



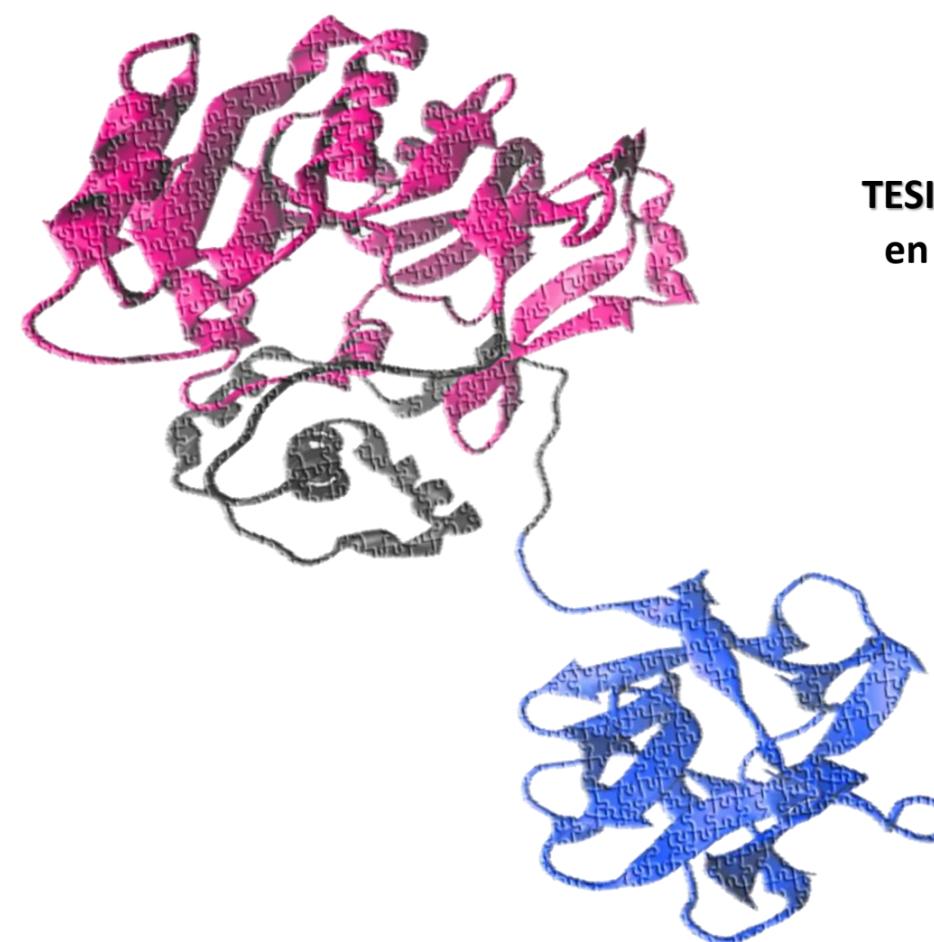
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Mecanismos de regulación enzimática en la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc

Lic. Virginia Lorenz

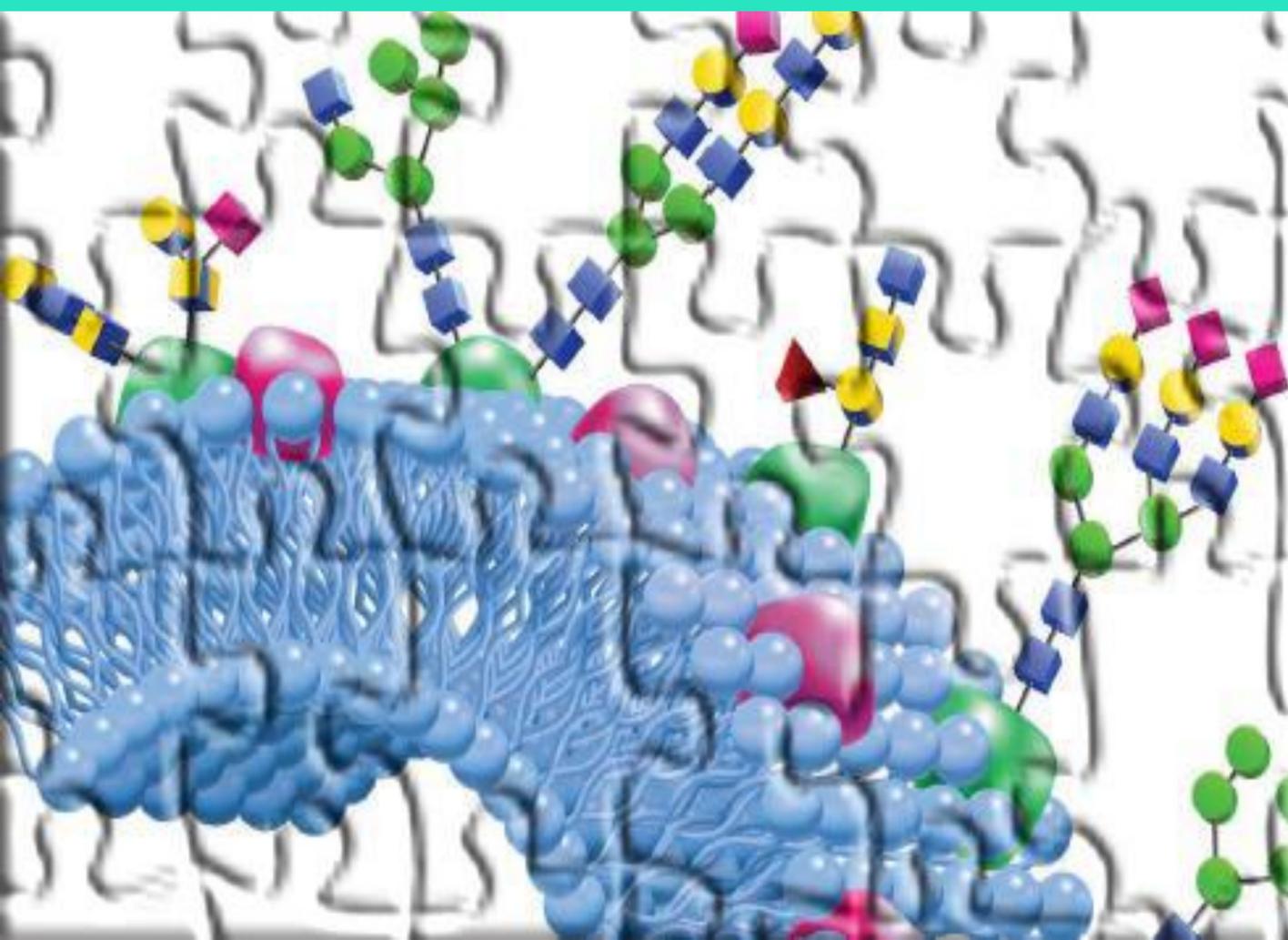
TESIS DE DOCTORADO
en Ciencias Químicas

Marzo de 2016



Virginia Lorenz

2016



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas



**Mecanismos de regulación enzimática
en la biosíntesis de glicanos
de tipo O-GalNAc**

**Tesis de Doctorado
en Ciencias Químicas**

Lic. Virginia Lorenz

Departamento de Química Biológica
Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba
(CIQUIBIC – UNC)

Marzo de 2016

Director de Tesis: Dr. Fernando J. Irazoqui

Comisión de Tesis: Dr. Gustavo Chiabrando

Dr. Gustavo A. Nores

Dra. Viviana Nicotra

Evaluador Externo: Dr. Alberto A. Iglesias

DEDICATORIA

A todos los jóvenes que tenemos la ilusión de mejorar el mundo a través de la ciencia y queremos comprender cada día un poquito más este misterio que es la vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Córdoba, a la Facultad de Ciencias Químicas y al CIQUIBIC por abrirme sus puertas para continuar mi formación en la investigación y ayudarme a calmar mi sed de curiosidad, como así también, a CONICET por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar este doctorado.

Un caluroso agradecimiento a los miembros de mi Comisión de Tesis, quienes leyeron esta Tesis con gran celeridad y la revisaron de manera atenta para poder hacer sus aportes a mi trabajo final y a mi formación integral.

Un agradecimiento especial a mi DIRECTOR, el cual estuvo muy presente a lo largo de todo el proceso de esta Tesis y quien supo escuchar mis dudas y reclamos y me dio libertad para trabajar y aprender en un ambiente cálido que siempre extrañaré cualquiera sea mi próximo trabajo.

Estoy muy agradecida...

A mi compañero incondicional, Isaac, quien con su ternura calmó mis locuras.

A mis padres, a mi hermana y a mi madrina por su apoyo invaluable.

A mi abuela Titina, por su energía y amor apasionado por sus nietas.

A mis abuelos que me acompañan desde un lugar en donde yo no los puedo ver, pero siento su presencia.

A mis amigos cordobeses y cuasicordobeses que adoptaron a Córdoba como su segundo hogar (al igual que yo) y que la vida puso en mi camino, por sus enseñanzas porque con ellos revaloricé el sentido de la palabra amistad.

A mis compañeros de laboratorio que más que compañeros fueron amigos, gracias por sus bromas, por sus explicaciones, por su paciencia y por compartir su pasión por la investigación (Nati, Yani, Victor, Romi Comín, Samy, Romi Cejas y Euge).

A mi director Fernando José, Chari, por su paciencia y tranquilidad, por ser un director super piola, por los after labs...quisiera no haberle sacado tantas canas verdes...

A Gus, por haberme robado tantas sonrisas, danke schön!... y por fomentar la familia-lab team Nores-Irazoqui. Gus!, creo que algunas palabras de tu léxico deberían ser acuñadas en el diccionario de la RAE...no me las voy a olvidar nunca...

A todos los miembros del CIQUI... profesores, estudiantes de doctorado, técnicos, personal y compañeros que dedicaron su tiempo y ganas ayudándome a resolver consultas de diversos temas, aquellos con los cuales charlamos sobre una técnica que me estaba volviendo loca, discutimos sobre un resultado, me prestaron reactivos, hicimos catarsis sobre los experimentos fallidos y tantas otras preguntas que no tienen respuesta y nos hacemos a menudo en el oficio del investigador....También, con aquellos que compartimos unos mates entre experimento y experimento, intercambiamos sonrisas o miradas cansadas atravesando el largo pasillo del instituto cuando había que quedarse hasta tarde o compartimos la emoción por los logros de un compañero porque sabemos que hacer ciencia en este país nos cuesta a todos...

A todos aquellos fieles compañeros de esta aventura que viví estos últimos años en la ciudad que me vio nacer y luego, me adoptó una vez más y ahora me deja ir, no alcanzan las palabras, ni la extensión de esta Tesis para expresar mi agradecimiento y recordar anécdotas que quedarán para los futuros encuentros que deseo no se hagan esperar.

