranda y Robbins, 1991). Estos datos sugieren que las dos primeras manosas de los restos O-glicosídicos se deben transferir en el RE.

I.2.2.3. Aislamiento y caracterización del gen MNT1.

La proteína Mnt1p cataliza la transferencia del tercer residuo de manosa unido en $\alpha(1,2)$ de los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a la proteína. En 1992, Häusler y Robbins publicaron la clonación y caracterización de un gen (MNT1) que codifica una proteína con actividad $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa. A partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada, sintetizaron oligonucleótidos que utilizaron como "iniciadores" para amplificar secuencias de una librería. Estas amplificaciones se usaban como sondas radioactivas para detectar en esa librería, el gen que codificaba la enzima (MNT1).

El mutante *mnt1* sintetiza O-oligosacáridos con un máximo de 2 manosas ya que está bloqueado en la adición de la tercera manosa. El gen MNT1 resultó ser idéntico a otro identificado previamente (KRE2), que se aisló al hacer ensayos con la proteína killer (Häusler y cols, 1992). La enzima $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa se ha localizado en vesículas de la región media del aparato de Golgi (Lussier y cols, 1995a). Lussier y cols (1995b) sugirieron que la Mnt1p podría estar también involucrada en el proceso de N-glicosilación.

La última etapa en el proceso de O-glicosilación consiste en la transferencia de los dos últimos residuos de manosa unidas en $\alpha(1,3)$. La enzima que cataliza estas reacciones es una $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa que actúa tanto en la síntesis de N- como de O-oligosacáridos y está codificada por el gen MNN1 (Graham y cols, 1992).

I.3. ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS DE N-OLIGOSACÁRIDOS.

I.3.1. ESTRUCTURA.

I.3.1.1. Primeros estudios estructurales.

Se iniciaron en los años 70 por el grupo dirigido por C. E. Ballou en la Universidad de California en Berkeley. Estos investigadores separaban los restos glucídicos de las manoproteínas de levadura mediante tratamiento básico fuerte. Utilizando diversas técnicas (acetólisis, RMN,...) observaron que eran restos muy grandes, formados mayoritariamente por manosa y algo de GlcNAc y grupos fosfato. Finalmente determinaron los tipos de enlace existentes entre las manosas, llegando a la conclusión de que estaban constituidos por una región cercana a la proteína llamada núcleo ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) y una cadena externa lineal de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ con ramificaciones

en $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$. En la determinación de esta estructura jugaron un papel fundamental los mnn, aislados y caracterizados por este grupo.

1.3.1.2. Aislamiento y caracterización de los mnn.

Los mnn se seleccionaron por su falta de afinidad hacia anticuerpos obtenidos frente a la pared celular de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Los restos glucídicos de las manoproteínas de la pared celular son los que, casi exclusivamente, actúan como determinantes antigénicos de la célula. Los mnn se unen débilmente a esos anticuerpos por poseer la estructura de la pared celular alterada (revisado por Ballou, 1990).

La caracterización de los mnn se hizo por distintos métodos (Ballou, 1990):

- Unión al colorante catiónico alcian blue.
- Determinación del tamaño de la invertasa secretada.
- Análisis de los oligosacáridos presentes en las manoproteínas.
- Construcción de múltiples y estudios de complementación utilizando métodos genéticos convencionales.

Las características de los mnn aislados son las siguientes:

- mnn1: Mediante acetólisis de los oligosacáridos de este mutante, se observó que las ramificaciones eran algo más cortas que las de la cepa silvestre. Estudios posteriores mostraron que carecen de las manos terminales unidas en $\alpha(1,3)$. Esta mutación afecta a la síntesis de restos O- y N-glicosídicos y en estos últimos, tanto al núcleo como a la cadena externa. La clonación del gen Mnn1 (Yip y cols, 1994) reveló que codifica una $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa que actúa tanto en la cadena externa como en el núcleo de los N-oligosacáridos.
- mnn2: Al someter las manoproteínas de este mutante a un proceso de acetólisis, se obtenía manosa y una baja proporción de oligosacáridos de 3-4 manosas. Los autores concluyeron que el mnn1 poseía una cadena larga de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ sin ramificaciones. Cuando se digerían las manoproteínas con una $\alpha(1,6)$ endomanosidasa, se liberaban muchas manosas y un fragmento de mayor tamaño que se encontraba próximo a la proteína y presentaba ramificaciones. Esta zona cercana a la proteína es lo que se denomina núcleo interno y el resto corresponde a la cadena externa. El gen MNN2 se clonó en 1990 (Devlin y Ballou, 1990) y parece codificar una proteína implicada en el transporte a través de Golgi.

- mnn3: La cadena externa de los restos N-glicosídicos posee un menor tamaño medio (Cohen y cols, 1980). Esta mutación también afecta a la síntesis de los restos O-glicosídicos.

- mnn4 y mnn6: El mnn4 fue aislado por Ballou y cols (1973) y el mnn6 por Karson y Ballou (1978). Ambos presentan una menor incorporación de grupos manosilfosfato en los restos N-glicosídicos. El fenotipo del mnn4 se muestra dominante en determinadas condiciones (Ballou, 1990), mientras que el del mnn6 es siempre recesivo. El gen MNN4 ha sido clonado recientemente y codifica una proteína de membrana (Odani y cols, 1996). Estudios bioquímicos y genéticos sugieren que la Mnn4p es necesaria para la transferencia de grupos manosilfosfato tanto al núcleo como a la cadena externa. La destrucción, o bien, la sobreexpresión del gen MNN4 conduce a una disminución o un incremento respectivamente del contenido de los grupos manosilfosfato en el tamaño de la pared celular de las estirpes silvestre y mnn4. Como ya sugirieron Hernández y cols en 1989, esto parece indicar que el mutante mnn4 se encuentra afectado en la regulación del proceso de fosforilación y no en la/s manosilfosfotransferasa/s.

- mnn5: Esta mutación impide la adición de las segundas manosas unidas en $\alpha(1,2)$ en las ramificaciones de la cadena externa (Cohen y cols, 1980).

- mnn7, mnn8, mnn9 y mnn10: Estos presentan un acortamiento de la cadena externa. Los mnn7 y mnn8 son alélicos y su fenotipo es similar al del mnn10 (Ballou y cols, 1989). El mnn9 es el más afectado, presentando una sola ramificación en la cadena externa de los oligosacáridos de las manoproteínas.

El gen MNN10 se ha clonado por complementación del fenotipo que mostraba este mutante con respecto a la sensibilidad a la higromicina B. El análisis de su secuencia indica que es una proteína de membrana con los rasgos característicos de una glicosiltransferasa (Dean y Poster, 1996). Estos autores sugieren que el gen MNN10 codifica una manosiltransferasa localizada en Golgi. La mutación mnn1 no afecta a los azúcares unidos O-glicosídicamente.

El gen MNN9, parece codificar una proteína implicada en el transporte a través de Golgi (Yip y cols, 1994).

En la figura I.3 se muestra la estructura deducida de estos estudios. Dicha estructura fue propuesta en 1982 (Ballou, 1982) y permaneció vigente hasta 1989 (ver más

adelante).

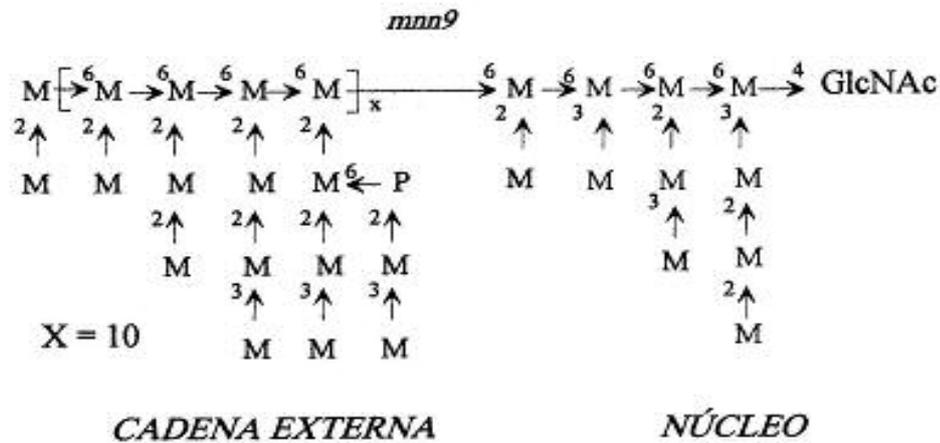


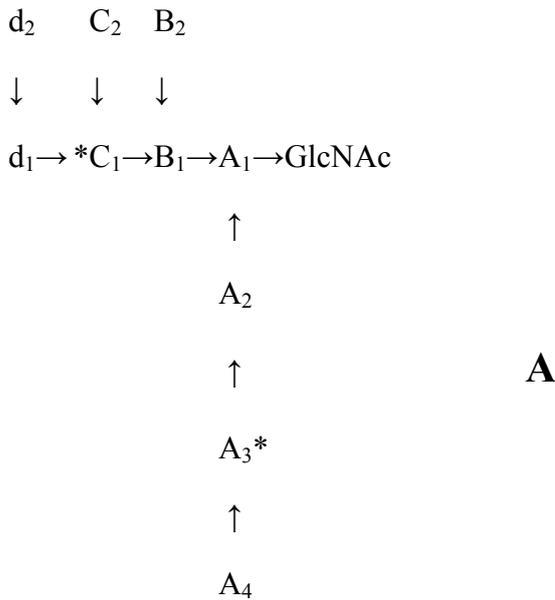
Figura I.3. Estructura propuesta inicialmente (Ballou, 1982) para los N-oligosacáridos de las manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, indicándose el defecto originado por la mutación *mnn9* que impide la síntesis de la mayor parte de la cadena externa. En rojo se representan las manosas pertenecientes al núcleo que fueron transferidas en bloque desde el dolicol a la proteína.

1.3.1.3. Localización de los grupos fosfato en el núcleo interno.

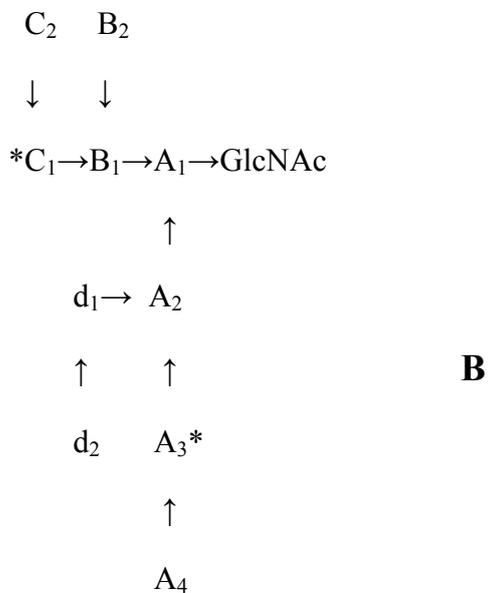
Para determinar la localización de los grupos fosfato en el núcleo interno se utilizaron distintos métodos: RMN, acetólisis, metilación, cromatografías, digestiones con manosidasas específicas y Espectrometría de masas. Los estudios relacionados con la localización de los grupos fosfato se hicieron con el doble mutante *mnn1 mnn9* (Hernández y cols, 1989b). Los restos N-glicosídicos se aislaron a partir de manoproteínas purificadas y se fraccionaron en sus componentes neutros y fosforilados. Se encontró que en la región del núcleo podían aparecer uno o dos grupos fosfato.

Para averiguar la posición de los fosfato, los oligosacáridos fosforilados se digirieron con una α -manosidasa inespecífica analizándose los fragmentos por RMN y Espectrometría de masas. Los grupos fosfato impedían que la α -manosidasa continuase hidrolizando manosas, deteniéndose al llegar a las manosas fosforiladas del núcleo. Los

resultados de estos estudios apuntaban que las posiciones de fosforilación en el núcleo, eran las señaladas con un asterisco en el esquema I.1.



Esquema I.1



Los grupos fosfato se unen al grupo hidroxilo del carbono 6 de las manosas. Se pensaba que la cadena externa (manosas d_1 y d_2 en el esquema I.1 A) se unía al núcleo en la posición 6 de la manosa C_1 , con lo cual esta no podría estar fosforilada. Análisis posteriores confirmaron la existencia de grupos fosfato en las dos posiciones del núcleo

anteriormente citadas (A_3 y C_1). Consecuentemente, la cadena externa se debería unir a otra de las manosas del núcleo que tuviera libre la posición 6 y no estuviera fosforilada. Hernández y cols (1989a, b) concluyeron que la manosa a la que se unía la cadena externa en el mutante *mnn1 mnn9*, era la denominada A_2 , por lo que el esquema I.1A se modificó quedando como se indica en el esquema I.1.B. Posteriormente, se comprobó que el sitio de unión de la cadena externa demostrado en el mutante *mnn1 mnn9* era válido también para la cepa silvestre (Ballou y cols, 1990). A partir de los resultados antedichos, la estructura propuesta para los restos unidos N-glicosídicamente que se muestra en la Fig. I.3, tuvo que ser modificada quedando como se indica en la Fig. I.4.

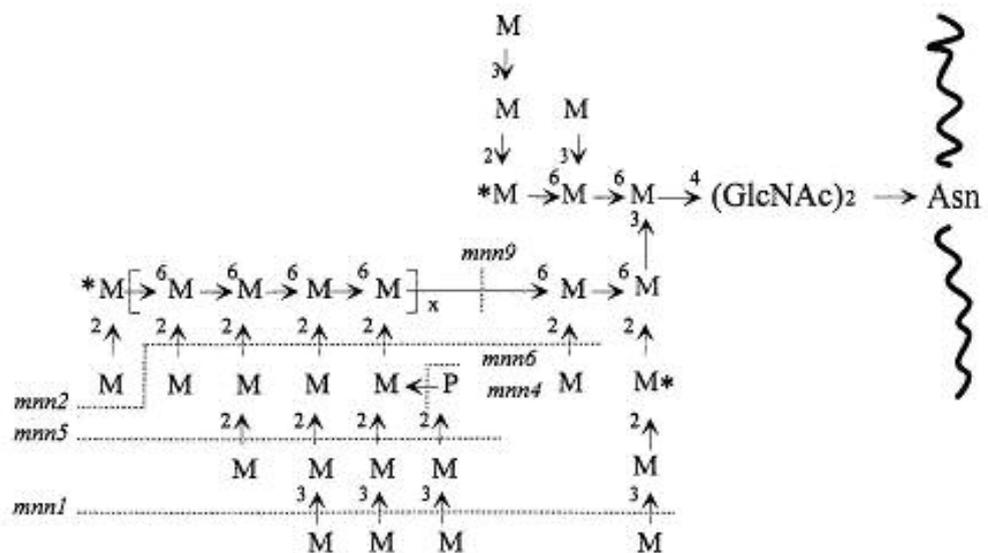


Figura I.4. Estructura propuesta para los N-oligosacáridos de las glicoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* vigente actualmente (Hernández y cols, 1989a,b; Ballou y cols, 1990). Se indican los defectos de los diferentes mutantes *mnn*, incluyéndose en un recuadro verde aquellos cuyos genes han sido clonados. En rojo se representan las manosas pertenecientes al núcleo que fueron transferidas en bloque desde el dolicol y los asteriscos señalan los sitios adicionales de fosforilación.

Los oligosacáridos sintetizados por el mutante *mnn9* están presentes también en algunas glicoproteínas de la cepa silvestre: exoglucanasa mayoritaria secretada

(Hernández y cols, 1992), CPY (Ballou y cols, 1990) y en algunas posiciones de la invertasa secretada (Trimble y cols, 1983; Ziegler y cols, 1988).

I.3.2. BIOSÍNTESIS DE LOS RESTOS N-GLICOSÍDICOS.

I.3.2.1. **Etapas que suceden en el RE.**

En la Fig.I.5 se muestra un esquema de todas las etapas que ocurren en el RE, basado en Herscovics y Orlean (1993).

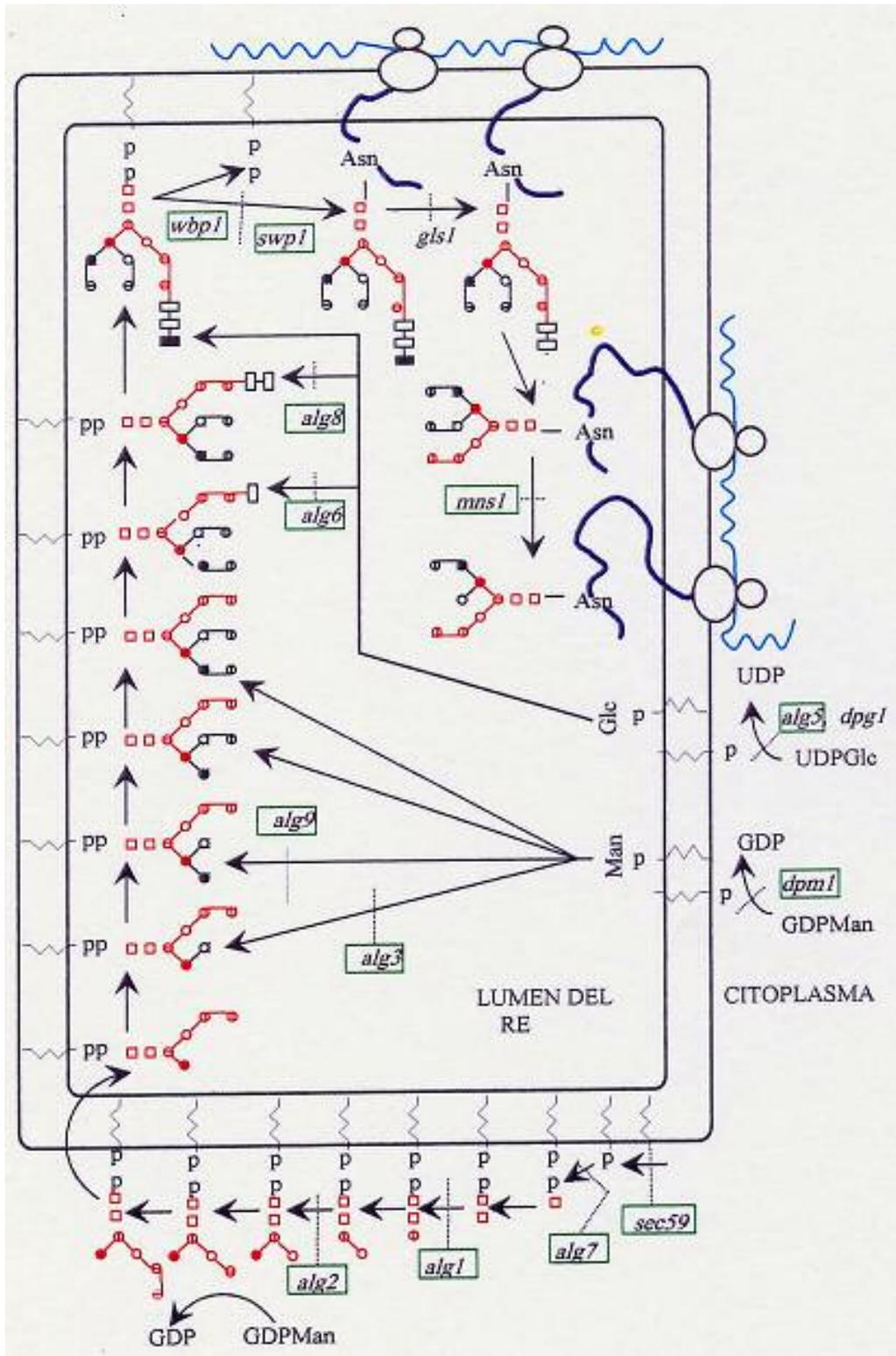
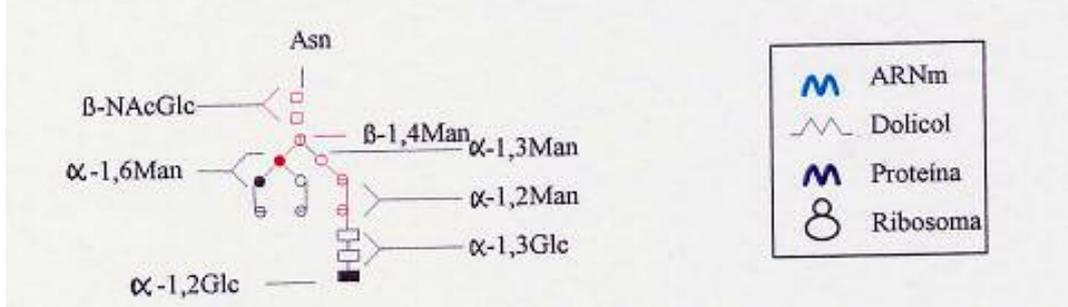


Figura 1.5. Esquema de las etapas de biosíntesis de los restos N-glicosídicos que suceden en el RE (modificado a partir de Herscovics y Orlean, 1993). Se indican los mutantes bloqueados en las distintas etapas, señalándose con un recuadro verde aquellos cuyos genes han sido clonados. El significado de los símbolos utilizados es el siguiente:



Inicialmente se sintetiza un oligosacárido precursor formado por $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, unido a un lípido intermediario (Dol-PP) de la membrana del RE. Este oligosacárido es transferido a la proteína modificándose posteriormente en el RE y aparato de Golgi (AG) por la acción de glicosidasas y glicosiltransferasas específicas.

La síntesis comienza en la cara citoplasmática del RE donde se añaden 2 moléculas de GlcNAc y 5 residuos de manosas cuyo donador es GDP-Man. Posteriormente se produce una translocación y el pequeño oligosacárido entra en el lumen del RE, donde se añaden 4 manosas más. En el lumen del RE, el donador de manosas es el Dol-P-Man. A continuación se añaden 3 glucosas y este complejo se transfiere en bloque a la proteína en una reacción catalizada por un complejo enzimático conocido por el nombre de oligosacariltransferasa. La ausencia de alguno de los residuos de glucosa no impide la transferencia del oligosacárido a la proteína, aunque sí afecta a la velocidad del proceso. Antes de salir esta molécula del RE se hidrolizan las 3 glucosas por la acción de dos glicosidasas diferentes (I y II). Una deficiencia en la actividad glicosidasa no parece afectar a etapas posteriores del procesamiento (Tsai y cols, 1984a) ya que el mutante *gls 1* presenta los tres residuos de glucosa en sus proteínas maduras (ver más adelante). También se hidroliza una manosa por acción de una manosidasa específica, quedando un residuo de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ que constituye el núcleo y es la estructura que pasa a Golgi.

En células de mamíferos se ha encontrado una endomanosidasa de Golgi que rompe el enlace $\alpha(1,2)$ existente entre la manosa sustituida por un residuo de glucosa y el resto de la glicoproteína, rindiendo $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$; Esto proporcionaría una ruta alternativa para el proceso de eliminación de los residuos de glucosa (Weng y Spiro,

1996), aunque la presencia de las tres glucosas en las proteínas maduras del mutante *gls1*, parece indicar que en levaduras no está presente esta ruta alternativa.

El ensamblaje del oligosacárido y el procesamiento inicial del mismo en el RE, son similares en levaduras y la mayoría de los eucariotas, sin embargo, las etapas posteriores del procesamiento son diferentes. El aislamiento y caracterización de distintos mutantes ha sido muy importante en el esclarecimiento de esta ruta. A continuación se describen los métodos de selección y las características más representativas de dichos mutantes:

- alg (asparagine linked glycosylation).

El método de aislamiento consistió en crecer a las levaduras, tras la mutagénesis con EMS, en un medio con ^3H Man y mantenerlas después congeladas a -80°C para acumular el daño de la radiactividad incorporada (Huffaker y Robbins, 1982). Las células que presentaran defectos en glicosilación lógicamente incorporarían menor cantidad de ^3H Man y podrían sobrevivir durante más tiempo. Algunos de los aislados eran termosensibles para el crecimiento (*alg1*, *alg2* y *alg4*), mientras que otros eran viables y expresaban las mutaciones a 37°C (*alg2*, *alg5*, *alg6* y *alg8*). Con este método, los autores obtuvieron una serie de afectados en el ensamblaje del oligosacárido unido al lípido intermediario y cuyos defectos se muestran en la Fig.I.5. El mutante *alg4*, no estaba afectado directamente en el ensamblaje del oligosacárido unido al dolicol, sino que presentaba defectos en la fosfomanomutasa implicada en la síntesis de GDP-Man y además, resultó ser alélico al mutante *sec53* aislado independientemente y de distinta forma (Ferro-Novick y cols, 1984a, b). El mutante *alg7* fue aislado por Rine y cols (1983) por otro método diferente.

Las mutaciones *alg* que afectan a las últimas etapas del ensamblaje del núcleo de los oligosacáridos, no originan defectos en el crecimiento de las células. Sin embargo, la combinación de una mutación *alg* tardía (acumulación de un oligosacárido incompleto unido al lípido de membrana) con el alelo *wbp1* que afecta a la actividad oligosacariltransferasa, conduce a un fenotipo letal a 30°C (Burda y cols, 1996). Este nuevo fenotipo, sensible a la temperatura permitió el aislamiento, en levaduras, de los correspondientes loci silvestres por complementación del fenotipo mutante (Stagljar y cols, 1994). De esta forma se han clonado varios genes *ALG* y se ha aislado un nuevo mutante: el *alg9*.

El alg1 es un mutante termosensible bloqueado específicamente en la transferencia de la primera manosa unida por enlace $\beta(1-4)$ a la $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Huffaker y Robbins, 1982). El gen ALG 1 se clonó por complementación del fenotipo termosensible y la *Alglp* catalizaba la transferencia de manosa desde GDP-Man hasta el aceptor $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ para formar $\beta\text{Man}1\rightarrow 4\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, por tanto, ALG1 es el gen estructural que codifica la $\beta(1\rightarrow 4)$ manosiltransferasa implicada en la transferencia de la primera manosa del oligosacárido unido al lípido intermediario (Couto y cols, 1984). La destrucción del gen por inserción de URA3, confirmó que ALG1 era esencial para la viabilidad celular (Albright y Robbins, 1990).

El mutante alg2 también es termosensible y cuando se incubaba a la temperatura restrictiva acumula $(\text{Man})_{1-2} \text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Huffaker y Robbins, 1983). El gen ALG2 fue clonado por complementación de la sensibilidad a la temperatura y se demostró que era un gen esencial ya que su interrupción resultó en la muerte de la célula (Jackson y cols, 1993). Aunque no está clara la función de la proteína que codifica, la secuencia del gen sugería que podría ser la manosiltransferasa que cataliza la transferencia de la tercera manosa. A pesar del pequeño tamaño de los oligosacáridos acumulados, Jackson y cols (1989), encontraron que podían ser transferidos a la proteína, lo cual a su vez implica que moléculas menores de $(\text{Man})_5 \rightarrow \text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ pueden atravesar la membrana del RE y pasar al lumen.

El alg3 presenta el bloqueo en una etapa más avanzada y acumula mayoritariamente $(\text{Man})_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Huffaker y Robbins, 1983), sin embargo, parece ser algo "leaky" ya que aproximadamente el 20% de los oligosacáridos se alargaban normalmente en un mutante doble alg3 sec18 (Verostek y cols, 1991; Verostek y cols, 1993b). De la misma forma que en el alg2, los oligosacáridos incompletos acumulados por alg3 podían ser transferidos a la proteína aunque la mayoría (>75%) ni siquiera incorporaban las tres glucosas que facilitaban la transferencia (Verostek y cols, 1993a). El gen ALG3 ha sido recientemente clonado (Aebi y cols, 1996) por complementación del fenotipo termosensible en un doble mutante alg3 stt3 ya que el mutante alg3 no posee un fenotipo fácilmente seleccionable (Huffaker y Robbins, 1983). Este gen codifica una proteína transmembranal del RE.

Los alg5, alg6 y alg8 no son termosensibles y están afectados en la transferencia de las glucosas, última etapa en el ensamblaje del oligosacárido unido al Dol. Los dos primeros presentan el mismo fenotipo formando $(\text{Man})_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ya que son

incapaces de transferir la primera glucosa (Huffaker y Robbins, 1983; Runge y cols, 1984), mientras que *alg8* puede formar $\text{Glc}_1 \rightarrow (\text{Man})_9 \rightarrow \text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (Runge y Robbins, 1986). El mutante *alg5* se encuentra afectado en la síntesis de Dol-P-Glc, mientras que el *alg6* está bloqueado en la transferencia de la primera glucosa a partir de Dol-P-Glc. En los tres casos el oligosacárido era transferido a la proteína, aunque a una velocidad menor que en la cepa silvestre, y procesado en el RE hasta $(\text{Man})_8 \rightarrow \text{GlcNAc}_2$. El gen *ALG5* codifica la UDP-glucosa:Dol-P glucosiltransferasa (te Hessen y cols, 1994) mientras que el *ALG8* codifica la segunda glucosiltransferasa que actúa en el RE (Stagljar y cols, 1994). El *ALG6* ha sido recientemente clonado (Reiss y cols, 1996) y parece codificar una glucosiltransferasa que actúa en el RE transfiriendo la primera glucosa desde el Dol-P-Glc al oligosacárido aceptor $(\text{Man})_9 \rightarrow \text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

El mutante *alg7* está afectado en la transferencia de la primera GlcNAc al Dol-P. Esta reacción es catalizada por la enzima UDP-GlcNAc-1-P transferasa, la cual es inhibida por el antibiótico tunicamicina. En 1983, Rine y cols aislaron un gen, *ALG7*, que era capaz de hacer sobrevivir a las células en un medio con tunicamicina. Para ello transformaron levaduras con un plásmido multicopia que contenía fragmentos de una librería de DNA genómico y seleccionaron transformantes capaces de crecer en presencia del antibiótico. Las células que sobrevivían contenían varias copias del *ALG7* lo cual sugería que era el gen estructural de la enzima UDP-GlcNAc-1-P transferasa (Barnes y cols, 1984). La destrucción del gen *ALG7* mostró que es esencial para la viabilidad celular (Kukuruzinska y Robbins, 1987).

El mutante *alg4* también fue aislado por Huffaker y Robbins (1983) y a temperatura restrictiva acumula oligosacáridos unidos al Dol de tamaño muy heterogéneo (entre 1-8 manosas), pero sólo los residuos $(\text{Man})_5 \rightarrow \text{GlcNAc}_2$ o menores eran transferidos a la proteína ya que la invertasa glicosilada carecía de N-oligosacáridos sensibles a endo H. El mutante *alg4* resultó ser alélico a un mutante termosensible de secreción. *sec53*, incapaz de secretar proteínas a la temperatura restrictiva (Ferro-Novick y cols, 1984a, b). Cuando se construyó un plasmado multicopia con *SEC53* y se introdujo en *S. cerevisiae* se observó un aumento de la actividad fosfomanomutasa, lo que sugería que *SEC53* era el gen estructural de esta enzima y su defecto en la glicosilación y secreción de proteínas podía explicarse por la falta de GDP-Man (Kepes y Scheckman, 1988).

El gen *ALG9* codifica una manosiltransferasa involucrada en la biosíntesis de los oligosacáridos unidos al lípido de membrana. En el mutante *alg9*, el crecimiento del

oligosacárido $\text{Man}_6 \text{GlcNAc}_2$; no se produce, o bien, lo hace a una frecuencia muy baja (Burda y cols, 1996), pero se ha demostrado que residuos con cinco o seis manosas se transfieren a la proteína sin problemas. Además, se ha observado que cepas que sufrieron una delección del gen ALG9 (Δalg9), acumulan residuos de $\text{Man}_6 \text{GlcNAc}_2$ y presentan una hipoglicosilación de las proteínas secretadas. La adición de la séptima manosa podría suceder en $\alpha(1,2)$ o $\alpha(1,6)$, por tanto aún no se sabe si la Alg9p es una $\alpha(1,3)$ o una $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa.

- Otros dañados en las etapas de N-glicosilación que ocurren en RE.

Además de los *alg*, se han descrito otros genes que intervienen en las etapas de N-glicosilación que suceden en el RE:

El sec59 es un mutante termosensible de secreción, que a la temperatura restrictiva acumula precursores inactivos de proteínas de secreción incorrectamente glicosiladas en el RE

(Ferro-Novick y cols, 1984b). La clonación y secuenciación del SEC59 mostró que dicho gen

codifica una Dol-quinasa (Heller y cols, 1992). Esta enzima cataliza la síntesis de Dol-P, el cual es el aceptor primario al que se unirá la primera GlcNAc. Esta mutación también afecta al proceso de O-glicosilación.

El mutante dpm1 es también termosensible y presenta un defecto en la Dol-P-Man sintetasa (Orlean, 1990). El aislamiento del mutante y clonación del gen ya se describió en el apartado I.2.2.1.

El mutante gls1 se aisló casualmente en estudios de la invertasa acumulada por el mutante de secreción *secl8* (Esmon y cols, 1981). El mutante *secl8*, acumulaba en el RE N-oligosacáridos con la estructura $\text{Man}_8 \text{GlcNAc}_2$; mientras que el mutante doble *gls1 secl8* acumulaba $\text{Glc}_3\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, debido a la deficiencia en actividad glucosidasa I (Esmon y cols, 1984). La proteína Gls1p está involucrada en la eliminación de los tres residuos de glucosa, pero no en el proceso de secreción. Las tres glucosas aparecían también en manoproteínas maduras por lo que su presencia no parece interferir en el procesamiento posterior (Tsai y cols, 1984a).

El mutante dpg1 se encontró accidentalmente en un cultivo de *mnn1 mnn2 mnn9 gls1* como supresor de la mutación *gls1* (Ballou y cols, 1986). *dpg1* presentaba un defecto en la síntesis de Dol-P-Glc por lo que el fenotipo mutante era similar al *alg5* ya descrito, sin embargo, no es alélico con él.

El mutante mns1 se encuentra afectado en la manosidasa específica que actúa en el RE. Este mutante es perfectamente viable y la presencia de la manosa extra no impide el procesamiento posterior (Camirand y cols, 1991). El gen MNS1 codifica una proteína de membrana, una $\alpha(1,2)$ manosidasa que posee una elevada especificidad para eliminar un solo residuo de manosa del oligosacárido $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Esta enzima es un miembro de una familia de $\alpha(1,2)$ manosidasas con una secuencia aminoacídica similar (Lipari y Herscovics, 1996).

En el proceso de N-glicosilación, la etapa clave es la transferencia de los oligosacáridos del núcleo, unidos al Dol-P de la membrana, a residuos de Asn-X-Ser/Thr de una cadena polipeptídica naciente en el RE. Esta reacción está catalizada por la enzima N-oligosacariltransferasa. Los genes WBP1 y SWP1, codifican dos subunidades de la oligosacariltransferasa y son esenciales para la viabilidad celular ya que con defectos en dichos genes son letales (te Heesen y cols, 1992; te Heesen y cols, 1993). El complejo oligosacariltransferasa consta en total de 6 subunidades (Kelleher y Gilmore, 1994).

I.3.2.2. Etapas que suceden en el aparato de Golgi.

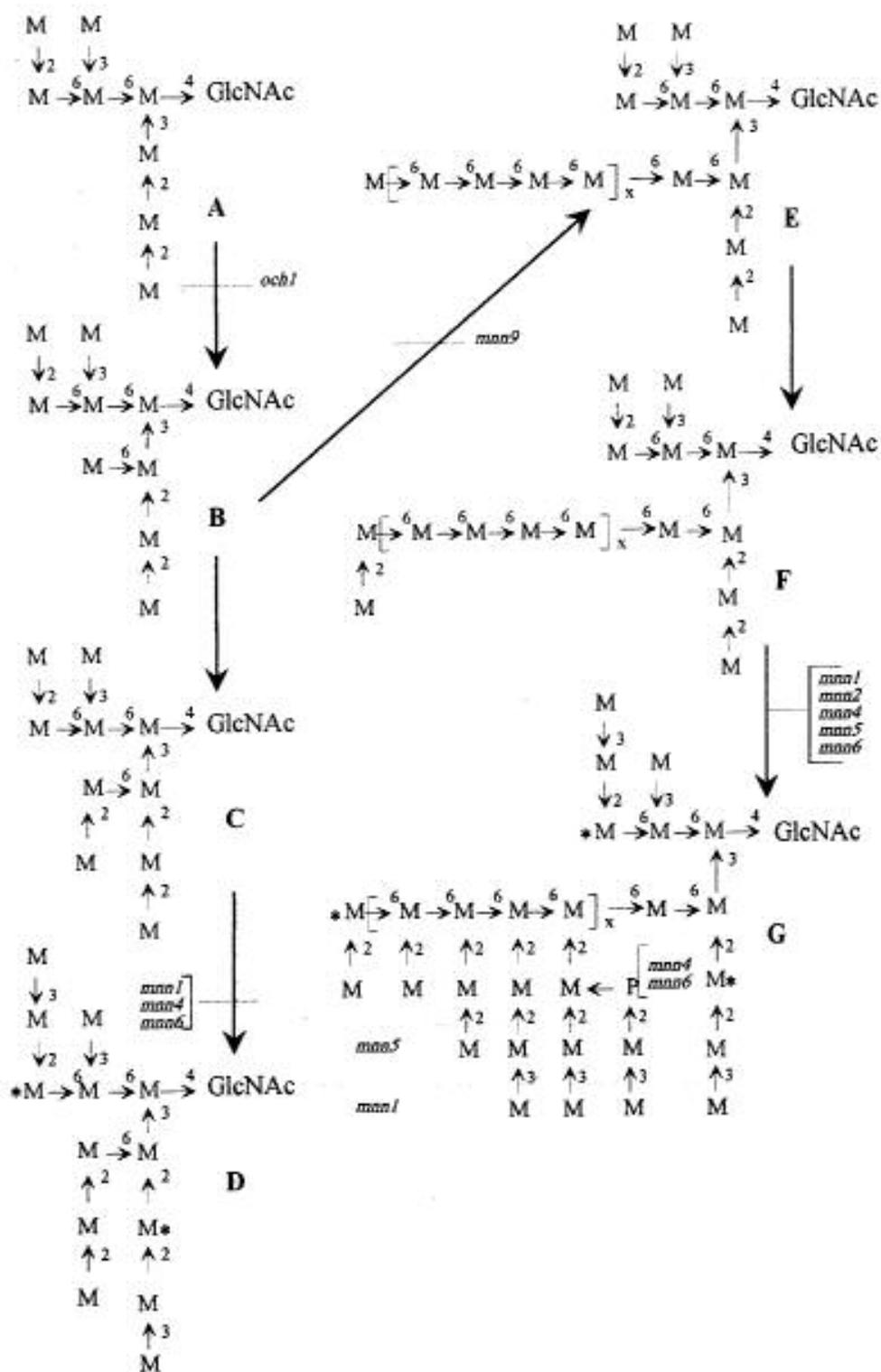


Figura I.6. Reacciones del procesamiento de los N-oligosacáridos que suceden en el aparato de Golgi, indicándose los defectos de algunos de los mutantes afectados en las distintas etapas. La ruta A→B→C→D es la seguida por los N-oligosacáridos de la CPY, exoglucanasa mayoritaria secretada, algunas posiciones de la invertasa externa glicosilada y las manoproteínas del mutante *mnn9*. La ruta A→B→E→F→G es la seguida por los N-oligosacáridos presentes en las manoproteínas de la cepa silvestre y en algunos sitios de la invertasa glicosilada (modificada a partir de Ballou y cols, (1990) y Yip y cols, (1994). Con un asterisco se indican las posiciones adicionales de fosforilación y en rojo se muestran las manosas correspondientes a la región del núcleo.