Virginia Lorenz (Viti)

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Glicobiología	5
1.2 Composición de glicanos: monosacáridos y enlace glicosídico	6
1.3 La estructura de los glicanos está codificada indirectamente en el genoma	7
1.4 Principales glicanos	8
1.5 Glicosilación de proteínas	9
1.5.1 N-Glicosilación	10
1.5.2 O-Glicosilación	11
1.5.2.1 O-Fucosilación (O-Fucosa)	11
1.5.2.2 O-Manosilación (O-Manosa).....	12
1.5.2.3 O-GlcNAc glicosilación	13
1.5.2.4 O-GalNAc glicosilación	14
1.6 ppGalNAc-Ts	16
1.6.1 Características estructurales.....	16
1.6.2 Especificidad de sustrato	19
1.7 C1GalT	20
1.8 Funciones biológicas de O-GalNAc glicanos	21
1.9 Mecanismos que regulan la O-GalNAc glicosilación.....	23
1.10 Organización de glicosiltransferasas en Golgi	26
1.11 Acetilación de proteínas como modificación postraduccional en residuos lisina	28
1.12 Estudios del acetiloma.....	30
1.13 Acetilación de lisinas en el lumen del RE.....	32
2. OBJETIVO GENERAL	36
2.1 Objetivos específicos	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Líneas celulares	37
3.2 Glicopéptido	38

3.3	Expresión y purificación de enzimas y dominios lectina	38
3.3.1	Constructos.....	38
3.3.2	Generación de virus recombinantes y expresión de proteínas	40
3.3.3	Purificación de proteínas recombinantes	41
3.4	Ensayo de actividad GalNAc-transferasa	42
3.4.1	Ensayo de espectrometría de masas	42
3.4.2	Ensayo colorimétrico	43
3.5	Biotinilación de dominios lectina	44
3.6	Ensayo de interacción directa de los dominios lectina	44
3.7	Ensayo competitivo de la interacción de los dominios lectina.....	45
3.8	Cultivo y transfección de la línea celular CHO IdID.....	45
3.9	Western blot.....	45
3.10	Citometría de Flujo	47
3.11	Cuantificación de terminales α GalNAc en mucina submaxilar ovina	47
3.12	Ensayo de actividad galactosiltransferasa	48
3.13	Predicción de sitios de acetilación en lisinas de ppGalNAc-T3.....	48
3.14	Generación de mutantes: Mutagénesis sitio dirigido	49
3.15	Expresión y purificación de las mutantes ppGalNAc-T3K626.....	50
3.16	Ensayos de interacción directa de ppGalNAc-T3s	51
3.17	Ensayos de interacción de ppGalNAc-T3s con sustratos glico/peptídicos en presencia de carbohidratos.....	51
3.18	Análisis Estadístico	51
4.	RESULTADOS	52
4.1	Roles funcionales de dominios lectina de ppGalNAc-Ts en el inicio de la glicosilación de tipo O- GalNAc.....	52
4.1.1	Expresión y purificación de glicosiltransferasas y dominios lectina	52
4.1.2	Efecto de los dominios lectina sobre la actividad catalítica de ppGalNAc-T2	52
4.1.3	Efecto de los dominios lectina sobre la actividad catalítica de ppGalNAc-T3	58
4.1.4	Ensayo de actividad GalNAc-transferasa en un modelo celular	62
4.1.5	Interacciones de dominios lectina con ppGalNAc-T2	65

4.1.6	Las interacciones de T3lec y T4lec con ppGalNAc-T2 no están mediadas por glicanos.....	65
4.1.7	Efecto de los dominios lectina sobre la actividad Galactosiltransferasa de C1GalT	67
4.2	Efecto de la acetilación de lisinas en las propiedades biológicas de ppGalNAc-T3.....	71
4.2.1	Predicción de sitios de acetilación en ppGalNAc-T3.....	71
4.2.2	Generación y expresión de proteínas mutantes de ppGalNAc-T3K626	72
4.2.3	Ensayo de actividad enzimática de ppGalNAc-T3s	73
4.2.4	Ensayos de interacción de ppGalNAc-T3s con O-glicanos	75
4.2.5	Rol del carbohidrato en la interacción de ppGalNAc-T3s con MUC1- α GalNAc.....	76
4.2.6	Influencia de glicósidos en la interacción de ppGalNAc-T3s con péptidos.....	80
5.	DISCUSIÓN	83
6.	CONCLUSIONES.....	94
7.	PERSPECTIVAS.....	95
8.	BIBLIOGRAFÍA	97
9.	PUBLICACIONES	117

Índice de Figuras

Figura 1: Proyección de Fischer de D- y L-Glucosa	6
Figura 2: Estructuras de monosacáridos encontradas en glicoproteínas y proteoglicanos de animales superiores.....	7
Figura 3: Formación del enlace glicosídico	7
Figura 4: Clases más comunes de glicanos en células eucariotas	9
Figura 5: Distintos tipos de N-glicanos	11
Figura 6: Biosíntesis de O-glicanos de tipo mucina en mamíferos	15
Figura 7: Estructura de los dominios de la familia ppGalNAc-Ts.....	17
Figura 8: Alineamiento de las secuencias de los dominios lectina.....	19
Figura 9: Especificidad de sustrato de ppGalNAc-Ts	20
Figura 10: Biosíntesis de la estructura Core 1 y sus formas sialiladas.....	24
Figura 11: Reacción de acetilación y deacetilación de lisinas.....	29
Figura 12:Análisis global de acetilación de lisinas basados en espectrometría de masa	31
Figura 13:Análisis global de acetilación de lisinas basados en espectrometría de masa	32
Figura 14: Efecto de las mutaciones en la UDP-Glc/UDP-GlcNAc-4-epimerasa en células CHO IdID	38
Figura 15: Vector de expresión de las proteínas recombinantes	39
Figura 16: Constructos de las enzimas y dominios lectina	40
Figura 17: Sistema de expresión de proteínas	41
Figura 18: Esquema del ensayo de actividad enzimática con revelado colorimétrico	44
Figura 19: Estructuras de lisina y aminoácidos relacionados	49
Figura 20: Análisis electroforético de la purificación de proteínas recombinantes	52
Figura 21: Análisis de espectrometría de masas para examinar los efectos de los dominios lectina sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 (T2).....	54
Figura 22: Curvas de cinética de la actividad de ppGalNAc-T2 en presencia de dominios lectina frente a MUC1.....	55
Figura 23: Curvas de cinética de la actividad de ppGalNAc-T2 en presencia de dominios lectina frente a MUC2.....	56
Figura 24: Análisis de espectrometría de masas para examinar los efectos de los dominios lectina sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T3 (T3).....	59

Figura 25: Curvas de cinética de la enzima ppGalNAc-T3 en presencia de dominios lectina frente a MUC1 y MUC2.....	60
Figura 26: Respuesta de las células CHO IdID frente al agregado de GalNAc analizada por citometría de flujo	63
Figura 27: Sobreexpresión de ppGalNAc-T3 y su mutante en CHO IdID.....	63
Figura 28: Análisis de la transfección de las células CHO IdID mediante citometría de flujo	64
Figura 29: Niveles de expresión de residuos terminales GalNAc en células CHO IdID transfectadas analizados por citometría de flujo.....	64
Figura 30: Interacción de los dominios lectina con la enzima ppGalNAc-T2.....	66
Figura 31: Relevancia de glicanos en la interacción entre dominios lectina y ppGalNAc-T2	67
Figura 32: Actividad Gal-transferasa (Gal-T) en presencia de dominios lectina.....	68
Figura 33: Cinética enzimática de C1GalT en presencia de T3lec.....	68
Figura 34: Efecto activador de T3lec en la actividad de C1GalT	69
Figura 35: Cinética enzimática de C1GalT en presencia de T3 enzima.....	70
Figura 36: Resultados del análisis de la secuencia de la proteína ppGalNAc-T3 con el servidor ASEB	71
Figura 37: Detección de las mutantes ppGalNAc-T3 en la lisina 626 (KXQ, KxR y KxA) mediante Western blot	72
Figura 38: Grado de purificación de ppGalNAc-T3 y sus mutantes	73
Figura 39: Cinética enzimática de T3, T3K626Q y T3K626A frente al péptido MUC2	74
Figura 40: Cinética enzimática de T3, T3K626Q y T3K626A frente al péptido MUC1	74
Figura 41: Interacción entre la enzima T3 y sus mutantes con MUC1- α GalNAc.....	75
Figura 42: Efecto de glicósidos en la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1- α GalNAc.....	77
Figura 43: Efecto de Me- α -GlcNAc y Bzl- α -GalNAc sobre la interacción de T3 y sus mutantes con los péptidos MUC1 y MUC2	81
Figura 44: Esquema del mecanismo de interacción propuesto para los dominios lectina de ppGalNAc-Ts	89

Índice de Tablas.

Tabla 1: Soluciones utilizadas para la purificación de las proteínas recombinantes.....	42
Tabla 2: Soluciones utilizadas para la preparación y corrida de geles de poliacrilamida y Western blot	46
Tabla 3: Oligonucleótidos empleados en la generación de las mutantes de ppGalNAc-T3	50
Tabla 4: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T2 en ausencia y en presencia de T3lec y T4lec usando el péptido MUC1 como sustrato	57
Tabla 5: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T2 en ausencia y en presencia de T3lec y T4lec usando el péptido MUC2 como sustrato	57
Tabla 6: Constantes de inhibición de T3lec y T4lec sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 con los sustratos peptídicos MUC1 y MUC2.....	57
Tabla 7: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T3 en ausencia y en presencia de T3lec con el péptido MUC1 .	61
Tabla 8: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T3 en ausencia y en presencia de T3lec con el péptido MUC2 .	61
Tabla 9: Constantes de inhibición de T3lec en la actividad enzimática de ppGalNAc-T3 con los sustratos peptídicos MUC1 y MUC2	62
Tabla 10: Parámetros cinéticos de C1GalT en ausencia y presencia de T3lec con dOSM como glicoproteína aceptora	69
Tabla 11: Parámetros cinéticos de C1GalT en ausencia y presencia de ppGalNAc-T3 con OSM como glicoproteína aceptora	70
Tabla 12: Parámetros cinéticos de T3, T3K626Q, T3K626A frente a los péptidos MUC2 y MUC1	75
Tabla 13: Concentración de carbohidrato que reduce un 50% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1- α GalNAc.....	79
Tabla 14: Concentración de carbohidrato que aumenta al 200% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1- α GalNAc.....	79
Tabla 15: Concentración de glicósido que aumenta al 200% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1...	82
Tabla 16: Concentración de glicósido que aumenta al 200% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC2...	82

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Antígeno T: Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr

Antígeno Tn: GalNAc α 1-O-Ser/Thr

ARN: Ácido ribonucleico

ASB: Albúmina sérica bovina

ASG: Asialoglicoforina

ATB: Antibiótico

Bzl: Grupo bencilo

C1GalT: Core 1 β 1-3 galactosiltransferasa

Core 1: Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr

Cosmc: Chaperona específica de Core 1 β 1-3 galactosiltransferasa

DO: Densidad óptica

dOSM: Mucina submaxilar ovina desialilada

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

GalNAc: N-Acetilgalactosamina

Gal-T: Actividad galactosiltransferasa

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-Acetilglucosamina

GT(s): Glicosiltransferasa(s)

HPA: Lectina *Helix pomatia*

HRP: Peroxidasa de rábano picante (*Horse radish peroxidase*)

KAT: Lisina acetiltransferasa

MALDI-TOF: Desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador TOF: tiempo de vuelo

Me: Grupo metilo

MPT: Modificación postraducciona

OSM: Mucina submaxilar ovina

PAGE-SDS: gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

PBS: Solución tampón fosfato salina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PNA: Lectina Peanut Agglutinin

pNp: Grupo paranitrofenilo

ppGalNAc-Ts: polipeptidil N-Acetilgalactosaminil transferasas

RE: Retículo endoplasmático

rpm: Revoluciones por minuto

Ser: Serina

SFB: Suero fetal bovino

Sialil: Residuo terminal de ácido siálico

TA: Temperatura ambiente

Thr: Treonina

UDP: Uridin-difosfato

VVL: Lectina *Vicia villosa*

RESUMEN

La glicosilación de proteínas es la modificación postraducciona l más abundante en las células. La biosíntesis de glicanos, a diferencia de la síntesis de ADN, se lleva a cabo de manera independiente de un templado. Los mecanismos que controlan y resguardan la fidelidad de los glicanos aún son poco conocidos. El objetivo general de esta tesis es contribuir al conocimiento de los mecanismos de regulación de glicosiltransferasas que inician la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc. La glicosilación de tipo O-GalNAc es iniciada por la familia de polipeptidil N-acetilgalactosaminil transferasas (ppGalNAc-Ts) constituida por 20 miembros, los cuales incorporan un residuo de N-acetilgalactosamina sobre residuos serina/treonina (α GalNAc-Ser/Thr) de un polipéptido aceptor. Estas glicosiltransferasas son proteínas de membrana tipo II que presentan en su porción luminal un dominio catalítico y en el extremo carboxilo terminal un dominio tipo lectina con un plegamiento característico de tipo β -trefoil. Uno de los objetivos específicos de esta tesis fue estudiar la influencia de estos dominios tipo lectina en la actividad enzimática de glicosiltransferasas que inician la glicosilación de tipo O-GalNAc. En primer lugar, se demostró que los dominios lectina de ppGalNAc-T3 y T4 (T3lec y T4lec) inhiben la actividad enzimática de las isoformas ppGalNAc-T2 y T3. Este efecto inhibitorio pudo ser corroborado *in vivo* utilizando la línea celular CHO IdID. Los resultados mostraron que se trata de una interacción proteína-proteína en donde el dominio lectina de una ppGalNAc-T interacciona con el dominio catalítico de otra isoforma. A su vez, tanto T3lec como la enzima ppGalNAc-T3 (incluyendo el dominio catalítico y lectina) fueron capaces de activar la actividad de C1GalT, enzima que cataliza la incorporación de galactosa sobre α GalNAc-Ser/Thr. Esto pone de manifiesto el rol regulatorio diferencial de los dominios lectina sobre enzimas que catalizan reacciones consecutivas en esta biosíntesis de glicanos.

Por otro lado, la acetilación de lisinas está emergiendo como un mecanismo de control postraducciona l cada vez más frecuente que puede ocurrir en todos los compartimentos subcelulares. Múltiples glicosiltransferasas residentes en Golgi se han informado como enzimas blanco de la acetilación entre ellas las isoformas ppGalNAc-T2 y T9. Por eso, la segunda parte de esta tesis está abocada a estudiar el efecto de la acetilación de lisinas sobre las propiedades biológicas de las ppGalNAc-Ts. En particular, se focalizó en el efecto de una mutación puntual que simula acetilación en la K626 localizada en un motivo

estructural conservado (QKW) del dominio lectina de ppGalNAc-T3. Esta mutación (K626Q) disminuyó la actividad catalítica de la enzima y su capacidad de interacción con glicanos de tipo O-GalNAc. En ensayos de interacción con el glicopéptido (MUC1- α GalNAc) y péptidos derivados de mucinas, la mutante incrementó su unión a los mismos en presencia de glicósidos de GlcNAc.

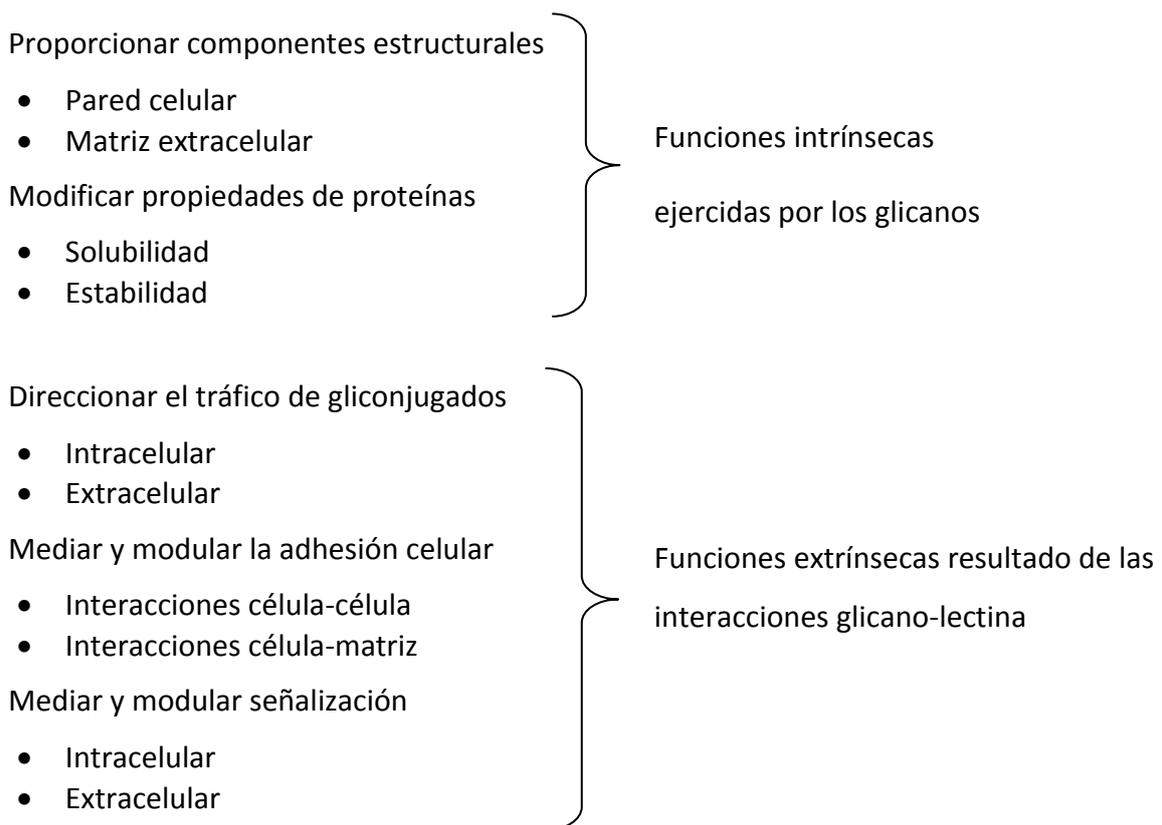
En conclusión, ambos mecanismos de regulación estudiados en la presente tesis muestran al plegamiento β -trefoil de los dominios lectinas de ppGalNAc-Ts como estructura clave para la regulación de la glicosilación de tipo O-GalNAc dadas sus propiedades de interacción con múltiples moléculas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Glicobiología

La Glicobiología es uno de los campos de más rápido crecimiento en las ciencias naturales con amplia relevancia en muchas áreas de investigación básica, biomedicina y biotecnología. El campo de estudio incluye la química de carbohidratos, enzimología de la formación de glicanos (monosacáridos y oligosacáridos que pueden estar libres o unidos covalentemente a proteínas o lípidos formando glicoconjugados) y su degradación, reconocimiento de glicanos por proteínas específicas (lectinas), rol de glicanos en sistemas biológicos complejos y su análisis o manipulación por medio de una variedad de técnicas (Varki et al., 2009).

Las funciones de los glicanos se pueden incluir en 5 categorías amplias (Taylor and Drickamer, 2006):



A lo largo de esta introducción se comprenderá mejor por qué el estudio de los glicanos fue relegado en la historia. En gran parte se debió a la complejidad estructural, las dificultades para determinar sus secuencias y en particular, a que la biosíntesis no puede predecirse a partir del genoma. En la década del 80', la Glicobiología fue creciendo como

una disciplina independiente dentro de las ciencias biológicas y se convirtió en una de las áreas de mayor desarrollo reciente.

1.2 Composición de glicanos: monosacáridos y enlace glicosídico

Los monosacáridos son la base estructural de los glicanos y en células eucariotas predominan los estereoisómeros D. Para definir estereoisómeros tomamos como modelo a un monosacárido como Glucosa. En la Figura 1 se muestra su estructura lineal conocida como proyección de Fischer de D- y L-Glucosa. Aquellos monosacáridos que contienen un grupo aldehído son llamados aldosas y el grupo aldehído define la posición del carbono (C) C-1 (extremo reductor). La configuración del grupo CHOH del carbono asimétrico más alejado del grupo aldehído (C-5) determina si se trata de un isómero D (si el grupo -OH hidroxilo se encuentra a la derecha del lector) o L (si el grupo -OH hidroxilo se encuentra a la izquierda del lector).

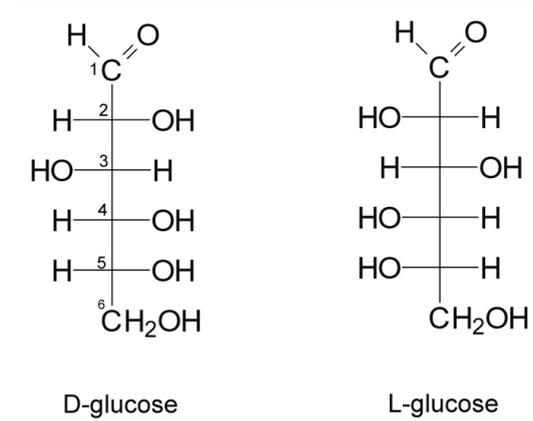


Figura 1: Proyección de Fischer de D- y L-Glucosa

Aunque cientos de monosacáridos distintos son hallados en la naturaleza, sólo un pequeño número de estos están presentes en animales superiores (Figura 2). Como se puede apreciar en la Figura 2, las aldosas (tal como el caso de Glucosa) forman hemiacetales cíclicos por medio del ataque del grupo hidroxilo sobre el C-5 con el C-1 del grupo aldehído formando un nuevo centro asimétrico, el carbono anomérico. En las conformaciones cíclicas en forma de silla (de menor energía) se representan al hidroxilo del anómero α con orientación axial en relación a la estructura de anillo, mientras que en el anómero β el hidroxilo está en orientación ecuatorial. En un enlace glicosídico siempre está involucrado al menos un grupo hidroxilo anomérico en configuración α o β .

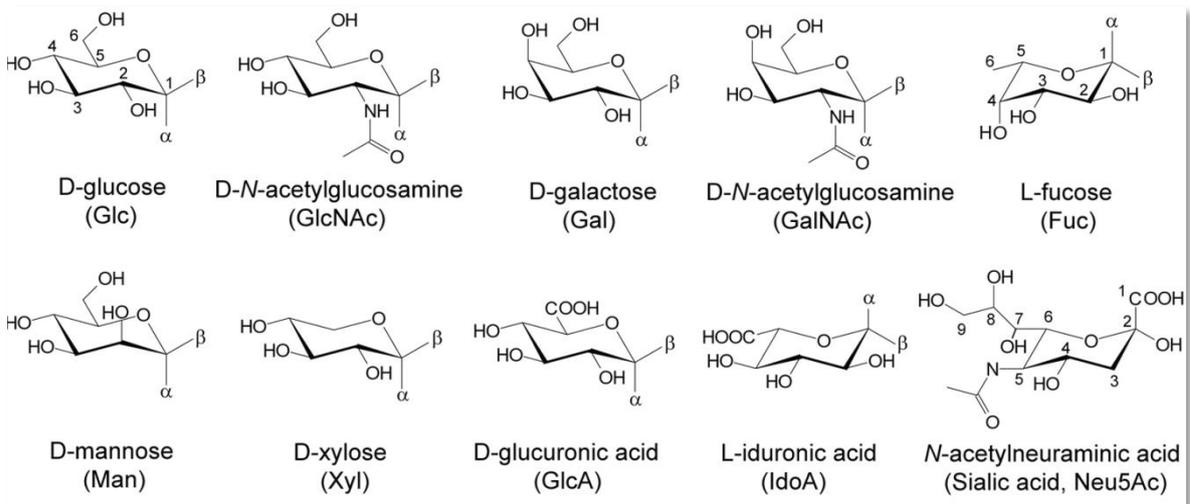


Figura 2: Estructuras de monosacáridos encontradas en glicoproteínas y proteoglicanos de animales superiores

Por lo tanto, el enlace glicosídico que consiste en la unión de un monosacárido a otro residuo mediante el grupo hidroxilo anomérico, genera uniones α o β definidas por la orientación del oxígeno del enlace glicosídico respecto al carbono anomérico y al anillo (Figura 3) (Pak, 2010). Es importante destacar que estos dos tipos de enlace (α o β) confieren diferentes propiedades y funciones biológicas para una misma secuencia glucídica (Varki et al., 2009).