En el aparato de Golgi continua la modificación de la porción glucídica de la glicoproteína. Se adicionan nuevos residuos de manosa al núcleo, constituyendo la cadena externa del oligosacárido. En la Fig.I.6 se representan las etapas del procesamiento de N- oligosacáridos que se producen en el aparato de Golgi y que conducen a las estructuras finales. De nuevo el aislamiento y caracterización de ha sido fundamental en el esclarecimiento de la ruta.

- och (outer chain defective).

Se aislaron por el método de suicidio por incorporación de ³H Man (Nagasu y cols, 1992), el mismo utilizado en el aislamiento de los alg (Huffaker y Robbins, 1982). De los aislados, el och1 es el mejor caracterizado. El gen OCH1 fue clonado por complementación del fenotipo termosensible y se demostró que codificaba una manosiltransferasa (Nakayama y cols, 1992), la enzima responsable de la adición de la primera manosa unida en $\alpha(1-6)$, es decir, de la iniciación de la cadena externa (Nakanishi-Shindo y cols, 1993). Este grupo de investigadores, mediante la utilización del triple mutante och1 mnn1 alg3, comprobó que la proteína Och1p podía utilizar como aceptores de manosas residuos de Man₅ GlcNAc₂; además de los normalmente usados de Man₈ GlcNAc₂ procedentes del RE. El análisis de los oligosacáridos del doble mutante och1 mnn1, comparándolos con los del mutante och1, indica la ausencia de las manosas $\alpha(1,3)$ terminales del núcleo. Parece por tanto que la actividad de la proteína Mnn1p no se ve afectada por la mutación och1.

- mnn (mannan defective).

Fueron aislados por el grupo de Ballou y presentan defectos en la estructura de la porción glucídica de las manoproteínas. En la Fig.I.3 se muestran los quimiotipos de los diferentes aislados (revisado por Ballou, 1990).

La selección se hizo, en la mayor parte de los casos, por la disminución de la afinidad de los por anticuerpos obtenidos frente a la cepa parental. Como cepas

parentales se utilizaban normalmente la cepa silvestre, con lo cual los anticuerpos eran principalmente anti $\alpha(1\rightarrow3)$ o el mutante *mnn2* que carecía de cadenas laterales e inducta la formación de anticuerpos anti $\alpha(1\rightarrow6)$. En ocasiones se utilizaban anticuerpos anti Man-fosfato obtenidos frente a *Kloeckera brevis*.

Las características más representativas de los distintos *mnn* aislados ya se comentaron en el apartado I.3.1.2.

- vrg (vanadate resistant glycosylation).

Se ha demostrado que el vanadato es un eficiente competidor del fosfato en reacciones bioquímicas, especialmente en aquellas que utilizan fosfoproteínas como sustrato o intermediarios. También interfiere en el crecimiento y multiplicación celular cuando la concentración en el medio supera ciertos niveles (4-6 mM) (Willsky y cols, 1985; Kanik-Ennulat y Neff, 1990). El grupo de Ballou aisló una serie de resistentes a vanadato que surgían espontáneamente cuando células silvestres se crecían a concentraciones de ortovanadato tóxicas para ellas (Ballou y cols, 1991). Posteriormente analizaron en ellos posibles defectos en el mecanismo de glicosilación. Se identificaron cinco grupos de complementación, tres de ellos alélicos a los *mnn8*, *mnn9* y *mnn10*, aislados previamente por el mismo grupo de investigadores, mientras que los otros dos grupos presentaban otros defectos en la glicosilación de proteínas. El fenotipo de estos indica la existencia de alteraciones en el tráfico de glicoproteínas. Señalar que el mutante *mnn9* (ver apartado I.3.1.2), aislado por el mismo grupo por otro método, mostraba el mayor grado de resistencia al vanadato con respecto a la estirpe silvestre.

Cuando las glicoproteínas abandonan el aparato de Golgi en su viaje hacia su destino final, en la célula o fuera de ella, su porción glucídica está ya compleja, es decir, la estructura que posee en el momento de abandonar el aparato de Golgi (D o G, en la Fig. I.6), es la misma que aparecerá en la proteína madura.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

II .1. CEPAS UTILIZADAS.

Saccharomyces cerevisiae X-218O-1A, estirpe silvestre y los mutantes derivados de ella: *mnn1*, *mnn4*, *mnn6*, *mnn1 mnn9*, *mnn1 vrg7* y *mnn1 vrg4*. Todos los mutantes fueron cedidos por Lun y Clint Ballou (Departamento de Biología Molecular y Celular, División de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de California en Berkeley).

Estos mutantes presentan alteraciones en la porción glucídica de sus manoproteínas (ver Fig.I.3). Las características fenotípicas y el método de aislamiento de cada uno de ellos se describieron en la Introducción General.

II.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

MEDIO SÓLIDO.

Para el cultivo en medio sólido, se utilizaban placas de Petri con medio YEPD (2% de extracto de levadura, 1% de peptona, 2% de glucosa, 2% de agar). En ocasiones, este medio se suplementaba con vanadato a distintas concentraciones o con K.Cl 0.5 M (ver Apéndice). Para determinar la resistencia a vanadato de las cepas problema, los microorganismos se sembraban en placas con YEPD, se hacían réplicas a placas con diferentes concentraciones de vanadato y se observaba el crecimiento a distintos tiempos comparándolas con controles de comportamiento conocido (Ballou y cols, 1991).

MEDIO LÍQUIDO.

Para el cultivo en líquido se utilizaron los siguientes medios:

- YEPD de igual composición al anterior con excepción del agar. Dependiendo del volumen necesario, se utilizaban tubos de cultivo estériles con 5 ml de medio o matraces de mayor capacidad. La incubación se realizaba con agitación en un incubador orbital a 200 rpm.
- Medio de desrepresión de la síntesis de invertasa. El mismo que el anterior pero la concentración de glucosa se reducía al 0.1% .
- Medio sintético: En la purificación de la exoglucanasa secretada se utilizó un medio mineral (medio K) descrito previamente (Olivero y cols, 1985) (ver Apéndice).

El crecimiento se determinaba midiendo el aumento de densidad óptica del cultivo en un espectrofotómetro a 600 nm. Las incubaciones se realizaban en todos los casos a 30°C.

II.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE ESPORULACIÓN.

Para la esporulación de las estirpes diploides las células se inoculaban en primer lugar en un medio de preesporulación (ver Apéndice) donde se incubaban durante 24 horas. A continuación, las células se lavaban dos veces con medio de esporulación (descrito en el Apéndice) y se resuspendían en dicho medio, donde se incubaban durante

varios días hasta la aparición de esporas (Sherman, 1991). Tanto la preesporulación como la esporulación se llevaban a cabo en tubos de cultivo con 3 ml de medio y agitación vigorosa a 30°C.

II.4. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

Para la conservación de las cepas, los microorganismos se crecían previamente en una placa de YEPD durante dos días a 30°C, resuspendiéndose a continuación en YEPD líquido estéril al que se había añadido dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma) a una concentración final del 10%. Alícuotas de 1 ml se depositaban en viales estériles y se almacenaban a -80°C.

II.5. AISLAMIENTO DE DEFICIENTES EN FOSFATO.

Como cepa parental se utilizó el mutante *mn1* tipo sexual **a** que carece de las manosas terminales unidas en $\alpha(1\rightarrow3)$ (ver Fig. I.4) presentando, por tanto, los grupos fosfato más accesibles. El protocolo de mutagénesis y selección de los mutantes de interés se describió previamente en la Tesis de Licenciatura (Mañas, 1995) (ver Apéndice).

II.6. MANIPULACIONES GENÉTICAS.

En la obtención de diploides y disección de las ascas se siguió esencialmente la metodología descrita previamente (Mañas, 1995) basada en la metodología recogida por Guthrie y Fink, Eds, (1991) (ver Apéndice).

II.7. TINCIÓN DE CÉLULAS DE LEVADURA CON ALCIAN BLUE.

El alcian blue es un colorante catiónico que se une a células que poseen carga negativa en su superficie (Friis y Ottolenghi, 1970). El ensayo se hace a pH ácido y como ya se ha indicado en estas condiciones el principal responsable de la carga negativa de la pared celular son los grupos fosfato de las manoproteínas, esta prueba permite diferenciar células con distinta cantidad de fosfato en la pared. El método ha sido descrito previamente (Ballou, 1990; Mañas, 1995) y se recoge en el Apéndice.

II.8. ELECTROFORESIS DE LA INVERTASA EN CONDICIONES NATIVAS.

Los posibles defectos en la maquinaria de glicosilación se pusieron de manifiesto determinando el tamaño de la invertasa periplásmica por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%, a temperatura ambiente y condiciones nativas. Esta metodología ha sido utilizada repetidas veces en la caracterización de mutantes de glicosilación (revisado por Ballou, 1990) y se describe con detalle en el Apéndice. La disminución del tamaño de la molécula de invertasa refleja una disminución en el número y/o tamaño de sus restos N-glicosídicos.

II.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

II.9.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC).

Por razones de disponibilidad se utilizaron dos equipos cromatográficos con dos columnas diferentes de intercambio iónico, ambas de Bio-Rad: TSK-DEAE-5-PW (7.5x75 mm) y Bio-scale DEAE 2 (10x64 mm). En ambos casos el eluyente era NaCl en tampón ácido acético-acetato sódico 25 mM, pH 5.2 y las fracciones recogidas eran de 0.5 ml pero el flujo utilizado y las condiciones del gradiente fueron diferentes. La columna TSK-DEAE-5-PW se utilizó acoplada a un equipo LKB a un flujo de 0.5 ml/min y las condiciones de elución eran las siguientes: se comenzaba con NaCl 0.2 M en isocrático durante 5 min seguido por un gradiente continuo hasta 0.4 M durante los siguientes 40 min. La columna Bio-scale DEAE 2 estaba acoplada a un equipo Gilson. El flujo utilizado en este caso fue de 1 ml/min, y la elución se comenzaba con NaCl 0.35 M en condiciones isocráticas durante los primeros 3 min, seguido por un gradiente continuo hasta 0.5 M en 27 min. En ambos casos las fracciones se recogían en un colector de fracciones GILSON FC 203B.

II.9.2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO CONVENCIONAL.

Para las cromatografías en DEAE-Sepbacell (Bio-Rad) la columna utilizada era, salvo indicación contraria, de 2.5x9 cm. En la purificación de las manoproteínas, la columna se equilibraba con tampón Tris/HCl 20 mM, pH 7.5 y, tras la aplicación de la muestra, se lavaba con el mismo tampón para eliminar el material no retenido, se eluía con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M en 400 ml del mismo tampón y se recogían fracciones de 8 ml (Ballou y cols, 1989; Hernández y cols 1989a, b; Ballou 1990).

En la purificación de las exoglucanasas, la columna se equilibraba con tampón acetato sódico 25 mM, pH 5.2. En este caso la muestra se eluía con un gradiente de NaCl

(0-0.3 M) en 400 ml del tampón anterior recogiendo fracciones de 4.5 ml (Hernández y cols, 1992).

En el fraccionamiento de N-oligosacáridos se usaba una columna de 1.5x9 cm empaquetada con QAE-Sephadex (Pharmacia) y equilibrada con Tris 2 mM. La muestra se disolvta en la solución anterior, se aplicaba a la columna y se eluía con un gradiente continuo de 0 a 125 mM de NaCl en 150 ml de Tris 2 mM (Hernández y cols, 1989b) recogiendo fracciones de 1 ml.

En ocasiones se utilizaban columnas de diferentes tamaños (1.5x9 o 2.5x9 cm) empaquetadas con la resina de intercambio iónico DOWEX AG 50W-X8 (Bio-Rad) para eliminar iones de las muestras. En estos casos, la columna se lavaba previamente con agua destilada, se aplicaba la muestra y se eluía también con agua quedando los cationes unidos a la resina.

II.9.3. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR.

Se utilizaron columnas de diferentes tamaños empaquetadas con BioGel-P2 o BioGel-P4, ambos de Bio-Rad, equilibradas en agua o en acetato amónico 0.1 M, dependiendo del experimento. El volumen de las fracciones recogidas variaba según las dimensiones de la columna.

II.9.4. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

Se utilizó en la purificación de las exoglucanasas previamente a la secuenciación del extremo amino. Los anticuerpos de conejo frente a la enzima se unieron a bolas de Sepharosa activadas (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante. La muestra que contenía la enzima parcialmente purificada se aplicó a la columna y las moléculas retenidas se eluyeron con una solución que contenía glicina 50 mM y NaCl 0.15 M. Dado que el pH de esta solución era próximo a 3, rápidamente se subía hasta 5.2 añadiendo el volumen adecuado de tampón fosfato 0.5 M pH 7.7 (referencia).

II.9.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Es una técnica simple, rápida y muy útil para el examen preliminar de mezclas de carbohidrato. Como soporte sólido se utilizaron placas de sílica gel 60 (Merk) que previamente se activaban por calentamiento a 110°C durante varias horas. El solvente

utilizado era acetato de etilo:n-butanol:ácido acético:agua en una proporción 3:4:2.5:4 (Haselbeck y Tanner,1983).

El revelado se realizaba pulverizando la placa con una solución de ácido sulfúrico concentrado en etanol absoluto (1:9 vol/vol) calentando a continuación en un horno a 110°C durante 15 min.

II.10. CONCENTRACIÓN Y DIÁLISIS.

La concentración de muestras enzimáticas se realizó en células de AMICON, de diferentes volúmenes equipadas con membranas cuyo límite de exclusión era de 10 Kda (PM10). Para volúmenes de muestra de 3.5 ml o menos, se emplearon microconcentradores de centrifuga (FILTRON) equipados con membranas del mismo límite de exclusión que las anteriores o un sistema "centrivap concentrator" (Labconco) acoplado al liofilizador.

Cuando se necesitaba concentrar muestras de carbohidrato, a veces en grandes volúmenes de agua destilada, se utilizaba la liofilización.

La diálisis se llevaba a cabo en membranas MEDICELL cuyo límite de exclusión era de 10 Kda. Se dializaba frente agua o un tampón adecuado dependiendo de la naturaleza de la muestra. Las muestras que se concentraban en células de AMICON o en el sistema FILTRON, se dializaban añadiendo en ambos casos a la muestra concentrada 5 veces su volumen de tampón de diálisis, o de agua, y se concentraba de nuevo. Esta operación se repetía 4 veces.

A veces, para concentrar con mayor rapidez un volumen grande de solución enzimática, se hacía pasar ésta por una columna empaquetada con DEAE-Sephadex (1.5x4 cm). Posteriormente, se pasaba un pequeño volumen de NaCl 1M con lo cual toda la enzima unida a la resina eluía en unas pocas fracciones. A continuación, la muestra concentrada se dializaba para eliminar la sal.

II.11. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE MANOPROTEÍNAS. LIBERACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE N-OLIGOSACÁRIDOS.

Las manoproteínas se solubilizaban por el método del tampón citrato en caliente y se purificaban por sucesivas precipitaciones selectivas con metanol, cetavlon (Sigma), y etanol siguiendo protocolos descritos previamente (Ballou y cols, 1989; Hernández y

cols, 1989 a, b; Ballou, 1990). La etapa final de purificación consistía en una cromatografía de intercambio iónico (ver detalles del proceso en el Apéndice).

Los N-oligosacáridos se liberaban de la proteína por tratamiento con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H) (Sigma). Para ello, las manoproteínas purificadas se disolvían en tampón fosfato 50 mM, pH 5.6 suplementado con azida de sodio 0.02% a una concentración aproximada de 300 mg/ml. Se añadían a continuación 0.1 U de endo H y la reacción se incubaba a 30°C durante 72 h adicionando 50 mU más de endo H a las 24 y 48 h. La reacción se paraba por calentamiento a 100°C durante 5 minutos. Las muestras se dejaban enfriar y se centrifugaban, a velocidad máxima, en una microfuga durante 45 minutos para eliminar material insoluble. En el caso de las cepas con la mutación *mnn9* y/o *ldb1*, las manoproteínas digeridas con endo H se aplicaban directamente a una columna de BioGel-P4 (1.5x170 cm) equilibrada con acetato amónico, 0.1 M, pH 7 para separar los N-oligosacáridos liberados (se incluían en la columna) de la porción proteica (quedaba en el volumen vacío). Aunque en esta cromatografía pueden separarse parcialmente los oligosacáridos neutros de los fosforilados, el fraccionamiento definitivo se realizaba por cromatografía en QAE-Sephadex (ver más arriba) (Ballou y cols, 1989; Hernández y cols, 1989a, b; Ballou, 1990).

II.12. AISLAMIENTO DE O-OLIGOSACÁRIDOS.

Los oligosacáridos unidos a la proteína por enlace O-glicosídico pueden separarse de ésta en condiciones alcalinas suaves (β -eliminación). La β -eliminación es un proceso químico que libera selectivamente los restos O-glicosídicos de las manoproteínas (Nakajima y Ballou, 1974). Las manoproteínas se disolvían en NaOH 0.1N a una concentración aproximada de 100 mg/ml y se incubaban a 30°C durante 48 horas. A continuación, la solución se neutralizaba con HCl concentrado hasta pH 5, se diluía con 4 volúmenes de agua destilada y se filtraba a través del sistema de microconcentración (FILTRON) equipado con una membrana de 10 Kda de límite de exclusión. El filtrado, que contenía los O-oligosacáridos liberados, pero no la proteína con los N-oligosacáridos, se desalaba con Dowex AG 50W-X8 y se concentraba en la centrífuga de vacío acoplada al liofilizador (ver sección II. 10). El fraccionamiento de los O-oligosacáridos así obtenidos se realizó por cromatografía en capa fina (ver sección II.9).

II.13. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS.

La obtención de anticuerpos frente a los restos glucídicos de las manoproteínas de la cepa silvestre, se llevó a cabo inoculando conejos con una suspensión de células enteras muertas por calor en suero fisiológico estéril. La inmunización consistió en inyectar dicha suspensión en días alternos durante cuatro semanas. Tras una semana de descanso, los conejos eran sangrados periódicamente, se titulaba el suero y, cuando el título adquiría un valor máximo, el conejo se sacrificaba para obtener el suero inmune total. Estos anticuerpos se obtuvieron en las instalaciones de la Universidad de California en Berkeley bajo la supervisión del Dr. C.E. Ballou y de Lun Ballou.

Los anticuerpos específicos frente a las manosas terminales unidas por enlace $\alpha(1,3)$ se aislaron a partir del antisuero anterior tras absorción con células enteras del mutante mnn1.

Los anticuerpos frente a la porción proteica de la exoglucanasa fueron obtenidos por la Dra. I. Olivero. Para ello, los conejos se inoculaban en repetidas ocasiones a intervalos de tres semanas con una suspensión de enzima purificada y desglicosilada procedente de un estudio anterior (Hernández y cols, 1992) emulsionada en Adyuvante incompleto de Freund. Tras una semana de descanso después de la tercera inoculación, se extraía sangre cada dos días y se titulaba el suero viéndose la conveniencia de continuar las inoculaciones o sacrificar al conejo para obtener el suero inmune total. A partir del suero inmune, se purificaron las IgG por precipitación con sulfato amónico.

II.14. SDS-PAGE, ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOTTING) DE EXOGLUCANASAS.

II. 14.1. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

La electroforesis de las exoglucanasas en condiciones desnaturalizantes se hacía en geles de acrilamida de 0.75 mm de espesor, utilizando un sistema discontinuo: gel de empaquetamiento 4%, gel de separación 7.5%. Se aplicaban aproximadamente 2 unidades de enzima en cada pocillo. La electroforesis se hacía en un sistema de Hoefer Scientific Instruments (16x18 cm) con una fuente de alimentación Power Pac 3000 de Bio-Rad (ver Apéndice).

II. 14.2. ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE LAS GLUCANASAS.

Las proteínas se transferían desde el gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando un equipo de Bio-Rad. El sandwich se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante y la transferencia se realizó, a 4°C durante 15 horas manteniendo la corriente constante a 10 mA.

Para la inmunodetección de las glucanasas, las membranas de nitrocelulosa, se lavaban con tampón TBS suplementado con BSA al 3% durante 2 horas, incubándose a continuación con el anticuerpo de conejo anti-exoglucanasa en TBST (TBS con 0.05% de Tween 20) durante tres horas más. Las membranas se lavaban de nuevo con TBST y se incubaban durante 2 h con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad). Finalmente, las membranas se lavaban de nuevo y las bandas de exoglucanasa se detectaban por una reacción coloreada (ver Apéndice).

II.15. SECUENCIACIÓN DEL EXTREMO AMINO DE LA EXOGLUCANASA.

II. 15.1. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SECUENCIACIÓN.

Se realizó a partir de un cultivo del mutante ldb1 crecido en 5 l de medio K hasta la fase exponencial. Las formas enzimáticas secretadas se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose y cromatografía de afinidad en una columna preparada con anticuerpos frente a la exoglucanasa mayoritaria acoplados a Sepharose activada (ver sección II.9).

Con las muestras de enzima purificada se realizó SDS-PAGE y electrotransferencia a una membrana Immobilon P (PVDF, Millipore). Las condiciones de la electroforesis y la transferencia fueron las mismas que se indicaron en la sección II.14. Finalizada la transferencia, las proteínas se visualizaron en la membrana tiñendo con Coomassie Brilliant Blue (Sigma) (ver Apéndice).

II. 15.2. SECUENCIACIÓN.

Finalmente, los extremos amino de las exoglucanasas (12 aminoácidos) se secuenciaron a partir de las bandas de la membrana en un secuenciador automático Beckman LF3000 equipado con un analizador de aminoácidos (System Gold,

* Posiciones posibles de unión de grupos fosfato.

Las manosas que provienen del oligosacárido que se sintetiza unido al lípido intermediario Dol-PP se muestran en letras mayúsculas, mientras que las manosas que se añaden posteriormente, durante el procesamiento que sufren estos residuos una vez transferidos a la proteína, se muestran en letra minúscula. Cada una de ellas pueden ser identificadas con relativa facilidad por ^1H RMN gracias a los desplazamientos químicos característicos de sus protones anoméricos (Cohen y Ballou, 1980; Hernández y cols, 1989a, b; Hernández y cols, 1992) que son los siguientes:

A₁, δ 4.77; A₂, δ 5.32; A₃, δ 5.29; A₄, δ 55.03.

B₁, δ 4.87; B₂, δ 5.379 (δ 5.08-5.11 cuando B₃ no está presente); B₃, δ 5.05.

C₁, δ 5.125; C₂, δ 5.04.

d₁, δ 5.125; d₂, δ 5.04.

Cuando la cadena externa está presente y se extiende hasta z₁, las señales de z₁ y z₂ sustituyen a las de d₁ y d₂. En determinados mutantes, la cadena externa aparece como una cadena lineal de manosas unidas por enlaces $\alpha(1,6)$ sin ramificaciones. En este caso, los protones anoméricos de dichas manosas aparecen a δ 4.90- δ 4.92. Cuando la cadena externa presenta ramificaciones, el espectro se complica bastante y resulta difícil hacer las asignaciones.

El esquema I muestra una estructura sintetizada por cepas que presentan la mutación mnn1. Cuando dicha mutación no está presente, esta estructura incorpora manosas adicionales unidas por enlace $\alpha(1,3)$ en el extremo no reductor de algunas de las ramificaciones del núcleo y cadena externa (a₅, c₃, d₃...). La señal correspondiente a los protones anoméricos de dichas manosas aparece en el espectro en la zona δ 5.12- δ 5.14.

La presencia de grupos fosfato unidos a la posición 6 de las manosas señaladas con un asterisco, puede ser puesta de manifiesto por los cambios que sufren los protones anoméricos de las manosas próximas a ellos:

Si un grupo fosfato monoesterificado se une a la manosa A₃, los protones anoméricos de las manosas A₁, A₂ y A₃ cambian a δ 4.81, δ 5.35 y δ 5.24 respectivamente. Si el fosfato estuviera diesterificado con otra manosa, la señal del protón anomérico de

dicha manosa aparecería en el espectro como un doblete en la zona de $\delta 5.43$ - $\delta 5.45$ y las señales correspondientes a A_1 , A_2 y A_3 cambiarían a $\delta 4.80$, $\delta 5.31$ y $\delta 5.28$ respectivamente.

Cuando el grupo fosfato se une a la manosa C_1 , no provoca cambios apreciables en los protones anoméricos de ninguna de las manosas del oligosacárido, por lo que su presencia es difícil de reconocer por esta técnica. Solamente cuando el fosfato está diesterificado, la señal correspondiente al protón anomérico de la manosa que diesterifica, aparece como un doblete en la zona de $\delta 5.43$ - $\delta 5.45$.

Finalmente, cuando la molécula está fosforilada en las dos posiciones posibles (A_3 y C_1), se producen los mismos cambios que se han señalado para cada una de ellas por separado.

En el Apéndice se muestran ejemplos de espectros que ilustran lo anterior.

II.17. OTROS MÉTODOS.

La proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), el carbohidrato por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois y cols, 1956) y el fosfato por el método de Ames (Ames, 1966) (para detalles ver Apéndice).

Las microfotografías se realizaron en un microscopio Zeiss, equipado con contraste de fases y sistema óptico Nomarski en película de 35 mm Ilford Pan F, ISO 50/19.

La actividad exoglucanásica se determinaba añadiendo 0.1 ml del sustrato sintético p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) (Sigma) a 0.5 ml de la solución enzimática en tampón acetato sódico 25 mM, pH 5.2. Tras incubación a 30°C hasta la aparición de un color amarillo claro, la reacción se detenta añadiendo 1 ml de carbonato sódico saturado. En estas condiciones alcalinas, el p-nitrofenol liberado da un color amarillo que se leía a 410 nm. La relación entre la lectura obtenida y cantidad de p-nitrofenol libre, se establecía construyendo una recta patrón con concentraciones conocidas de p-nitrofenol. Una unidad de actividad β -glucanásica se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de paranitrofenol durante 1 hora a 30°C en las condiciones indicadas (Tingle y Halvorson, 1971; Hernández y cols, 1992).

En el tratamiento de las exoglucanasas con endo H, se utilizó esencialmente el mismo protocolo utilizado para las manoproteínas (ver sección II. 11) aunque la

concentración de exoglucanasa en la mezcla de reacción era menor que la concentración de manoproteínas.

Para la digestión con la $\alpha(1,6)$ endomananasa, el oligosacárido se resuspendía en tampón citrato-fosfato 0.1 M, pH 6, conteniendo CaCl_2 1 mM y azida de sodio 0.02%, a una concentración variable entre 30 y 200 mg/ml. A continuación se añadían 2 U/ml de la enzima y la reacción se incubaba a 45°C durante 24 h. En ese momento se añadía de nuevo la misma cantidad de enzima y se continuaba la incubación a la misma temperatura durante 24 h más. La reacción se detenta por calentamiento a 100°C durante 3 min. La $\alpha(1,6)$ endomananasa, nos fue proporcionada por Lun Ballou (Universidad de California, Berkeley), fue obtenida a partir de una bacteria del suelo y presenta actividad hidrolítica sobre cadenas lineales de manosas unidas por enlaces $\alpha(1,6)$ (Nakajima y cols, 1976).

Identificación de colonias con la mutación mnn1. Las colonias con la mutación mnn1 se ponían de manifiesto por su no aglutinación con los anticuerpos específicos frente a las manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$.

II.18. PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS.

Todos los productos químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

III. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MUTANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* DEFECTIVOS EN EL PROCESO DE N-GLICOSILACIÓN.

III.1. RESUMEN.

En este capítulo se describe el aislamiento de nuevos mutantes no termosensibles de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos en el proceso de N-glicosilación de manoproteínas. Los N-oligosacáridos contienen en su estructura cantidades apreciables de grupos fosfato diesterificados que contribuyen en gran medida a la carga negativa de la superficie celular. Los mutantes con defectos en la síntesis de dichos oligosacáridos presentan un menor contenido en grupos fosfato y, en consecuencia, una disminución en

la carga negativa neta superficial. A causa de esta disminución de la carga negativa, los mutantes de interés pierden afinidad por la resina de intercambio iónico QAE-Sephadex y pueden separarse así de las células que mantienen el fenotipo silvestre con respecto a esta característica. Los mutantes se identificaron por la disminución en la afinidad por el colorante básico alcian blue y por esa razón, se han denominado ldb (**low dye binding**). Mediante ensayos de complementación entre ellos y con otros mutantes de fenotipo similar aislados previamente por otros grupos, se han encontrado 8 grupos de complementación nuevos. Cuatro de ellos, ldb1, ldb5, ldb6y ldb10, presentaban una reducción significativa en el número y/o tamaño de los N-oligosacáridos de la invertasa secretada.

Se ha determinado también la estructura de los N-oligosacáridos liberados por endo H a partir de manoproteínas sintetizadas por los dos mutantes que mostraron la reducción más drástica en la afinidad por el colorante alcian blue: ldb1 y ldb2. En ambos casos, no se detectaron grupos fosfato unidos a los N-oligosacáridos utilizando la metodología habitual en este tipo de estudios: ^1H RMN y cromatografía de intercambio iónico. Además, se ha encontrado que el mutante ldb1 sintetiza una cadena externa de longitud reducida, formada por una cadena lineal de manosas unidas por enlaces $\alpha(1,6)$ y carente completamente de ramificaciones en $\alpha(1,2)$.

III.2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS.

En los últimos años, el proceso de N-glicosilación de proteínas en levaduras ha sido estudiado en profundidad utilizando distintas metodologías. Los avances más importantes se han conseguido gracias al aislamiento y caracterización de mutantes defectivos en el proceso.

Las estrategias utilizadas para la selección han sido muy variadas y se recogen en varias revisiones (Kukuruzinska y cols., 1987; Tanner y Lehle, 1987; Ballou, 1990; Herscovics y Orlean, 1993). Los métodos de selección más representativos que se han utilizado en estos estudios se mencionan a continuación:

- Selección por suicidio con ^3H manosa. Así se aislaron los mutantes alg (asparagine-linked glycosylation) (Huffaker y Robbins, 1982) dañados en las etapas que ocurren en el RE, y los och (outer chain defective) (Nagasu y cols, 1992). El mutante och1 es defectivo en la iniciación de la cadena externa (Nakanishi-Shindo y cols, 1993).

- Disminución de la aglutinación con antisuero obtenido frente a células enteras de la cepa silvestre. De esta forma el grupo de Ballou aisló los mutantes mnn (mannan defective) que son defectivos en las etapas que ocurren en el aparato de Golgi (revisado por Ballou, 1990).

- Resistencia a la presencia de vanadato en el medio de cultivo. Así se aislaron los mutantes vrg (vanadate resistant glycosylation mutants) que presentan fenotipos similares a los mnn. También fueron aislados por el grupo de Ballou (Ballou y cols, 1991).

A partir de los datos existentes sobre la estructura de los N-oligosacáridos, se puede deducir la existencia de varias manosiltransferasas implicadas en la síntesis de la cadena externa de dichos restos. Sin embargo, sólo tres de los mutantes aislados parecen estar dañados en genes que codifican dichas enzimas: och1, mnn1 y mnn10. En teoría existe, por tanto, la posibilidad de aislar nuevos mutantes con defectos en el resto de las enzimas. Para ello, pensamos que sería conveniente poner a punto un método de selección nuevo no utilizado previamente.

En un artículo publicado hace algunos años (Ballou, 1990) se describió que dos mutantes carentes casi completamente de fosfato en sus N-oligosacáridos, mnn4 y mnn6, eran incapaces de unirse a una resina de intercambio iónico (QAE-Sephadex), mientras que la cepa silvestre sí se unía. A la vista de los datos expuestos anteriormente (ampliados en la Introducción General), en este capítulo nos propusimos los siguientes objetivos:

1.- Aprovechar el hecho de que los mutantes mnn4 y mnn6 no se unían a QAE-Sephadex (Ballou, 1990), para seleccionar nuevos mutantes con defectos generales en el proceso de N-glicosilación utilizando esta resina.

2.- Identificar los mutantes de interés por su disminución en la afinidad por el colorante alcian blue y por el aumento de la movilidad de la invertasa en geles de acrilamida.

3.- Determinar el número de grupos de complementación y cuáles de ellos complementan defectos de otros mutantes de fenotipo similar obtenidos previamente.

4.- Determinación de la estructura de los N-oligosacáridos sintetizados por alguno de los mutantes más representativos.

III.3. RESULTADOS.

III.3.1. MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN DE LOS MUTANTES.

Como ya se ha indicado, el propósito de este experimento era aislar mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que mostraran una disminución en la incorporación de grupos fosfato en los N-oligosacáridos. Como cepa parental se utilizó el mutante *mnn1* tipo sexual **a**. La ausencia de las manosas terminales en las cadenas laterales de sus N-oligosacáridos hace que los mencionados grupos fosfato estén más accesibles que los de la cepa silvestre y consecuentemente, resulta más fácil la distinción entre la cepa parental y los posibles mutantes.

Para el aislamiento de los mutantes se siguió el procedimiento descrito con detalle en el apartado VII.2.

La mutagénesis se hizo por duplicado en dos tubos (A y B), que se mantuvieron 15 y 25 minutos respectivamente en presencia del agente mutagénico. Para determinar el porcentaje aproximado de supervivencia durante la mutagénesis, se contaron células viables en ambos tubos antes y después del proceso. Para ello, se tomaron muestras alícuotas de cada tubo a tiempo cero y a los 15 y 25 minutos respectivamente, se neutralizó el EMS, se contaron las células y se sembraron en placas de YEPD a una concentración aproximada de 100 colonias por placa. El número de colonias procedentes de cada uno de los tubos al inicio y al final del proceso, nos daba una idea del porcentaje de supervivencia, que resultó ser alrededor del 80% al 90% en los dos casos.

Finalizado el período de mutagénesis y tras la toma de la muestra para el cálculo de la supervivencia, el contenido de cada tubo se repartió en dos que se designaron A1, A2 y B1, B2 respectivamente. Seguidamente se neutralizó el agente mutagénico y las células se lavaron y crecieron en YEPD líquido para permitir la expresión de las mutaciones. Los mutantes se seleccionaron por su falta de afinidad por el QAE según se describe en el Apéndice.

Las células seleccionadas se sonicaron durante 30 segundos para separar posibles grumos, ya que algunos mutantes descritos previamente con fenotipo similar a los que pretendemos obtener (ej. *mnn9*), tienen dificultades para separar las células después de la división (Ballou, 1990). A continuación se contaron las células, se diluyeron

convenientemente y se sembraron en placas de YEPD a una concentración aproximada de 100 a 150 células por placa, dejándose crecer hasta que cada célula formaba una colonia visible.

Tras 2-3 días de incubación a 30°C, se recogieron un total de 1400 colonias que se separaron en tres grupos atendiendo al tamaño: 467 grandes, 356 medianas y 577 pequeñas.

Esta separación en base al tamaño, se hizo porque los diferentes tamaños podían reflejar distintas velocidades de crecimiento y algunos mutantes con alteraciones en la estructura de la porción glucídica de las manoproteínas de la pared celular presentan un crecimiento más lento que la cepa silvestre (Ballou, 1990). Las colonias con un tamaño excesivamente grande se descartaban ya que era muy probable que estuvieran formadas por varias células que no se separaran durante la sonicación.

III.3.2 AFINIDAD POR EL COLORANTE CATIONICO ALCIAN BLUE.

La primera prueba que se realizó a las colonias recogidas, para identificar posibles mutantes de interés, fue la tinción con alcian blue, colorante catiónico que se une a la pared celular de la levadura proporcionalmente al contenido y accesibilidad de los grupos fosfato.