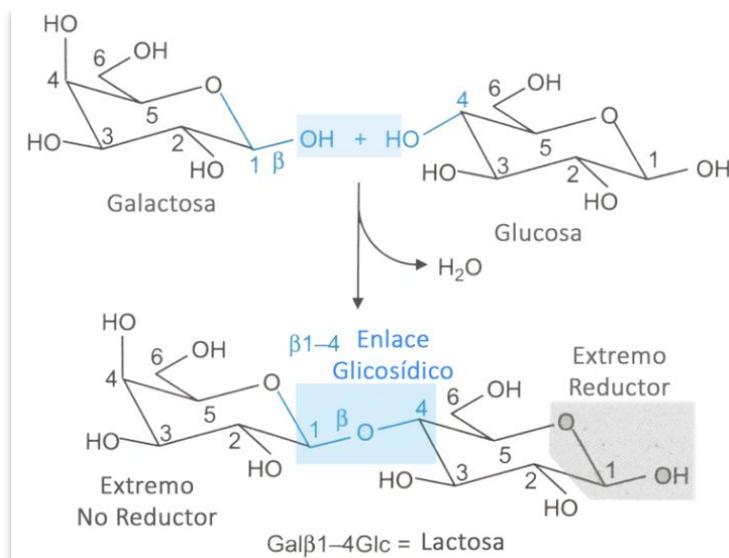


Figura 3: Formación del enlace glicosídico
Esquema del disacárido lactosa: un monosacárido de galactosa unido mediante enlace β 1,4 a un monosacárido de glucosa. Extraído de (Taylor and Drickamer, 2006).

1.3 La estructura de los glicanos está codificada indirectamente en el genoma

La información sobre la síntesis y estructura de proteínas está jerarquizada bajo lo que se conoce como dogma central de la biología molecular que fluye de ADN a ARN y de ARN a

aminoácidos que constituyen las proteínas. Tal sistematización no se aplica a los glicanos. Es decir, la estructura de las cadenas de azúcares no está codificada directamente en las secuencias de ADN. Sin embargo, está determinada por la transcripción y traducción de genes correspondientes a enzimas y transportadores, responsables de la biosíntesis y ensamble de las porciones de glicanos de los glicoconjugados. A su vez, las cadenas de glicanos presentan numerosas posibilidades combinatorias dadas por la variedad de glicosidasas y glicosiltransferasas que actúan de manera competitiva y secuencial. Pero, aun conociendo los niveles de los productos génicos relevantes, no es suficiente para predecir en forma precisa las estructuras y las vías de síntesis de un determinado tipo celular.

Para sumar a la complejidad de este tema, otro aspecto importante es el fenómeno de microheterogeneidad en la glicosilación de proteínas. Este término indica que cada sitio de unión a glicanos de una dada proteína sintetizada en una línea celular particular puede presentar variaciones en la estructura de la cadena de glicanos. De este modo, una proteína codificada por un único gen puede presentar múltiples glicofomas. Desde el punto de vista funcional, la relevancia biológica de la microheterogeneidad se desconoce y los mecanismos que la generan aún no están claros (Varki et al., 2009).

1.4 Principales glicanos

Los glicanos son polímeros glucídicos que en células eucariotas se pueden encontrar libres (glicosaminoglicanos) o unidos covalentemente a lípidos o proteínas generando glicolípidos, proteoglicanos y glicoproteínas (Figura 4).

El ácido hialurónico (polímero de $\text{GlcNAc}\beta\text{1-4GlcA}$) es una cadena libre de glicano que no se encuentra unido a alguna otra macromolécula. Entre los glicolípidos se nombrarán aquí dos clases principales. Por un lado, un glicofosfatidilinositol funciona como puente entre una porción lipídica (fosfatidilinositol y fosfoetanolamina) anclada a la membrana y el extremo carboxi terminal de una proteína. Por otro lado, un glicoesfingolípido consiste en un glicano unido a través de una glucosa o galactosa a un grupo hidroxilo de una ceramida. Estos pueden ser neutros o aniónicos. Entre estos últimos se destacan los gangliósidos que contienen uno o más residuos de ácido siálico (Varki et al., 2009).

Un tipo particular de glicano es el proteoglicano. Éste es un glicoconjugado que presenta una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) unidas a grupos hidroxilos de serinas a

través de un residuo de xilosa que constituye una región “core” típica de 4 azúcares. Los GAG se caracterizan por poseer una estructura lineal repetitiva de azúcares. La diferencia entre una glicoproteína y un proteoglicano es arbitraria ya que algunos polipéptidos de proteoglicanos presentan tanto GAG como diferentes N- y O-glicanos.

A nivel estructural, existen dos clases principales de glicosilación de proteínas dependiendo si el carbohidrato está unido a la proteína a través del nitrógeno amida de un residuo de asparagina, entonces se trata de un N-glicano. O bien, si es a través del oxígeno de un grupo hidroxilo de una serina, treonina o hidroxilisina, se trata de un O-glicano (Varki et al., 1998). En la próxima sección se profundizará sobre N- y O-glicosilación de proteínas.

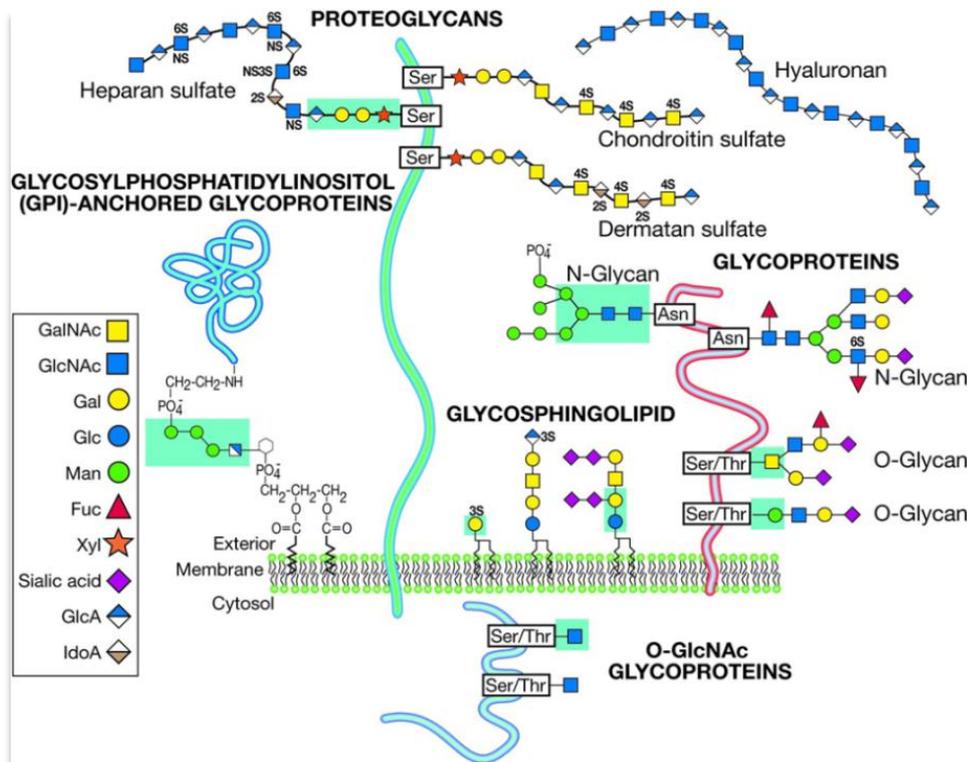


Figura 4: Clases más comunes de glicanos en células eucariotas
 En el diagrama se encuentran representados glicanos de glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicosfingolípidos y glicofosfatidilinositol. Extraído de (Varki et al., 2009).

1.5 Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas ha sido observada en todos los organismos desde bacterias hasta el ser humano (Wacker et al., 2002; Young et al., 2002). Posiblemente, la glicosilación es la modificación post-traduccional más común encontrada en proteínas de mamíferos (Dennis et al., 2009). A pesar de la diversidad de estructuras de glicanos que pueden ser sintetizadas, los principales tipos de glicosilación son: de tipo N-glicanos, O-

Fucosa, O-Manosa, O-GlcNAc, O-GalNAc cada uno con su propio camino biosintético inicial que se encuentra conservado en todos los metazoos.

1.5.1 N-Glicosilación

La biosíntesis de N-glicanos en todos los organismos eucariotas comienza en el retículo endoplasmático (RE). Catorce azúcares son agregados de manera secuencial al precursor lipídico dolicol fosfato. Luego, este precursor transferirá el glicano completo (transferencia en bloque) al residuo de asparagina (Asn) de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) de una proteína que está siendo sintetizada y translocada a través de la membrana del RE. Este motivo consenso es necesario pero no suficiente para que la N-glicosilación ocurra. Posteriormente, el glicano unido a la proteína será remodelado en el RE y Golgi por una serie de reacciones catalizadas por glicosidasas y glicosiltransferasas (GT) unidas a la membrana (Varki et al., 2009) (Figura 5). Los N-glicanos del tipo ricos en manosa (oligomanosa) usualmente contienen 8 o 9 residuos de manosas (Man). Éstos pueden permanecer sin modificaciones durante su pasaje a través del Golgi y estar presentes en glicoproteínas de la superficie celular o secretadas. Sin embargo, los N-glicanos son frecuentemente procesados en el Golgi, inicialmente en el *cis*-Golgi por un conjunto de α -manosidasas que remueven residuos de Man para generar el intermediario $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ que es el sustrato de la GT GlcNAc-T-I. La adición de GlcNAc por esta enzima inicia la síntesis de N-glicanos híbridos y complejos. Los N-glicanos híbridos mantiene los 5 residuos de Man y extienden la cadena que recibe GlcNAc con la adición de Galactosa (Gal) y ácido siálico y/u otros azúcares. Para convertirse en complejos, los N-glicanos pierden 2 de los 5 residuos de Man y adquieren un segundo GlcNAc para formar un glicano biantenarico. Este puede ramificarse hasta 6 veces y elongarse mediante la adición de diferentes azúcares incluyendo Gal, GlcNAc, GalNAc, Fucosa, ácido siálico (Stanley, 2009). Las poblaciones de azúcares unidas a cada asparagina glicosilada dependerán del tipo y estado fisiológico de la célula (Varki et al., 2009).

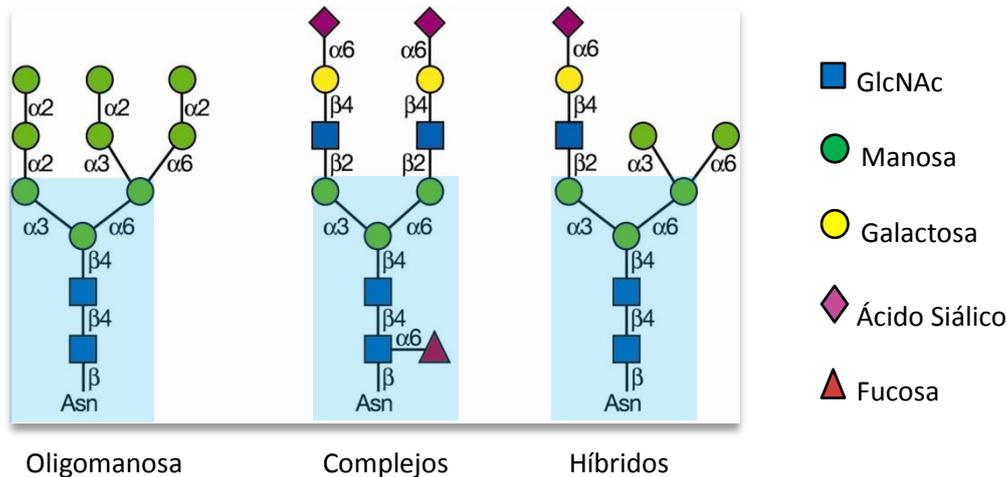


Figura 5: Distintos tipos de N-glicanos

Los N-glicanos que son agregados a las proteínas en las secuencias Asn-X-Ser/Thr son de tres tipos: oligomanosa, complejos e híbridos. Estos N-glicanos comparten una región central de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ que se encuentra coloreada en celeste. Los símbolos de los monosacáridos se encuentran indicados. Adaptado de (Varki et al., 2009).