Aunque no resulta fácil cuantificar exactamente la cantidad de colorante que se une a las colonias, se utilizó una escala de color azul arbitraria que variaba de 0-6 de acuerdo a los controles que se indican en la tabla III. 1.

Tabla III. 1. Valores de referencia para cuantificar la unión del colorante alcian blue a las colonias.

Mutante	Contenido en fosfato	Valor asignado	Color
mnn6	aprox. 10%	0	blanco
mnn1 mnn9	intermedio	3	↓
Silvestre	100%	5	↓

mn1	100% más accesible	6	azul intenso
-----	--------------------	---	--------------

De las 1400 colonias analizadas, se seleccionaron 42 que mostraban una significativa reducción de su afinidad por el colorante y por esta razón se denominaron mutantes ldb (low dye binding). El porcentaje de mutantes encontrados (3%) indicaba que el método de selección utilizado fue razonablemente específico. Estos 42 mutantes, se separaron en tres grupos según los valores de afinidad por el colorante (tabla III.2).

Tabla III.2. Grupos de mutantes seleccionados según la coloración mostrada al ser teñidos con el colorante alcian blue (ver tabla I).

Grupo	Valor asignado	Número de representantes
I	0-1	18
II	2-4	14
III	5	8

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en esta prueba, el grupo I debe incluir células con N-oligosacáridos carentes casi totalmente de grupos fosfato, mientras que el grupo II estaría compuesto por cepas con una reducción en la incorporación de fosfato entre el 30 y el 70%.

Finalmente, en los mutantes del grupo III el contenido en fosfato sería muy próximo al de la cepa silvestre. En este trabajo nos hemos centrado en los grupos I y II, por ser los que a priori deben presentar las alteraciones más drásticas en la estructura de los N-oligosacáridos.

Asimismo, podrían aportar también alguna información acerca de la biosíntesis y función de los residuos manosilfosfato incorporados en los N-oligosacáridos de las manoproteínas de las levaduras.

III.3.3. ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN.

Como se ha indicado, los estudios de complementación se hicieron solamente con los mutantes incluidos en los grupos I y II. En primer lugar, todos los mutantes se cruzaron dos veces con la estirpe parental para obtener ambos tipos sexuales y efectuar una limpieza de mutaciones no deseadas en el genoma de los mutantes de interés.

Mutantes pertenecientes al grupo I (ver tabla III.2)

Los mutantes del grupo I se cruzaron en primer lugar con *mnn4* y *mnn6* ya que presentan un fenotipo prácticamente indistinguible con respecto a la afinidad por el alcian blue. El mutante *mnn4* fue descrito inicialmente como "dominante" ya que al ser cruzado con la cepa silvestre, el cigoto incubado en YEPD se comportaba como mutante, es decir, seguía sin unir alcian blue (Ballou y cols, 1973). Sin embargo, la dominancia no se manifestaba cuando el diploide se crecía en el mismo medio suplementado con KCl (Ballou, 1990). Este hecho ha sido corroborado en un trabajo posterior (Odani y cols, 1996). Por esta razón, los cruces con este mutante y el posterior crecimiento de los cigotos, se llevaron a cabo en placas de YEPD complementadas con KCl 0.5 M.

Uno de los mutantes del grupo I no fue capaz de conjugarse, por lo que no se pudo analizar. De los 17 restantes, 6 fueron incapaces de complementar el defecto del *mnn4*. Aunque en algunos casos los resultados no eran absolutamente claros, puesto que parecía producirse una complementación parcial con respecto a la capacidad de unión al alcian blue, no creímos que mereciera la pena detenernos en un estudio más profundo del problema y todos ellos fueron incluidos en un grupo que llamamos "grupo del *mnn4*".

Los 11 mutantes restantes se cruzaron con el *mnn6*, apareciendo dos que no fueron capaces de complementar dicho fenotipo por lo que se incluyeron en el mismo grupo de complementación que el *mnn6*.

Cada uno de los 9 mutantes que quedaban en este grupo se cruzó con todos los demás determinándose la capacidad de los cigotos para teñirse con el colorante alcian blue. Estos nueve mutantes se separaron en dos grupos de complementación: *ldb1*, con 3 representantes (*ldb1-1*, *ldb1-2* y *ldb1-3*) y *ldb2* con 6 (*ldb2-1*, *ldb2-2*, *ldb2-3*, *ldb2-4*, *ldb2-5* y *ldb2-6*).

Mutantes pertenecientes al grupo II (ver tabla III.2)

De los 14 mutantes incluidos en este grupo, tres presentaron problemas en la esporulación de las estirpes diploides construidas al cruzarlos con la cepa parental por lo que no se continuó con su análisis. Los once restantes se repartieron en 8 grupos de complementación (denominados ldb3 a ldb10} con los siguientes representantes cada uno: ldb3: 2 (ldb3-1 y ldb3-2), ldb4: 3 (ldb4-1, ldb4-2 y ldb4-3) y del ldb5 al ldb 10: un solo representante cada uno.

III.3.4. ANÁLISIS DE POSIBLES DEFECTOS EN LA ELONGACIÓN Y/O TRANSFERENCIA DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS A LA PROTEÍNA. PRUEBAS ADICIONALES DE COMPLEMENTACIÓN.

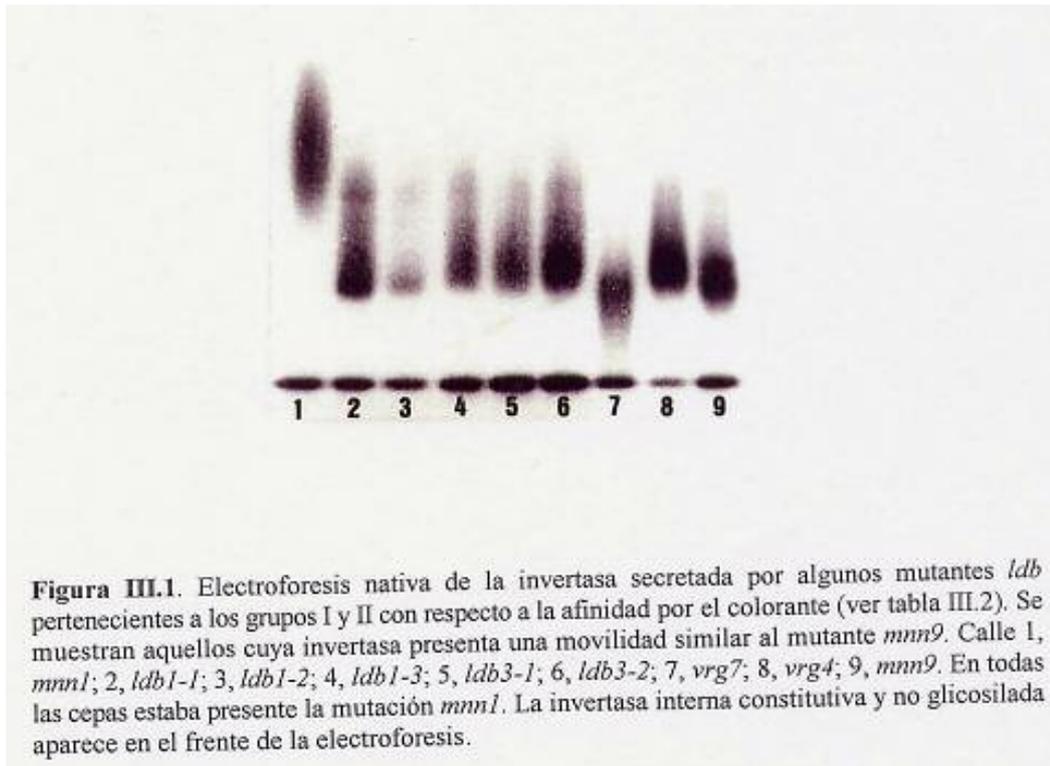
La invertasa de *S. cerevisiae* contiene 14 sitios potenciales de N-glicosilación 13 de los cuales pueden estar glicosilados, aunque la enzima secretada generalmente posee solamente 9-10 cadenas de carbohidrato (Reddy y cols, 1988). El tamaño de las cadenas varía considerablemente de unos sequones a otros: oscila entre $\text{Man}_{8-11}\text{-GlcNAc}_2$ en los más pequeños y $\text{Man}_{>50}\text{-GlcNAc}_2$ en los más grandes (Ziegler y cols, 1988).

En un gel nativo y a temperatura ambiente, la invertasa secretada por la estirpe silvestre aparece como una banda difusa, mientras que la invertasa del mutante *mnn1 mnn9* forma una banda relativamente discreta de menor peso molecular. La invertasa interna, constitutiva y no glicosilada, migra como una banda bien definida cerca del frente de la electroforesis (ver Fig.III.1 y III.2).

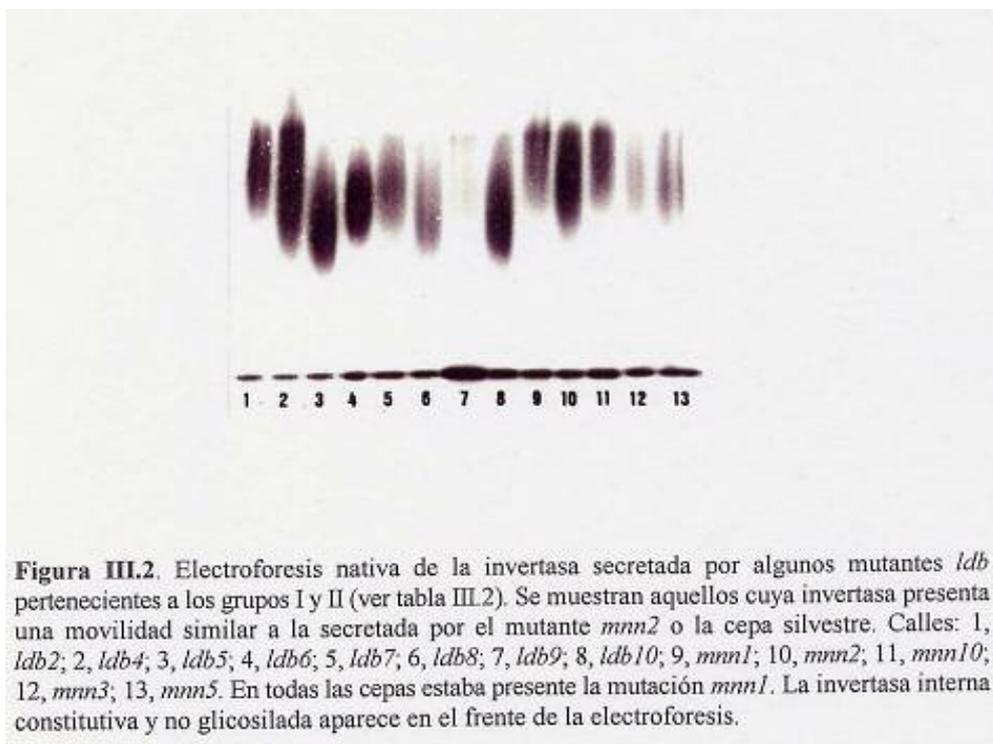
Una posible razón para la baja incorporación de fosfato por parte de nuestros mutantes podría ser una reducción en el número y/o tamaño de las cadenas de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a las glicoproteínas. Para examinar esta posibilidad, se analizó la migración de la invertasa glicosilada de todos los mutantes seleccionados mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones nativas, utilizando como controles la invertasa de la cepa parental y la de la cepa silvestre.

Grupos I y II (ver tabla III.2)

En la Figura III. 1 se muestran los resultados obtenidos con los mutantes *ldb1-1*, *ldb1-2* y *ldb 1-3* del grupo I y *ldb3-1* y *ldb3-2* del grupo II. Todos ellos presentaron un modelo de migración de la invertasa muy similar al de las estirpes *mnn9*, *vrg7* y *vrg4* que también se han incluido en la figura.



En la Figura III.2 se presentan los resultados obtenidos con el resto de mutantes de estos grupos, todos los cuales presentaban un patrón similar al mutante *mnn2* o a la cepa parental.



Se observa que *ldb5*, *ldb6*, *ldb8* y *ldb10* (calles 3, 4, 6 y 8) sintetizan una invertasa que migra algo más rápido que la de la cepa parental (calle 9), mostrando un patrón

similar al de la enzima secretada por mnn2, mnn10 o mnn3 (calles 10,11 y 12). Finalmente, la invertasa sintetizada por el resto de los mutantes ldb poseía un tamaño muy similar y a veces prácticamente indistinguible al de la cepa parental (calle 9). Es interesante resaltar que el mutante ldb9 (calle 7) debe presentar algún problema en la desrepresión de la invertasa o en su actividad ya que, aunque se cargó el doble de volumen de muestra (notándose un aumento proporcional en la banda correspondiente a la invertasa interna), la banda correspondiente a la invertasa glicosilada era de menor intensidad que en el resto de los casos. En esta figura se ha incluido también el mutante mnn5 ya que su fenotipo, con respecto a la unión a alcian blue, era similar al de los mutantes pertenecientes al grupo II.

En este experimento también se analizó la movilidad electroforética de los mutantes que incluimos en los grupos del mnn4 y mnn6. En todos los casos el tamaño resultó indistinguible del de la enzima secretada por la cepa parental mnn1 (resultados no mostrados).

Todos los mutantes de los grupos I y II utilizados en este experimento, así como los controles, llevaban, además, la mutación mnn1.

A la vista de los resultados obtenidos, decidimos realizar nuevos ensayos de complementación cruzando cada uno de estos mutantes ldb con otros mutantes aislados previamente que presentaban un patrón de movilidad electroforética de la invertasa y/o afinidad por el alcian blue similar a ellos. En todos los casos se analizaban ambas características fenotípicas (tamaño de la invertasa y afinidad por el colorante) en los diploides heterocigóticos, encontrándose que siempre aparecían unidas, es decir, la recuperación del tamaño de la invertasa de la cepa parental, siempre iba asociada con la recuperación de la afinidad por el alcian blue.

Los mutantes ldb 1-1 y ldb3-1, representantes de los grupos de complementación que sintetizaban invertasa de tamaño similar a la sintetizada por el mutante mnn9, se cruzaron con mnn9, vrg7 y vrg4 (en todos los casos con la mutación mnn1). Encontramos que el ldb3-1 y el vrg4 pertenecían al mismo grupo de complementación ya que los diploides heterocigóticos no recuperaban el fenotipo silvestre, es decir, no complementaban sus mutaciones. En todos los casos se comprobó la capacidad de los diploides para esporular.

Los experimentos de complementación con los mutantes resistentes a vanadato se realizaron en el laboratorio del Dr. Ballou en la Universidad de California en Berkeley, bajo la supervisión de Lun Ballou quien amablemente nos proporcionó dichos mutantes.

El resto de los mutantes se cruzaron con el *mnn2*, *mnn3*, *mnn5* y *mnn10* (*mnn5* se incluyó porque muestra baja afinidad por el alcian blue, aunque el patrón de migración de su invertasa no difiere significativamente del de la cepa silvestre). El mutante *ldb8* resultó ser alélico al *mnn2* ya que en el diploide heterocigótico no se recobró el tamaño de la invertasa ni la afinidad por el colorante, característicos de la cepa parental. En el resto de los diploides construidos en los distintos cruces se producta complementación de ambas mutaciones, recuperándose el fenotipo de la cepa parental.

La invertasa secretada por el *vrg2* y *vrg3* también muestra un modelo de migración similar al del *ldb5*, *ldb6*, *ldb8* y *ldb10* (Ballou y cols, 1991). Estos mutantes no se incluyeron en este experimento porque ninguno de los mutantes *ldb* mencionados presentaba resistencia al vanadato (ver más adelante, apartado III.3.5), lo cual indicaba que deberían pertenecer a diferentes grupos de complementación. Los mutantes *och1* y *och2* aislados por Nagasu y cols, (1992) también presentaban una invertasa glicosilada de tamaño semejante a los mutantes que nos ocupan, sin embargo, hemos descartado la posibilidad de que sean alélicos con ellos porque *och1* y *och2* fueron descritos como termosensibles para el crecimiento mientras que los aislados por nosotros son viables y expresan las mutaciones a 30°C.

Debemos resaltar que el *ldb9*, cuyas células presentaban una morfología muy alterada, secretaba una invertasa de tamaño similar a la cepa silvestre, lo cual sugiere que dicho defecto no se debe a alteraciones en la maquinaria de glicosilación de manoproteínas sino posiblemente a alteraciones en la biosíntesis de otros componentes de la pared celular.

Mutantes pertenecientes al grupo III (ver tabla III.2)

La electroforesis en condiciones nativas de la invertasa glicosilada sintetizada por los mutantes del grupo III, con coloración semejante al silvestre, reveló que en todos ellos el patrón electroforético era indistinguible del de la cepa parental (resultados no mostrados). Este grupo es quizás el menos atractivo porque en ocasiones resulta bastante difícil diferenciarlo de la cepa parental (*mnn1*) por la prueba de la tinción con alcian blue, aunque hay que tener en cuenta que si hubiéramos aislado un mutante en el gen

estructural de alguna de las posibles manosil-fosfatotransferasas presentes en *S. cerevisiae*, es probable que estuviera incluido entre estos 10 mutantes. Sin embargo, su análisis detallado queda fuera del presente trabajo.

III.3.5. RESISTENCIA A VANADATO.

Se ha demostrado que la resistencia a vanadato suele estar asociada con defectos en la maquinaria de glicosilación (Ballou y cols, 1991). Por otra parte, ya se ha visto que el mutante *ldb3* resultó ser alélico con el *vrg4*, uno de los resistentes a vanadato que habían sido aislados previamente. Por estas razones, nos pareció interesante determinar el comportamiento de todos los grupos de complementación *ldb*, con respecto a la presencia de vanadato en el medio, comparándolos con los mutantes *mnn1* (cepa parental no resistente), *mnn1 vrg7* y *mnn1 vrg4* (seleccionados como resistentes) así como con *mnn1 mnn9* el cuál muestra también una alta resistencia a vanadato en el medio aunque no fue seleccionado por esa característica (Ballou y cols, 1991). Para ello, se prepararon placas de YEPD con concentraciones de vanadato de 2 mM, 5 mM y 10 mM sembrándose todos los mutantes a cada una de las concentraciones y determinando su capacidad para crecer tras 48 horas de incubación.

El *mnn1*, que se utilizó como control, se comportó igual que la cepa silvestre, es decir, crecía a 2 mM pero no a 5 ni a 10 mM. Los mutantes *mnn1 vrg7* y *mnn1 mnn9* crecieron a las tres concentraciones mientras que *mnn1 vrg4* creció a 2 y 5 mM pero no a 10 mM. Estos resultados eran idénticos a los publicados previamente por Ballou y cols, (1991).

El *ldb3*, que es alélico con el *vrg4* con respecto a la unión de alcian blue y tamaño de la invertasa, se comportó de la misma forma, es decir, creció también a 2 y 5 mM pero no a 10 mM. En el grupo de complementación *ldb1*, encontramos una aparente contradicción puesto que dos de los componentes de este grupo, *ldb1-1* y *ldb1-3*, no mostraron resistencia, mientras que el *ldb 1-2* era capaz de crecer a 2 mM y 5 mM. Esto parecía indicar que los defectos en la glicosilación y la capacidad para crecer en 5 mM de vanadato del mutante *ldb1-2*, eran consecuencia de dos mutaciones diferentes. Una forma sencilla de demostrar esta hipótesis es determinar la resistencia a vanadato del diploide heterocigótico construido al cruzar el *ldb1-1* o *ldb1-3* con el *ldb1-2*. El diploide se comportó como la cepa parental con respecto a este carácter, es decir, crecía

solamente en las placas que contenían vanadato a la concentración de 2 mM. Naturalmente se comprobó que dicho diploide seguía comportándose como mutante con respecto a la unión de alcian blue y tamaño de la invertasa. Este resultado parecía indicar que en *ldb1-2* la resistencia a vanadato podría ser separable de la mutación responsable del defecto en la glicosilación.

Para comprobar la hipótesis mencionada, el mutante *ldb1-2* se cruzó con la cepa parental, obteniéndose esporas a partir del diploide. En varias tetradas de este cruce, se determinó la capacidad de unión al colorante alcian blue, el tamaño de la invertasa secretada y la capacidad para crecer en presencia de vanadato en el medio de cultivo a una concentración de 5 mM.

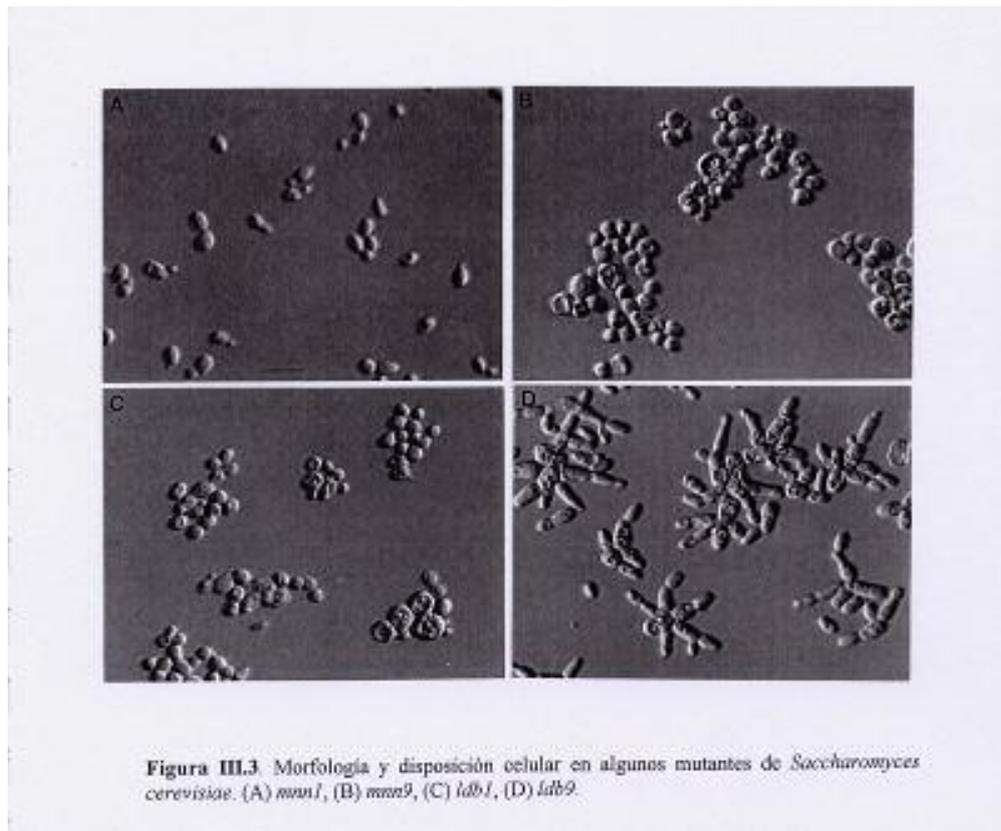
En todos los casos se encontró que el tamaño pequeño de la invertasa y la baja afinidad por el alcian blue, aparecían ligados en la misma espora mientras que la resistencia al vanadato segregó independientemente de las otras dos. En consecuencia, el grupo de complementación *ldb1*, era tan sensible a la presencia de vanadato en el medio como la cepa parental.

III.3.6. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS MUTANTES.

Las manoproteínas de la pared celular de levaduras juegan un papel importante en la morfología e integridad celular. Alguno de los mutantes afectados en los procesos de glicosilación presentan alteraciones morfológicas evidentes al observarse al microscopio óptico. El caso más claro es quizás el del mutante *mnn9*, cuyas células presentan una morfología irregular, algunas se lisan durante el crecimiento y la mayoría aparecen formando grumos (Tsai y cols, 1984). Algunos de los mutantes *alg* también presentan formas globosas características, perfectamente visibles al microscopio óptico. Por esta razón, se observaron preparaciones de cada uno de los mutantes *ldb* al microscopio de contraste de fases.

Sólo dos de los grupos de complementación presentaron morfología claramente alterada con respecto a la de la cepa parental: *ldb1* y *ldb9*. En la Fig III. 3 se muestra que el mutante *ldb1* (panel C) presentaba un fenotipo similar al del *mnn1 mnn9* (panel B) aunque los grumos parecían de tamaño ligeramente inferior. El *ldb9* presentaba células completamente deformes, muy alargadas, a veces ramificadas y en grumos (panel D), sin embargo, eran capaces de crecer, aunque con alguna dificultad, en ausencia de un estabilizador osmótico.

El resto de los grupos de complementación, exhibían una morfología celular difícilmente distinguible de la cepa parental *mnn1* que se muestra en el panel D como control.



III.3.7. ESTRUCTURA DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS DEL MUTANTE *ldb2*

Los mutantes pertenecientes al grupo I, *ldb1* y *ldb2*, parecían los más indicados para el estudio de la estructura de los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente porque mostraban la reducción más clara en la afinidad por el colorante alcian blue, entre todos los grupos de complementación aislados. En consecuencia, se esperaba encontrar la reducción más drástica en la incorporación de grupos fosfato a los N-oligosacáridos.

En un análisis preliminar, se determinó la relación manosa/fosfato en manoproteínas purificadas a partir de los mutantes *ldb1-3* y *ldb2-1*. Como control, se utilizaron manoproteínas purificadas a partir de la cepa silvestre y del mutante *mnn6*. En la cepa silvestre la relación obtenida fue 35 mientras que en el mutante *mnn6* el valor fue 163. Estos resultados estaban de acuerdo con valores publicados previamente (Karson y Ballou, 1978). Por el contrario, en *ldb1-3* y *ldb2-1*, sólo se detectaron cantidades traza de fosfato, haciendo difícil establecer una relación válida. A tal relación

le fue asignado un valor superior a 500. Aunque estos datos confirmaban nuestras suposiciones sobre la ausencia de fosfato en las manoproteínas de estos mutantes, se realizó un análisis más exhaustivo purificando los N-oligosacáridos y sometiénolos a ^1H RMN:

El mutante *ldb2* mostraba un patrón de migración de la invertasa indistinguible de la cepa parental *mnn1* (ver Fig. III.2). Esto parecía indicar que los N-oligosacáridos de las manoproteínas debían ser de tamaño idéntico o muy parecido a los de la cepa parental *mnn1*. Para simplificar el análisis del defecto fenotípico de la mutación *ldb2* en lo referente a la incorporación de fosfato, decidimos reducir el tamaño de los N-oligosacáridos introduciendo la mutación *mnn9*. Este mutante sintetiza oligosacáridos que carecen prácticamente de la cadena externa, la cual está reducida a una sola rama con dos manosas unidas al núcleo, aunque la maquinaria de fosforilación no está afectada (Tsai y cols, 1984; Hernández y cols, 1989a) (ver Introducción General). Utilizando técnicas genéticas estándar, construimos el mutante *mnn9 ldb2-1*, que en realidad es un triple mutante por haberse obtenido el *ldb2-1* usando como cepa parental el mutante *mnn1* (ver apartado III.3.1). La ausencia de manosas terminales en las cadenas laterales de los oligosacáridos debida a la mutación

mnn1 resulta muy ventajoso en el estudio del defecto fenotípico que nos ocupa, ya que de una parte hace más fácil la distinción entre la presencia o no de grupos fosfato en el oligosacárido y de otra, disminuye la heterogeneidad del mismo.

Las manoproteínas de este mutante se solubilizaron y purificaron según se indica en el apartado correspondiente del apéndice y a continuación se trataron con endo H para liberar los N-oligosacáridos. La mezcla de reacción se cromatografió en una columna (1.5 x 170 cm) empaquetada con Bio-Gel P4 y se eluyó en acetato amónico 0.1 M. El perfil de carbohidrato obtenido se muestra en la Fig. III.4, panel A.

Se observa que en el volumen vacío de la columna eluyó un gran pico de carbohidrato (I) que correspondía a la proteína unida a los oligosacáridos resistentes a endo H (principalmente O-oligosacáridos). Los oligosacáridos liberados por endo H eluyeron más tarde en un pico (III) incluido en la columna. En el panel C de la misma figura se muestra el perfil de carbohidrato obtenido para las manoproteínas del mutante *mnn1 mnn9* que se usó como control. En este caso, el material liberado por la endo H eluyó en 2 picos (II y III). Estudios previos realizados por el grupo de Ballou (Tsai y cols, 1984; Hernández y cols, 1989a,b) demostraron que el pico II contenía todo el material fosforilado (mono- y difosfatos, ambos en formas mono- y diéster), mientras que el pico III incluía todo el carbohidrato neutro. Según esto, todo el material liberado por la endo H en el mutante *mnn1 mnn9 ldb2-1* (pico III de la Fig. III.4, panel A), que eluye en la misma posición que el pico III del panel C, debería ser neutro. El análisis de la región de los protones anoméricos del espectro ^1H RMN corroboró esta suposición. En el espectro mostrado en la Fig.III.5, se puede apreciar la ausencia de las señales

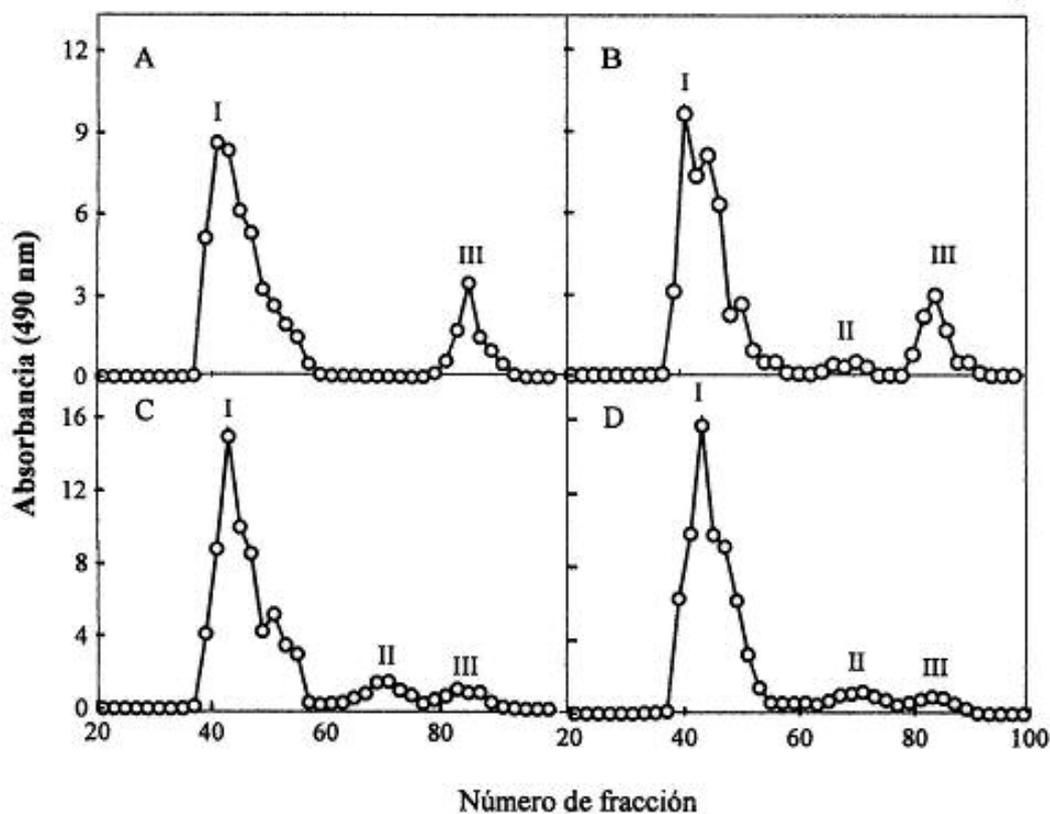
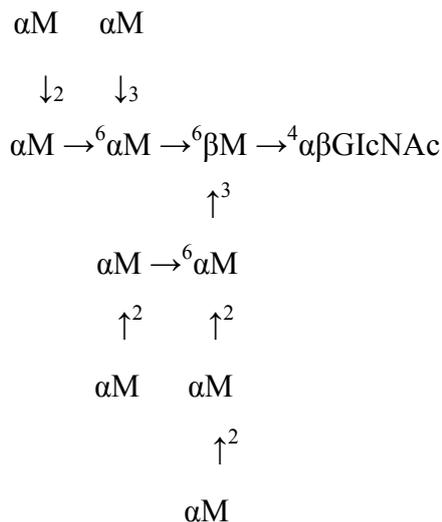


Figura III.4. Cromatografías de filtración en una columna de Bio-Gel- P4 (1.5x170cm) de las manoproteínas de diferentes mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, digeridas previamente con endo H. La elución se llevó a cabo con acetato amónico 0.1 M. El perfil de carbohidrato se determinó mediante el método del fenol-ácido sulfúrico. (A) *mnn1 mnn9 ldb2-1*, (B) *mnn1 mnn9 mnn6*, (C) *mnn1 mnn9*, (D) *mnn1 ldb1-3*.

características de una molécula fosforilada (Hernández y cols, 1989a, b) (ver apéndice). Las señales corresponden a un oligosacárido neutro formado por M_{10} .GlcNAc con la estructura:



ESTRUCTURA I

Estos resultados, parecen indicar que el único efecto de la mutación *ldb2* sobre los N- oligosacáridos era impedir la incorporación de grupos fosfato. Es importante resaltar que en los mutantes *mnn4* y *mnn6* descritos previamente como afectados en el proceso de fosforilación, se detectó, sin embargo, una cierta cantidad de grupos fosfato unidos a los N-oligosacáridos (Hernández y cols, 1989b). Por el contrario, en *ldb2* no hemos sido capaces de detectar carbohidrato en la posición esperada para la fracción fosforilada. El cromatograma obtenido con el mutante *mnn1 mnn9 mnn6* se muestra, como control, en el panel B de la Fig. III.4.

III.3.8. ESTRUCTURA DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS DEL MUTANTE *ldb1*.

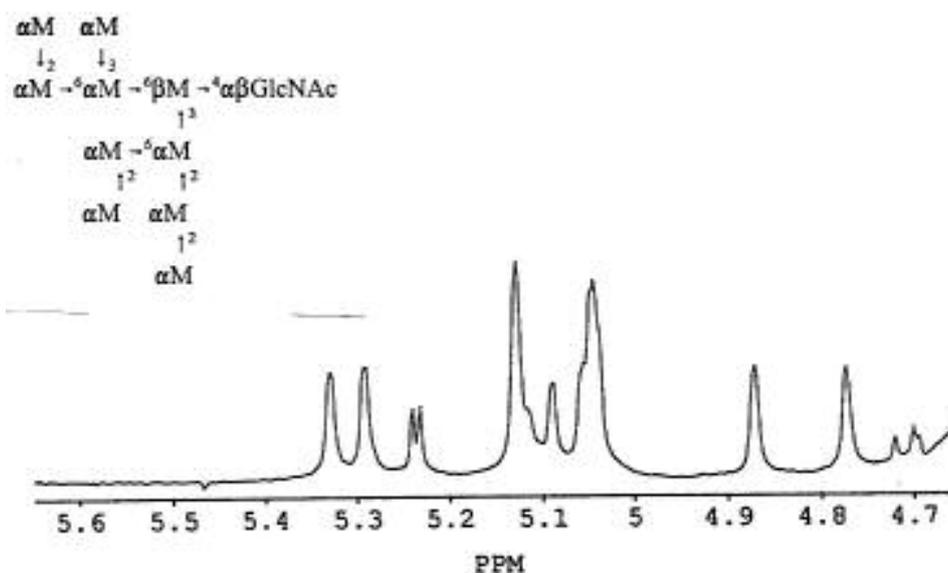
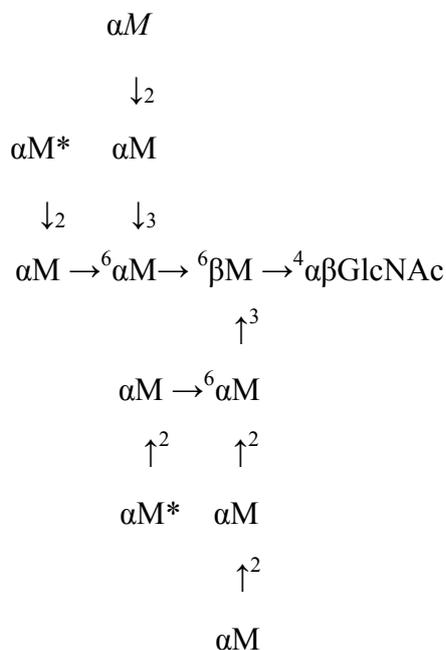


Figura III.5. Espectro de ^1H RMN de los N-oligosacáridos neutros sintetizados por el mutante *mnn1 mnn9 ldb2* (pico III de la Fig. III.4A) liberados al tratar sus manoproteínas con endo H. Se muestra solamente la región del espectro correspondiente a los protones anoméricos.

El patrón electroforético de la invertasa glicosilada, sintetizada por los mutantes incluidos en el grupo de complementación *ldb1*, sugería una reducción significativa en el tamaño de las cadenas de sus N-oligosacáridos. Por esta razón, decidimos analizar directamente los N-oligosacáridos a partir de las manoproteínas de la cepa *mnn1 ldb 1-3* sin introducir mutaciones adicionales. Las manoproteínas purificadas, se trataron con endo H y se cromatografiaron en una columna de Bio-Gel P4 (1.5 x 170 cm) eluída con acetato amónico 0.1 M. El perfil de carbohidrato obtenido en las fracciones se muestra en la Fig. III.4, panel D.