1.5.2 O-Glicosilación

En la biosíntesis de O-glicanos los monosacáridos son unidos uno a uno de manera secuencial al polipéptido aceptor a través de azúcares nucleótidos; a diferencia de la transferencia en bloque de un glicano previamente sintetizado sobre un lípido, como ocurre en N-glicanos (Sección 1.5.1). Además, el inicio de la O-glicosilación (la incorporación del primer azúcar al polipéptido) puede ser catalizada por diversas glicosiltransferasas que poseen diferentes especificidad de sustrato en contraste a la N-glicosilación que involucra un complejo multiproteico denominado oligosacariltransferasa (OST) y produce un único tipo de unión ($\text{GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}$) (Stanley, 2009). Las diferentes glicosiltransferasas que inician la síntesis de O-glicanos producen un amplio rango de uniones mediadas por oxígeno entre las cuales se encuentran O-GalNAc, O-Fuc, O-GlcNAc, O-Man, O-Xil, O-Glc y O-Gal (Varki et al., 2009). A su vez, estos tipos de O-glicanos pueden ser elongados para formar estructuras más complejas o simplemente permanecer como un único azúcar como es el caso de O-GlcNAc y O-Glc. A continuación se ampliará sobre las clases más abundantes de O-glicosilaciones.

1.5.2.1 O-Fucosilación (O-Fucosa)

La O-fucosilación ($\text{Fuca}1\text{-Ser/Thr}$) ocurre en proteínas que contienen repeticiones de tipo factor epidérmico (EGF) o repeticiones de tipo trombospondina I (TSR) (Harris and Spellman, 1993; Hofsteenge et al., 2001). Ambos módulos, aunque no presentan secuencias relacionadas, comparten una estructura que consiste en motivos ricos en cisteínas de 40-60 aminoácidos aproximadamente. La O-fucosilación de las repeticiones

de tipo EGF ocurre dentro de una secuencia consenso $CX_{4-5}[S/T]C$, y es catalizada por la proteína O-fucosiltransferasa 1 (POFUT1); mientras que, en las repeticiones TSR ocurre dentro de la secuencia consenso $CX_{2-3}[S/T]CX_2G$, y es catalizada por la proteína O-fucosiltransferasa 2 (POFUT2) (Luo et al., 2006a; Luo et al., 2006b; Wang et al., 2001). Dos vías diferentes están involucradas en la posterior glicosilación de estas secuencias por glicosiltransferasas adicionales (Harris and Spellman, 1993; Hofsteenge et al., 2001). En cuanto a los motivos de tipo EGF, O-Fuc puede ser elongada para formar el tetrasacárido Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuc α 1-Ser/Thr. Respecto a los motivos de tipo TSR, una molécula de glucosa puede ser agregada para formar el disacárido Glc β 1,3Fuc α 1-Ser/Thr. Este tipo de glicosilación tiene un rol vital en la regulación de la vía de señalización del receptor de membrana Notch, importante en el desarrollo de muchos tejidos en metazoos (Bray, 2006). Es un ejemplo de cómo un evento de señalización puede ser regulado por el cambio de estado de glicosilación de un receptor. La transferencia de GlcNAc en posición β 1,3 a O-fucosa en las repeticiones de EGF del receptor Notch es realizada por las glicosiltransferasas Fringe, modulando así las interacciones con sus ligandos Delta y Serrate (Moloney et al., 2000).

Por otro lado, recientemente ha surgido evidencia de que POFUT1 podría tener actividad chaperona en RE independientemente de su actividad fucosiltransferasa (Okajima et al., 2005). Además, su expresión ha sido asociada a distintos tipos de cáncer, leucemia mieloide aguda, glioblastoma, cáncer de colon (Gurvich et al., 2010; Kroes et al., 2007; Loo et al., 2013) y también, se ha propuesto como un marcador de la progresión tumoral en carcinoma de células escamosas orales (OSCC) (Yokota et al., 2013).

1.5.2.2 O-Manosilación (O-Manosa)

En mamíferos, se estima que el 30% de los O-glicanos es iniciado con O-manosa encontrándose, principalmente, en cerebro y músculo esquelético (Chai et al., 1999; Nilsson et al., 2010; Smalheiser et al., 1998; Stalnaker et al., 2011a; Stalnaker et al., 2010). Las estructuras reportadas se basan primordialmente en un “core” de Sia α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α -Ser/Thr (Endo, 1999). O-manosiltransferasa 1 y 2 (POMT1 y POMT2) son las enzimas que inician la síntesis incorporando una manosa en residuos serina o treonina de proteínas de la vía secretora. Éstas constituyen un heterocomplejo por lo cual ambas son requeridas para la correcta actividad manosil-transferasa *in vivo*; dado que en forma aislada no poseen actividad (Manya et al., 2004). Mutaciones en

genes que codifican enzimas o proteínas involucradas en la síntesis de este tipo de glicanos son causantes de distintas variantes de distrofia muscular congénita (Muntoni et al., 2008) y una enzima particular de esta vía ha sido vinculada a metástasis en cáncer (de Bernabé et al., 2009).

La proteína de mamíferos O-manosilada mejor caracterizada es α -distroglicano que se une a proteínas de la matriz extracelular de manera dependiente de la glicosilación. Sin embargo, muchos de los sustratos proteicos de las estructuras de los glicanos y las enzimas que participan en esta vía aún son desconocidos (Stalnaker et al., 2011b). Asimismo, hasta el momento no se ha podido dilucidar una secuencia consenso (Manya et al., 2007; Nilsson et al., 2010; Stalnaker et al., 2010).

1.5.2.3 O-GlcNAc glicosilación

La modificación de proteínas mediante β -N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) a residuos serina o treonina ha emergido rápidamente como uno de los mecanismos principales de señalización celular compitiendo con la fosforilación de proteínas en términos de abundancia. O-GlcNAc es agregado y removido de proteínas nucleocitoplasmáticas y mitocondriales mediante las enzimas intracelulares O-GlcNAc-transferasa (OGT) y O-GlcNAc-asa (OGA). En mamíferos, representa el único caso donde la glicosilación de proteínas no se lleva a cabo en la vía secretora. La O-GlcNAc glicosilación no está asociada a una secuencia consenso clara (Bond and Hanover (2015).

O-GlcNAc tiene una extensa interacción con la fosforilación y ubiquitinación dado que compiten por los mismos sitios de unión en ciertas proteínas (Hart et al., 2011; Ruan et al., 2013) y asimismo, modula la actividad del proteasoma (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2003). O-GlcNAc es considerado un sensor de nutrientes clave. Por esto, la O-GlcNAc glicosilación es importante en la regulación de la transcripción incluyendo funciones que abarcan la modulación de RNA Polimerasa II (Ranuncolo et al., 2012) y factores de transcripción (Özcan et al., 2010) y el control de la metilación de histonas y ADN (Fujiki et al., 2009; Zhang et al., 2014). También, modifica muchas quinasas, su actividad y especificidad (Bullen et al., 2014; Dias et al., 2012). Un aumento agudo en la O-GlcNAc glicosilación protege a las células del daño inducido por el estrés, mientras, la desregulación crónica del ciclo de O-GlcNAc contribuye a la etiología de la mayoría de las enfermedades asociadas a la edad como diabetes, cáncer y neurodegeneración (Hart, 2014). Aunque esta modificación no está presente en proteínas procesadas en la vía

secretora, en forma reciente fue hallada en proteínas extracelulares (Matsuura et al., 2008; Sakaidani et al., 2010); múltiples cuestiones aún restan por develar al respecto.

1.5.2.4 O-GalNAc glicosilación

La maquinaria de O-GalNAc glicosilación sólo se encuentra en eumatazoos¹, a diferencia de la N-glicosilación que está presente en eucariotas inferiores (Hashimoto et al., 2009). A su vez, la O-GalNAc glicosilación se encuentra en más del 10% de las proteínas humanas y en más del 50% de las proteínas que atraviesan la vía secretora. También, esta glicosilación se conoce como O-glicosilación de tipo mucina ya que las mucinas y proteínas similares son sustratos clásicos de este tipo de glicosilación, en donde secuencias repetitivas PTS (prolina, treonina y serina) son densamente O-glicosiladas de una manera heterogénea (Hang and Bertozzi, 2005; Hanisch, 2001).

La O-GalNAc glicosilación es iniciada por la familia de enzimas polipeptidil N-acetilgalactosaminil transferasas (ppGalNAc-Ts) (Figura 6), las cuales transfieren N-acetilgalactosamina (GalNAc) del azúcar donador, UDP-GalNAc, a residuos serina (Ser) o treonina (Thr) de un polipéptido aceptor formando la unión GalNAc α 1-O-Ser/Thr (Clausen and Bennett, 1996) o antígeno Tn. El gran número de enzimas que controlan este primer paso hace que esta glicosilación sea única entre las distintas clases de glicosilación de proteínas. En humanos se han reportado 20 isoformas de las cuales 19 han sido expresadas en forma recombinante mostrando ser activas *in vitro* (Bennett et al., 2012). Con poca frecuencia en tejidos normales pero comúnmente en condiciones de cáncer, la sialiltransferasa, ST6GalNAc-I, adiciona ácido siálico al antígeno Tn finalizado en forma abrupta la biosíntesis de la cadena de O-glicanos.

¹ Eumatazoos: Animales que se caracterizan por tener tejidos organizados en órganos y en sistemas de órganos. Álvarez, F.P., F. Padilla, A. Cuesta, and A.E.C. López. 2003. Zoología aplicada. Ediciones Díaz de Santos.

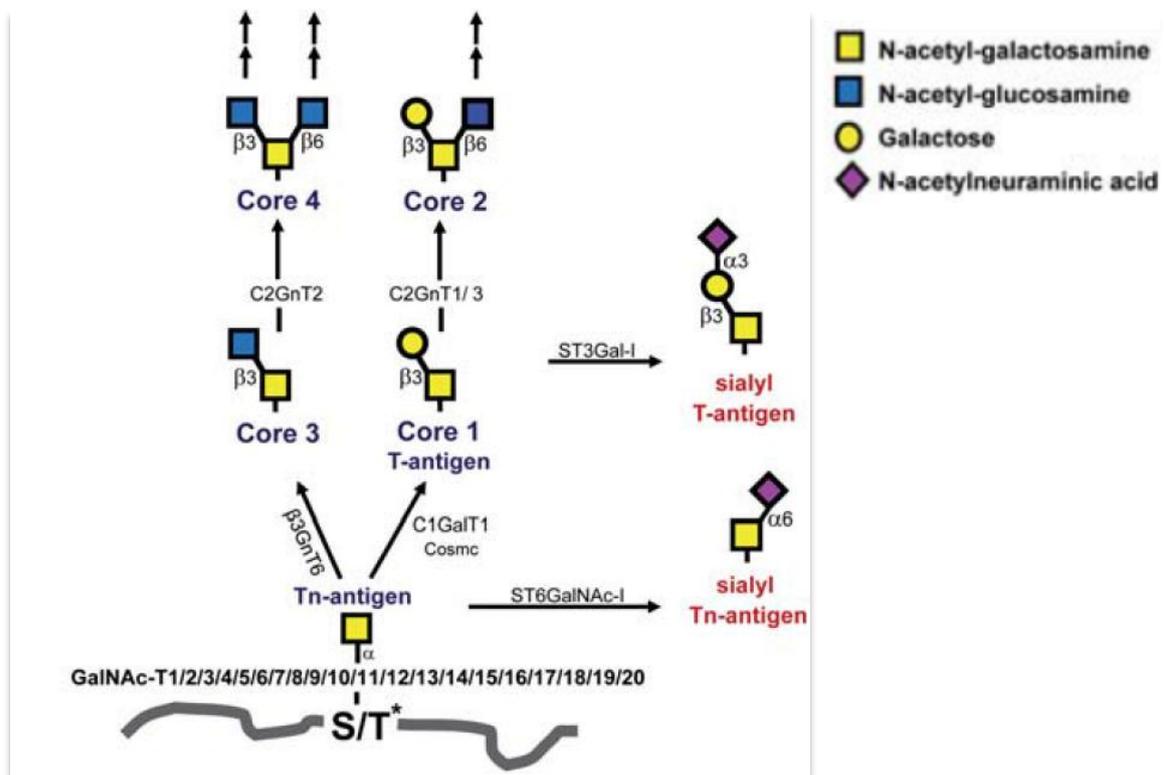


Figura 6: Biosíntesis de O-glicanos de tipo mucina en mamíferos

La O-glicosilación de tipo mucina es iniciada por una de las 20 isoformas de ppGalNAc-Ts formando el antígeno Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr), el cual puede ser elongado por core 1 sintasa, C1GalT, (con la asistencia de su chaperona Cosmc) o core 3 sintasa, β 3GnT6, y luego ramificado por core 2 sintasas, C2GnT1-3, para formar estructuras denominadas Core 2 y Core 4. Estas estructuras, a su vez, pueden ser elongadas por cadena de N-acetilgalactosamina o finalizadas por la adición de fucosa o ácido siálico. Las cadenas de oligosacáridos pueden finalizar en forma prematura por la acción de sialiltransferasas, ST3Gal-I sobre las estructuras de Core 1 (antígeno T) y ST6GalNAc-I sobre el antígeno Tn para dar lugar a SialylT y SialylTn, respectivamente (Bennett et al., 2012).