Se aprecia que es prácticamente idéntico al de los N-oligosacáridos del *mnn1 mnn9* mostrados en la Fig. III.4, panel C. En consecuencia, parecía que una parte, cercana al 50%, de los oligosacáridos sintetizados por este mutante estaban fosforilados (pico II) mientras que el resto eran neutros (pico III) y todos ellos de tamaño similar a los sintetizados por el mutante *mnn1 mnn9*. Este resultado era, en cierto modo, sorprendente puesto que ya se ha indicado que *ldb1* mostraba una baja afinidad por el alcian blue, con lo cual, esperábamos encontrar una reducción notable, si no total, en la incorporación de grupos manosil-fosfato en los N-oligosacáridos. El material del pico II (Fig. III.4, panel D), presuntamente fosforilado, se pasó por una columna de intercambio iónico empaquetada con QAE-Sephadex para separar las formas mono- y difosforiladas.

Sorprendentemente, la columna no retuvo al carbohidrato (resultados no mostrados) puesto que todo él eluyó en el lavado inicial de la columna previo a la aplicación del gradiente. De acuerdo con este resultado, este material (incluido en el pico II) debe carecer de grupos fosfato, es decir, es neutro y en consecuencia la elución en esa posición en la columna de Bio-Gel P4 podría deberse a su mayor peso molecular. Los espectros de ^1H RMN del material incluido en los picos II y III de la Fig. III.4, panel D, nos permitió confirmar esta última posibilidad (se muestran en la Fig. III.6). El espectro mostrado en el panel A corresponde al pico III y las principales señales se corresponden con una estructura similar a la sintetizada por el mnn1 mnn9 ldb2-1, aunque ligeramente modificada y con una manosa más (ver estructura II). La señal a $\delta 5.09$ en la Fig. III. 5 (manosa B₂; en el esquema I) ha cambiado a $\delta 5,38$ como consecuencia de estar sustituida por la manosa B₃, una manosa unida en $\alpha(1,2)$ (en *itálica* en la estructura II). La señal a $\delta 5.12$ de la Fig. III.5 corresponde a dos manosas unidas en $\alpha(1,6)$ y sustituidas en $\alpha(1,2)$ (C₁ y d₁), mientras que esta misma señal en la Fig.III.6, panel A, corresponde a una sola manosa. La otra manosa ha cambiado a $\delta 4.90$ - $\delta 4.92$, es decir, la posición esperada para una manosa unida en $\alpha(1,6)$ pero no sustituida. Esto significa que en la estructura II debe faltar una de las dos manosas unidas en $\alpha(1,2)$ marcadas con un asterisco (C₂ o d₂).



ESTRUCTURA II

El espectro de ^1H RMN del material del pico II se muestra en el panel B de la Fig. III.6. Difiere del obtenido para el pico III en un aumento de la señal a $\delta 4.90$ lo cual revela la presencia de una larga cadena externa constituida por manosas unidas en $\alpha(1,6)$ y sin ramificaciones. Esta estructura sin ramificar es característica de las manoproteínas sintetizadas por cepas con la mutación *mnn1*. Por la amplitud de la señal en el espectro a $\delta 4.90$, podemos asignar un promedio de 8-10 manosas a la cadena externa (estructura III).

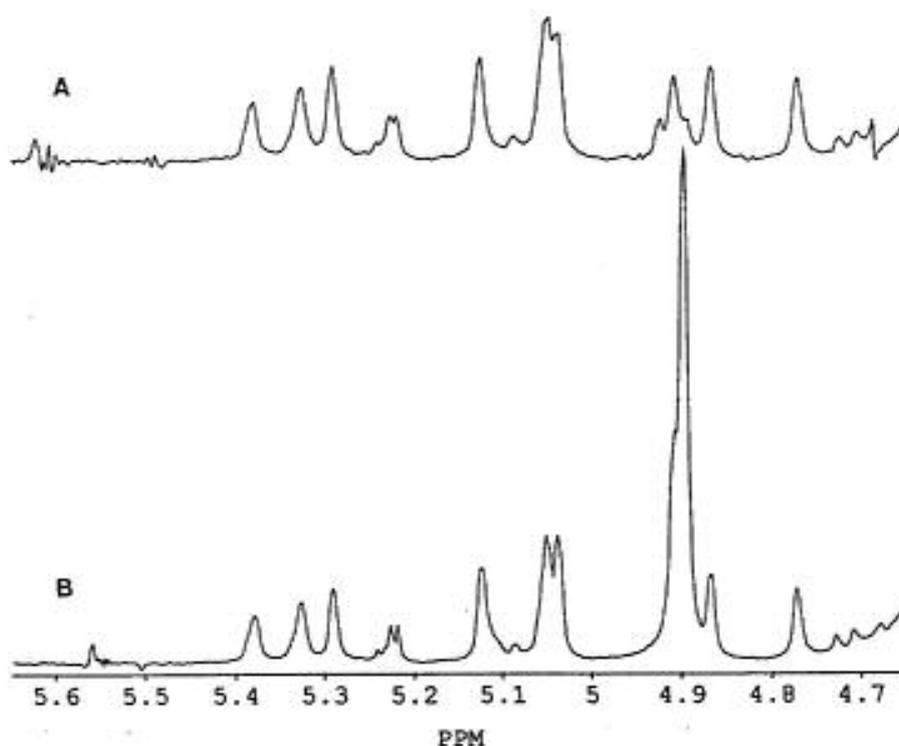
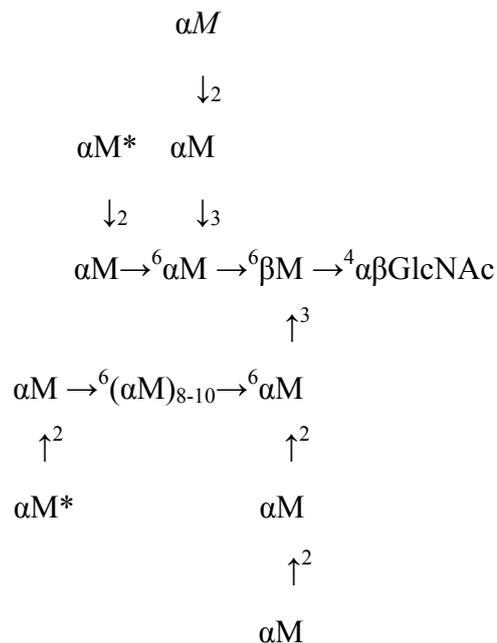


Figura III.6. Espectros de ^1H RMN de los oligosacáridos sintetizados por el mutante *lab1-3* liberados al tratar sus manoproteínas purificadas con endo H y separados en una columna de filtración (Bio-Gel-P4). (A) fragmento de menor peso molecular (pico III en la Fig.III.4D), (B) fragmento de mayor peso molecular (pico II en la Fig.III.4D). Se muestra solamente la región del espectro correspondiente a los protones anoméricos.



ESTRUCTURA III

La longitud de la cadena externa es similar a la de los mutantes de la clase del *mnn1* (Ballou y cols, 1989). Por las mismas razones expuestas en el caso de la estructura II, sólo una de las manosas señaladas con un asterisco está presente en la estructura III.

Los diferentes defectos estructurales en los N-oligosacáridos del mutante *ldb1-3* sugerían que podían ser consecuencia de más de una mutación, a pesar de que todas las cepas utilizadas en este estudio se cruzaron dos veces con la cepa parental *mnn1* antes de comenzar los estudios estructurales. Con el fin de descartar esta posibilidad, se purificaron manoproteínas a partir de los mutantes *mnn1 ldb1-1* y *mnn1 ldb1-2*, los otros dos componentes del grupo de complementación *ldb1*. Las manoproteínas se trataron con endo H, y los N-oligosacáridos liberados se fraccionaron igual que en el caso del mutante *ldb1-3* y se analizaron por ^1H RMN. En la Fig. III.7 se muestran los espectros correspondientes a los oligosacáridos de mayor peso molecular sintetizados por estos mutantes. En ambos casos, los espectros corroboraban los defectos señalados para los oligosacáridos equivalentes sintetizados por *ldb1-3*: (a), cadena externa no ramificada de longitud intermedia (señal a $\delta 4.90$) (b), presencia de la manosa B₃ en casi el 100% de las moléculas (señal a $\delta 5.38$) (c) presencia de sólo una de las manosas señaladas con un asterisco en la estructura III (la señal a $\delta 5.12$ integra para una sola

manosa) (d) total ausencia de grupos fosfato, ya que las moléculas no fueron retenidas en QAE-Sephadex y las señales del espectro eran las esperadas para una molécula neutra. Los espectros correspondientes a los oligosacáridos de menor peso molecular sintetizados por estos dos mutantes también eran prácticamente idénticos a los obtenidos para el mutante *ldb1-3* (resultados no mostrados).

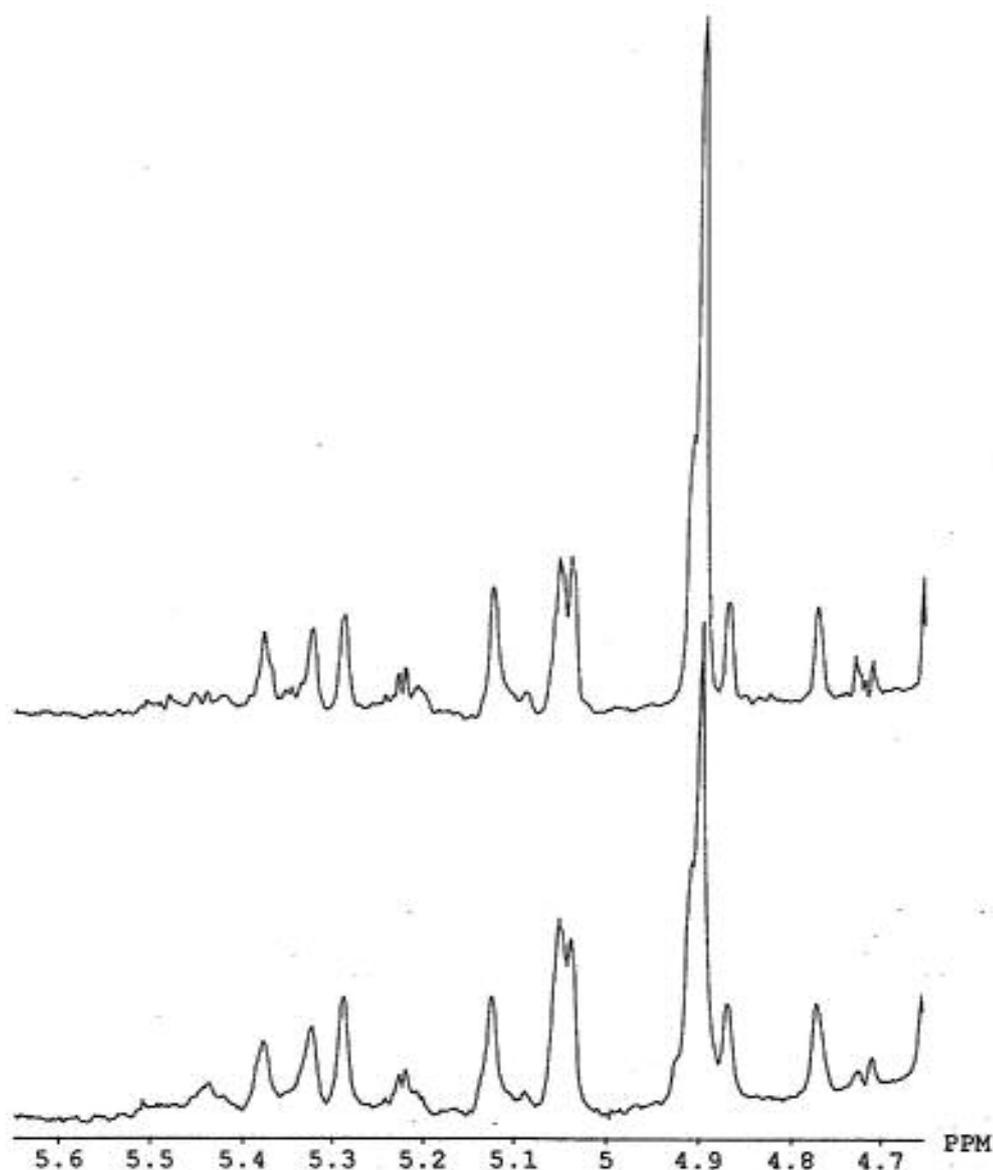


Figura III.7. Espectros de ^1H -RMN de los oligosacáridos de mayor peso molecular liberados por endo H a partir de manoproteínas sintetizadas por miembros del grupo de complementación *ldb1*. (A) *mn1 ldb1-1*, (B) *mn1 ldb1-2*. Se muestra solamente la región del espectro correspondiente a los protones anoméricos.

Debe mencionarse que los mutantes *ldb1-1* y *ldb1-3* fueron aislados a partir del tubo A₁ (ver apéndice) por lo que podrían pertenecer al mismo clon original. Sin embargo, *ldb1-2* se aisló a partir del tubo A₂, por lo que procede de un clon diferente y

es muy improbable que las mismas dos o más mutaciones se acumulen en una sola célula en dos acontecimientos mutagénicos diferentes. Aun asumiendo que este fenotipo fuera consecuencia de más de una mutación, todas ellas deberían estar ligadas puesto que no se separaron después de dos retrocruzamientos con la cepa parental. A la vista de todos estos datos, se puede concluir que las características fenotípicas del mutante *ldb1* son todas consecuencia de una sola mutación.

Con el fin de determinar en cuál de las dos posiciones posibles se encontraba la manosa señalada con un asterisco en la estructura III, el oligosacárido de mayor tamaño sintetizado por el mutante *ldb1-3* (material del pico II de la Fig. III.4, panel D) fue digerido con una $\alpha(1,6)$ endomananasa que hidroliza la cadena externa originando una mezcla de manosa, manobiosa y manotriosa (Nakajima y cols, 1976). El material digerido se separó en una columna de Bio- Gel P4 (1.5 x 100 cm), eluyendo con agua con el fin de separar el núcleo de los mono- y disacáridos (datos no mostrados). El fragmento del núcleo se recogió y se sometió a ^1H -RMN obteniéndose el espectro que se muestra en la Fig. III.8. La señal a $\delta 4.90$ de la Fig. III.6, panel B, ya no aparece lo cual significa que la cadena externa no ramificada ha sido reducida a una mezcla de una o dos manosas ($\delta 4.90$ - 4.92). Como la señal a $\delta 5.12$ aún está presente en la molécula, se la estructura IV para los fragmentos del núcleo y la estructura V para el oligosacárido inicial antes de la digestión.

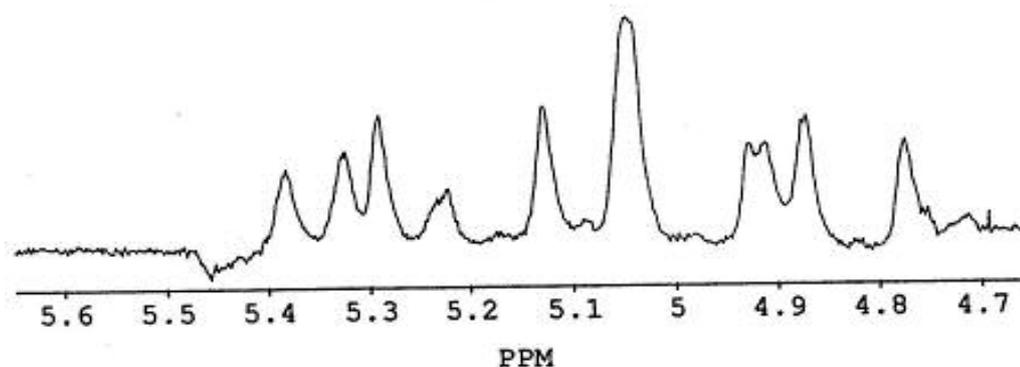
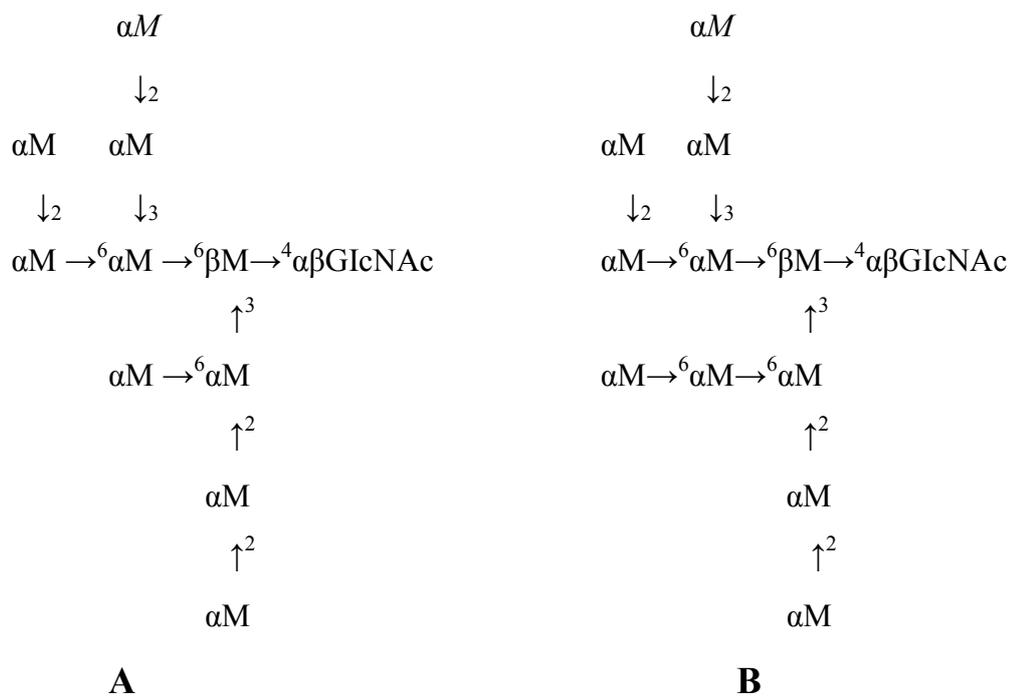
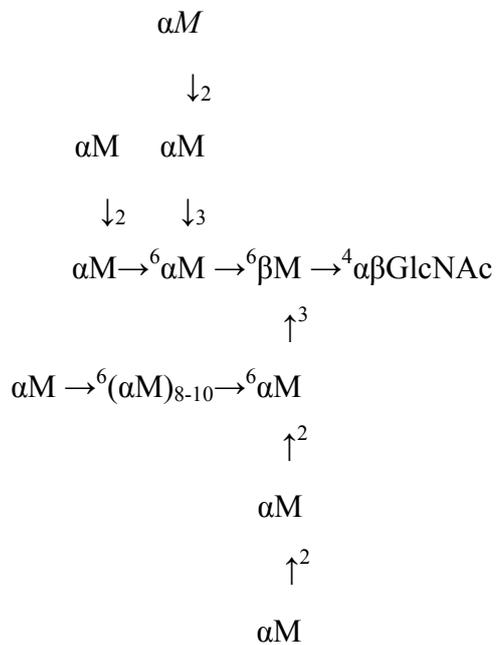


Figura III.8. Espectro de ^1H -RMN del fragmento correspondiente al núcleo interno de los oligosacáridos de mayor peso molecular liberados por endo H a partir de las manoproteínas del mutante *mm1 ldb1-3*. El material incluido en el pico II de la Fig. III.4D se recogió, concentró y posteriormente fue digerido con una $\alpha(1,6)$ endomanosidasa. La muestra digerida se cromatografió en una columna de Bio-Gel P4 (1.5x100 cm), se recogieron las fracciones que contenían el fragmento del núcleo y se analizó su estructura mediante ^1H -RMN. Se muestra solamente la región del espectro correspondiente a los protones anoméricos.

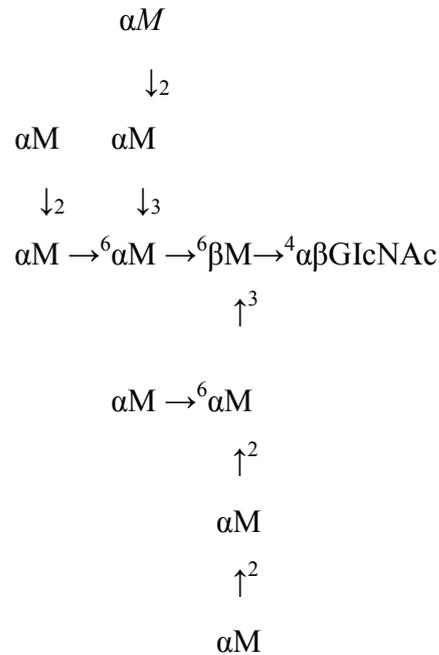


ESTRUCTURA IV



ESTRUCTURA V

Estos datos sugerían que todas las manosas añadidas en el retículo endoplásmico (representadas con letras mayúsculas en el esquema I) están presentes en las moléculas maduras. Según esto, en la estructura II, de las dos manosas marcadas con un asterisco, debía faltar la manosa localizada en la posición d2. En consecuencia, el oligosacárido de menor peso molecular sintetizado por este mutante (material del pico III de la Fig. III.4 panel D), presentaría en realidad la estructura VI.



ESTRUCTURA VI

III.4. DISCUSIÓN.

En este trabajo, hemos aislado 8 nuevos grupos de complementación de mutantes no condicionales de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos en la incorporación de fosfato en los N-oligosacáridos. El método de selección utilizado parece bastante específico puesto que la proporción de mutantes obtenidos fue razonablemente alta. Algunos de los mutantes aislados inicialmente, resultaron ser alélicos con otros mutantes aislados previamente por otros métodos: *mnn2*, *mnn4*, *mnn6*, y *vrg4*. Las características más representativas de los grupos de complementación nuevos se muestran en la tabla III. 3.

Tabla III.3. Algunas características de los nuevos grupos de complementación

Grupo de complement.	Número de aislamientos	Valor unión al colorante	Tamaño de la Invertasa	Crecimiento 5mM Van.	Alteración* morfológica
ldb1	3	0-1	mnn9	-	+
ldb2	6	0-1	wt	-	-
ldb4	3	3-4	wt	-	-
ldb5	1	2-3	mnn2	-	-
ldb6	1	3-4	mnn2	-	-
ldb7	1	3-4	wt	-	-
ldb9	1	2-3	wt	-	+++
ldb10	1	2-3	mnn2	-	-

*El signo menos (-) indica que las alteraciones en la forma no son evidentes. El número de signos mas (+) indica el grado de alteración.

La reducción en la incorporación de fosfato por los mutantes descritos en este trabajo, podría deberse a alguna de las siguientes posibilidades:

a) Defectos en la(s) transferasa(s) responsable(s) de la incorporación de los restos manosil-fosfato. De los estudios estructurales y de los resultados presentados en el capítulo V de esta memoria, parece deducirse la existencia de dos manosil-P-transferasas distintas ya que los grupos fosfato (*) se encuentran en dos secuencias aparentemente diferentes: $\text{Man} \rightarrow^2 \text{Man}^* \rightarrow^6 \text{Man}$ y $\text{Man} \rightarrow^2 \text{Man}^* \rightarrow^2 \text{Man}$ (Hernández y cols, 1989b). Precisamente los mutantes mnn4 y mnn6, que presentan una reducción en la incorporación de fosfato próxima al 90%, parecen tener su defecto en alguna proteína que participe en la regulación del proceso y no en la(s) enzima(s) que catalizan directamente la transferencia (Hernández y cols, 1989b).

b) Defecto en las manosiltransferasas que participan en la síntesis de la cadena externa. En este sentido, conviene señalar que de todos los mutantes aislados con defectos en la síntesis de la cadena externa, tan solo en och1 y mnn1 se ha demostrado que presentan su defecto en genes que codifican transferasas (Nakayama y cols, 1992; Yip y cols, 1994).

c) Cualquier defecto en proteínas implicadas en el transporte de forma que las manoproteínas no sean accesibles a la(s) transferasa(s) de grupos manosil-fosfato, u

otras manosiltransferasas que sinteticen los aceptores de las anteriores, en su ruta de secreción a través de las cisternas del aparato de Golgi. En los últimos años, se han identificado numerosos genes y proteínas que colaboran en el proceso de secreción. Cualquier mutación no letal en alguna de ellas podría generar un fenotipo seleccionable por el método utilizado en este trabajo. Algunos de los mutantes *mnn* y *vrg* parecen ser de este tipo (Ballou, 1990; Ballou y cols, 1991).

El mutante *ldb2* presenta una cadena externa de tamaño similar al de la cepa silvestre, por tanto, la posibilidad (b) debe ser descartada. Este mutante podría ser un candidato a presentar su defecto en una manosil-P-transferasa, en el caso de que una sola enzima fuera responsable de la transferencia de todos los grupos fosfato, sin embargo, si existieran dos enzimas diferentes, como parece muy probable, la posibilidad (a) parece también descartable quedando como explicación más aceptable para este fenotipo un defecto en el transporte a través de las cisternas del aparato de Golgi (posibilidad (c)).

El mutante *ldb1* presenta un fenotipo mucho más complejo, que no puede ser explicado por un defecto en una sola transferasa (ver también los resultados del capítulo IV). Según se deduce de los estudios estructurales, las siguientes enzimas que participan en la síntesis de la cadena externa en la cepa silvestre, mostraban una actividad reducida o nula en este mutante:

- $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa responsable de la elongación de la cadena externa desde una longitud de 8-10 manosas hasta el tamaño final.
- $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa (M_2MT-1) responsable de la adición de una manosa unida en $\alpha(1,2)$ al extremo no reductor de la cadena externa (Lewis y Ballou, 1991).
- $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa responsable de la iniciación de las ramificaciones.
- Manosil-P-transferasa(s) responsable(s) de la transferencia de los grupos manosil-P, tanto a la región del núcleo como a la de la cadena externa (Karson y Ballou, 1978).

La explicación más lógica de este fenotipo es la misma que se sugirió en el caso anterior para el mutante *ldb2*. Las manoproteínas parecen no ser accesibles a las enzimas mencionadas anteriormente durante su ruta de secreción a través del aparato de Golgi. Una consecuencia inmediata del análisis del fenotipo *ldb1* es que, al menos en este mutante, la cadena externa parece detener su elongación sin la necesidad de la colaboración de la manosa unida por enlace $\alpha(1,2)$ al extremo no reductor de la cadena lineal de manosas unidas por enlaces $\alpha(1,6)$ durante el crecimiento de ésta (ver más

adelante). La presencia de la manosa B₃ en la mayoría de los N- oligosacáridos, también sugiere que el mutante puede presentar un defecto en la última etapa de procesamiento que presumiblemente ocurre en el RE, en la cual una $\alpha(1,2)$ manosidasa específica hidroliza exclusivamente la mencionada manosa B₃ en la cepa parental (Jelinek-Kelly y cols, 1985). Este hecho fue observado también por Ballou y cols, (1991) en parte de los N- oligosacáridos sintetizados por el mutante vrg1. Sin embargo, en ldb1, dicha manosa aparecía en casi el 100% de las moléculas y también se encontró en los tres miembros del grupo de complementación, ldb1-1, ldb1-2 y ldb1-3. Basándonos en los resultados obtenidos en el presente capítulo, en estudios previos de glicosilación y tomando como punto de partida la ruta propuesta por Franzusoff y Schekman (1989) y por Ballou y cols, (1990), en la Fig. III.9 se propone un modelo de actuación de distintas enzimas, localizadas en las cisternas del aparato de Golgi, que participan en la síntesis de la cadena externa y que nos permite explicar el fenotipo del mutante ldb1.

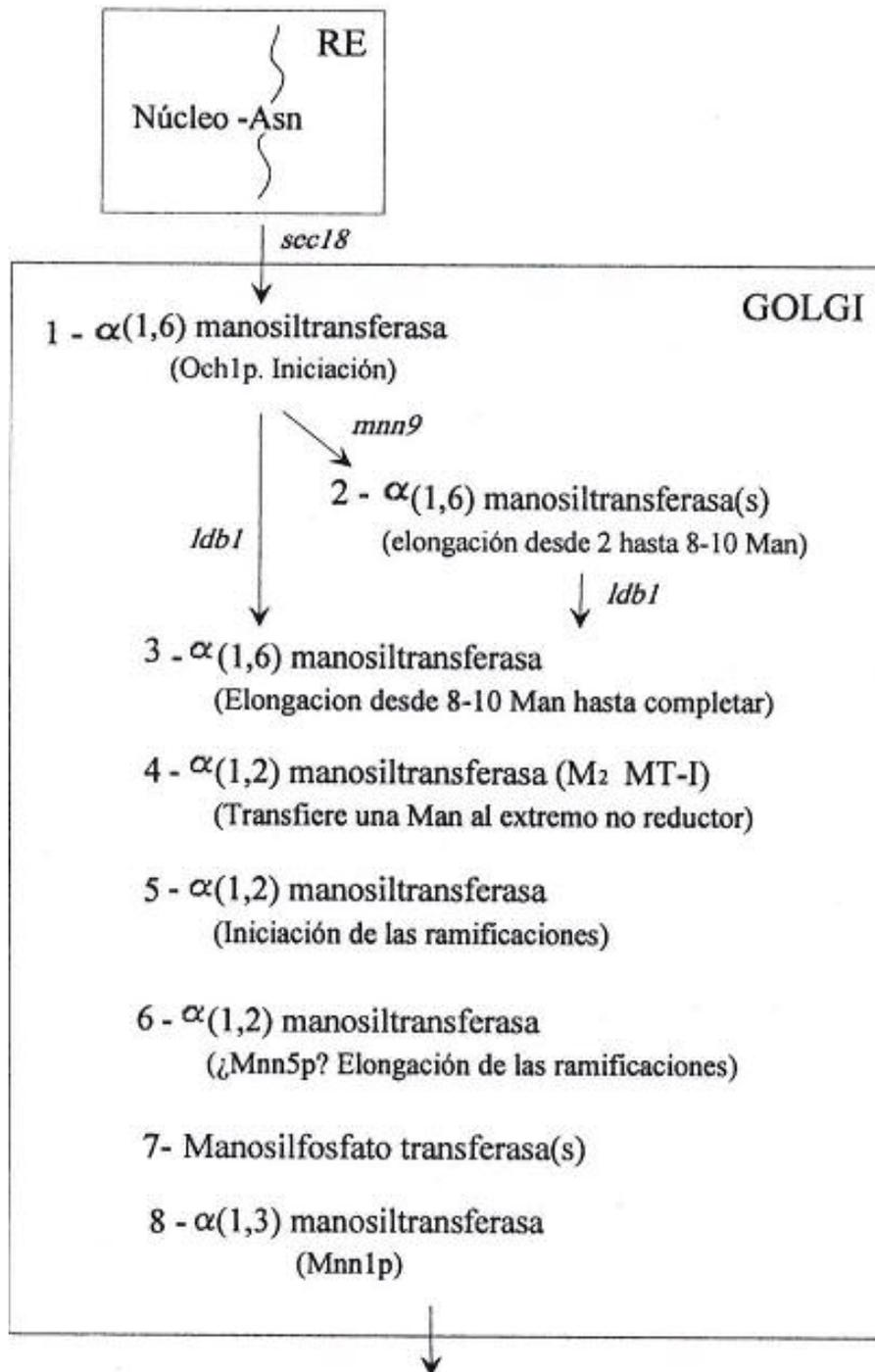


Figura III. 9. Ruta propuesta para el procesamiento de N-oligosacáridos en el aparato de Golgi de *Saccharomyces cerevisiae*. Se indican las etapas afectadas en algunos mutantes (ver texto).

Las características más importantes de este modelo son las siguientes:

- (1) La manosa unida al extremo no reductor de la cadena externa por enlace $\alpha(1,2)$ no es necesaria para detener la elongación, al menos en los N-oligosacáridos sintetizados

por el mutante *ldb1* y en algunos de los aislados a partir del mutante *vrg1*. Este modelo, no está en desacuerdo con estudios previos de Gopal y Ballou (1987) y Ballou y cols, (1989), según los cuales la elongación de la cadena externa no era permitida, cuando la manosa situada en el extremo no reductor de la cadena externa estaba sustituida en la posición 2 por otra α Man. En nuestro modelo, las $\alpha(1,6)$ manosiltransferasas (enzimas 2 y 3 en la Fig. III.9) serían incapaces de actuar en presencia de la manosa terminal unida en $\alpha(1,2)$. De hecho, esta característica estructural podría ser la señal de "stop" que impidiera el crecimiento de la cadena externa a partir de la manosa del núcleo C_1 , la cual también está unida en $\alpha(1,6)$ a la anterior, pero está sustituta por otra α Man en la posición 2.

(2) Existencia de al menos dos o tres enzimas diferentes con actividad $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa, responsables de la elongación de la cadena externa (enzimas 2 y 3 en la Fig.III.9), y probablemente localizadas en diferentes vesículas del aparato de Golgi. La diferente afinidad de dichas enzimas por los oligosacáridos aceptores, explicaría la longitud más corta de la cadena externa en los mutantes del tipo del *mnn7* (Ballou y cols, 1989), en el mutante *vrg1* (Ballou y cols, 1991) y en el mutante *ldb1* (este trabajo). La enzima 1 en la Fig. III.9 es otra manosiltransferasa con especificidad $\alpha(1,6)$. Corresponde a la *Och1p*, de la cual se ha demostrado previamente que cataliza la transferencia de la primera manosa de la cadena externa (iniciación) (Nakayama y cols, 1992, Romero y cols, 1994) y, por tanto, debe localizarse en una región de Golgi que preceda a aquella donde se producen las reacciones de elongación. Su existencia explica el fenotipo del mutante *mnn9* y la síntesis de los oligosacáridos de menor peso molecular sintetizados por *ldb1*. En un estudio realizado por Gaynor y cols, (1994) sobre el transporte de una proteína de membrana desde el aparato de Golgi al RE, probaron que *Och1p* estaba localizada en una región del aparato de Golgi que precede a la región que contiene la(s) enzima(s) responsables de la elongación.

El fenotipo de los mutantes del tipo del *mnn7* y los N-oligosacáridos de mayor tamaño presentes en las manoproteínas sintetizados por *ldb1*, sugiere que la enzima 2 es una $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa capaz de transferir manosas a los oligosacáridos sintetizados por la enzima 1, hasta una longitud media de 8 o 10 manosas. La explicación de la parada en el crecimiento una vez alcanzado este tamaño, sería una disminución de la afinidad de la enzima por los oligosacáridos de mayor tamaño. Dado que la afinidad no decrece bruscamente, el resultado de la acción de esta enzima sería

una población de oligosacáridos bastante heterogénea en cuanto al tamaño, aunque centrada en las 8 a 10 Man como tamaño medio. Dicha heterogeneidad fue ya probada en el caso de los oligosacáridos sintetizados por mutantes del tipo del *mnn7*, utilizando un sistema de HPLC capaz de separarlos (Ballou y cols, 1989).

La elongación de la cadena externa sería completada por la acción de otra $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa (enzima 3 en la Fig. III.9) con afinidad por oligosacáridos de mayor tamaño. Teniendo en cuenta el fenotipo del mutante *mnn10* (Ballou y cols, 1991), dicha enzima podría ser el producto del gen *MNN10* el cual codifica una manosiltransferasa implicada en la elongación de la cadena externa (Dean y Poster, 1996).

En esta hipótesis, que propone la existencia de tres enzimas con actividad $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa (enzimas 1,2 y 3), no se explica la presencia en el mutante *vrg1* de algunos N-oligosacáridos de pequeño tamaño que presentan dos manosas unidas por enlace $\alpha(1,6)$ en la cadena externa (Ballou y cols, 1991), es decir, representaría una etapa de elongación intermedia entre las determinadas por las enzimas 1 y 2 de nuestro esquema. Este hecho podría explicarse con la existencia de una $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa adicional responsable de la transferencia específica de la segunda manosa de la cadena externa. Sin embargo, la confirmación de este nuevo punto intermedio en la elongación de la cadena externa, requeriría el aislamiento de un nuevo mutante de glicosilación en el cual todos sus N-oligosacáridos tuvieran la misma estructura que los mencionados sintetizados por el mutante *vrg1*, como ocurre en el caso de los mutantes *mnn9* y *mnn10*.

El mutante *vrg1* parece estar también afectado en la accesibilidad de sus N-oligosacáridos a las enzimas 3-6, puesto que algunos de sus N-oligosacáridos no incorporan la manosa terminal unida por enlace $\alpha(1,2)$ y también carecen de ramificaciones. Ballou y cols (1991) sugirieron que las manoproteínas de este mutante podían no pasar por algunos compartimentos del aparato de Golgi en su ruta de salida hasta el exterior de la célula (Ballou y cols, 1991).

(3) El mutante *ldb1*, está afectado in vivo en varias actividades enzimáticas (enzimas 3 a 7 en la Fig. III.9) localizadas en el aparato de Golgi. Esto no significa que dichas enzimas se encuentren en un compartimento de Golgi aislado físicamente de otros, pero sí parece claro que todas las enzimas mencionadas necesitan la colaboración del producto del gen *LDB1* para actuar sobre los N-oligosacáridos de las manoproteínas.

Conviene tener en cuenta que mutantes termosensibles de secreción como *sec o bet*, presentan un bloqueo en la ruta de secreción a la temperatura restrictiva y acumulan

las proteínas secretoras en el compartimento previo al punto de bloqueo (Novick y cols, 1980; Newman y Ferro-Novick, 1987). Sin embargo, en *mnn9*, *mnn7*, *mnn2*, *vrg1* y *ldb1*, las proteínas de secreción no se acumulan en el interior de la célula, sino que parecen abandonar la ruta normal de salida, utilizando rutas alternativas, antes de volver de nuevo a la ruta normal para continuar su camino hasta el exterior de la célula.

En el mutante *mnn9* las manoproteínas no serían accesibles a la enzima 2, en los mutantes del grupo del *mnn7* no actuaría sobre ellas la enzima 3 y en el *mnn2*, la enzima 5 (los defectos del mutante *mnn2* en la fosforilación de manoproteínas se discuten en el capítulo V). En apoyo de esta hipótesis, Devlin y Ballou (1990) clonaron el gen *MNN2* y concluyeron que codificaba una proteína localizada en el aparato de Golgi, sin actividad manosiltransferasa, que estaba implicada en el transporte de las manoproteínas. De la misma forma, Yip y cols (1994) clonaron el gen *MNN9* y, aunque no asignaron una función específica a la *Mnn9p*, también propusieron que no presentaba actividad $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa, y que podía tratarse de una proteína implicada en alguna función del aparato de Golgi relacionada con el transporte.

Debe también mencionarse aquí que en la cepa silvestre, algunas manoproteínas llevan unidos N-oligosacáridos del tamaño de los sintetizados por el mutante *mnn9*. Entre ellas están la proteasa vacuolar carboxipeptidasa Y (Ballou y cols, 1990), la exoglucanasa mayoritaria secretada (Hernández y cols, 1992) y la invertasa glicosilada en alguno de los sitios de glicosilación (Trimble y cols, 1983). Aunque existe la posibilidad de que la carboxipeptidasa Y y la exoglucanasa secretada sigan en la cepa silvestre, la ruta definida por la mutación *mnn9* no parece probable, ya que en la invertasa aparecen, en el mismo polipéptido, oligosacáridos de diferentes tamaños. Parece más razonable que la causa de que aparezcan este tipo de oligosacáridos se deba a que impedimentos estéricos obstaculicen la actuación de las enzimas responsables de la elongación, posibilidad que ya fue sugerida para la invertasa por Trimble y cols, (1982).

En cuanto a los mutantes desprovistos de fosfato, *mnn4*, *mnn6* y *ldb2*, ha sido propuesto que los dos primeros pueden ser mutantes con alteraciones en la regulación del proceso de fosforilación ya que ambos mantienen niveles basales (alrededor del 10%) de grupos fosfato en los dos sitios de fosforilación presentes en el núcleo interno de las manoproteínas (Hernández y cols, 1989b) (ver también Fig. III.4, panel B). Sin embargo, con los datos disponibles, tampoco podría descartarse un defecto en el proceso

secretor que resultara en la inaccesibilidad de las glicoproteínas de secreción a la(s) enzima(s) 7. En el caso del mutante *ldb2* no hemos sido capaces de detectar oligosacáridos fosforilados por lo que parece que el defecto es más drástico que en el caso de los mutantes anteriores. Si existiera una sola enzima responsable de la transferencia de grupos manosil-fosfato a todos los sitios de fosforilación, el producto del gen *LDB2* podría ser la propia enzima. Sin embargo, si existieran dos o más enzimas, como parece lo más probable según los resultados presentados en el capítulo V, la hipótesis más razonable es que el mutante *ldb2* presente también un defecto en el tráfico de las manoproteínas a través del aparato de Golgi.

En el mutante *ldb1*, la $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa (*Mnn1p*) no parece afectada. La cepa parental utilizada presentaba el defecto *mnn1*, sin embargo, cuando el mutante *mnn1 ldb1* se cruzó con la cepa silvestre separándose ambas mutaciones, la cepa con la mutación *ldb1* recuperó también parte de la capacidad de aglutinación con anticuerpos específicos dirigidos frente a las manosas unidas en $\alpha(1,3)$. Lógicamente, no se esperaba que *ldb1* recuperara totalmente la capacidad de aglutinación de la cepa silvestre puesto que le faltan todas las manosas terminales presentes en las ramificaciones de la cadena externa, sin embargo la aglutinación *st* era comparable a la presentada por el mutante *mnn9*. En consecuencia, el producto del gen *LDB1* no parece necesario para la actividad de la *Mnn1p* sobre los N- oligosacáridos.

(4) A partir de los datos presentados aquí, parece claro que el producto del gen *LDB1* debe estar implicado en el transporte de glicoproteínas a través de las cisternas de Golgi. Sin embargo, la presencia de la manosa B3 en oligosacáridos maduros, sugiere también que puede estar implicado en determinadas funciones del RE, puesto que la hidrólisis de dicha manosa parece ocurrir en el RE gracias a la acción de una manosidasa específica (Esmon y cols, 1984).

IV. ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO Y O-GLICOSILACIÓN DE MANOPROTEÍNAS EN EL MUTANTE LDB DE *Saccharomyces cerevisiae*.

IV.1. RESUMEN.

El mutante de glicosilación *Ldb1*, descrito en el capítulo anterior, muestra un fenotipo que sugiere un defecto general en el tránsito de las glicoproteínas a través del

aparto de Golgi. En este capítulo se han analizado en Ldb1 dos funciones más asignadas al aparato de Golgi: el procesamiento proteolítico de una proteína de secreción y el proceso de O-glicosilación de manoproteínas.

Se ha encontrado que, alrededor del 70% de la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo por este mutante, lleva un tetrapéptido adicional en su extremo amino-terminal que se debe a un procesamiento proteolítico incompleto, probablemente por la proteasa Kex2p. Por el contrario, los oligosacáridos unidos por enlace O-glicosídico, aislados a partir de este mutante, no mostraron diferencias detectables con respecto a los de la cepa parental. Estos resultados sugieren que la proteasa Kex2p, localizada en la región tardía del aparato de Golgi (trans-Golgi), debe encontrarse en vesículas cuyo acceso está afectado por la mutación ldb1, mientras que las $\alpha(1,2)$ manosiltransferasas implicadas en O-glicosilación, localizadas en la región media del aparato de Golgi (medial-Golgi), deben estar localizadas en vesículas cuyo acceso es independiente de la mutación ldb1.

También se ha demostrado que los defectos en N-glicosilación y en el procesamiento proteolítico por Kex2p aparecen ligados en más de 50 tétradas analizadas, por lo que el fenotipo ldb1 parece consecuencia de una mutación recesiva en un solo gen.

IV.2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS.

El aparato de Golgi de *S. cerevisiae* es un complejo sistema membranoso donde tienen lugar importantes modificaciones de las proteínas de secreción. Entre ellas se incluyen algunas etapas de los procesos de N-glicosilación, O-glicosilación, biosíntesis de restos GPI, así como determinadas reacciones de procesamiento proteolítico. Algunas de estas funciones han sido asignadas a vesículas o regiones determinadas (Franzoso y Schekman, 1989; Graham y Emr, 1991; Gaynor y cols, 1994; Lussier y cols, 1995) pero otras aún no se han localizado. La etapa inicial de O-glicosilación ocurre en el RE (Haselbeck y Tanner, 1983, Orlean, 1990; Gentsch y Tanner, 1996) mientras que la $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa (Kre2p/Mnt1 p), que cataliza la adición de la tercera manosa que forma parte de estos restos, ha sido localizada en un compartimento de la región media de Golgi que se solapa con el que contiene la $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa producto del gen MNN1 (Lussier y cols, 1995). La proteasa Kex2p se ha asignado a la región

tardía del aparato de Golgi (trans-Golgi) en la cual tiene lugar la separación de las proteínas vacuolares del resto de proteínas secretadas (Graham y Emr, 1991). En el procesamiento proteolítico de la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo por *S. cerevisiae*, se ha propuesto que interviene la Kex2p (Basco y cols, 1990). Las formas procesada y no procesada pueden separarse fácilmente por cromatografía de intercambio iónico, lo cual puede utilizarse para determinar el funcionamiento de la proteasa Kex2p en una cepa determinada.

En el capítulo anterior se ha descrito el mutante de glicosilación *ldb1* como afectado en algunas funciones del aparato de Golgi relacionadas con el proceso de N-glicosilación. En el presente capítulo hemos pretendido profundizar más en el análisis del funcionamiento del aparato de Golgi de este mutante mediante la consecución de los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio del procesamiento proteolítico por la proteasa Kex2p, de la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo por el mutante *Ldb1*.
- 2- Determinar si la mutación *ldb1* afecta al proceso de O-glicosilación mediante el aislamiento de los O-oligosacáridos sintetizados por este mutante y comparándolos con los de la cepa parental.

IV.3. RESULTADOS.

IV.3.1. PERFIL IÓNICO DE LA EXOGLUCANASA SECRETADA EN VARIOS MUTANTES DE *S. cerevisiae* AFECTADOS EN LAS ETAPAS DE N-GLICOSILACIÓN QUE OCURREN EN EL APARATO DE GOLGI. ANÁLISIS DE LAS DOS FORMAS SECRETADAS POR *ldb1*.

Según se ha señalado anteriormente, la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo por *S. cerevisiae*, es procesada proteolíticamente por la enzima Kex2p (Basco y cols, 1990). Las formas procesadas y no-procesadas de la exoglucanasa se pueden separar fácilmente, debido a la diferencia de carga existente entre ambas, e identificarse mediante cromatografía de intercambio iónico. Este hecho constituye una magnífica herramienta para evaluar la función de la Kex2p en una estirpe mutante y en este capítulo ha sido utilizada para analizar la actividad de la Kex2p in vivo en varios mutantes de *S. cerevisiae* con posibles alteraciones en la función del aparato de Golgi. La presencia en el medio de cultivo de cantidades apreciables de la forma no procesada, podría interpretarse como un defecto en el transporte de la última región de Golgi. Se

analizaron los siguientes mutantes: *ldb1*, *ldb2*, *mnn2*, *vrg4*, *vrg7*, *mnn10* y *mnn6*. La estirpe silvestre y el mutante *mnn1*, cepa parental de los mutantes *ldb*, se utilizaron como controles de comportamiento conocido.

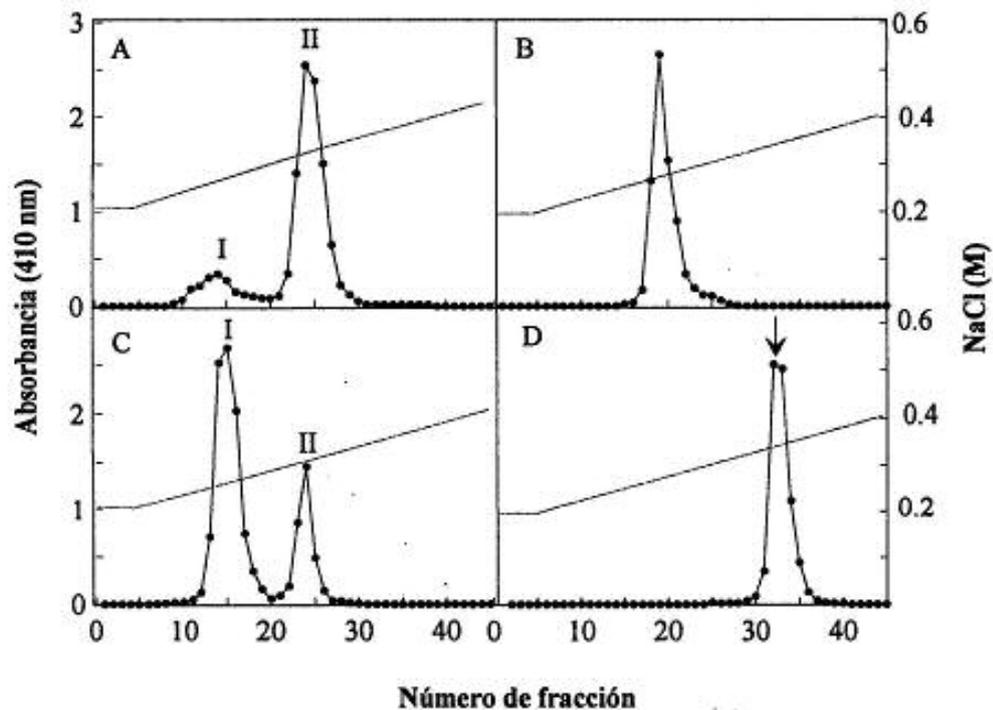


Figura IV.1. Cromatografía de intercambio iónico (columna TSK-DEAE-5-PW) de la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo por *S. cerevisiae*. (A) Cepa parental (*mnn1*), (C) *mnn1 ldb1-1*. Los picos I y II del panel C se recogieron por separado, se trataron con endo H para liberar los N-oligosacáridos, y la proteína se cromatografió en la misma columna. (B) pico I del panel C, (D) pico II del panel C.

En el mutante *mnn1* (Fig. IV. 1, panel A) o en la estirpe silvestre (no mostrada), el pico II representa la exoglucanasa mayoritaria secretada en su forma procesada, que posee dos cortas cadenas de carbohidrato unidas N-glicosídicamente (Hernández y cols, 1992). El pico I corresponde a una menor proporción de moléculas también en su forma procesada pero con una menor movilidad electroforética debido a la elongación de, al menos, una de sus cadenas de carbohidrato unido N-glicosídicamente a la proteína. Las porciones proteicas de las moléculas presentes en ambos picos son idénticas (Basco y cols, 1994). Los mutantes *ldb2*, *mnn2*, *vrg4*, *vrg7*, *mnn10* y *mnn6* mostraron un perfil muy similar al de la cepa silvestre o *mnn1* con los mismos dos picos y en proporciones similares. Por el contrario, el mutante *ldb1-1* mostró un patrón significativamente

diferente (Fig. IV. 1, panel C). Aproximadamente un 70% de la exoglucanasa secretada eluía en una posición muy próxima a la del pico I de la Fig. IV. 1, panel A.

Existía la posibilidad de que la forma mayoritaria secretada por este mutante fuera similar a la contenida en el pico I del panel A, es decir, con al menos uno de sus restos N-glicosídicos alargados por la presencia de la cadena externa. Dicha posibilidad parecía bastante improbable porque no sería fácil entender cómo el mutante *ldb1*, afectado en varias etapas del proceso de N-glicosilación de manoproteínas, lo cual resulta en la síntesis de N-oligosacáridos de menor tamaño, podría glicosilar en exceso a una proteína particular. Con el fin de descartar dicha posibilidad, se realizaron los siguientes experimentos:

- Separación de las dos formas enzimáticas secretadas por *ldb1* por cromatografía de intercambio iónico.
- SDS-PAGE para determinar si el peso molecular se correspondía con el de la forma contenida en el pico I de la Fig IV. 1, panel A. Las bandas de exoglucanasa se inmunodetectaban utilizando anticuerpos específicos tras electrotransferencia a papel de nitrocelulosa. El experimento se realizó también, con las mismas formas tras liberación de los N-oligosacáridos por tratamiento con endo H.
- Cromatografía de intercambio iónico en HPLC para determinar el posible cambio en el perfil de elución tras la separación de los N-oligosacáridos.

El mutante *mnn1 ldb1-1* y la cepa parental *mnn1* se crecieron en medio sintético hasta alcanzar la fase exponencial temprana separándose el sobrenadante por centrifugación. El medio de cultivo se dializó y se sometió a cromatografía de intercambio iónico en una columna de 2.5x9 cm empaquetada con DEAE-Sephacell, para separar las dos formas enzimáticas. Los picos I y II se recogieron por separado, se dializaron, concentraron y se sometieron a SDS-PAGE y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Los resultados de la inmunodetección se muestran en la Fig. IV.2, calles 1 y 2. Puede observarse que ambas presentan un peso molecular aparente prácticamente idéntico y difícilmente distinguible del de la forma mayoritaria secretada por la cepa parental *mnn1* que se muestra en la calle 3 de la misma figura. Este resultado sugería que el diferente comportamiento iónico de las dos formas de exoglucanasa secretadas por el mutante *ldb1-1*, no se debía al diferente tamaño de los dos restos de carbohidrato unidos N-glicosídicamente. Esta posibilidad fue confirmada repitiendo el

experimento con muestras de ambas formas tratadas previamente con endo H. En las calles 4, 5 y 6 de la misma Fig. IV.2 se muestra que los productos desglicosilados también presentan un peso molecular muy similar por lo que parece claro que ambas tienen el mismo tipo de N-oligosacáridos. La reducción observada en el peso molecular en los carriles 4, 5 y 6 con respecto a los carriles 1, 2 y 3 se corresponde con el peso molecular de los restos N-glicosídicos hidrolizados por la endo H (Hernández y cols, 1992).

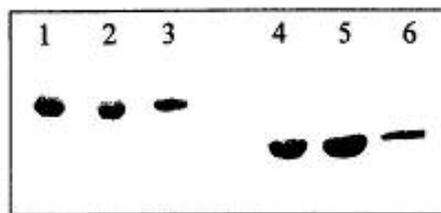


Figura IV.2. Immunoblot de la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo por la cepa parental (*mnn1*) y el mutante *mnn1 ldb1-1*. Calle 1, *mnn1 ldb1-1* (pico I de la Fig.IV.1C); calle 2, *mnn1 ldb1-1* (pico II de la Fig.IV.1C); calle 3, *mnn1* (pico II de la Fig.IV.1A); en las calles 4, 5 y 6 se cargó el mismo material de las calles 1, 2 y 3 respectivamente, pero después de eliminar los N-oligosacáridos mediante tratamiento con endo H.

Los diferentes tiempos de elución de las dos formas con actividad exoglucanásica secretadas por el mutante *ldb1-1* podrían deberse a la carga de las cadenas de carbohidrato. Para descartar esta posibilidad, analizamos el comportamiento iónico en HPLC de las porciones proteicas obtenidas tras la digestión de la glicoproteína con endo-H. En la Fig. IV. 1, paneles B y D, se muestran los resultados. Se observa que la diferencia en los tiempos de elución obtenida para los picos I y II (panel C de la misma figura), se mantiene tras la digestión con endo H (aproximadamente 13 fracciones de diferencia) y que, como se esperaba, ambos eluyen a concentraciones de NaCl más altas que las correspondientes formas glicosiladas.

Estos datos parecen indicar que la razón del diferente comportamiento iónico de las dos formas secretadas por *ldb1-1*, antes y después del tratamiento con endo-H, reside en la porción proteica de la molécula en lugar de en las cadenas de carbohidrato. Tal diferencia no es fácil de detectar mediante SDS-PAGE.

IV.3.2 SECUENCIACIÓN DEL EXTREMO AMINO-TERMINAL DE LAS DOS FORMAS IÓNICAS SECRETADAS POR *ldb1-1*.

Basco y cols, (1990) mostraron que el mutante *kex2* de *S. cerevisiae* secretaba al medio de cultivo una exoglucanasa con una movilidad electroforética similar a la glucanasa mayoritaria secretada por la estirpe silvestre, pero que eluía a menor concentración de NaCl en una cromatografía de intercambio iónico. La secuencia del extremo amino-terminal de esta enzima reveló la presencia de cuatro aminoácidos adicionales (Asn-Lys-Lys-Arg) que precedían al extremo amino-terminal de la cepa silvestre. Sugirieron por tanto, que la proteasa *Kex2p* era la responsable de cortar este tetrapéptido en la cepa silvestre.

A la vista de estos datos, consideramos la posibilidad de que la exoglucanasa mayoritaria secretada por *ldb1-1* (pico I, Fig. IV. 1, panel C) fuese una forma no procesada similar a la secretada por el mutante *kex2*.

Las dos formas de la exoglucanasa sintetizada por el mutante *ldb1-1* se purificaron a partir de 5 litros de cultivo del mutante crecido en medio K por cromatografías de intercambio iónico y de afinidad. Se sometieron a continuación a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF donde se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Las únicas bandas que aparecieron en la membrana correspondían a las exoglucanasas y a partir de dichas bandas se secuenciaron 12 aminoácidos correspondientes al extremo amino de las moléculas.

Como se esperaba, la forma más ácida (procedente del pico II de la Fig. IV. 1, panel C) presentaba la misma secuencia que la proteína secretada por la estirpe silvestre (Fig. IV.3, A), mientras que la menos ácida resultó ser una mezcla de dos tipos de moléculas en una proporción aproximada de 4:1. La secuencia del tipo de molécula más abundante correspondía a la forma no procesada por la proteasa *Kex2p* (Fig. IV.3, B 1), conteniendo el tetrapéptido extra que precede al extremo amino-terminal de la exoglucanasa mayoritaria secretada por la estirpe silvestre. Por otra parte, al tipo de

molécula menos abundante del pico I le faltaban cuatro aminoácidos del extremo aminoterminal de la forma silvestre. Este último resultado fue inesperado y sugiere la acción de otra proteasa sobre una baja proporción de moléculas de exoglucanasa secretadas por *ldb 1*.

Estos resultados sugerían que el mutante *ldb1* presentaba anomalías en el transporte de proteínas de secreción a través del aparato de Golgi, tanto en la región media (defectos en la elongación y ramificación de la cadena externa) como en la región tardía (procesamiento por la proteasa *Kex2p*).

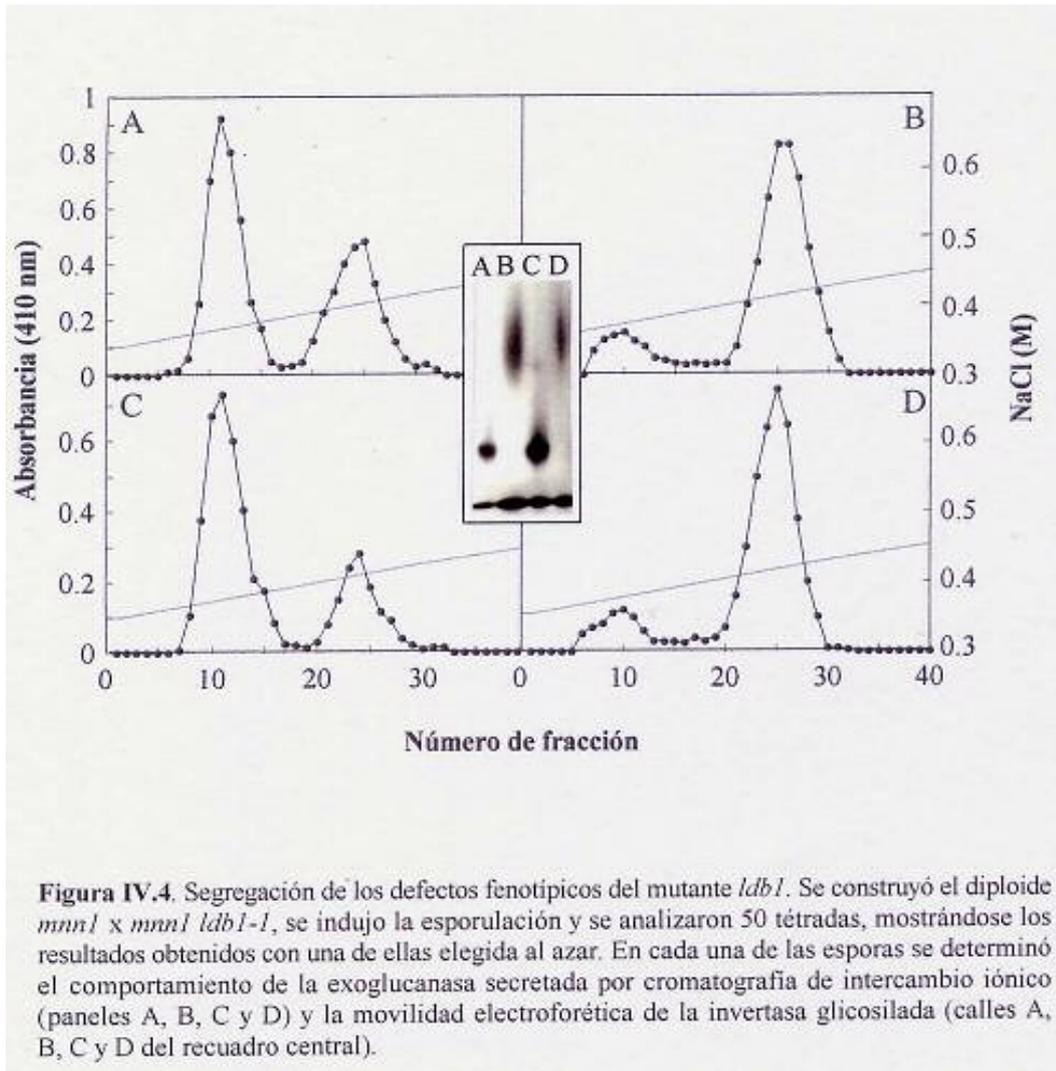
A	B	
	B1	B2
	Asn	
	Lys	
	Lys	
	Arg	
Tyr	Tyr	
Tyr	Tyr	
Asp	Asp	
Tyr	Tyr	
Asp	Asp	Asp
His	His	His
Gly	Gly	Gly
Ser	Ser	Ser
Leu		Leu
Gly		Gly
Glu		Glu
Pro		Pro

Figura IV.3. Secuencia del extremo aminoterminal (12 aminoácidos) de la porción proteica de la exoglucanasa secretada por el mutante *mnn1 ldb1-1*. (A) Muestra purificada procedente del pico II de la Fig.IV.1C, (B1 y B2) Muestras purificadas procedentes del pico I de la Fig.IV.1C.

IV.3.3. SEGREGACIÓN DEL DEFECTO EN EL PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DEPENDIENTE DE *Kex2p* Y EL DEFECTO EN EL PROCESO DE N-GLICOSILACIÓN DEL MUTANTE *ldb1-1*.

Aunque parecía claro que los dos defectos eran consecuencia de una única mutación, decidimos asegurarnos analizando el patrón de segregación de ambos.

El mutante *mn1 ldb1-1* se cruzó con la cepa parental *mn1* construyendo el diploide correspondiente. A continuación, se llevó a cabo la esporulación del diploide, se recogieron las esporas y se analizaron 50 tetradas. En cada espora se determinó el tamaño de la invertasa por electroforesis en condiciones nativas y el perfil cromatográfico de la actividad exoglucanasa secretada al medio mediante HPLC. En todos los casos, la segregación de ambos defectos fue 2:2 y las esporas que sintetizaban la invertasa de tamaño pequeño, también secretaban la forma no procesada de la exoglucanasa. En la Fig. IV.4 se muestran los resultados obtenidos con una tétada elegida al azar.



Este mismo experimento se repitió con los otros dos miembros del grupo de complementación *ldb1* (*ldb1-2* y *ldb1-3*), pero en este caso sólo se analizaron un número reducido de tétradas. En todas ellas se obtuvieron los mismos resultados que con *ldb1-1*. Es decir, ambos defectos aparecían siempre ligados en la misma espora.

Con todos estos datos se puede afirmar que el fenotipo *ldb1* se debe a una única mutación recesiva en un solo gen.

IV.3.4. ANÁLISIS DE LOS OLIGOSACÁRIDOS SINTETIZADOS POR EL MUTANTE *ldb1* UNIDOS A LAS MANOPROTEÍNAS POR ENLACE O-GLICOSÍDICO.

Como ya se ha indicado anteriormente, una vez demostrado que el mutante *ldb1* se encuentra afectado en el transporte a través de la regiones media y tardía del aparato de Golgi, afectando al procesamiento de restos N-glicosídicos y a la correcta actuación de

la proteasa Kex2p, nos pareció interesante estudiar si la mutación afectaba también al proceso de O-glicosilación ya que algunas reacciones biosintéticas se producen también en la región media de Golgi (Lussier y cols, 1995).

La cepa parental *mnn1* y los tres mutantes pertenecientes al grupo de complementación *ldb1* (*mnn1 ldb1-1*, *mnn1 ldb1-2* y *mnn1 ldb1-3*), se crecieron cada uno de ellos en 6 l de YEPD hasta la fase exponencial tardía, se separaron las células por centrifugación y se extrajeron y purificaron las manoproteínas (ver apéndice).

Los O-oligosacáridos se separaron específicamente realizando una reacción de β -eliminación en presencia de NaOH 0.1 N durante 48 horas a 30°C. Pasado este tiempo, el NaOH se neutralizó con HCl, las muestras se diluyeron con cuatro volúmenes de agua destilada y se filtraron a través de un sistema microconcentrador (FILTRON) para separar los O-oligosacárido (filtrado) de la proteína con sus restos N-glicosídicos (concentrado). Los azúcares liberados por β -eliminación se analizaron a continuación por cromatografía en capa fina.

La Fig. IV.5 muestra que no existía una diferencia significativa entre la estirpe parental *mnn1* y los mutantes *mnn1 ldb1-1*, *mnn1 ldb1-2* y *mnn1 ldb1-3* (calles 3 a 6). El disacárido formado por dos manosa unidas en $\alpha(1,2)$ es la molécula más abundante en las cuatro estirpes. Como es sabido, la mutación *mnn1* impide la síntesis de oligosacáridos mayores que $\alpha\text{Man}1-2\alpha\text{Man}1-2\text{Man}$, por lo cual, en la cromatografía sólo aparecen mono-, di- y trisacáridos.

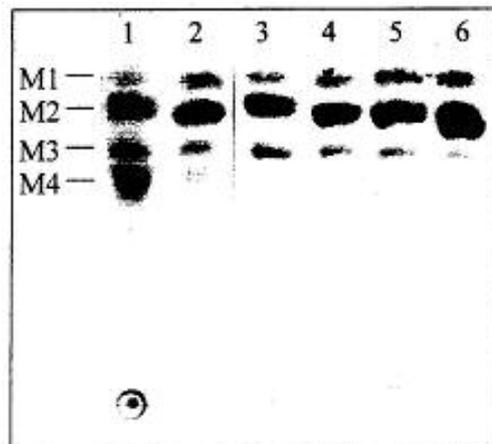


Figura IV.5. Cromatografía en capa fina de los O-oligosacáridos liberados mediante una reacción de β -eliminación de las manoproteínas de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Calles: 1, cepa silvestre (*MNN1 LDB1*); 2, *MNN1 ldb1*; 3, cepa parental (*mnn1*); 4, *mnn1 ldb1-1*; 5, *mnn1 ldb1-2*; 6, *mnn1 ldb1-3*.

Como ya se indicó en el capítulo anterior, la mutación *ldb1* no parecía afectar sensiblemente a la actividad de la $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa codificada por el gen *MMN1* ya que la cepa *ldb1 MNN1*, era capaz de aglutinar con los anticuerpos anti- $\text{Man}\alpha(1,3)$. Dado que la *Mnn1p* actúa también sobre los restos unidos O-glicosídicamente, se purificaron manoproteínas a partir de las cepas *ldb1 MNN1* y la cepa silvestre (*LDB1 MNN1*) analizándose a continuación los restos O-glicosídicos por cromatografía en capa fina. En la Fig. IV.5, calles 1 y 2, se muestran los resultados obtenidos. En ambos casos aparecía la mancha correspondiente al tetrasacárido que posee una manosa adicional unida por enlace $\alpha(1,3)$ al extremo no-reductor del trisacárido anteriormente mostrado ($\alpha\text{Man}1-2\alpha\text{Man}1-2\text{Man}$). Sin embargo, la mancha correspondiente al terasacárido del mutante *ldb1 MNN1* (calle 2) es menos intensa que la correspondiente a la cepa silvestre *LDB1 MNN1*. Por el contrario, la mancha correspondiente al disacárido es sensiblemente más intensa en el mutante que en la cepa silvestre sugiriendo que la mutación *ldb1* podría dificultar la adición de la tercera manosa de estos restos.

IV.4. DISCUSIÓN.

En el capítulo III se describió el aislamiento y quimiotipo del mutante *Saccharomyces cerevisiae* *ldb1* el cual sintetiza N-oligosacáridos defectuosos debido a alteraciones en algunas etapas del proceso de N-glicosilación que suceden en el aparato de Golgi: incorporación de grupos fosfato, crecimiento longitudinal de la cadena externa y formación de las ramificaciones en esta última. La explicación que se ha sugerido para justificar este fenotipo, es que el mutante presenta un defecto en el transporte de manoproteínas a través del aparato de Golgi y, como consecuencia de él, las manoproteínas resultan inaccesibles a determinadas transferasas localizadas en compartimentos del aparato de Golgi cuyo acceso depende del producto del gen *LDB1*.

En este capítulo se han analizado en *ldb1* dos reacciones más de procesamiento de manoproteínas de secreción asignadas al aparato de Golgi: O-glicosilación y un tipo de procesamiento proteolítico, dependiente de la proteasa *Kex2p*. Se ha encontrado que los O- oligosacáridos aislados a partir de manoproteínas del mutante *ldb1 mnn1* son indistinguibles de los sintetizados por la cepa parental *mnn1*, sin embargo, se observan algunas diferencias entre los sintetizados por las cepas correspondientes sin la mutación *mnn1* (*ldb1 MNN1* y *LDB1 MNN1*). La exoglucanasa secretada al medio de cultivo por *ldb1*, se encuentra mayoritariamente en forma no procesada. Además, se ha demostrado que los defectos en el proceso de N-glicosilación y procesamiento por *Kex2p* están ligados, por lo que el fenotipo *ldb1* parece consecuencia de una mutación recesiva en un solo gen que afecta a varias regiones celulares implicadas en el proceso de secreción-glicosilación de manoproteínas. Dichas regiones son las siguientes:

a) Región cis-Golgi. La iniciación de la síntesis de la cadena externa se produce en esta región localizada adyacente a las cisternas del RE. En ella se encuentra la $\alpha(1,6)$ manosiltransferasa (*Och1p*) responsable de la transferencia de la primera manosa de la cadena externa unida por enlace $\alpha(1,6)$ (manosa d_1 en el esquema II.1). Dicha manosa está presente en todos los oligosacáridos sintetizados por el mutante

ldb1 por lo que esta función no parece afectada en el mutante, incluso aunque ha sido demostrado que la localización de Och1p implica transporte retrógrado a través del aparato de Golgi, al menos desde la región TGN (Harris y Waters, 1996). La elongación de la cadena externa por formación de una cadena lineal de manosas unidas por enlace $\alpha(1,6)$, también se ha propuesto que ocurre en esta región de Golgi (Lussier y cols, 1995). Este proceso sí está afectado en el mutante ldb1 ya que algunos de sus N-oligosacáridos contienen solamente la primera manosa de la cadena externa, es decir, no se produce elongación en absoluto, mientras que el resto incorporan una cadena lineal de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ que contiene, por término medio unas 10 unidades. Este tamaño representa menos de la mitad de la longitud total de la cadena externa presente en los N-oligosacáridos de la cepa silvestre.

(b) Región medial-Golgi. En la región intermedia del aparato de Golgi, se ha propuesto que ocurren varias funciones relacionadas con el proceso de glicosilación de manoproteínas: Síntesis de las ramificaciones de la cadena externa en los N-oligosacáridos, adición de las manosas terminales en $\alpha(1,3)$ tanto a los N- como a los O-oligosacáridos (reacción catalizada por Mnn1p), fosforilación de N-oligosacáridos (Franzussoff y Schekman, 1989; Grahamy Emr, 1991; Cunningham y Wickner, 1980) y adición de al menos una manosa en $\alpha(1,2)$, catalizada por la Kre2p/Mnt1p, a los O-oligosacáridos (Lussier y cols, 1995).

La síntesis de las ramificaciones y la incorporación de grupos fosfato están completamente bloqueados en el mutante ldb1 (ver capítulo III) mientras que la función de la Kre2p/Mnt1p parece estar afectada parcialmente puesto que la mancha correspondiente al disacárido, sustrato de esta enzima, es más intensa en el mutante ldb1 que en la cepa silvestre (Fig. IV.5, calles 1 y 2). La explicación más razonable para justificar la mayor cantidad relativa del disacárido en los O-oligosacáridos sintetizados por la cepa ldb1, es que esté afectada la síntesis del trisacárido en la reacción catalizada por la Kre2p/Mnt1p. El hecho de que la cantidad de tetrasacárido sea también menor en ldb1 que en la cepa silvestre, puede ser una consecuencia de lo anterior, es decir, la dificultad en la síntesis del trisacárido es lo que determina la menor proporción del tetrasacárido. Los datos presentados no permiten establecer que la actividad de la $\alpha(1,3)$ manosiltransferasa (Mnn1p) esté afectada en este mutante.

Estos resultados refuerzan la hipótesis, apunada en el capítulo anterior, de que el mutante *ldb1* presenta un defecto generalizado en el funcionamiento del aparato de Golgi, especialmente en la región conocida como medial-Golgi. Algunas enzimas localizadas en esta región que participan en el procesamiento de N-oligosacáridos (manosilfosfato transferasa(s) y las enzimas responsables de la síntesis de las ramificaciones de la cadena externa) parecen absolutamente dependientes del producto del gen *LDB1*, mientras que otras enzimas como la(s) implicadas en la elongación de la cadena externa y la $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa (*Kre2p/Mnt1p*) sólo presentan un requerimiento parcial de dicho producto génico, puesto que muestran una reducción en su actividad pero mantienen parte de ella en la cepa mutante.

(c) Región trans-Golgi. Las glicoproteínas, una vez completados sus restos glucídicos en la región medial-Golgi, son transportadas a la trans-Golgi, en la cual se localizan varias enzimas proteolíticas como son, *Kex2p*, *Kex1p* y la dipeptidil aminopeptidasa (DPA). En esta región se produce la maduración proteolítica de las proteínas secretoras y seguidamente se dirigen hacia su destino final en la vacuola o en el exterior de la membrana plasmática (Cunningham y Wickner, 1980; Franzusoff y cols, 1991; Lussier y cols, 1995). El mutante *ldb1* también parece estar afectado en el transporte a través de esta región, puesto que la proteasa *Kex2p* presenta una actividad reducida, al menos sobre la exoglucanasa mayoritaria secretada al medio de cultivo.