Luego, al primer azúcar GalNAc se le une covalentemente otro monosacárido, paso catalizado por enzimas “cores” para generar glicanos Core 1 o Core 3. En la mayoría de los tejidos, galactosa es agregada por la enzima core 1 β 1-3 galactosiltransferasa (C1GalT) la cual genera el glicano Core 1 (Gal β 1-3GalNAc-O) o antígeno T (Gill et al., 2011). En vertebrados, C1GalT requiere de una chaperona específica llamada Cosmc, la cual se une a C1GalT y asegura su actividad en Golgi (Varki et al., 2009). Glicanos Core 1 también pueden sufrir sialilación tras la incorporación de ácido siálico por la acción catalítica de ST3Gal- y ST6Gal-sialiltransferasas. Por el contrario, en tejidos de colon un azúcar diferente N-acetilglucosamina (GlcNAc) es agregado por core 3 sintasa (C3GnT), la cual produce glicanos Core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc-O).

En un siguiente paso, GlcNAc puede ser agregado a glicanos Core 1 por β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasas (C2GnT1, ² y 3) para producir glicanos Core 2. La isoforma C2GnT2 incorpora GlcNAc sobre Core 3 generando glicanos Core 4. Además, los glicanos Core 2 y Core 4 pueden ser elongados por la adición de diferentes azúcares como galactosa (Gal) por β 4GalT4 o por repeticiones de polilactosamina (Gal-GlcNAc) a través de la acción en forma alternada de las enzimas β 4GalT y β 3GnT.

Por otro lado, los glicanos Core 3 pueden ser extendidos sólo a través de la adición de galactosa por β 4GalT4. Todos los O-glicanos pueden sufrir la adición de ácido siálico por ST3Gal- y ST6Gal-sialiltransferasas, lo cual produce la finalización de la biosíntesis de la cadena de oligosacáridos. Estructuras menos frecuentes como Core 5-8 han sido caracterizadas bioquímicamente a partir de tejidos y se cree que éstas surgen por modificación directa de O-GalNAc, pero la maquinaria enzimática necesaria para generarlas aún se desconoce (Gill et al., 2011).

1.6 ppGalNAc-Ts

1.6.1 Características estructurales

Las ppGalNAc-Ts son proteínas de membrana tipo II. Su estructura consiste en una cola citoplasmática corta en el extremo amino terminal seguida por un dominio hidrofóbico de anclaje a la membrana, y una porción insertada en el lumen del Golgi (Fritz et al., 2004; Fritz et al., 2006). Esta última incluye la región “*stem*” o tallo de longitud variable, el dominio catalítico y un dominio lectina tipo ricina en el extremo carboxi terminal que contiene tres sitios putativos de unión a carbohidratos (Hazes, 1996; Imberty et al., 1997) (Figura 7).

² C2GnT2: esta enzima es menos rigurosa en cuanto a la especificidad por su sustrato, por lo que es capaz de utilizar Core 1 (para formar Core 2) y Core 3 (para formar Core 4). Yeh, J.-C., E. Ong, and M. Fukuda. 1999. Molecular cloning and expression of a novel β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches. *Journal of Biological Chemistry*. 274:3215-3221.

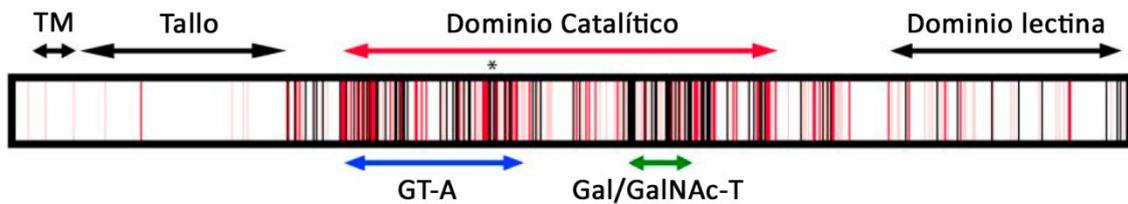


Figura 7: Estructura de los dominios de la familia ppGalNAc-Ts

Diagrama de secuencias consenso de varias ppGalNAc-Ts con actividad demostrada. Regiones en blanco, rosa, rojo y negro representan 0-29%, 30-69%, 70-99% y 100% de identidad de secuencia respectivamente. Las posiciones de los dominios transmembrana (TM), tallo, catalítico (motivos GTA y Gal/GalNAc-T) y lectina están indicados por las flechas de colores. El asterisco muestra la ubicación del motivo DXH conservado involucrado en la unión del azúcar nucleótido. Extraído y adaptado de (Ten Hagen et al., 2003).

Las colas citoplasmáticas de todas las ppGalNAc-Ts contienen residuos básicos que podrían estar involucrados en la interacción con complejos de sostén de proteínas periféricas de membrana de Golgi (Smith and Lupashin, 2008). El dominio transmembrana es corto de 15 a 25 aminoácidos. En glicosiltransferasas este dominio ha sido implicado en la localización en Golgi (Opat et al., 2001), pero esto no ha sido establecido para ninguna de las ppGalNAc-Ts aún. Las regiones tallo son de longitud variable entre 90 a 170 aminoácidos y funciones específicas asociadas a su gran variabilidad aún deben ser determinadas (Bennett et al., 2012). Es probable que estas regiones sean susceptibles al clivaje proteolítico por acción de una proteasa de membrana (Hooper et al., 1997) dado que las ppGalNAc-Ts son encontradas en secreciones como calostro (Hagen et al., 1993). Los dominios catalíticos (aproximadamente de 230 aminoácidos de longitud) contienen motivos estructurales que son conservados en todas las isoformas. El motivo GT-A tiene residuos que se unen a la porción uracilo del sustrato donador UDP-GalNAc (Fritz et al., 2006). Mientras que, DXH, el motivo de unión a Mn^{+2} permite la estabilización del difosfato del UDP escindido durante la reacción enzimática vía coordinación con el cofactor Mn^{+2} (Hagen et al., 1999). También, el motivo Gal/GalNAc-T compartido por GalNAc-Ts y β 4Gal-Ts es una región que interactúa con la porción de GalNAc del sustrato donador (Fritz et al., 2004). En particular, en ppGalNAc-T10 se encontró un bolsillo de unión a GalNAc adicional (Perrine et al., 2009; Raman et al., 2008) lo que explicaría su preferencia por sustratos glicopeptídicos. Un estudio de cristalografía de la enzima ppGalNAc-T2 reveló que dentro del sitio de unión del sustrato aceptor se forma un bolsillo de prolina (Fritz et al., 2006), lo cual pone de manifiesto la preferencia de algunas isoformas por aceptores que contienen una prolina en la posición +3 (a 3 residuos de distancia de la Ser/Thr glicosilada hacia el extremo carboxiloterminial) (Gerken et al., 2011; O'Connell et al., 1991; Wilson et al., 1991). Además, se encontró un bolsillo que

acomoda el grupo metilo de una treonina de un péptido aceptor; lo cual obedecería a la preferencia de las ppGalNAc-Ts por residuos Thr sobre Ser.

El dominio catalítico y lectina están conectados por una secuencia corta de 10-25 aminoácidos de longitud que posee gran flexibilidad (Bennett et al., 2012). Este conector podría funcionar controlando la orientación relativa de los dominios lectina y catalítico y así manejar la especificidad de sustrato mediada por lectina, como ha sido observado en un experimento de sustitución de la región conectora; el cual resultó en una enzima quimérica cuya especificidad de sustrato se vio alterada (Kubota et al., 2006).

Otro nivel de complejidad en esta familia de enzimas está dado por los dominios lectina, únicos entre las glicosiltransferasas de eucariotas, los cuales pertenecen a la familia estructural de lectinas tipo Ricina (Dodd and Drickamer, 2001). Estas lectinas, también han sido clasificadas como miembros de la familia 13 dentro de los módulos de unión a carbohidratos (CBM) en la base de datos CAZy (**C**arbohydrate-**A**ctive **e**n**Z**ymes, base de datos que incluye enzimas relacionadas con carbohidratos). Este CBM se encuentra en muchos reinos incluyendo procariontes y adopta una conformación llamada “ β -trefoil” semejante a una hoja de trébol compuesta por tres repeticiones homólogas designadas en orden desde el extremo N-terminal: subdominios α , β y γ que presumiblemente han evolucionado a través de eventos de duplicación de genes (Hazes, 1996; Rutenber et al., 1987). El plegamiento β -trefoil es encontrado en numerosas superfamilias de proteínas tales como citoquinas (interleuquinas y factores de crecimiento de fibroblastos) (Ponting and Russell, 2000), toxinas tipo B ricinas (como aglutininas y lectinas hemolíticas) (Hazes, 1996), inhibidores de proteasas Kunitz y proteínas de unión a actina (Kureishy et al., 2002; Liu et al., 2002; Mukhopadhyay, 2000). Algunas características del plegamiento β -trefoil son:

- 1) presencia de 3 motivos QXW donde X puede ser cualquier aminoácido y W: triptófano u otro aminoácido aromático y 3 motivos CLD en cada repetición de 40 aminoácidos aproximadamente.
- 2) similitud de secuencia limitada (Ornitz and Itoh, 2001).
- 3) especificidad de unión hacia diversos carbohidratos: heparan sulfato, GalNAc sulfatado, Xilosa, Galactosa, Glucosa, lactosa y GalNAc.

Las secuencias de los dominios lectina se encuentran poco conservadas excepto por los motivos antes nombrados QXW y CLD y seis residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro dentro de cada uno de los tres subdominios α , β and γ (Fritz et al., 2004) (Figura

8). Las especificidades de unión a carbohidrato de los dominios lectina de ppGalNAc-Ts muestran un importante reconocimiento por GalNAc y glicopéptidos de GalNAc (Wandall et al., 2007).

XBD- α	313	GQIKG-----VGSGRCLVFNAS--TTDGTQVILYDCHA-----TNQOWTYTDA-----	355
XBD- β	356	GELR-----VYGDKCLDAAG---TGNGTKVQIYSCWG-----GDNQKWRLNDS-----	395
XBD- γ	396	GSIVG-----VQSGCLDAVGG--GTANGTLIDLYSCSN-----GSRQWRTRT-----	436
T2- α	448	GALQQ-----GTNCLTLGH---FADGVVGVTECHN-----AGGNQEWALT-----	484
T2- β	485	KE-KS-----VKHMDLCLTVVDR---APGSLIKLQGCRE-----NDSRQKWEQIEGNS-----	528
T2- γ	529	KLRH-----GSNLCLESRTA---KSGGLSVEVCGP-----ALSQQWKFLLNLQQ-----	571
T3- α	507	GYIKS-----VGQPLCLLVGEN--NQGGKPLIMTCEG-----LGGNOYFEYSAQ-----	549
T3- β	550	HEIRH-----NIQKELCLHAAQ-----GLVQLKACTYKGHKTVVVTGECLWEIQKDQ-----	595
T3- γ	596	LLY-N-----PFLKMLLSANG-----EHPSLVSCNP-----SDPLQKWLISQND-----	633
T4- α	446	GAIRS-----RGISSECLLYNSPDNNPTGANLSLTCGCG-----QGGNOYFEYTSN-----	491
T4- β	492	KEIRF-----NSVTELCALVPEQ-----KNYVGMQNCPK--DGFPVPANITLWTFKED-----	537
T4- γ	538	GTIFH-----PHSGLCLSAJR--TPEGRPDVIMRTCD-----LDKQKWLWTFEK-----	578

Figura 8: Alineamiento de las secuencias de los dominios lectina

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios lectina de la enzimas ppGalNAc-T2, T3 y T4 que serán analizados en esta tesis y XBD (dominio de unión a xilano de Xilanas de *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (Fujimoto et al., 2000), una lectina tipo Ricina típica que adopta el plegamiento β trefoil. En rojo se indican los residuos invariantes que forman la estructura central de estos dominios (de izquierda a derecha: motivos CLD, cisteínas y motivos QXW). En verde se indican los residuos que en XBD interactúan con azúcares o candidatos para la interacción con azúcares en ppGalNAc-Ts que son invariantes o similares a los residuos de XBD. Extraído de (Kubota et al., 2006).

1.6.2 Especificidad de sustrato

Recientemente se han llevado a cabo estudios de glicoproteómica que han identificado un gran número de sitios y proteínas O-GalNAc glicosiladas en múltiples líneas celulares humanas de diversos órganos. Pero debido a la complejidad de la glicosilación de tipo O-GalNAc no hay una secuencia consenso que pueda ser usada para predecir e identificar proteínas que lleven este tipo de modificación (Steentoft et al., 2013).

Cada isoforma de ppGalNAc-Ts tiene una especificidad de sustrato acepto distinta, aunque existe al mismo tiempo, solapamiento entre ellas. La especificidad de sustrato incluye secuencias peptídicas y péptidos parcialmente O-GalNAc glicosilados. Se ha sugerido que estas enzimas trabajan sincronizadamente de manera jerárquica. Por lo cual, se han clasificado las distintas isoformas de acuerdo a su preferencias por sustratos peptídicos o glicopeptídicos en ppGalNAc-Ts “iniciadoras” de la glicosilación que actúan sobre péptidos sin modificar o con baja densidad de O-GalNAc y aquellas que “completan o rellenan” que actúan agregando GalNAc en sitios próximos/adyacentes a otros que ya han sido ocupados por GalNAc (como las isoformas ppGalNAc-T7 y 10 que reconocen exclusivamente glicopéptidos) (Perrine et al., 2009) (Figura 9).

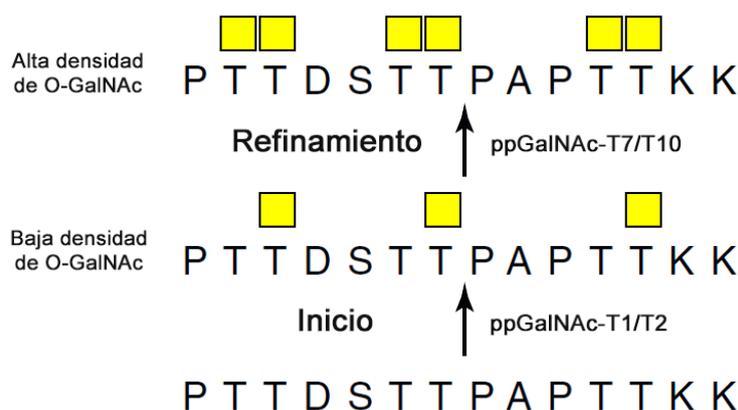


Figura 9: Especificidad de sustrato de ppGalNAc-Ts

Esquema de una secuencia de glicosilación por parte de enzimas ppGalNAc-Ts. Algunas ppGalNAc-Ts actúan en forma inicial (isoformas ppGalNAc-T1/T2) incorporando GalNAc sobre sustratos peptídicos o con baja densidad de GalNAc, preferentemente. Otro grupo de ppGalNAc-Ts que “rellenan” (isoformas ppGalNAc-T7/T10) actúan en una etapa posterior de refinamiento, incorporando GalNAc sobre péptidos previamente glicosilados generando una mayor densidad de O-GalNAc sobre el polipéptido aceptor. Los cuadrados amarillos simbolizan moléculas de GalNAc. Las secuencias corresponden a péptidos en donde T: Treonina y S: serina.

Si bien, a pesar de los esfuerzos realizados no se ha encontrado un motivo consenso, existen algunos criterios. Estudios *in vitro* sugieren que la modificación α GalNAc está favorecida en Thr sobre Ser, como se comentó anteriormente, (Elhammer et al., 1993) y la posición de residuos GalNAc en el extremo amino o carboxilo de un glicopéptido aceptor condiciona la especificidad y la actividad catalítica de cada isoforma (Gerken et al., 2013). Además, experimentos con bibliotecas de péptidos han ayudado a predecir la O-GalNAc glicosilación de una manera específica de isoforma. El programa ISOGlyP (Isoform Specific O-glycosylation Prediction) <http://isoglyp.utep.edu> (Gerken et al., 2011) es un ejemplo entre otros programas disponibles para predecir sitios de O-GalNAc glicosilación.

1.7 C1GalT

La modificación más abundante de GalNAc α 1-Ser/Thr es la generación del glicano Core 1 (sección 1.5.2.4). En mamíferos existe una sola core 1 β 1-3 galactosiltransferasa (C1GalT) responsable de la adición de galactosa al antígeno Tn (Ju et al., 2002a; Ju et al., 2002b). El gen que codifica esta enzima está ampliamente expresado en mamíferos y se encuentra evolutivamente conservado en otras especies. En *Drosophila* han sido descritas 4 enzimas funcionales (Müller et al., 2005) con una sorprendente diversidad en los patrones de expresión, lo que sugiere que tendrían funciones biológicas distintas (Lin et al., 2008b).

C1GalT es una típica proteína transmembrana tipo II con una topología similar a otras glicosiltransferasas de Golgi, con un dominio citoplasmático N-terminal corto, un dominio transmembrana y un dominio luminal catalítico (Ju et al., 2002a). En mamíferos se encuentra como un dímero unido por puentes disulfuro, pero la forma monomérica de la enzima también es activa (Ju et al., 2002b). La síntesis de C1GalT activa en mamíferos requiere la coexpresión de una proteína chaperona específica denominada Cosmc (su sigla en inglés, **core 1 β Gal-T specific molecular chaperone**) (Ju and Cummings, 2002). Cosmc es una proteína del RE (Narimatsu et al., 2008; Sun et al., 2011) que se une específicamente a C1GalT asistiéndola en su plegamiento y asegurando su localización apropiada en el aparato de Golgi. Mutaciones en Cosmc resultaron en la pérdida de C1GalT del Golgi y la ausencia de su actividad (Aryal et al., 2014; Ju and Cummings, 2002; Narimatsu et al., 2008). Por el contrario, C1GalT de *Drosophila* (dC1GalT) no parece requerir una chaperona para su actividad (Müller et al., 2005).

1.8 Funciones biológicas de O-GalNAc glicanos

A los glicanos de tipo O-GalNAc se le han asignado múltiples funciones en mamíferos. Los más abundantes presentes en las mucinas de la superficie celular o secretadas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, como así también, de los ojos son esenciales por su habilidad de hidratar y proteger el epitelio constituyendo una barrera física para los patógenos, por ejemplo, atrapando bacterias a través de receptores específicos (Hang and Bertozzi, 2005; Varki et al., 2009). Mucinas de la superficie celular funcionan también como una plataforma para integrar señales entre las células y su ambiente local. Las mucinas y gran parte de la maquinaria de O-glicosilación de tipo mucina aparecieron en forma temprana en la evolución de eumetazoos, sugiriendo que la barrera de mucus fue central para su desarrollo (Hashimoto et al., 2009; Lang et al., 2007).

Otro atributo de estos glicanos es que confieren protección frente a la degradación de proteasas; ya sea en mucinas, las cuales presentan regiones densamente glicosiladas como en proteínas con un único sitio de O-glicosilación (Garner et al., 2001; Kato et al., 2006; Schjoldager et al., 2010; Steentoft et al., 2013)

También, los glicanos de tipo O-GalNAc, en particular los derivados de la estructura Core 2, cumplen roles de suma importancia durante la activación de linfocitos. Además, interacciones mediadas entre estos glicanos y P selectina (receptores de adhesión que

incluyen un dominio tipo lectina) permiten la unión de los leucocitos al endotelio capilar en el reclutamiento y extravasación durante una respuesta inflamatoria (Ellies et al., 1998; Varki et al., 2009).

Tejidos asociados a la función reproductiva producen mucinas y glicoproteínas que podrían tener roles importantes en la fertilidad. Estructuras de tipo O-GalNAc terminales específicas han mostrado formar ligandos en la interacción óvulo-espermatozoide en varias especies (Varki et al., 2009).

En muchos casos, la pérdida de función por presencia de mutaciones, por *knock-out* o *knock-down* (animales mutantes) de genes que codifican alguna de las glicosiltransferasas o enzimas relacionadas (*Cosmc*) que participan en esta biosíntesis pone en evidencia los procesos en los cuales están implicados estos glicanos de tipo O-GalNAc. La carencia en la actividad de una enzima suele asociarse a enfermedades particulares o distintos tipos de cáncer.

La síntesis incompleta de estructuras Core 1 ha sido asociada a dos enfermedades en humanos: inmunoglobulina A nefropatía (IgAN) asociada a una baja expresión de *Cosmc* y Tn-síndrome, consecuencia de una mutación en *Cosmc* (Barratt et al., 2004; Berger, 1999). Células que carecen de *Cosmc* o C1GalT expresan antígenos Tn y SialilTn los cuales son conocidos como antígenos de carbohidrato asociados a tumores (su sigla en inglés TACA por *tumor-associated carbohydrate antigens*) encontrados en muchos carcinomas (Ju and Cummings, 2002; Ju et al., 2008). C1GalT es importante a nivel del desarrollo por lo que el *knock-out* para esta enzima (Xia et al., 2004) y para *Cosmc* (Wang et al., 2010) en ratones resultó ser letal en el estado embrionario.

En contraste, debido al elevado número de ppGalNAc-Ts que controlan el paso inicial de la glicosilación de tipo mucina podría esperarse que haya una compensación por la presencia de múltiples transferasas con la misma función en un mismo tipo celular y por lo tanto, un único gen defectuoso podría producir efectos o fenotipos más sutiles o no perceptibles.

En la actualidad, sólo un gen humano GALNT, GALNT3, ha mostrado ser la causa de una enfermedad. ppGalNAc-T3 es requerida para la glicosilación de un residuo específico en el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF23) que previene su clivaje e inactivación por acción de una proteasa (*proteasina convertasa* o PC) (Kato et al., 2006). La pérdida de la función de ppGalNAc-T3 produce calcinosis tumoral familiar caracterizada por una

hiperfosfatemia (Topaz et al., 2004). Aunque ppGalNAc-T3 tiene una especificidad de sustrato más amplia, parecería que una función específica de esta isoforma es regular la homeostasis del fosfato. A su vez, ppGalNAc-T2 está involucrada en el mantenimiento de los niveles normales de lípidos en plasma mediante un mecanismo similar de O-glicosilación sitio específica en la proteína tipo angiopoietina 3 (ANGPTL3) (Schjoldager et al., 2010; Teslovich et al., 2010).

Por último, la asociación entre patrones de glicosilación alterados, variaciones en los niveles de expresión de glicosiltransferasas y formación de tumores se encuentra muy bien documentada en la bibliografía (Kim and Varki, 1997; Kim et al., 1996; Ono and Hakomori, 2003). Por ejemplo, glicanos Core 1 reemplazan a glicanos Core 2 en cáncer de mama (Dalziel et al., 2001) y glicanos Core 1 y Core 2 reemplazan a los glicanos normales Core 3 y Core 4 en cáncer de colon (Byrd and Bresalier, 2004; Yu et al., 2007). Muchos tipos de cáncer se caracterizan por presentar O-glicanos cortos Tn, SialilTn y T (Brockhausen, 2006; Springer, 1984) los cuales aumentan la motilidad de las células en cultivo afectando la adhesión a la matriz extracelular (Ju and Cummings, 2005; Julien et al., 2006; Pinho et al., 2007). *In vivo*, la presencia de estos glicanos truncos se correlaciona con un aumento de la metástasis y mal pronóstico de supervivencia (Brockhausen, 2006; Gill et al., 2013).