(d) Retículo endoplásmico. En el capítulo III se mostró que los N-oligosacáridos del mutante *ldb1* mantenían en el núcleo interno una manosa unida por enlace $\alpha(1,2)$ (B_3 en el esquema II.1) la cual, en la cepa silvestre, es hidrolizada por una $\alpha(1,2)$ manosidasa específica que actúa antes del punto de ejecución de la mutación *sec 18* (Esmon y cols, 1984). Los N-oligosacáridos acumulados por este mutante incubado a la temperatura restrictiva, no contenían la manosa B_3 . Estudios posteriores parecen confirmar que dicha manosidasa está localizada en las membranas del retículo endoplásmico (Burke y cols, 1996). Parece claro que el producto del gen *LDB1* es requerido para el transporte correcto a través de distintas cisternas de Golgi y es difícil de entender cómo puede actuar también en el retículo endoplásmico. De acuerdo con nuestros datos podría considerarse la posibilidad de que la $\alpha(1,2)$

manosidasa implicada en la hidrólisis de la manosa B₃, estuviera localizada en vesículas previas al aparato de Golgi o incluso en la región cis-Golgi, aunque anterior al punto de bloqueo del mutante sec 18. Esta posibilidad ha sido ya discutida previamente (Herscovics y Orlean, 1993). Por otra parte, Ballou y cols, (1991) describieron el mutante vrg1 y propusieron que estaba afectado en varias etapas del transporte a través del aparato de Golgi. También encontraron que aproximadamente el 50% de los N-oligosacáridos presentes en las manoproteínas de este mutante contenían la manosa B₃.

Existe, todavía, al menos otra posibilidad que podría hacer compatible en ldb1 la reducción en la actividad de la $\alpha(1,2)$ manosidasa específica localizada en el RE y el hecho de que el producto del gen LDB1 sea requerido para distintas funciones del aparato de Golgi: si asumimos que la $\alpha(1,2)$ manosidasa está localizada en el RE como consecuencia de un proceso de transporte inverso desde una cisterna de Golgi, el producto del gen LDB1 podría ser también requerido para dicho proceso. El transporte de Wbplp desde una cisterna de Golgi hasta el RE ha sido demostrado en *S. cerevisiae*, sin embargo, Wbplp es una proteína de membrana que contiene la secuencia específica KKXX (Lussier y cols, 1995).

Aunque parece menos probable, no se puede descartar otra posibilidad más para explicar el fenotipo ldb1: el producto del gen LDB1 podría estar implicado en dirigir varias enzimas participantes en glicosilación y proteasa(s) responsable(s) del procesamiento proteolítico a la vesícula correcta, en lugar de afectar al transporte de las proteínas de secreción. Si este fuera el caso, también podría ser requerido para la inserción de la $\alpha(1,2)$ manosidasa en la membrana del RE.

Tomados en conjunto, los resultados presentados en este capítulo y en el anterior, nos permiten concluir que el producto del gen LDB1 es requerido para el correcto funcionamiento de distintas regiones del aparato de Golgi, y quizás también para alguna función relacionada con el RE. El transporte y glicosilación de proteínas de secreción en células eucariotas está regulado por un complejo sistema de diferentes proteínas muchas de las cuales se mantienen, con escasas variaciones desde las levaduras hasta el hombre (revisado por Rothman, 1994). Con los datos disponibles en este momento, sería demasiado especulativo intentar identificar el

producto del gen LDB1 con una proteína conocida implicada en el transporte. La clonación del gen LDB1 y otros genes LDB en un futuro próximo, será de gran ayuda para clarificar algunos de los puntos discutidos en este capítulo y en el anterior.

V. EL MUTANTE *mnn2* DE *Saccharomyces cerevisiae* ESTÁ AFECTADO EN EL PROCESO DE FOSFORILACIÓN DE MANOPROTEÍNAS.

V.1. RESUMEN.

En este capítulo, se ha estudiado la fosforilación de N-oligosacáridos en el mutante *mnn2* con el fin de comprobar la posible influencia de dicha mutación en el patrón de fosforilación de la región del núcleo interno.

En primer lugar se analizó la estructura de los N-oligosacáridos sintetizados por una cepa con la mutación *mnn2* encontrándose que sólo el 20% de los fragmentos correspondientes a la región del núcleo interno, estaban fosforilados. Los fragmentos, contenían un sólo grupo fosfato, que se unía específicamente a la manosa C₁ (ver más abajo el esquema V.1), una de las dos posibles posiciones de fosforilación (la otra es la manosa A₃), encontradas en el mutante *mnn1 mnn9* (Hernández y cols, 1989b). Las posibles razones de la inhibición de la fosforilación en A₃ podrían ser: a) la propia mutación *mnn2*, b) impedimento esférico causado por la presencia de la cadena externa en la cepa utilizada.

Para esclarecer la causa, se construyó el mutante triple *mnn1 mnn2 mnn9*, que carece de la mayor parte de la cadena externa, así como de las manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$, y se analizaron sus N-oligosacáridos, encontrándose resultados idénticos a los anteriores, es decir, fosforilación exclusivamente en la posición C₁.

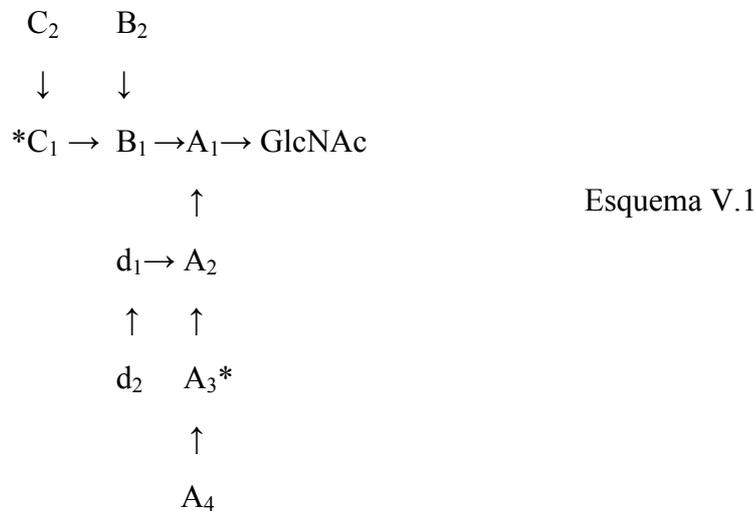
En el capítulo III, se comprobó que el mutante *ldb8*, aislado en este trabajo, pertenecía al mismo grupo de complementación que el *mnn2*. Con el fin de corroborar los resultados anteriores con otra cepa de origen diferente, se construyó también el mutante triple *mnn1 ldb8 mnn9* y se analizaron sus N-oligosacáridos encontrándose los mismos resultados.

Estos resultados parecen indicar la existencia en *S. cerevisiae* de, al menos, dos manosilfosfatotransferasas diferentes ya que la mutación *ldb8* (*mnn2*) afecta a la adición de fosfato a la manosa A_3 unida en $\alpha(1,2)$ y sustituida en la misma posición, pero no a la manosa C_1 unida en $\alpha(1,6)$ y sustituida en $\alpha(1,2)$.

V.2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS.

Como es sabido, el núcleo de los N-oligosacáridos está fosforilado. Esto se puso de manifiesto en estudios con la proteasa vacuolar carboxipeptidasa Y (CPY), sintetizada por la estirpe silvestre de *S. cerevisiae* (Hashimoto y cols, 1981), que posee una cadena externa reducida a una sola rama, igual que la de los oligosacáridos aislados de las manoproteínas del mutante *mnn9* de *S. cerevisiae* (Tsai y Ballou, 1986).

Hernández y cols, (1989a) llegaron a la misma conclusión realizando estudios con los N-oligosacáridos del doble mutante *mnn1 mnn9* y determinaron que en el núcleo interno existían dos sitios potenciales de unión de los grupos fosfato (manosas C_1 y A_3 en el esquema V.1).



* Posiciones posibles de unión de grupos fosfato.

Este mutante fosforilaba aproximadamente el 75% de sus N-oligosacáridos y alrededor del 50% de las moléculas estaban fosforiladas en las dos posiciones

mencionadas. Este mismo grupo también llevó a cabo estudios de los N-oligosacáridos del triple mutante mnn1 mnn2 mnn10, observando que presentaba una menor proporción de oligosacáridos fosforilados, y el fosfato se unía específicamente a uno sólo de los sitios de fosforilación del núcleo (manosa C₁).

Parece claro que la mutación mnn1 no afecta a la fosforilación de la manosa A₃ puesto que aparece fosforilada en el doble mutante mnn1 mnn9 (Hernández y cols, 1989a). Por tanto, la "no fosforilación" de la manosa A₃ del núcleo en el triple mutante mnn1 mnn2 mnn10 podría deberse a la mutación mnn2, a la mutación mnn10, o simplemente a la presencia de la cadena externa. El efecto de estas mutaciones en la estructura de los N-oligosacáridos puede verse en la figura I.4.

A la vista de estos datos, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1.- Aclarar, si la presencia de la mutación mnn10 es la causante de la inhibición de la fosforilación en la posición A₃. Para ello se realizarán análisis estructurales de los N-oligosacáridos sintetizados por el mutante mnn2. Si el patrón de fosforilación fuese igual al del mnn1 mnn2 mnn10, se podría descartar la influencia de la mutación mnn10 en dicho patrón. En este caso se acometería el siguiente objetivo:

2.- Determinar si la razón de la no fosforilación en A₃ es la propia mutación mnn2 o un impedimento estérico causado por la presencia de la cadena externa en el mnn1 mnn2 mnn10. Para ello se construirá el mutante triple mnn1 mnn2 mnn9 y se analizarán los N-oligosacáridos. Si el patrón de fosforilación fuera el mismo que el del mutante mnn1 mnn9, sería la presencia de la cadena externa la responsable de la no fosforilación en A₃, en el mutante mnn1 mnn2 mnn10. Si, por el contrario, se mantuviera el patrón de fosforilación del mnn2, sería esta mutación la responsable.

Dado que el mutante mnn2 resultó ser alélico al ldb8 aislado por nosotros, se comprobará que el mutante mnn1 ldb8 mnn10, se comporta igual que el mnn1 mnn2 mnn10 para corroborar que es el gen MNN2 el responsable del mencionado fenotipo.

Si el resultado del objetivo 1 indicara que es la mutación mnn10 la responsable de la no fosforilación en A₃, se realizaría también el objetivo 2, pero sustituyendo la

mutación *mnn2* por la *mnn10* en el mutante triple. Debemos significar que esta última posibilidad nos parece poco probable puesto que el gen *MNN10* ha sido clonado recientemente y parece codificar una manosiltransferasa implicada en la elongación de la cadena externa (Dean y Poster, 1996).

V.3. RESULTADOS.

V.3.1. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN EN EL NÚCLEO INTERNO EN LOS N- OLIGOSACÁRIDOS DEL MUTANTE *mnn2*.

Las manoproteínas del mutante *mnn2* se purificaron a partir de 6 l de cultivo en YEPD, obteniéndose un rendimiento de 0.42 g de manoproteínas puras. La mitad de esta cantidad se sometió a digestión exhaustiva con la $\alpha(1,6)$ endomanosidasa, con el fin de degradar la cadena externa manteniendo intacto el núcleo interno. Seguidamente, la muestra se dializó frente a agua destilada, se liofilizó, y se resuspendió en un pequeño volumen (aproximadamente 0.5 ml) del tampón adecuado para su posterior tratamiento con endo H.

Tras la incubación en presencia de endo H, la digestión se paró por calor y la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de filtración en gel en una columna de BioGel P-4 (1.5x170 cm) eluyendo con acetato amónico. En la Fig. V.1A, se muestran los resultados de esta cromatografía. Al igual que en experimentos anteriores (ver Fig. III. 4), aparece un pico de carbohidrato en el volumen vacío de la columna, marcado con I en la figura V.1A, que corresponde al material no digerido por la endo H (principalmente O-oligosacáridos), y otros dos picos de menor tamaño incluidos en la columna (marcados con II y III), que corresponden al material liberado por la endo H. Comparando estas cromatografías con las mostradas en la Fig. III.4, los picos II y III podrían corresponder a N-oligosacáridos fosforilados y neutros respectivamente, con un tamaño similar al del núcleo interno.

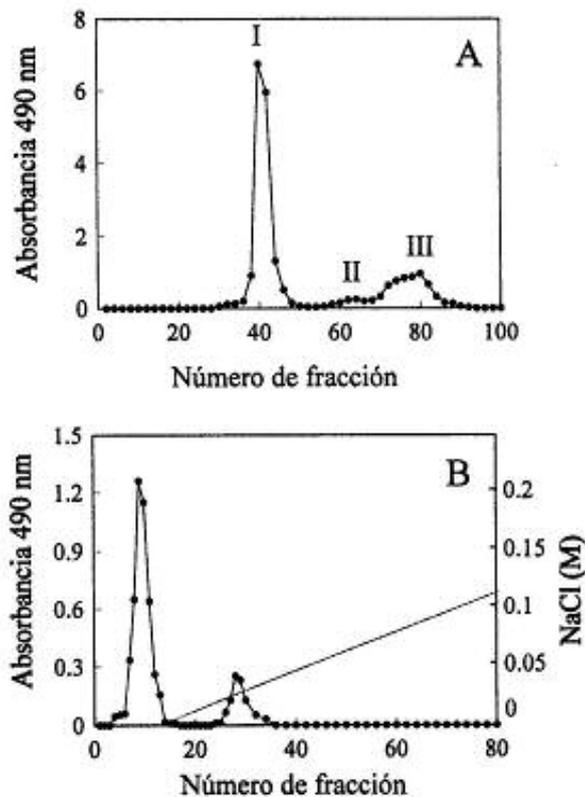


Fig. V.1. Fraccionamiento de los N-oligosacáridos del mutante *mnm2*. (A), columna de filtración de Bio-Gel P-4 de las manoproteínas tratadas con endo H; (B), cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex del material de los picos II y III del panel A.

Dado que la separación entre los picos II y III no era clara, las fracciones 58 a 87 de esta cromatografía se recogieron juntas, se trataron con la resina AG50W X8 y se liofilizaron, sometiéndose a continuación a una cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex. Para ello, la muestra liofilizada se resuspendió en 2 mM Tris, se aplicó a la columna y se lavó con la misma solución de Tris para permitir el paso de las moléculas neutras que no son retenidas por la resina. El material retenido, se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 125 mM. Los resultados de esta cromatografía se muestran en la Fig.V.IB. Se observa un pico de carbohidrato antes de aplicar el gradiente (I) y otro de menor tamaño (II) después de iniciado el gradiente de NaCl. El primero debe corresponder al material neutro y el segundo al material fosforilado. Además, la posición de elución de este último, a baja molaridad de NaCl, sugiere que

corresponde a una molécula monofosforilada y con el grupo fosfato diesterificado por una manosa (Hernández y cols, 1989b).

La proporción aproximada de ambos picos es 5:1, en consecuencia, estos resultados sugerían que la mutación *mnn10* no era responsable de la reducción en la fosforilación en el mutante triple *mnn1 mnn2 mnn10*.

La confirmación de las estructuras sugeridas se realizó por ^1H RMN. Las muestras se recogieron por separado, se desalaron por cromatografía de filtración en BioGel P-4 (1x35 cm), se liofilizaron y procesaron para RMN.

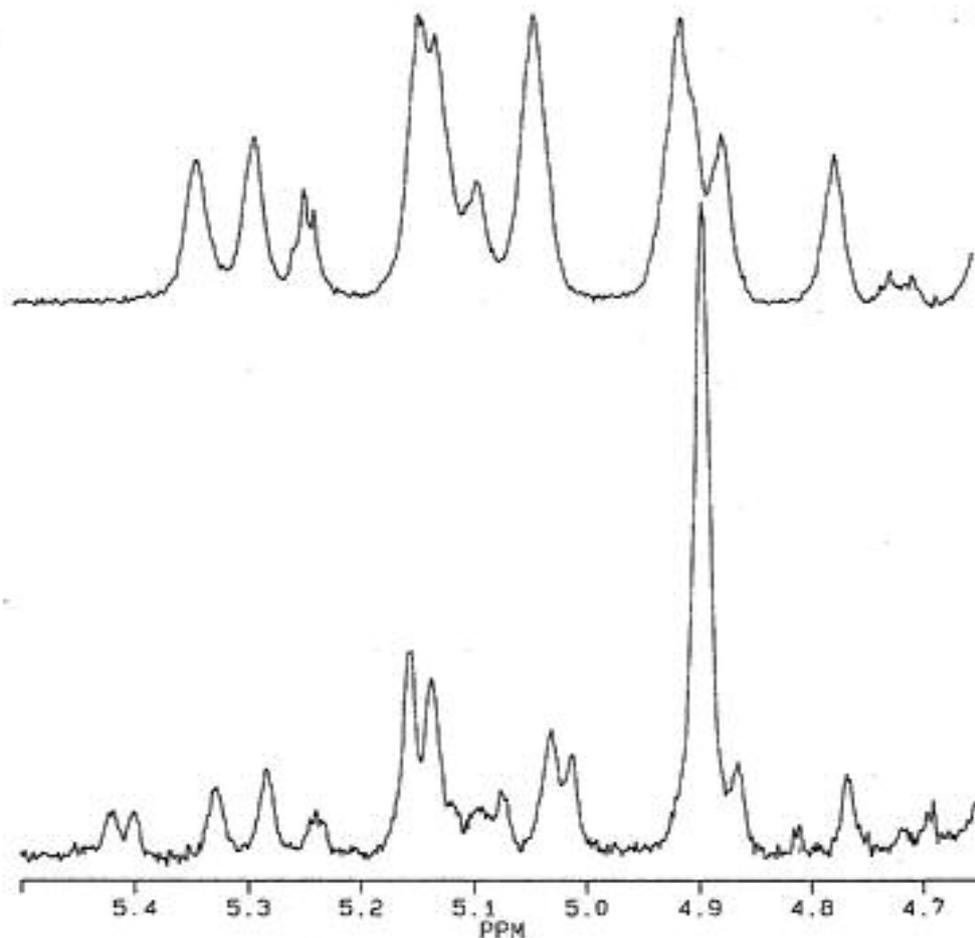
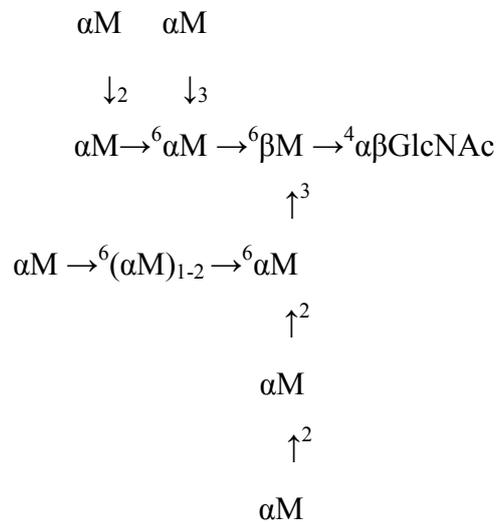


Fig. V.2. Espectro de ^1H -RMN de la región del núcleo de los N-oligosacáridos liberados por endo H a partir de las manoproteínas del mutante *mnn2*. La región del núcleo se obtuvo por digestión de los N-oligosacáridos con la $\alpha(1,6)$ endomanosidasa (ver texto). (A), neutro; (B), fosforilado.

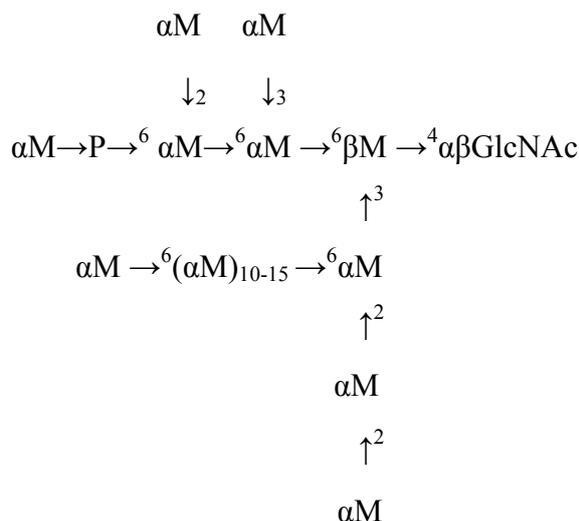
En la Fig. V.2 se muestran los espectros obtenidos. El correspondiente al material no adsorbido a QAE-Sephadex (panel A) se corresponde con una molécula neutra con la siguiente estructura:



ESTRUCTURA I

El espectro del material adsorbido a QAE-Sephadex se muestra en el panel B. Las diferencias más significativas con respecto al anterior son las siguientes: a) Presencia de un doblete a $\delta 5.40-5.42$ cuya integral corresponde a una manosa e indica la presencia de una manosa diesterificando a un grupo fosfato, y b), la señal a $\delta 4.90$, que corresponde a manosas unidas en $\alpha(1,6)$, es mayor en este caso (la integral corresponde aproximadamente a 10-15 manosas). En la zona entre $\delta 5$ y $\delta 5.2$ hay también algunas diferencias pero que no son significativas para el caso que nos ocupa, y el resto de las señales se mantienen invariables.

Estos datos son compatibles con la siguiente estructura:



ESTRUCTURA II

El grupo fosfato debe unirse a la manosa C₁ porque si se uniera a A₃, provocaría el cambio de algunas señales (ver capítulo II). La posición de elución en la columna de QAE-Sephadex y la integral de la señal a δ 5.40-5.42 apoyan la presencia de un solo grupo fosfato. La presencia de la larga cadena de manosas unidas en $\alpha(1,6)$ sugiere que la presencia del grupo fosfato dificulta la acción de la $\alpha(1,6)$ endomananasa.

V.3.2. ANÁLISIS DE LOS N-OLIGOSACÁRIDOS DEL MUTANTE TRIPLE mnn1 mnn2 mnn9.

A la vista de los resultados del apartado anterior, podemos afirmar que la mutación mnn10 no interfiere en el proceso de fosforilación sino que debe ser la mutación mnn2, o la presencia de la cadena externa, lo que impide la fosforilación en A₃.

Para responder a este interrogante, se necesita construir una cepa con una sola de las características mencionadas, es decir con la mutación mnn2 pero sin cadena externa o viceversa, y analizar la fosforilación en la región del núcleo de los N-

oligosacáridos. Dado que lo que interesa analizar es la región del núcleo, lo más conveniente sería construir una cepa que careciera de cadena externa y tuviera la mutación *mnn2*. Para ello, a un doble mutante *mnn1 mnn9* se le introdujo la mutación *mnn2* por técnicas genéticas convencionales, resultando el triple mutante *mnn1 mnn9 mnn2*. La mutación *mnn9* previene la síntesis de la mayor parte de la cadena externa (ver Fig. I.4), mientras que la mutación *mnn1* se ha introducido también para evitar la heterogeneidad debida a las manosas unidas en $\alpha(1,3)$.

Las manoproteínas del triple mutante *mnn1 mnn2 mnn9* se purificaron y trataron con endo H, cromatografiándose a continuación en la columna de BioGel P-4 (1.5 x 170), equilibrada y eluída con 0.1 N acetato amónico, para recuperar los N-oligosacáridos hidrolizados por la endo H. En la figura V.3A se muestra el resultado de la cromatografía. Al igual que en el apartado anterior, el pico I representa el carbohidrato no liberado por endo H, mientras que los picos II y III deben incluir respectivamente los oligosacáridos fosforilados y neutros liberados por la enzima (comparar con la Fig. V1A). Esta cromatografía ya revela que la proporción de moléculas fosforiladas no supera el 20%. Estos dos picos se recogieron por separado y se cromatografiaron en la columna de QAE-Sephadex (1.5 x 9 cm). El pico III no se retuvo en la columna (resultados no mostrados) mientras que el pico II eluyó tras la aplicación del gradiente de NaCl en la posición esperada para una molécula con una sola carga negativa (monofosfato diéster) (Fig. V.3B).

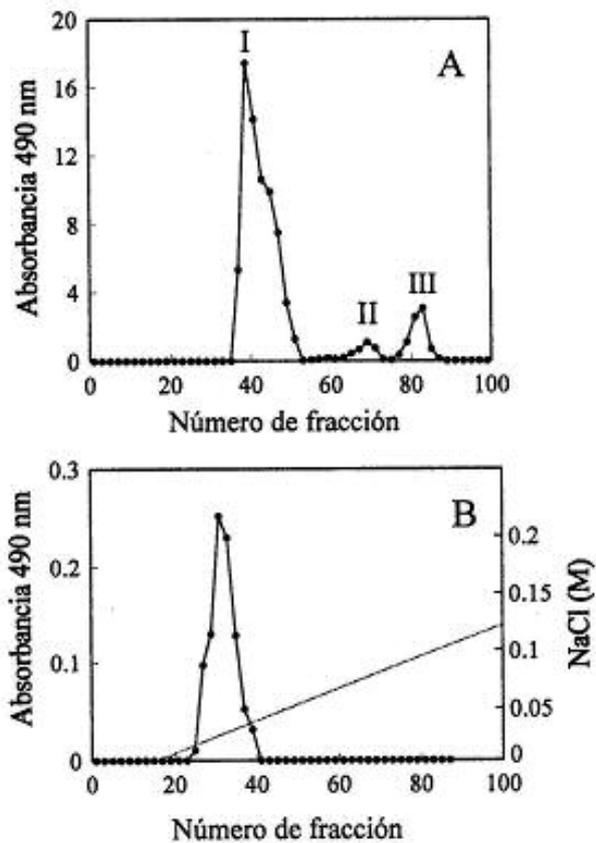


Fig. V.3. Fraccionamiento de los N-oligosacáridos del triple mutante *mnn1 mnn9 mnn2*. (A), columna de filtración de Bio-Gel P-4 de las manoproteínas tratadas con endo H; (B), cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex del material del pico II del panel A.

Las estructuras se confirmaron por ^1H RMN. Las muestras se desalaron por filtración en BioGel P-4 (1 x 35 cm) y se procesaron para ^1H RMN. En la figura V.4 se muestran los espectros obtenidos para las moléculas neutras (panel A) y fosforiladas (panel B).

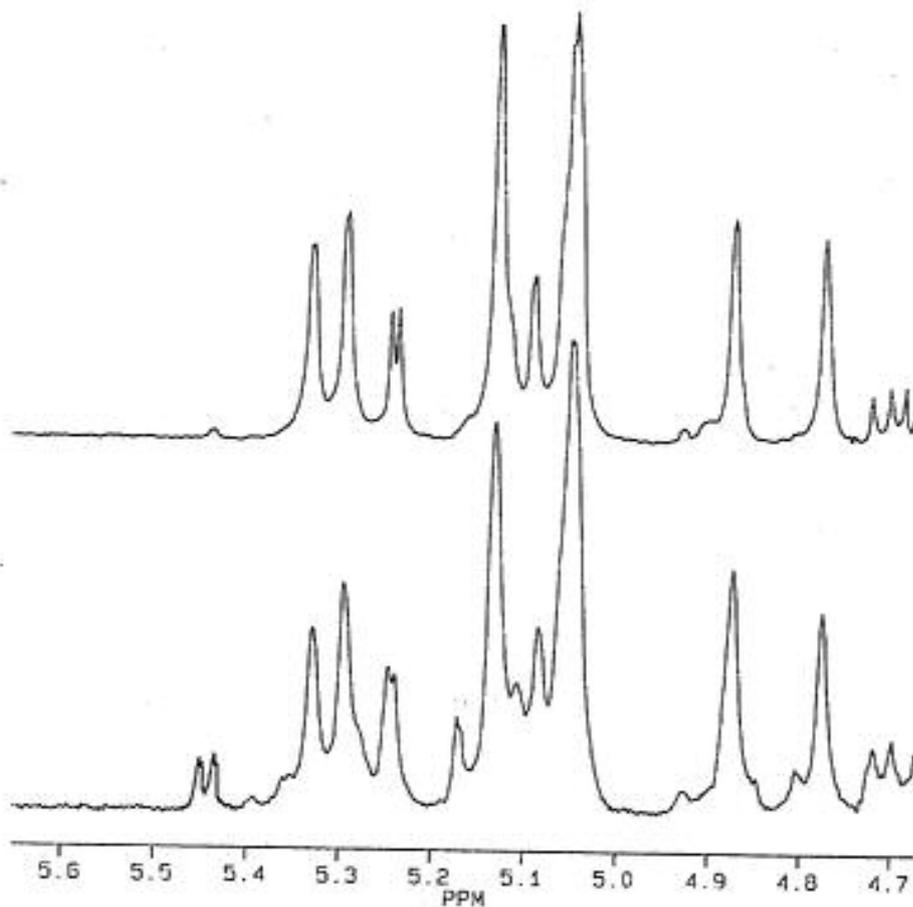
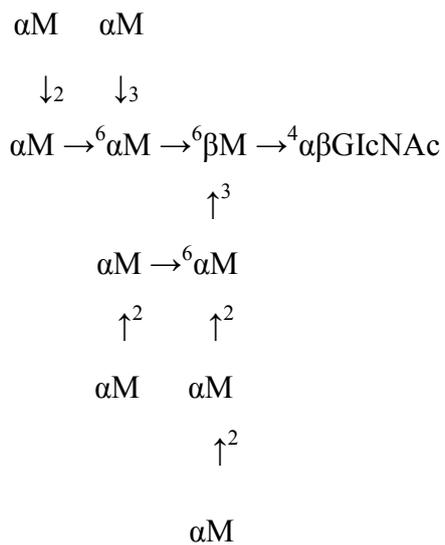


Fig. V.4. Espectro de ^1H -RMN de los N-oligosacáridos liberados por endo H a partir de las manoproteínas del mutante *mnn1 mnn9 mnn2*. (A), material neutro; (B), material fosforilado.

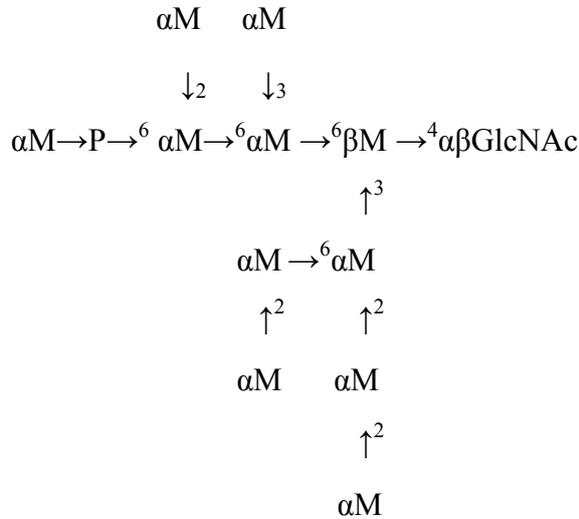
La molécula neutra presenta un espectro compatible con la siguiente estructura:



ESTRUCTURA III

Como se esperaba, esta molécula neutra es idéntica a la sintetizada por el mutante *mnn1 mnn9*.

El espectro de la molécula fosforilada (panel B) se corresponde con el monofosfato diéster con el fosfato unido a la manosa C₁ según la estructura siguiente:



ESTRUCTURA IV

Las razones para explicar la correspondencia espectro-estructura son las mismas indicadas para el caso del espectro de la Fig. V.2B con la estructura II: (a) la presencia del doblete a $\delta 5.40-5.42$ y su integral confirma la presencia de un solo grupo fosfato diesterificado ya sugerida por el perfil cromatográfico en QAE-Sephadex mostrado en la Fig.V.3B, (b) el hecho de que la señal correspondiente a la manosa A₁, aparezca en la misma posición que la molécula neutra, en $\delta 4.77$, indica que el grupo fosfato no está unido a la manosa A₃, por lo que debe unirse a C₁.

A la vista de estos datos, parece claro que la mutación *mnn2* es la única responsable de que no se produzca fosforilación en A₃, sin embargo, nos pareció interesante descartar que fuera una característica específica de la cepa utilizada. Dado que en el capítulo III se aisló el mutante *ldb8*, perteneciente al mismo grupo de complementación que el *mnn2*, se construyó también el mutante triple *mnn1 ldb8*

mnn9 y se analizaron sus N-oligosacáridos encontrándose exactamente los mismos resultados.

V.4. DISCUSIÓN.

En este capítulo, se ha establecido que la mutación mnn2 afecta a la fosforilación del núcleo interno de los N-oligosacáridos impidiendo la adición de fosfato específicamente a uno de los sitios de fosforilación.

El núcleo interno de los N-oligosacáridos de *S. cerevisiae* posee dos sitios potenciales de fosforilación en las manosas C₁ y A₃ (Hernández y cols 1989a,b). Ambas manosas forman parte de dos secuenciasceptoras distintas: C₁ está unida en $\alpha(1,6)$ y sustituida en $\alpha(1,2)$, mientras que A₃ está unida en $\alpha(1,2)$ y sustituida también en $\alpha(1,2)$. Dichas secuenciasceptoras se repiten también, y son sitios potenciales de fosforilación, en la cadena externa (ver Fig. I.4) (Hernández y cols 1989b). Este hallazgo permitió sugerir la posibilidad de que existieran dos manosil-P-transferasas, con distinta especificidad por la secuencia aceptora, responsables de la fosforilación en cada una de estas posiciones. Sin embargo, todos los mutantes con defectos drásticos en la fosforilación de N-oligosacáridos descritos hasta la fecha, presentan una inhibición por igual en las dos posiciones mencionadas: mnn4, mnn6 (Hernández y cols, 1989b), ldb1 y ldb2 (ver capítulo III de esta memoria).

Como ya se ha indicado, tan solo el mutante triple mnn1 mnn2 mnn10 ha mostrado una fosforilación diferencial específica en las dos posiciones (Hernández y cols, 1989b). En este capítulo se ha demostrado que la mutación mnn2 es la responsable de esta fosforilación diferencial impidiendo la unión del grupo fosfato a la manosa A₃. El gen MNN2 fue clonado por complementación del fenotipo mutante por Devlin y Ballou (1990) y parece ser una proteína integral de membrana localizada en Golgi. Aunque el fenotipo de este mutante resulta en la pérdida de las manosas unidas en $\alpha(1,2)$ de las ramificaciones de la cadena externa (ver figura I.4), la sobreproducción de la Mnn2p no daba lugar a un aumento de la actividad $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa en las células de levadura. Esto sugería que la Mnn2p no es la enzima $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa sino una proteína asociada a Golgi involucrada en

el proceso de secreción (Devlin y Ballou, 1990). El fenotipo *mnn2*, por tanto, parece la consecuencia de un defecto en el tráfico de vesículas en el aparato de Golgi.

El hecho de que el mutante *mnn1 mnn2 mnn10*, mostrara una fosforilación diferencial específica en las dos posiciones del núcleo interno resultaba un poco sorprendente dado, que los genes *MNN1* y *MNN10* codifican dos manosiltransferasas (Yip y cols, 1994; Dean y Poster, 1996) y que el gen *MNN2* parece afectar exclusivamente a la estructura de la cadena externa (Devlin y Ballou, 1990, Ballou, 1990). Con estas premisas, la explicación más razonable para justificar el defecto en la fosforilación del núcleo interno, parecía ser un impedimento estérico debido a la presencia de la cadena externa en *mnn1 mnn2 mnn10*, puesto que los estudios para determinar las posiciones de fosforilación en el núcleo se habían hecho con la cepa *mnn1 mnn9*, que carecía de la mayor parte de la cadena externa (Hernández y cols, 1989b). Sin embargo, cuando se introdujo la mutación *mnn2* o *ldb8* en la cepa *mnn1 mnn9*, construyendo los mutantes triples *mnn1 mnn2 mnn9* o *mnn1 ldb8 mnn9*, se encontró que sus N-oligosacáridos carecían también de grupos fosfato unidos a la manosa A₃ del núcleo, a pesar de que su cadena externa se reducía a una sola rama igual que en el mutante *mnn1 mnn9*. Descartada la cadena externa, como responsable del defecto en la fosforilación del núcleo, la única diferencia entre las cepas *mnn1 mnn9* y *mnn1 mnn2 mnn9* o *mnn1 ldb8 mnn9* era el defecto en el gen *MNN2*. En consecuencia, parece clara la implicación del gen *MNN2* en la fosforilación de la manosa A₃.

¿En qué región de la ruta secretora se produce la fosforilación de los N-oligosacáridos? A la vista de la figura I.4 podría sugerirse la existencia de cuatro sitios de fosforilación en los N-oligosacáridos de *S. cerevisiae*, los dos del núcleo ya mencionados, uno en las ramificaciones de la cadena externa (equivalente a la manosa A₃ del núcleo por ser manosas unidas en $\alpha(1,2)$ y sustituidas también en $\alpha(1,2)$) y otro en el extremo no reductor de la cadena externa (equivalente a la manosa C₁, del núcleo por ser manosas unidas en $\alpha(1,6)$ y sustituidas en $\alpha(1,2)$). Odani y cols (1996) sugirieron que alguna de estas reacciones de fosforilación sobre la porción del núcleo, podría suceder en un compartimento previo al aparato de Golgi (pre-Golgi),

mientras que las otras adiciones podrían ocurrir en compartimentos de Golgi propiamente dichos (Stevens y cols, 1982).

No se puede descartar la posibilidad de que se produzca una fosforilación diferencial entre el núcleo y la cadena externa. Podría ocurrir que la fosforilación del núcleo se produjera en el RE, en reacciones catalizadas por una o dos manosilfosfatotransferasas, antes de la adición de la cadena externa evitando los posibles impedimentos estéricos, producidos por la presencia de ésta. Sobre la cadena externa podrían actuar otra u otras dos manosilfosfatotransferasas, lógicamente localizadas en Golgi, puesto que la cadena externa se sintetiza en Golgi. Sin embargo, no conocemos datos que avalen esta hipótesis. Como ya se sugirió anteriormente, a la vista de los datos, parecería más razonable suponer la existencia de sólo dos manosilfosfatotransferasas localizadas en Golgi, que actuarían tanto en la región del núcleo como en la cadena externa, y con especificidad por las secuencias mencionadas más arriba. Esta hipótesis sería compatible con los resultados obtenidos con el mutante *mnn2*. La enzima que cataliza la transferencia del grupo manosil-P sobre la posición A_3 del núcleo sería la misma que cataliza la transferencia del grupo manosil-P sobre las ramificaciones de la cadena externa y estaría localizada en vesículas de Golgi dependientes de la *Mnn2p*, probablemente las mismas vesículas en las que se localiza la $\alpha(1,2)$ manosiltransferasa responsable del inicio de las ramificaciones de la cadena externa, o muy próximas a ellas. En cualquier caso, no debe estar en la ruta secretora en una localización posterior al sitio de acción de la *Mnn1p*, puesto que esta enzima puede transferir manosa(s) en $\alpha(1,3)$ sobre los grupos manosil-P, y está localizada en la región medial-Golgi (Lussier y cols, 1995a).

La segunda manosilfosfatotransferasa, sería responsable de la fosforilación del núcleo en la posición C_1 y la cadena externa en la posición equivalente (extremo no reductor). Esta enzima estaría localizada también en Golgi, en cualquier región a partir de aquella en la que se produce la síntesis de la secuencia aceptara de la cadena externa pero en vesículas independientes de la *Mnn2p*.

A la vista de los resultados obtenidos en este capítulo, sugerimos una pequeña modificación del esquema propuesto en el capítulo III (Fig. III.9) para la ruta de

procesamiento de los N-oligosacáridos en Golgi, quedando como se muestra en la Fig.V.5.

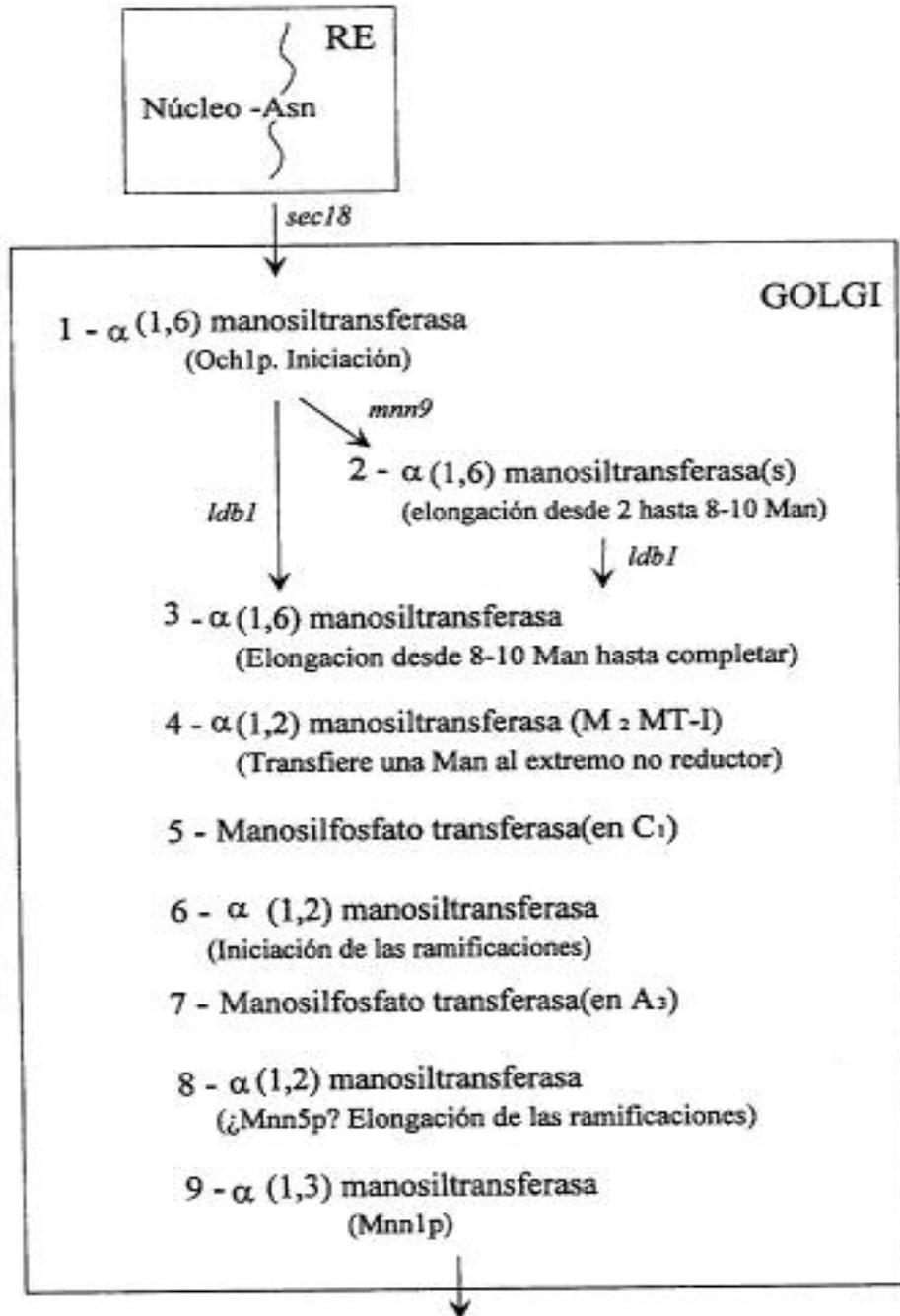


Fig. V.5. Modificación de la ruta propuesta en el capítulo III (Fig. III.9) para el procesamiento de N-oligosacáridos en el aparato de Golgi de *Saccharomyces cerevisiae*. Se indican las etapas afectadas en algunos mutantes.

En esta nueva versión, se han incluido las dos posibles manosilfosfatotransferasas, en lugar de una, sugiriéndose el sitio de actuación de cada una de ellas en la secuencia de procesamiento de los N-oligosacáridos. Según este esquema, la Mnn2p estaría implicada en el correcto transporte a través del compartimento donde se encuentra localizada la enzima 6 y posiblemente también la enzima 8 (podrían ser el mismo), sin embargo, no parece afectar a la acción de la Mnn1p puesto que este mutante adiciona normalmente las manosas terminales unidas en $\alpha(1,3)$ (Alvarado y cols, 1990). La manosiifosfatotransferasa que cataliza la transferencia del grupo manosil-P en A_3 se ha colocado con el número 6 inmediatamente después de la $\alpha(1,2)$ manosiiltransferasa que inicia las ramificaciones. Finalmente, la manosiifosfatotransferasa que cataliza la transferencia del grupo manosil-P en C_1 , se ha colocado con el número 5, inmediatamente después de la enzima que completa la síntesis de su secuencia aceptora en el extremo no reductor de la cadena externa (enzima 4) y antes de las enzimas afectadas por la mutación mnn2. Esta enzima podría haberse ubicado también en la secuencia, después de las enzimas afectadas por la mutación mnn2, ya que los datos disponibles no permiten diferenciar entre las dos posiciones. En cualquier caso, siempre antes del sitio de actuación de la Mnn1p.

El establecimiento de una correspondencia exacta entre las enzimas implicadas en el procesamiento de N-oligosacáridos y las vesículas del aparato de Golgi que las contienen, requerirá estudios adicionales. La caracterización futura de los defectos de algunos de los mutantes obtenidos en este trabajo, podrá contribuir a seguir encajando las piezas de este rompecabezas que constituyen los procesos de secreción-glicosilación en *Saccharomyces cerevisiae*.

VI. CONCLUSIONES.

1.- El método de selección de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con menor carga negativa en la superficie celular, basado en la reducción en la afinidad por la resina de intercambio aniónico QAE-Sephadex, resultó ser bastante efectivo puesto que alrededor del 3% de las colonias seleccionadas mostraron también una reducción en su afinidad por el colorante catiónico alcian blue.

2.- El producto del gen LDB2 es requerido para la transferencia de grupos manosil-P a los N- oligosacáridos en todas las posiciones posibles de fosforilación tanto del núcleo interno como de la cadena externa.

3.- El producto del gen LDB1 es necesario para varias reacciones de procesamiento de los N-oligosacáridos atribuidas a la región media del aparato de Golgi, así como a la hidrólisis de una manosa específica localizada aparentemente en el RE.

4.- El producto del gen LDB1 es requerido también para el correcto funcionamiento de la región tardía del aparato de Golgi ya que afecta al procesamiento proteolítico de una proteína de secreción mediado por la proteasa Kex2p, la cual se ha localizado en la mencionada zona del aparato de Golgi. Esto sugiere que el producto de dicho gen sea una proteína implicada en el tráfico intracelular de proteínas de secreción a través varias zonas del aparato de Golgi, y probablemente del RE.

5.- La transferencia de la tercera manosa de los restos O-glicosídicos, que se realiza también en la región media del aparato de Golgi, catalizada por la Mnt1p/Kre2p, parece requerir la colaboración del producto del gen LDB1 para su correcto funcionamiento.

6.- El producto del gen MNN2, implicado en el tráfico de glicoproteínas a través de la región central del aparato de Golgi, y descrito como necesario para la síntesis de las ramificaciones de la cadena externa de los N-oligosacáridos, es requerido para el procesamiento de la región del núcleo interno, ya que la Mnn2p participa en la fosforilación del citado núcleo interno, en una posición específica de las dos posibles.

7.- Deben existir al menos dos manosilfosfatotransferasas implicadas en la fosforilación del núcleo interno de los N-oligosacáridos. Una de ellas catalizaría la transferencia de residuos Manosil-P a la posición 6 de la manosa C₁, mientras que la otra catalizaría la transferencia de los restos Manosil-P a la posición 6 de la manosa A₃ y Esta última requeriría la colaboración de la Mnn2p.

8.- El producto del gen LDB2 no es probable que sea una enzima que cataliza la transferencia de residuos manosil-fosfato, puesto que afecta a la fosforilación de N-

oligosacáridos en todas las posiciones posibles, sino que debe ser algún factor requerido para todo el proceso de fosforilación. Lo mismo ocurrirá con el producto del gen MNN6.

VII. APÉNDICE.

VII.1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

YEPD.

Extracto de levadura (Difco) al 1%, Bacto-Peptona (Difco) al 2% y Glucosa (Panreac) al 2% en agua destilada. En la preparación de medio sólido se añadía, además, agar (Difco) al 2%.

YEPD SÓLIDO SUPLEMENTADO CON VANADATO.

Se preparaba una solución 0.5 M de ortovanadato sódico (Sigma) en agua, se esterilizaba por filtración y se añadía la cantidad adecuada al medio estéril antes de que éste solidificara. Seguidamente se repartía en las placas (Kanik-Ennulat y Neff, 1990).

YEPD SÓLIDO O LÍQUIDO SUPLEMENTADO CON KCl.

En este caso, el KCl se disolvía en el medio antes de esterilizarlo de forma que la concentración final fuera de 0.5 M (Ballou, 1990).

MEDIO SINTÉTICO (MEDIO K).

Se preparaba en tampón citrato-fosfato potásico 0.3 M, pH 5.5. La composición del medio era la siguiente (Olivero y cols 1985):

Medio base:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 5 g
- KH_2PO_4 : 5g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.13 g
- Agua desmineralizada hasta 1 l.

Solución de vitaminas:

- Biotina: 0.01 g
- Pantotenato de calcio: 0.80 g
- Inositol: 40 g
- Niacina: 1.6g
- Piridoxina: 1.6 g
- Tiamina: 1.6 g
- Agua desmineralizada hasta 1l.

Solución de oligoelementos A

- H_3BO_3 : 1 g
- KI: 0.2 g
- Na_2MoO_4 : 0.4 g
- Agua desmineralizada hasta 1 l

Solución de oligoelementos B:

- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0.08 g
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$: 0.04 g
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$: 0.08 g
- HCl 10^{-3} N hasta pH 3
- Agua desmineralizada hasta 1 l

Solución de glucosa: 20g en 200 ml de agua destilada.

Preparación del medio:

El medio base se esterilizaba en autoclave, mientras que las soluciones de vitaminas y oligoelementos se esterilizaban por filtración. Para obtener 1l de medio completo, a 800 ml de medio base se le añadían 200 ml de la solución de glucosa y 0.5 ml de cada una de las soluciones de vitaminas y oligoelementos, todo ello en condiciones de esterilidad.

MEDIO DE PREESPORULACIÓN.

Acetato potásico al 1%, Yeast nitrogen base (Difco) al 0.6%, extracto de levadura al 0.5%, bacto-peptona al 0.5% y glucosa al 10% en agua destilada. Todos los componentes se disolvían en agua antes de la esterilización (Sherman, 1991).

MEDIO DE ESPORULACIÓN

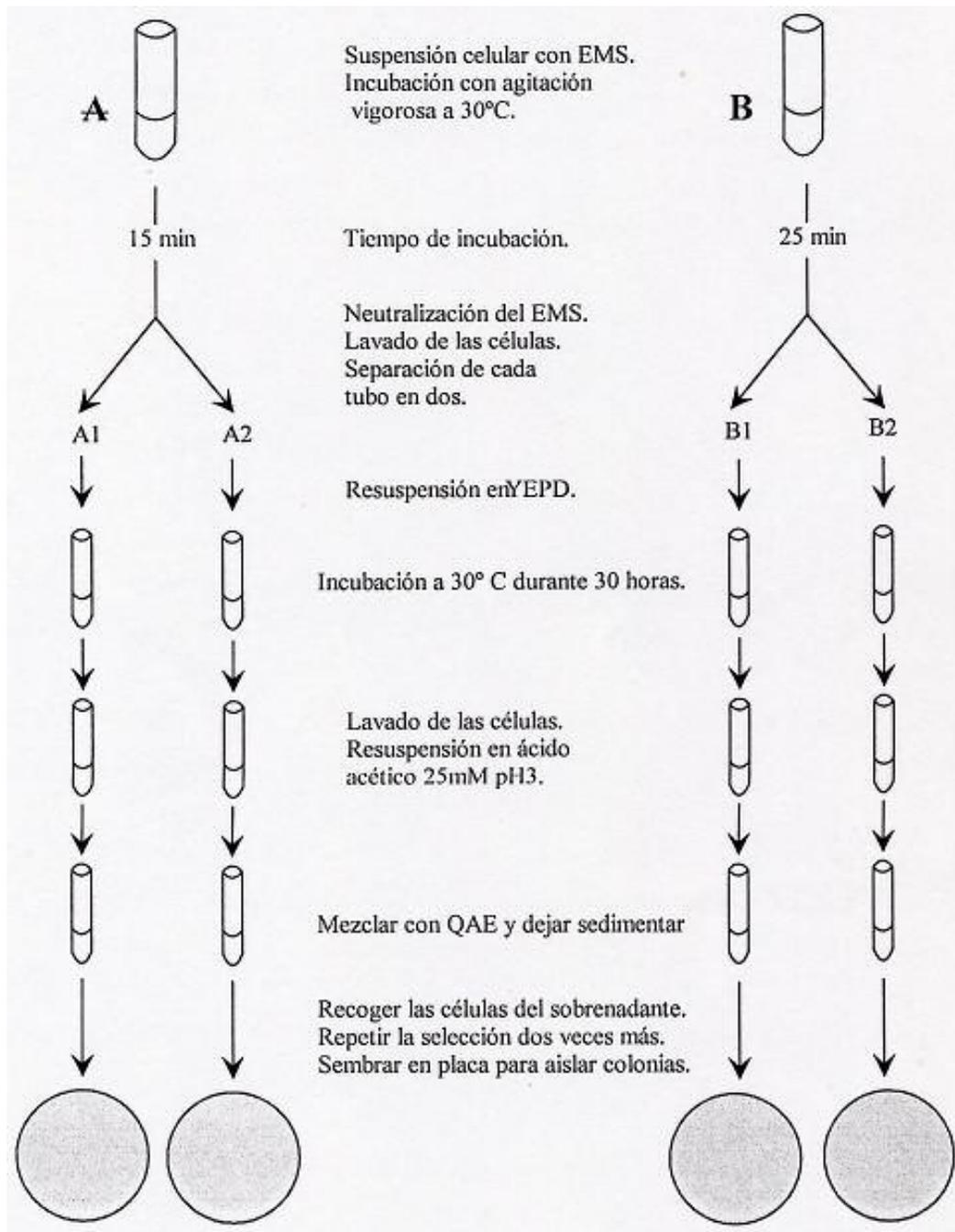
Acetato potásico al 1%, extracto de levadura al 0.1% y glucosa al 0.05% en agua destilada (Sherman, 1991).

VII.2. MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN DE MUTANTES CON DEFECTOS EN LA INCORPORACIÓN DE FOSFATO.

MUTAGÉNESIS

La mutagénesis se realizó por tratamiento con el agente mutagénico sulfonato de etil metano (EMS), siguiendo el protocolo que se muestra en el siguiente esquema (Mañas, 1995):

El EMS se neutralizó con 5ml de tiosulfato sódico al 5%. Las células se lavaron dos veces con tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7 y cada uno de los dos tubos se separó, a su vez, en dos. A continuación se resuspendieron en 4ml de YEPD líquido y se crecieron durante 30 horas para permitir la expresión de las mutaciones (modificado a partir de Lawrence, 1991).



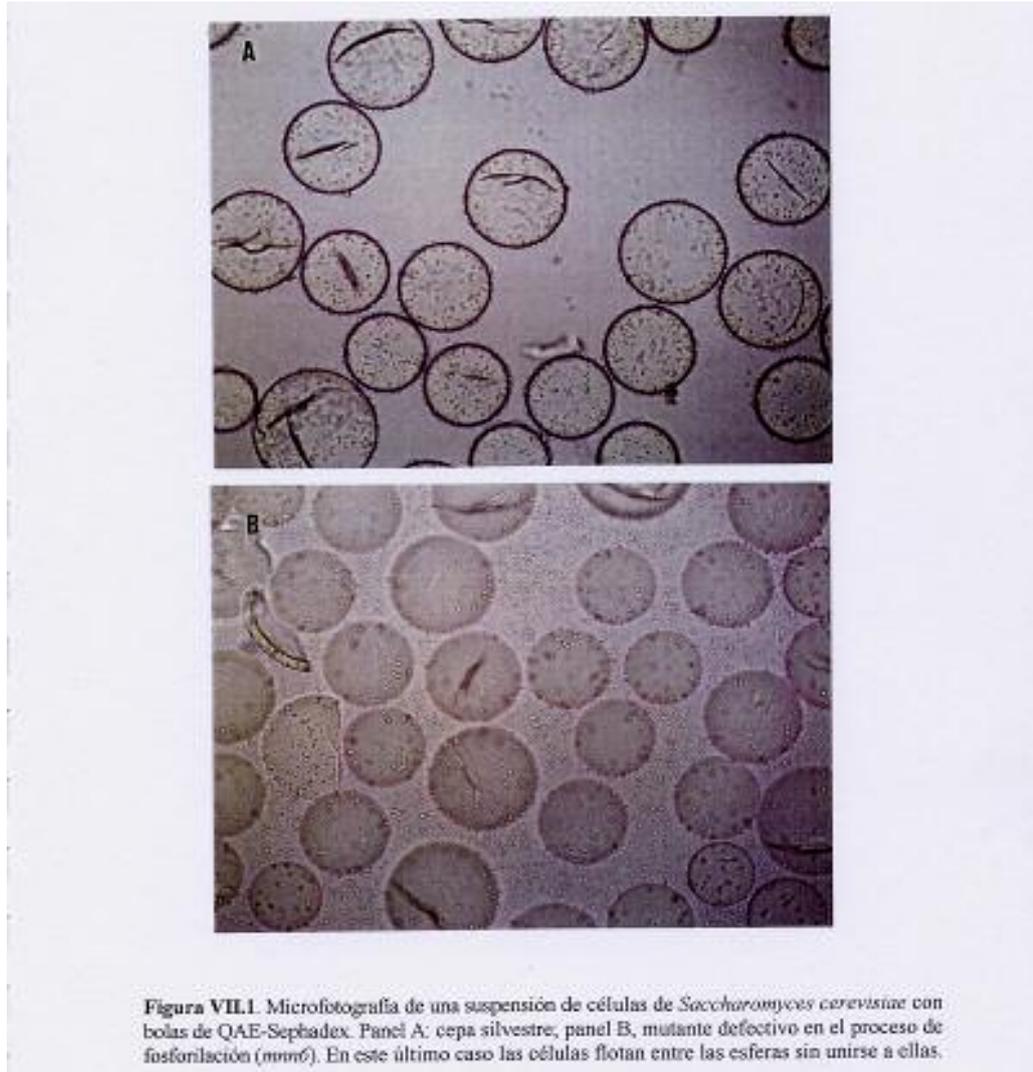
SELECCIÓN

El método de selección se basa en la disminución de la afinidad de los mutantes, con menor carga negativa en su superficie celular, por una resina de intercambio aniónico: QAE- Sephadex. Esta disminución de la afinidad fue descrita por Ballou

(1990) para los mutantes *mnn4* y *mnn6*, pero esta característica no ha sido utilizada hasta ahora en el aislamiento de nuevos mutantes.

Las bolas de QAE-Sephadex se lavaron con agua destilada, se mantuvieron durante 30 minutos en etanol al 95% y finalmente se lavaron dos veces con agua estéril para eliminar el etanol. El experimento se realizó en tubos de vidrio de 12 ml de capacidad a los que se añadían 2 ml de una suspensión de células en ácido acético 25 mM, pH 3. A este pH los grupos carboxilo ($pK > 4$) de las manoproteínas de la pared celular están protonados y son los grupos fosfato presentes en los oligosacáridos, cuyo segundo pK es 2, los únicos responsables de la carga negativa de la superficie celular. La suspensión celular tenía una D.O. aproximada de 0.5 puesto que un exceso de células daría lugar a la saturación de las bolas y consecuentemente quedarían células silvestres en el sobrenadante que no podrían unirse al QAE. A esta suspensión se añadió 1 ml de la suspensión de bolas de QAE en agua estéril. La mezcla de bolas y células se agitó lentamente durante 5 minutos y se dejó reposar durante otros 5.

A continuación se recogieron del sobrenadante las células que no se unieron a las bolas de QAE y con ellas se repitió el mismo proceso dos veces más. Simultáneamente se tomaba una muestra de los precipitados y se observaba al microscopio para comprobar que la mayoría de las células aparecían unidas a la superficie de las bolas de QAE. En la Fig. VII.1, panel A, se muestra el aspecto que presentaban. Se observan numerosas células adheridas a la superficie de las esferas y apenas hay células libres entre ellas. En el panel B se muestra un control con células del mutante *mnn6* en el cual las células aparecen flotando entre las esferas de QAE.



VII.3. MANIPULACIONES GENÉTICAS.

(Guthrie y Fink (Eds.), 1991; Mañas, 1995)

OBTENCIÓN DE DIPLOIDES

Las estirpes haploides de tipo sexual opuesto se mezclaban en la superficie de una placa de medio YEPD sólido. Tras varias horas de incubación a 30°C, los zigotos se identificaban por su morfología y se aislaban utilizando un micromanipulador específico para levaduras. El sistema de micromanipulación se adquirió completo de la casa Micro Video Instruments INC, Avon, MA (U.S.A.).

Los cigotos se incubaban en las mismas placas de YEPD a 30°C durante 2-3 días hasta que las colonias se hacían visibles.

DISECCIÓN DE ASCAS.

Los diploides se esporulaban según se indicó en el apartado II.3. Posteriormente, se tomaba 1 ml del medio de esporulación y se lavaba con agua destilada estéril. A continuación se adicionaba glusulasa (Biomedical Products Dep., DuPont Company) hasta obtener una dilución final de 1:20 y se incubaba durante 15 minutos a 37°C sin agitación. En ese momento, se añadía agua destilada estéril para diluir la enzima hasta niveles en los que su actividad era prácticamente despreciable. La glusulasa digiere la pared del asca facilitando la liberación de las cuatro ascosporas que posteriormente pueden separarse por micromanipulación. Las esporas se depositaban ordenadamente en placas de YEPD y se incubaban a 30°C durante 3-5 días, hasta que cada una de ellas daba lugar a una colonia visible.

VII.4. TINCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LEVADURA CON EL COLORANTE ALCIAN BLUE.

(Friss y Ottolenghi, 1970; Ballou, 1990; Mañas, 1995).

El colorante se preparaba en HCl 0.02 N a una concentración de 0.1%. Tras agitación vigorosa durante 15 min, se centrifugaba a 5000 rpm para eliminar el precipitado que el HCl no fue capaz de disolver.

Las células se dejaban crecer durante 48 horas en medio YEPD sólido. Seguidamente se tomaba una pequeña cantidad utilizando palillos estériles y se depositaban en un tubo de ensayo de vidrio. Es importante evitar transferir agar, ya que el colorante se une fuertemente a él pudiendo distorsionar los resultados. A continuación se lavaban con 1 ml de suero fisiológico y posteriormente se añadían 0,2 ml de la solución de alcian blue en HCl. Se agitaba hasta conseguir una correcta mezcla de las células y el colorante, y se dejaba a temperatura ambiente de cinco a diez minutos. Las células se centrifugaban a 5000 rpm y se eliminaba el sobrenadante por decantación, limpiando con papel de filtro los restos de éste que quedaban en la

boca del tubo. Más tarde, se lavaba dos veces el precipitado con 2 ml de HCl 0.02 N sin eliminar el sobrenadante la segunda vez.

Una vez realizada la prueba se estimaba la intensidad del color azul del precipitado en una escala de 0 (mnn6) a 6 (mnn1). El mutante mnn9 y la cepa silvestre muestran valores intermedios (3 y 5 respectivamente).

Cuando el test se hacía a un gran número de muestras, para una mayor comodidad y rapidez, se utilizaban placas de microtitulación con 96 pocillos donde se depositaban las células reduciéndose convenientemente la cantidad de los reactivos añadida:

Suero fisiológico: 0.2 ml

Solución de alcian blue: 0.1 ml

HCl 0.02N: 0.2 ml

Para precipitar las células en los pocillos después de cada lavado, las placas se centrifugaban a 2000 rpm en una centrífuga de sobremesa utilizando un rotor con un adaptador adecuado. En la Fig. VII .2 se muestra un ejemplo de la coloración de distintas colonias.



Figura VII.2. Fotografía en la que se muestra la tinción de distintas colonias de *S. cerevisiae* con el colorante alcian blue en una placa de microtitulación. Las diferencias en la intensidad del color azul reflejan la distinta afinidad de las células por el colorante.

VII.5. ELECTROFORESIS DE LA INVERTASA EN CONDICIONES NATIVAS.

(Ballou, 1990; Mañas, 1995)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA ENZIMÁTICA.

Las levaduras se crecían en un tubo de cultivo con 5 ml de medio YEPD líquido durante 48 horas. En este momento los cultivos probablemente habrían agotado ya la glucosa del medio, sin embargo, para asegurar la desrepresión de la invertasa en todos los casos, las células se centrifugaban, se lavaban una vez con medio de desrepresión (YEPD con 0.1% de glucosa) y se incubaban en 5 ml de este último durante 3 horas. Seguidamente, las células se separaban por centrifugación, se lavaban con 3 ml de tampón TBP suplementado con PMSF, y se rompían por agitación vigorosa en presencia de bolas de vidrio de 0.45 mm de diámetro durante 10 min. Las bolas de vidrio se separaban por decantación y el lisado celular se

clarificaba por centrifugación en una microfuga descartando el precipitado. El sobrenadante de esta última centrifugación se mezclaba con el tampón de muestra para la electroforesis (TBP suplementado con glicerol y azul de bromofenol) en proporción 2:1 y se cargaba en el gel de 5 a 10 µl por cada pocillo.

PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA Y DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS.

Se preparaban geles nativos de 0.75 mm de espesor al 5% de poliacrilamida en un sistema de electroforesis de 16x18 cm. La fórmula utilizada en la preparación del gel era la siguiente:

Agua destilada.....	21.9 ml
Tampón Tris-HCl, 0.8 M, pH 7.3.....	3 ml
Solución de acrilamida-bis (30-0.8).....	5 ml
Persulfato amónico (0.1g/ml)	0.15 ml
Temed.....	30 µl

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó tampón Tris-Borato 8 mM, pH 7.5 manteniendo una corriente constante de 10 mA a temperatura ambiente.

REVELADO DEL GEL.

Los geles se revelaban determinando la actividad invertásica, utilizando sacarosa como sustrato y siguiendo un método que detecta la glucosa liberada en el gel por acción de la invertasa. Los geles se incubaban a 4°C con 100 ml de una solución de sacarosa 0.1 M en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.1, que había sido preincubada a la misma temperatura. Tras 10 minutos de incubación, la solución de sacarosa se cambiaba por otra precalentada a 37°C, donde se mantenía durante otros 10 minutos.

Posteriormente el gel se lavaba con agua y se sumergía en una solución de cloruro de trifenil tetrazolio, calentando la cubeta en una placa hasta la aparición de color rojo. Cuando la intensidad del color hacía perfectamente visibles a las bandas de invertasa (aproximadamente 1 minuto), el gel se lavaba rápidamente con agua y se depositaba en una solución de ácido acético al 10%.

Para la conservación definitiva, los geles se colocaban sobre papel Wathman n° 1 y secaban en un secador de geles de BIO-RAD.

VII.6. SOLUBILIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE MANOPROTEÍNAS.

(Ballou y cols, 1989; Hernández y cols, 1989a, b; Ballou, 1990).

SOLUBILIZACIÓN CON CON TAMPÓN CITRATO EN CALIENTE

Partiendo de un inóculo adecuado, los microorganismos se crecían en YEPD líquido durante dos días a 30°C (fase estacionaria temprana). Las células se separaban por centrifugación, se lavaban dos veces con agua destilada y se resuspendían en tampón citrato 0.02 M, pH 7, a una concentración aproximada de 2 g de peso húmedo/ml. La suspensión celular se autoclavaba durante una hora, se dejaba enfriar, se centrifugaba a 40000xg durante 15 min y se recuperaba el sobrenadante. El precipitado se resuspendía de nuevo en tampón citrato (1.5 veces del volumen usado anteriormente), se autoclavaba y centrifugaba en iguales condiciones recogiendo también el sobrenadante que se mezclaba con el anterior. Los sobrenadantes contienen las manoproteínas en solución acuosa.

PURIFICACIÓN

La etapa inicial de purificación consistía en una precipitación con metanol. A la solución acuosa de manoproteínas se le añadían tres volúmenes de etanol manteniéndose durante 12 h a 4°C con agitación. A continuación se centrifugaba a 4500xg descartando el sobrenadante y el precipitado se disolvía en agua con ayuda de sonicación (aproximadamente 1ml/gr de peso húmedo de células). Si la solución no aparecía transparente, el material insoluble se eliminaba por centrifugación a

40000xg. Esta solución se dializaba frente agua destilada y se liofilizaba obteniéndose el denominado "manano crudo".

La segunda etapa de purificación consistía en una precipitación con "cetavlon" (bromuro de hexadecil-trimetilamonio). El manano crudo se disolvía en agua a una concentración aproximada de 2 g por 25 ml (al volumen resultante nos referiremos a continuación como "V"). A continuación, se disolvía la misma cantidad de cetavlon en el mismo volumen de agua y se mezclaba con lo anterior manteniéndose de 12 a 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaba a 3500xg, se descartaba el precipitado, y al sobrenadante se le añadía un volumen "V" de ácido bórico al 2%, ajustando el pH a 8.8 mediante adición gradual de NaOH 2 N. Esta solución se dejaba a temperatura ambiente durante 12 h para permitir la precipitación de las manoproteínas, se centrifugaba a 3500xg durante 15 min y el precipitado se lavaba con borato sódico al 0.5%, pH 8.8.

La tercera etapa de purificación consistía en una precipitación de las manoproteínas con etanol. El precipitado obtenido en la etapa anterior se disolvía en un volumen "V" de una solución de ácido acético al 2% y acetato sódico también al 2% en agua destilada. A continuación se añadían tres volúmenes (3 "V") de etanol absoluto para precipitar el manano centrifugándose a continuación para recuperar el precipitado. Este se lavaba con ácido acético al 2% en etanol y una vez más con etanol absoluto. Las manoproteínas así obtenidas se disolvían en agua, se dializaban frente agua destilada y se liofilizaban.

La etapa final de purificación consistía en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex (Bio Rad). La muestra de manoproteínas se disolvía en tampón Tris-HCl, 20 mM, pH 7.5 y se aplicaba a una columna (2.5x9 cm) empacutada con DEAE-Sephadex y equilibrada con el mismo tampón. La columna se lavaba con 50 ml del tampón mencionado para eliminar el material no unido a la resina y a continuación se aplicaba un gradiente lineal de NaCl (0-0.5M) en el mismo tampón recogiendo fracciones de 8 ml. En las primeras fracciones, después de aplicado el gradiente, eluía un pico de carbohidrato asociado a un pico de proteína en el que están incluidas las manoproteínas. Dichas fracciones se recogían, se dializaban frente a agua destilada y se liofilizaban obteniéndose de esta forma el manano puro.

Todas las etapas mencionadas se realizaban con microorganismos procedentes de 6 l de cultivo (salvo especificación de otra cantidad) obteniéndose un rendimiento aproximado de 0.5 g de manoproteínas. Esta cantidad podía variar dependiendo del mutante utilizado (ej. El mutante mnn9 ofrece un rendimiento menor que la cepa silvestre).

VII.7. SDS-PAGE, ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNO-DETECCIÓN DE EXO-GLUCANASAS.

PREPARACIÓN DEL GEL Y DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS

Se siguió el método de Laemli (1970). Las muestras conteniendo la cantidad adecuada de proteína se mezclaban con el tampón de muestra en proporción 1:1, se hervían durante 3 min y se cargaban en los pocillos.

La electroforesis se realizaba en un sistema discontinuo con un gel concentrador al 4% de acrilamida y un gel separador al 7.5% de acrilamida que se preparaban con las siguientes fórmulas:

Gel concentrador:

Agua destilada.....	6.1 ml
Tampón Tris-HCl, 0.5 M, pH 6.8.....	2.5 ml
Solución de acrilamida-bis (30-0.8%)...	1.3 ml
Solución de SDS al 10%.....	0.1 ml
Persulfato amónico al 10%.....	50 µl
Temed.....	10 µl

Gel separador:

Agua destilada.....	9.8 ml
---------------------	--------

Tampón Tris-HCl, 1.5 M, pH 8.8.....	5 ml
Solución de acrilamida-bis (30-0.8%)....	5 ml
Solución de SDS al 10%.....	0.2 ml
Persulfato amónico al 10%.....	0.1 ml
Temed.....	20 µl

El espesor del gel era de 0.75 mm. Para la electroforesis se utilizó el mismo equipo que en la electroforesis en condiciones nativas (Hoeffer) con placas de 16x18 cm. Tras cargar las muestras, la electroforesis se desarrollaba manteniendo la corriente constante a 20 mA en el gel concentrador y a 25 mA en el gel separador.

ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE LAS EXOGLUCANASAS (WESTERN BLOT)

La electrotransferencia se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo (Bio-Rad). Las bandas de exoglucanasa se detectaron por una reacción coloreada aprovechando la reacción producida por la fosfatasa alcalina acoplada al anticuerpo secundario. Una vez tratadas con los anticuerpos (ver sección II.14), las membranas se lavaban 4 veces con TBS y se revelaban con una solución, preparada justo antes de su uso, compuesta por los siguientes reactivos:

50 ml de bicarbonato sódico 0.1 M conteniendo $MgCl_2$ 1 mM.

0.5 ml de una solución que contiene 30 mg de NBT en 1 ml de N,N dimetilformamida (DMF) al 70%.

0.5 ml de una solución que contiene 15 mg de BCIP en 1ml de DMF.

El NTB y BCIP son sales que forman parte del "Immun-Blot Alkaline Phosphatase Assay Kit" de Bio-Rad.

Las membranas se incubaban en esta solución hasta la aparición de las bandas. Cuando éstas alcanzaban la intensidad adecuada, la reacción se paraba añadiendo

agua destilada, se lavaban varias veces con agua destilada y finalmente se secaban entre papeles de filtro.

Para la visualización de la exoglucanasa en las membranas, sin utilización de anticuerpos, éstas se incubaban con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) al 0.1% en 50% de metanol durante 5 minutos, lavándose a continuación varias veces con una solución de metanol al 50% y 10% de ácido acético hasta la desaparición del fondo azul. Finalmente, las membranas se lavaban varias veces con agua destilada y se dejaban secar al aire.

VII.8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA (Método de Bradford).

Para determinar la concentración de proteína en una muestra, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) tomando como referencia una recta patrón preparada con distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA).

REACTIVO DE BRADFORD

La composición del reactivo de Bradford es la siguiente:

- 25 mg Coomasie Brillian Blue G250 (Sigma).
- 12.5 ml de etanol 95%.
- 25 ml de ácido fosfórico al 85%.
- Agua destilada hasta 250 ml..

Una vez preparado, el reactivo se filtraba y se guardaba a 4°C hasta su uso.

MÉTODO

Las muestras patrón y problema se llevaban hasta un volumen de 100 µl con agua destilada y se les añadían 0.5 ml del reactivo de Bradford. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se medía la densidad óptica a 595 nm. La equivalencia entre las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro y la cantidad de proteína, se calculaba mediante una recta patrón construída con seroalbúmina bovina.

VII.9. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATO (Método del fenol-ácido sulfúrico).

En la determinación de carbohidrato se utilizó el método del fenol-sulfúrico (Dubois y cols, 1956) tomando como referencia una recta patrón construida con distintas concentraciones de manosa. A la muestra (máximo 100 μ l) se le añadían 0.4 ml de fenol al 4%, agitándose vigorosamente. Seguidamente se añadían 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitaba de nuevo y el color desarrollado se leía a 490 nm.

VII. 10. LIOFILIZACIÓN.

Las soluciones de carbohidrato se dializaban frente a agua destilada y se congelaban sumergiendo el recipiente en una mezcla de nieve carbónica e isopropanol. Durante este proceso, el recipiente se giraba continuamente para que la congelación se produjera en capas finas con el fin de facilitar la sublimación. Una vez congelada la muestra, el recipiente se acoplaba a un liofilizador (Telstar) manteniéndose hasta que todo el hielo se sublimaba. El tiempo de liofilización dependía del volumen de la muestra.

VII.11. ASIGNACIÓN DE SEÑALES EN UN ESPECTRO DE ^1H RMN.

En la sección II.16 se describieron los desplazamientos químicos característicos de los protones anoméricos de las manosas constituyentes de las estructuras objeto de estudio.

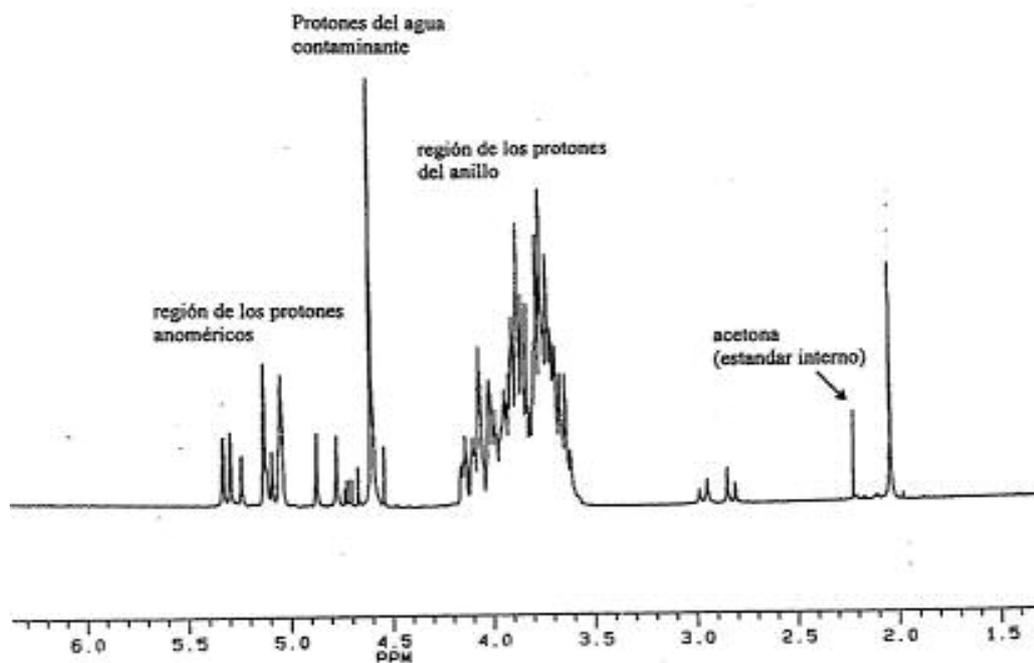
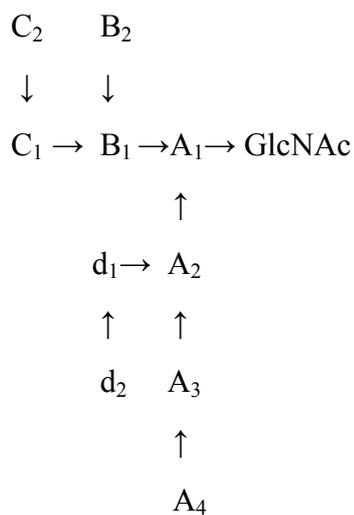


Figura VII.3. Espectro completo de ^1H RMN de un N-oligosacárido liberado de la proteína por tratamiento con endo H. El oligosacárido tiene la composición Man_{10} - GNAc con la glucosamina en el extremo reductor, y está disuelto en agua deuterada a la que se le ha añadido una pequeña cantidad de acetona.

En la Fig. VII.3 se muestra el espectro completo de ^1H RMN correspondiente a un oligosacárido modelo con la estructura siguiente:



En la determinación de estructuras de interés para el presente trabajo, la región del espectro que más nos interesaba era la correspondiente a los protones anoméricos (entre 4.65 y 5.55 PPM aproximadamente) y ésta es precisamente la que se muestra en los espectros de la Fig. VII.4.

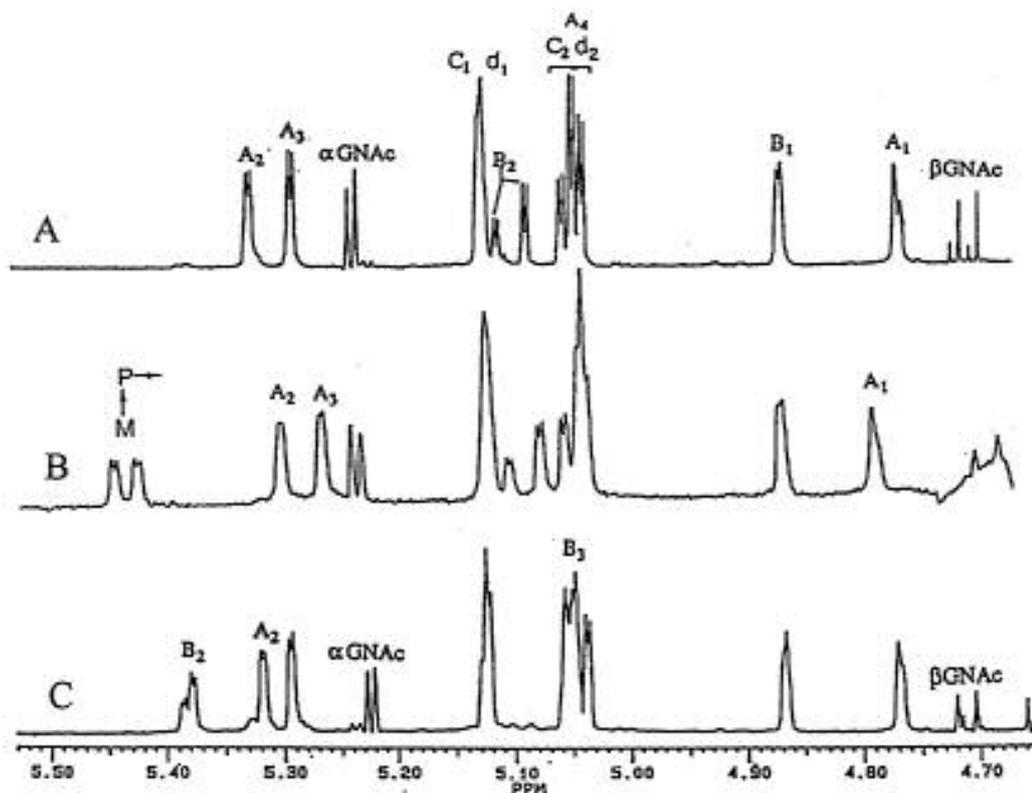
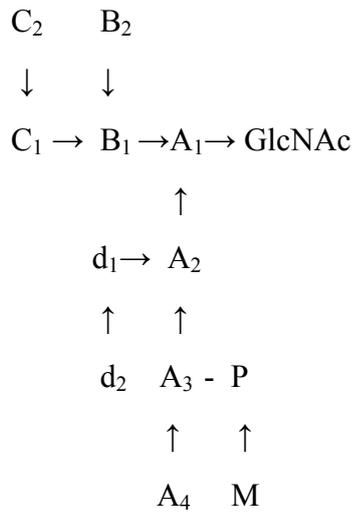
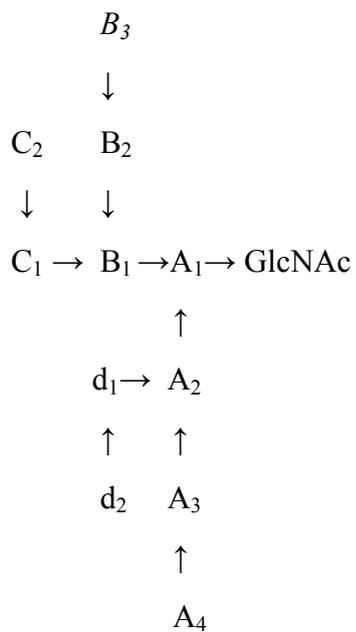


Figura VII.4. Espectros de ^1H RMN de N-oligosacáridos liberados de la proteína por tratamiento con endo H. Se muestra solamente la región de los protones anoméricos y se indican las manosas a las que corresponden algunas de las señales. A, M_{10} -GNAc; B, Man-P- M_{10} -GNAc; C, M_{11} -GNAc (ver texto).

El espectro A corresponde a la estructura anterior y en él se indica a qué manosa corresponde cada una de las señales. En el espectro B se indican los cambios que sufre esta región del espectro cuando la molécula está fosforilada en la posición 6 de la manosa A_3 con un grupo fosfato diesterificado.



Finalmente, en el espectro C se indican los cambios que se producen cuando está presente la manosa B₃:



VII.12. TAMPONES UTILIZADOS.

Tampón acetato (ácido acético/acetato sódico) 1 M, pH 5.2

Preparación

Preparar 60 g de ácido acético en 800 ml de agua destilada. Añadir NaOH 1M hasta conseguir el pH deseado y enrasar con agua destilada hasta 1 l.

Para obtener las concentraciones utilizadas se diluía adecuadamente con agua destilada:

Tampón acetato 25 mM, pH 5.2 para los experimentos con la exoglucanasa.

Tampón acetato 0.1 M, pH 5.1 para el revelado de los geles de electroforesis de invertasa.

Tampón bicarbonato sódico (NaHCO₃ 0.1 M, MgCl₂ 1 mM, pH 9.8) para el revelado del western blotting

Preparación

Preparar 8.4 g de NaHCO₃ y 0.2 g de MgCl₂ en 800 ml de agua destilada. Mezclar adecuadamente y ajustar el pH a 9.8 con NaOH 1 M. Enrasar con agua destilada hasta 1 l.

Tampón citrato-fosfato

Preparación

Preparar 500 ml de una solución de ácido cítrico 0.6 M.

Para la preparación del medio K se utilizó a una concentración de 0.3 M y pH 5.5. Para ello, se tomaban 100 ml de la solución anterior, se ajustaba el pH a 5.5 con fosfato potásico 2 M y añadía agua destilada hasta 200 ml.

Para las digestiones con endo H se utilizó a una concentración de 50 Mm y pH 5.7. En este caso se tomaban 5 ml de la solución anterior, se ajustaba el pH a 5.7 con fosfato potásico 2 M y añadía agua destilada hasta 60 ml.

Para las digestiones con la α -(1,6)endomanosidasa se utilizó a una concentración de 0.1 M y pH 6 conteniendo, además, CaCl₂ 0.2 mM. Se tomaban 100 ml de la solución inicial, se ajustaba el pH a 6 con fosfato potásico 2 M, se añadía la cantidad

de CaCl_2 necesaria para conseguir 600 ml a una concentración de 0.2 mM y finalmente se enrasaba con agua destilada hasta 600 ml.

Tampón citrato 20 mM para la extracción de las manoproteínas por el método del citratocaliente.

Preparación

Disolver 1.9 g de ácido cítrico en 400 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 1M y añadir agua destilada hasta 500 ml.

Tampón fosfato 0.5 M

Preparación

Preparar 34.02 g de fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua y, por separado, 43.5 g de fosfato potásico dibásico (K_2HPO_4) en otros 500 ml de agua destilada. Mezclar en una proporción adecuada hasta conseguir el pH deseado.

Diluir convenientemente con agua destilada hasta conseguir la concentración utilizada en cada caso:

Tampón fosfato 0.5 M, pH 7.7 para neutralizar el pH dado por la glicina en la cromatografía de afinidad.

Tampón fosfato 0.1 M, pH 7 para neutralizar la acción del EMS durante la mutagénesis.

TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) para el revelado del blotting

Preparación

Preparar 4.84 g de Tris y 58.48 g de NaCl en 1500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado y añadir agua destilada hasta 2 l.

TBS-T para el revelado del blotting

Posee la misma composición que el TBS, más un 0.05% de Tween 20.

Preparación

Adicionar 0.05 ml de Tween 20 a 100 ml de TBS.

Tampón Tris/HCl 1 M

Preparación

Disolver 242.2 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Ajustar al pH deseado con HCl concentrado. Mezclar y añadir agua destilada hasta 1 l.

Diluir convenientemente con agua destilada hasta la concentración indicada en cada caso:

Tris/HCl 0.5 M, pH 6.8 para la preparación del gel concentrador de SDS-PAGE.

Tris/HCl 1.5 M, pH 8.8 para la preparación del gel separador de SDS-PAGE.

Tris/HCl 0.8 M, pH 7.3 para la preparación del gel de electroforesis de invertasa.

Tris/HCl 20 mM, pH 7.5 para la purificación de las manoproteínas en columnas de DEAE-Sephacell.

Tampón de transferencia del blotting (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanol)

Preparación

Añadir 18.2 g de Tris y 86.5 g de glicina a 4 l de agua destilada. Adicionar 1200 ml de metanol y llevar hasta 6 l con agua destilada. El pH de la solución obtenida es de 8.3-8.5.

Tampón para el desarrollo de la electroforesis de la invertasa en condiciones nativas (Tris/ácido bórico, 8 mM, pH 7.5)

Preparación

Disolver 1 g de Tris y 5.02 g de ácido bórico en 800 ml de agua destilada. Mezclar adecuadamente y a continuación enrasar con agua destilada hasta 1 l.

Tris 2 mM (columnas QAE-Sephadex para el fraccionamiento de oligosacáridos fosforilados)

Preparación

Se prepara una disolución 1 M disolviendo 121.1 g de Tris en 800 ml de agua destilada y enrasando posteriormente con agua hasta 1 l. Antes de utilizar se diluía 50 veces con agua destilada para conseguir la concentración de 2 mM.

Tampón Tris-glicina, pH 8.3 para el desarrollo de SDS-PAGE

Preparación

Preparar 9 g de Tris y 43.2 g de glicina en 500 ml de agua destilada y mezclar adecuadamente. Añadir 3 g de SDS y aplicar calor para su total disolución. Posteriormente enrasar con agua destilada hasta un volumen final de 600 ml.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H. y te Heesen, S. (1996) Cloning and characterization of the ALG3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **6**, 439-444.

Albright, C. F., Orlean, P. y Robbins, P. W. (1989) A 13 amino acid peptide in three Yeast glycosyltransferases may be involved in dolichol recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7366-7369.

Albright, C. F. y Robbins, P. W. (1990) The sequence and transcript heterogeneity of the Yeast gen ALG1, an essential mannosyltransferase involved in N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **265**, 7042-7049.

Ames, B. N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* **8**, 115-118.

Antalis, C., Fogel, S. y Ballou, C. E. (1973) Genetic control of Yeast mannan structure. *J. Biol. Chem.* **248**,4655-4659.

Ballou, L. (1975) Genetic control of Yeast mannan structure: Mapping genes *mnn2* and *mnn4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacterial.* **123**, 616-619.

Ballou, C. E. (1982) Yeast cell wall and cell surface. In: The molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expresión. Strathem, J. N., Jones, E. W. y Broach, J.R. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp. 335-360.

Ballou, C. E. (1990) Isolation, characterization and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with non-conditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* **185**,440-470.

Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P-K., Dell, A. y Ballou, C. E. (1989) Protein glycosylation defects in the *Saccharomyces cerevisiae* mnn7 mutant class. *J. Biol. Chem.* **264**,11857-11864.

Ballou, L., Cohén, R. E. y Ballou, C. E. (1980) *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer chain. *J. Biol. Chem.* **255**, 5986-5991.

Ballou, L., Gopal, P., Krummel, B., Tammi, M. y Ballou, C. E. (1986) A mutation that prevents glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide precursor leads to underglycosylation of secreted Yeast invertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3081-3085.

Ballou, L., Hernández, L. M., Alvarado, E y Ballou, C. E. (1990) Revision of the oligosaccharide structures of Yeast carboxypeptidase Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3368-3372.

Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S. y Ballou, C. E. (1991) Vanadate-resistant Yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3209-3212.

Ballou, C. E., Kem, K. A. y Raschke, W. C. (1973) Genetic control of Yeast mannan structure. *J. Biol. Chem.* **248**, 4667-4673.

Bames, G., Hansen, W. J., Holcomb, C. L. y Riñe, J. (1984) Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic analysis of an early step. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2381-2388.

Basco, R. D., Giménez-Gallego, G y Larriba, G. (1990) Processing of Yeast exoglucanase (β -glycosidase) in a KEX2-dependent manner. *FEBS Lett.* **268**,99-102.

Basco, R. D., Hernández, L. M., Muñoz, M. D., Olivero, I., Andaluz, E., Del Rey, F. y Larriba, G. (1994) Selective elongation of the oligosaccharide attached to the second potential glycosylation site of Yeast exoglucanase: effects on the activity and properties of the enzyme. *Biochem. J.* **304**, 917-922.

Basco, R. D., Muñoz, M. D., Hernández, L. M., Vázquez de Aldana, C., y Lamba, G. (1993) Reduced efficiency in the glycosylation of the first sequon of *Saccharomyces cerevisiae* exoglucanase leads to the synthesis and secretion of a new glycoform of the molecule. *Yeast* **9**, 221-234.

Bax, A. y Davis, D. G. (1985) MELV-17 based two dimensional magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.

Bernstein, M., Hoffman, W., Ammerer, G. y Schekman, R. (1985) Characterization of a gene product (sec 53p) required for protein assembly in the Yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **101**, 2374-2382.

Bernstein, M., Kepes, F. y Schekman, R. (1989) SEC59 encodes a membrane protein required for core glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1191-1199.

Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A. y Bussey, H. (1990) Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall B-glucan assembly. *J. Cell. Biol.* **110**, 1833-1843.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Burda, P., te Heesen, S., Brachat, A., Wach, A., Düsterhüñ, A. y 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**, 7160-7165.

Burke, J., Lipari, F., Igdoura, S. y Herscovics, A. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* processing $\alpha(1,2)$ mannosidase is localized in the endoplasmic reticulum, independently of known retrieval motifs. *European Journal of Cell Biology* **70**, 298-305.

Camirand, A., Heysen, A., Grondin, B. y Herscovics, A. (1991) Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 15120-15127.

Cleves, A. E., Cooper, D. N. W., Barondes, S. H. y Kelly R. B. (1996) A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **133**, 1017-1026.

- Cohén, R. E. y Ballou, C. E. (1980) Linkage and sequence analysis of mannose-rich glycoprotein core oligosaccharides by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **19**, 4345-4358.
- Cohén, R. E., Ballou, L. y Ballou, C. E. (1980) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins mutants. *J. Biol. Chem.* **255**, 7700-7707.
- Cohén, R. E., Zhang, W. y Ballou, C. E. (1982) Effects of mannoprotein mutations on *Saccharomyces cerevisiae* core oligosaccharide structure *J. Biol. Chem.* **257**, 5730-5737.
- Couto, J. R., Huffaker, T. C. y Robbins, P. W. (1984) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a Yeast mannosyltransferase from the asparagine-linked glycosylation pathway. *J. Biol. Chem.* **259**, 378-382.
- Cross, G. A. (1990) Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 1-39.
- Cunningham, K. y Wickner, W. T. (1989) Yeast Kex2 protease and mannosyltransferase I are localized to distinct compartments of the secretory pathway. *Yeast* **5**, 25-33.
- Dean, N. y Poster, J.B. (1996) Molecular and phenotypic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN10 gene identifies a family of related glycosyltransferases. *Glycobiology* **6**, 73-81.
- Derome, A. E. (1987) Modern NMR techniques for Chemistry Research, Pergamon Press, New York.
- Devlin, C. y Ballou, C. E. (1990) Identification and characterization of a gene and protein required for glycosylation in the Yeast Golgi. *Mol. Microb.* **4**, 1993-2001.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- Dwek, R. A., Edge, C. J., Harvey, D. J., Wormald, M. R. y Parekh, R. B. (1993) Analysis of the glycoprotein associated oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 65-100.

Elbein, A. D. (1991) The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function. *TIBTECH.* **9**, 346-352.

Eider, J. H. y Alexander, S. (1982) endo-p-N-Acetylglucosaminidase F: Endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**,4540-4544.

Esmon, B., Esmon, P. C. y Schekman, R. (1984) Early steps in processing of Yeast glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **259**,10322-10327.

Esmon, B., Novick, P. y Schekman, R. (1981) Compartmentalized assembly of oligosaccharide on exported glycoproteins in Yeast. *Cell* **25**,451-460.

Ferguson, M. A. J. (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors: the tale of a tail. *Biochem. Soc. Transactions* **20**,243- 256.

Ferro-Novick, S., Hansen, W., Schauer, I. y Schekman, R. (1984a) Genes required for completion of import of proteins into the endoplasmic reticulum in Yeast. *J. Cell. Biol* **98**,44-53.

Ferro-Novick, S., Novick, P., Field, P. y Schekman, R. (1984b) Yeast secretory mutants that block the formation of active cell surface enzymes. *J. Cell. Biol.* **98**, 35-43.

Fankhauser, C., Homans, S. W., Thomas - Oates, J. E., Me Conville, M. J., Desponds, Ch., Conzelman, A. y Ferguson, M . A. J. (1993) Structures of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor from *Saccharomyces cerevisiae* . *J. Biol. Chem.*, **268**,26365-26374.

Franzusoff, A. y Schekman, R. (1989) Functional compartments of the Yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **8**,2695-2702.

Franzusoff, A., Rothblatt, J. y Schekman, R. (1991) Analysis of polipeptide transit through Yeast secretory pathway. *Methods Enzymol.* **194**, 662-674.

Friis, J. y Ottolenghi, P. (1970) The genetically determined binding of alcian blue by a minor fraction of Yeast cell wall. *C. R. Trav. Lab. Carisberg.* **37**, 327-341.

Gaynor, E. C., te Heesen, S., Graham, T. R., Aebi, M. y Emr, S. D. (1994) Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in Yeast. *J. Cell. Biol.* **127**, 653-665.

Gentsch, M y Tanner, W. (1996) The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *The EMBO Journal* **15**, 5752-5759.

Gopal P. K. y Ballou C. E. (1987) Regulation of the protein glycosylation pathway in Yeast: structural control of N-linked oligosaccharide elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8824-8828.

Guthrie, C. y Fink, G. R. (eds) (1991) Guide to Yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* **194**, Academic Press, San Diego, California.

Graham, T. R. y Emr, S. D. (1991) Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a Yeast sec 8 (NSF) mutant. *J. Cell Biol.* **114**,207-218.

Graham, T. R., Verostek, M. F., Mackay, V., Trimble, R. y Emr, S. D. (1992) *Yeast* **8**, S458.

Hardy, M. R. y Townsend, R. R. (1988) Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3289-3293.

Harris, S. L. y Waters, G. (1996) Localization of a Yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *J. Cell. Biol.* **132**, 985-998.

Haselbeck, A. y Tanner, W. (1983) O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **158**, 335-338.

Haselbeck, A. (1989) Purification of GDP mannose: dolichyl-phosphate O- β -D-mannosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **181**, 663-668.

Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C. E. y Robbins, W. (1992) Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an α (1,2) mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6846-6850.

Häusler, A. y Robbins, P. W. (1992) Glycosilation in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization of an α -1,2-mannosyltransferase structural gene. *Glycobiology* **2**, 77-84.

Heller, L., Orlean, P. y Adair, W.L. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* sec 59 cells are deficient in dolichol kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7013-7016.

Hernández, L.M., Ballou, L., Alvarado, E., Gillece-Casíro, B.L., Burlingame A.L. y Ballou, C.E. (1989a). A new *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutant N-linked oligosaccharide structure. *J. Biol. Chem.* **264**, 11849-11856.

Hernández, L.M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P.K. y Ballou, C.E. (1989b) Structure of the phosphorylated N-linked oligosaccharides from me mnn9 and mnn 10 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**, 13648-13659.

Hernández, L. M., Ballou, L. y Ballou, C. E. (1990) Separation of Yeast asparagine-linked oligosaccharides by high-performance anion-exange chromatography. *Carbohydrate Research* **203**,1-11.

Hernández, L. M., Olivero, I., Alvarado, E. y Larriba, G. (1992) Oligosaccharide structures of the major exoglucanase secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* **31**, 9823-9831.

Herscovics, A. y Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in Yeast. *FASEB J.* **7**, 540-550.

Huffaker, T. C. y Robbins, P. W. (1982) Temperature-sensitive Yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **257**, 3203-3210.

Huffaker, T. C. y Robbins, P. W. (1983) Yeast mutants deficient in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7466-7470.

Ichishima, E., Arai, M., Shigematsu, Y., Kumagai, H. y Sumida-Tanaka, R. (1981) Purification of an acidic α -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* and specific cleavage of 1,2- α -D- mannosidic linkage in Yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **658**,45-53.

Immervoll, T, Gentzsch, M. y Tanner, W. (1995) PMT3 and PMT4, two new members of the protein-0-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1345-1351.

- Jackson, J. A., Kukuruzinska, M. A. y Robbins, P. W. (1993) Biosynthesis of asparagine- linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: the alg2 mutation. *Glycobiology*. **3**, 357-364.
- Jackson, B. J., Warren, C. D., Bugge, B. y Robbins, P. W. (1989) Synthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Man₂GlcNAc₂ y Man₁GlcNAc₂ are transferred from dolichol to protein in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 203-209.
- Jelinek-Kelly, S., Akiyama, T., Saunier, B. Tkaz, J.S. y Herscovics, A. (1985) Characterization of a specific α -mannosidase involved in oligosaccharide processing in *S. cerevisiae*. *J. Biol.Chem.* **260**, 2253-2257.
- Jentoft, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? *TIBS* **15**, 291-294.
- Jones, G. H. y Ballou, C. E. (1969) Studies on the structure of Yeast mannan. I. Purification and some properties of an alpha-mannosidase from an *Arthrobacter species*. *J. Biol. Chem.* **244**, 1043-1051.
- Kanik-Ennulat, C. y Neff, N. (1990) Vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show alterations in protein phosphorylation and growth control. *Moll. Cell. Biol.* **10**, 898-909.
- Karson ,E. M. y Ballou, C. E. (1978) Biosynthesis of Yeast mannan. Properties of a mannosylphosphate transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **253**, 6484-6492.
- Kelleher, D. J. y Gilmore, R. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J. Biol.Chem.* **269**, 12908-12917.
- Kepes, F. y Schekman, R. (1988) The Yeast sec53 gene encodes phosphomannomutase. *J. Biol.Chem.* **263**, 9155-9161.
- Klis, F. M. (1994) Review: Cell wall assembly in Yeast. *Yeast* **10**, 851-869.
- Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L. E. y Jackson, B. J. (1987) Protein glycosylation in Yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 915-944.
- Kukuruzinska, M. A. y Robbins, P. W. (1987) Protein glycosylation in Yeast: Transcript heterogeneity of the ALG7 gen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2145-2149.

- Kuranda, M. J. y Robbins, P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 19758-19767.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawrence, C. W. (1991) Classical mutagenesis techniques. *Methods Enzymol.* **194**, 273-281.
- Lemp D., Haselbeck, A. y Klebl, F. (1990) Molecular cloning and heterologous expression of N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.* **265**, 15606-15610.
- Lewis M. y Ballou C. E. (1991) Separation and characterization of two α -1,2-mannosyltransferase activities from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 8255-8261.
- Li, Y-T. (1967) Studies on the glycosidases in jack bean meal. *J. Biol. Chem.* **242**, 5474-5480.
- Lipari, F. y Herscovis, A. (1996) Role of the cysteine residues in the α 1,2-mannosidase involved in N-glycan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 27615- 27622.
- Lipke, P. N. y Kurjan, J. (1992) Sexual agglutination in budding Yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* **56**, 180-194.
- Lussier, M., Sdicu, A. M., Ketela, T. y Bussey, H. (1995a) Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p α ,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* **131**, 913-927.
- Lussier, M., Sdicu, A. M., Camirand, A. y Bussey, H. (1995b) Functional characterization of the KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family. *Yeast* **11**, S333.
- Mañas, P. M. (1995) Aislamiento y caracterización parcial de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos en el proceso de glicosilación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.
- Muñoz, M. D., Hernández, L. M., Basco, R., Andaluz, E. y Larriba, G. (1994) Glycosylation of Yeast exoglucanase sequons in alg mutants deficient in the

glucosylation steps of the lipid-linked oligosaccharide. Presence of glucotriose unit in Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ influences both glycosylation efficiency and selection of N-linked sites. *Biochim. Biophys. Acta*. En prensa.

Nagasu, T., Shimma, Y., Nakanishi, Y., Kuromitsu, J., Iwama, K., Nakayama, K., Suzuki, K. y Jigami, Y. (1992) Isolation of new temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mannose outer chain elongation. *Yeast*. **8**, 535-547.

Nakajima, T. y Ballou, C. E. (1974) Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J. Biol. Chem.* **249**, 7685-7694.

Nakajima, T. y Ballou, C. E. (1975) Yeast manno-protein biosynthesis: Solubilization and selective assay of four mannosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3912-3916.

Nakajima, T., Maitra, S. K. y Ballou, C. E. (1976) An endo- α -(1,6)-D-mannanase from a soil bacterium. Purification, properties and mode of action. *J. Biol. Chem.* **251**, 174-181.

Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Takana, A., Toda, Y. y Jigami, Y. (1993) Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of α -1,6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26338-26345.

Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. y Jigami, Y. (1992) OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J.* **11**, 2511-2519.

Newman, A. P. y Ferro-Novick, S. (1987) Characterization of new mutants in the early part of the Yeast secretory pathway isolated by (³H)mannose suicide selection. *J. Cell. Biol.* **105**, 1587-1594.

Novick, P., Field, C. y Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the Yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215.

Odani, T., Shimma, Y., Tanaka, A. y Jigami, Y. (1996) Cloning and analysis of the MNN4 gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*.

Orlean, P. (1990) Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O-mannosylation, and N-glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5796-5805.

Orlean, P., Albright, C. y Robbins, P. W. (1988) Cloning and sequencing of the Yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 17499-17507.

Orlean, P., Kuranda, M. J. y Albright, C. F. (1991) Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**, 682-697.

Olivero I., Hernández L. M. y Larriba G. (1985) Regulation of p-exoglucanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *Arch. Microbiol.* **143**, 143-146.

Parodi, A. J. (1979) Biosynthesis of Yeast mannoproteins; synthesis of mannan outer chain and of dolichol derivatives. *J. Biol. Chem.* **254**, 8343-8352.

Ramírez, M., Hernández, L. M. y Larriba, G. (1989) A similar protein portion for two exoglucanases secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **151**, 391-398.

Raschke, W. C., Kern, K. A., Antalis, C. y Ballou, C. E. (1973) Genetic control of Yeast mannan structure. *J. Biol. Chem.* **248**, 4660-4666.

Reddy, V. A., Johnson, R. S., Bieman, K., Williams, R. S., Ziegler F.D., Trimble, R.B. y Maley, F. (1988) Characterization of the glycosylation sites in Yeast external invertase. *J. Biol. Chem.* **263**, 6978-6985.

Reiss, G., te Heesen, S., Zimmerman, J., Robbins, P. W. y Aebi, M. (1996) Isolation of the ALG6 locus of *Saccharomyces cerevisiae* required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway.

Rine, J., Hansen, W., Hardeman, E. y Davis, R. W. (1983) Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6750-6754.

- Romero P. A., Sleno B., Herscovics A. (1994) Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification of the α -1,6-mannosyltransferase that initiates outer chain synthesis. *Glycobiology* **4**,135-140.
- Rothman, J. E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Runge, K. W., Huffaker, T. C. y Robbins, P. W. (1984) Two Yeast mutations in glucosylation steps of the asparagine glycosylation pathway. *J. Biol. Chem.* **259**,412-417.
- Runge, K. W. y Robbins, P. W. (1986) A new Yeast mutation in the glucosylation steps of the asparagine-linked glycosylation pathway. *J. Biol. Chem.* **261**,15582-15590.
- Sentandreu, R. y Northcote, D. H. (1968) The structure of a glycopeptide isolated from the Yeast cell wall. *Biochem. J.* **109**,419-432.
- Sharon, N. (1984) *Glycoproteins. TIBS* **9**, 198-203.
- Sharon, N. y Lis, H. (1993) Carbohidratos en el reconocimiento celular. *Investigación y Ciencia* Marzo, 20-27.
- Sherman, F. (1991) Getting started with Yeast. *Methods Enzymol.* **194**, 3-21.
- Stagljar, I., te Hessen, S. y 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**, 5977-5981.
- Stevens, T., Esmon, B. y Schekman, R. (1982) Early stages in the Yeast secretory pathway and required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* **30**,439-448.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. y Tanner, W. (1993) PMT1, the gene for a key enzyme of protein glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**,8164-8168.
- Tanner, W. y Lehie, L. (1987) Protein glycosylation in Yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 81-99.

- Tarentino, A. L., Quinones, G., Schrader, W. P., Changchien, L-M. y Plummer Jr, T. H. (1992) Múltiple endoglycosidase (endo) F activities expressed by *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.* **267**, 3868-3872.
- te Heesen, S., Janetzky, B., Lehie, L. y Aebi, M. (1992) The Yeast WBP1 is essential for oligosaccharyltransferase activity in vivo and in vitro. *EMBOJ.* **11**, 2071-2075.
- te Heesen, S., Knauer, R., Lehie, L. y Aebi, M. (1993) Yeast Wbplp and Swplp form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity. *EMBO J.* **12**, 279-284.
- te Hessen, S., Lehie, L., Weissman, A. y Aebi, M. (1994) Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **224**, 71-79.
- Thomas, J. R., Dwek, R. A., Rademacher T. W. (1990) Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochem.* **23**, 5413-5422.
- Tingle, M. A. y Halvorson, H. O. (1971) A comparison of glucanase and -glucosidase in *Saccharomyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* **250**, 165-171.
- Trimble, R. B. y Maley, F. (1977) Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252**, 4409-4412.
- Trimble, R. B., Maley, F. y Chu, F. K. (1983) Glycoprotein biosynthesis in Yeast. Protein conformation affects processing of high mannose oligosaccharides on carboxypeptidase Y and invertase. *J. Biol. Chem.* **258**, 2562-2567.
- Trimble, R. B. y Maley, F. (1984) Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by endo-p-N-acetylglucosaminidase H. *Analytical Biochemistry* **141**, 515-522.
- Trimble, R. B., Tarentino, A. L., Aumick, G. E. y Maley, F. (1982) Endo-beta-N-acetylglucosaminidase L from *Streptomyces plicatus*. *Methods Enzymol* **83**, 603-610.
- Tsai, P. K., Frevert, J. y Ballou, C. E. (1984) Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae mnn9* mannoprotein. *J. Biol. Chem.* **259**, 3805-3811.

Verostek, M. F., Atkinson, P. H. y Trimble, R. B. (1991) Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* alg3, sec18 mutant oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **266**, 5547-5551.

Verostek, M. F., Atkinson, P. H. y Trimble, R. B. (1993a) Glycoprotein biosynthesis in the alg3 *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Biol. Chem.* **268**, 12095-12103.

Verostek, M. F., Atkinson, P. H. y Trimble, R. B. (1993b) Glycoprotein biosynthesis in the alg3 *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Biol. Chem.* **268**, 12104-12115.

Vliegthart, J. F. G., Dorland, L. y van Halbeek, H. (1983) High-resolution, ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 209-374.

Webb, J. W., Jiang, K., Gillece-Casiro, B. L., Tarentino, A. L., Plummer, T. H., Byrd, J. C., Fisher, S. J. y Burlingame, A. (1988) *Anal. Biochem.* **169**, 337-349.

Weng, S. y Spiro, R. G. (1996) Evaluation of the early processing routes of N-linked oligosaccharides of glycoproteins through the characterization of Man8 GlcNAc2 isomers: evidence that endomannosidase functions in vivo in the absence of a glucosidase blockade. *Glycobiology* **6**, 861-868.

Wilcox, C. A. y Fuller, R. S. (1991) Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protein in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J. Cell. Biol.* **115**, 297-307.

Willsky, G. R., Leung, J. O., Offerman, P. V. Jr, Plotnick, E. K. y Dosch, S. F. (1985) Isolation and characterization of vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **164**, 611-617.

Wojciechowicz D., Lu, C. F., Kurjan J. Lipke, N. P. (1983) Cell surface anchorage and ligand -binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily . *Mol. Cell. Biol*

Yip, L.C., Weich, S. K., Klebí, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F. J., O'Hara, P. J. y 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**, 2723-2727.

Ziegler, F. D., Maley, F. y Trimble, R. B. (1988) Characterization of the glycosylation sites in Yeast external invertase. *J. Biol. Chem.* **263**, 6986-6992.