1.9 Mecanismos que regulan la O-GalNAc glicosilación

Los mecanismos que regulan la O-GalNAc glicosilación aún son poco conocidos. Sin embargo, la especificidad de sustrato se puede destacar como el principal factor que determina las estructuras de los glicanos O-GalNAc restringiendo las posibilidades de combinaciones de los azúcares. Por ejemplo, la estructura monosialilada de Core 1 (NeuAc α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc-) puede ser sintetizada sólo agregando un residuo de ácido siálico (NeuAc) a Core 1, pero no agregando un residuo de galactosa a la estructura NeuAc α 2-6GalNAc- (SialilTn) ya que el ácido siálico impide que actúe la enzima Core 1 β 1-3 galactosiltransferasa. A su vez, sustituciones de Core 1 con uno o dos residuos de ácido siálico previene la incorporación de *N*-acetilglucosamina para formar Core 2 como consecuencia de la carga negativa incorporada por el ácido siálico (Figura 10) (Brockhausen, 2009).

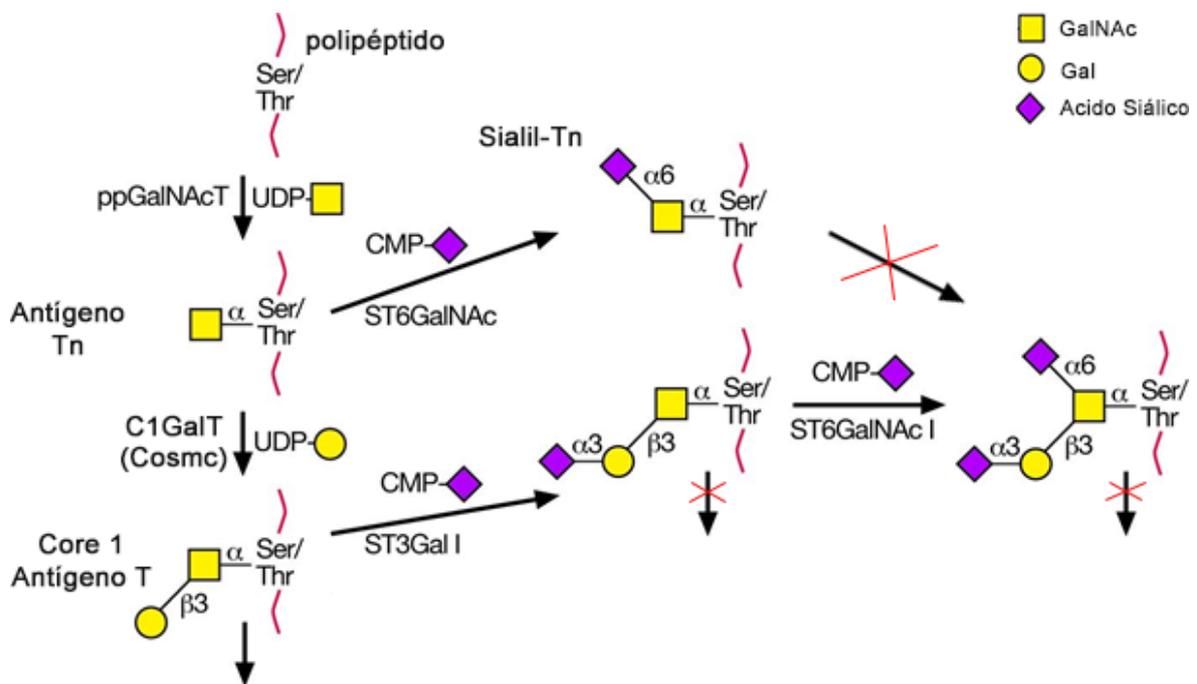


Figura 10: Biosíntesis de la estructura Core 1 y sus formas sialiladas
 Como se muestra en la figura, sólo una vía de síntesis es posible para que prosiga la elongación de la cadena de glicanos. La incorporación de ácido siálico sobre residuos GalNAc o galactosa interrumpe la O-GalNAc glicosilación. Extraído y adaptado de Varki et al., 2009 (Varki et al., 2009).

Otro factor importante es la actividad relativa de las enzimas ya que en muchos casos existe solapamiento en la localización de enzimas que compiten por un sustrato en común. Dependiendo de la actividad que predomine condicionará la estructura del glicano (Brockhausen, 2009). Esto está íntimamente relacionado con los niveles de expresión de cada enzima.

En relación a las ppGalNAc-Ts, éstas se expresan en forma diferencial en células y tejidos y su expresión varía de acuerdo al estadio del desarrollo (Bennett et al., 2012; Gill et al., 2011). Estudios de Northern blot indican que algunas ppGalNAc-Ts se expresan en forma más ubicua en ciertos órganos como ppGalNAc-T1 y T2 (Homa et al., 1993; White et al., 1995), mientras otras isoformas, ppGalNAc-T3, T4, T5, T7, T8, T9 y T10 tienen patrones de expresión más restringidos (Bennett et al., 2012). Estudios filogenéticos sugieren que la mayoría de las ppGalNAc-Ts pueden ser clasificadas en subfamilias que incluyen dos o más miembros relacionados en forma cercana. Estas subfamilias suelen compartir especificidad de sustrato pero generalmente se expresan en tejidos diferentes, lo que resulta en una redundancia parcial (Bennett et al., 1999; Schwientek et al., 2002). Generalmente, se trata de explicar el control de la O-GalNAc glicosilación a partir de las diferencias en la especificidad de sustrato (Sección 1.6.2) y en los patrones de expresión de ppGalNAc-Ts que constituyen el repertorio particular de cada tipo celular y cuya

función es decisiva ya que al dar inicio a la O-GalNAc glicosilación determinan los sitios de unión de O-GalNAc glicanos y su abundancia (Gill et al., 2011). Además, la adición del primer azúcar GalNAc sobre sustratos polipeptídicos con múltiples sitios aceptores altera la habilidad de reconocimiento de otras isoformas de ppGalNAc-Ts, la competición entre estas enzimas conduce a diferentes patrones de O-glicosilación (Kato et al., 2001). Por último, otro aspecto relacionado a la regulación de la expresión de estas transferasas son los mecanismos de control de la expresión génica que no han sido explorados en profundidad (Nomoto et al., 1999), aunque existen estudios que indican que diversas isoformas pueden ser reguladas por microARNs (Dyrskjøt et al., 2009; Gaziél-Sovran et al., 2011; Kahai et al., 2009).

También, la expresión selectiva ocurre con glicosiltransferasas que actúan en las etapas siguientes de la glicosilación de tipo mucina. Por ejemplo, la expresión diferencial de C3GnT (enzima que genera el glicano Core 3) que interviene en el punto de ramificación de la O-GalNAc glicosilación selecciona la síntesis hacia glicanos Core 1 o Core 3 (Figura 6). La expresión ubicua de C1GalT resulta en la síntesis de Core 1 y luego, de los productos derivados de Core 2 en la mayoría de los tejidos (Ju et al., 2002a). En el caso de tejidos gastrointestinales, debido a los altos niveles de C3GnT la síntesis se dirige hacia estructuras de glicanos Core 3 y luego, Core 4 (Iwai et al., 2002; Vavasseur et al., 1995). A su vez, un aumento en la expresión de C2GnT1 durante la diferenciación de las células T promueve la síntesis de O-glicanos Core 2 conteniendo polilactosaminas. Estos O-glicanos regulan la activación de las células T, la adquisición de memoria y susceptibilidad a la muerte celular mediada por galectina 1 (Mukasa et al., 1999; Nguyen et al., 2001; Piller et al., 1988). Por el contrario, la expresión diferencial de C2GnT2, pero no de C2GnT1, se observa en células de oviducto de hámster hembras, sugiriendo que glicanos Core 4, pero no Core 2 son importantes para el ciclo reproductivo femenino (McBride et al., 2005).

La localización de las glicosiltransferasas en los distintos compartimentos de Golgi también es un factor influyente en la regulación de esta biosíntesis. Se ha propuesto que las glicosiltransferasas se distribuyen como en una línea de ensamblaje en donde la enzimas que inician la glicosilación se hallan primordialmente al inicio del Golgi (cis-Golgi) y las enzimas que actúan en las últimas etapas, hacia el final del mismo (trans-Golgi) (Brockhausen, 2006). Estudios inmunocitoquímicos localizaron las ppGalNAc-Ts en el cis-Golgi en glándula submaxiliar (Roth et al., 1994). Sin embargo, ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 se encontraron a lo largo de los compartimentos del cis, medial y trans-

Golgi en células HeLa (Rottger et al., 1998). Por otro lado, las enzimas que sintetizan las estructuras Core 1 y Core 2 están principalmente en cis-Golgi; mientras, las que actúan en forma terminal, en el trans-Golgi (Brockhausen, 2006). Estudios recientes han comenzado a dilucidar los mecanismos que regulan la localización de ppGalNAc-Ts en Golgi que depende de un fino equilibrio entre las señales mediadas por una serie de quinasas que estimulan o inhiben la formación de vesículas COPI³ requeridas para el transporte retrógrado del Golgi a RE (Chia et al., 2014; Gill et al., 2013). La alteración de dicha localización produce cambios drásticos en los patrones de glicosilación modificando las características morfológicas de las células; debido al aumento en los niveles de antígeno Tn que es introducido en forma prematura.

Asimismo, se ha mencionado en la bibliografía que la escisión proteolítica de ppGalNAc-Ts podría representar un potencial punto de control de la actividad de los miembros de esta familia ya que estas enzimas han sido encontradas en fluidos biológicos y se desconoce su función biológica en el medio extracelular (Ten Hagen et al., 2003; Varki et al., 2009). Hay evidencias de la presencia en Golgi de una proteasa de unión a membrana responsable de la escisión proteolítica de la enzima sialiltransferasa (Kitazume et al., 2001). Por lo cual, podrían existir proteasas específicas ya sea para ppGalNAc-Ts como para otras glicosiltransferasas.

Otros factores que controlan directamente la actividad de glicosiltransferasas incluyen la disponibilidad de iones metálicos (cofactores), las concentraciones de azúcares nucleótidos y su transporte a través del Golgi, como así también, el pH el cual es variable en los distintos compartimentos del aparato de Golgi, modificaciones postraduccionales y la formación de complejos (Brockhausen, 2006).

1.10 Organización de glicosiltransferasas en Golgi

Existen tres modelos que podrían explicar la distribución de glicosiltransferasas en Golgi (Varki et al., 2009). Uno de ellos denominado reconocimiento de pares (“kin recognition”, en inglés) o modelo de oligomerización, desarrollado por Nilsson y col. en 1993 (Nilsson et al., 1993) proponía que enzimas localizadas en el mismo compartimento podrían

³COPI: complejo multiproteico requerido para la formación de vesículas de transporte que actúan en el transporte retrógrado de Golgi a RE. Beck, R., M. Ravet, F. Wieland, and D. Cassel. 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS letters*. 583:2701-2709, Szul, T., and E. Sztul. 2011. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology*. 26:348-364.

formar complejos, los cuales tendrían un rol en la estabilización de la localización de las GTs en el compartimento correcto de Golgi. Este modelo plantea que un ambiente altamente poblado de proteínas es propicio para el desarrollo de interacciones de “baja afinidad-alta especificidad” lo que permitiría el autoensamblaje de la maquinaria molecular de una manera dinámica. De este modo, los autores sostienen que las enzimas que intervienen en la glicosilación son capaces de autoensamblarse en complejos mediante interacciones proteína-proteína para promover la especificidad y eficiencia de la maquinaria biosintética de oligosacáridos (Nilsson et al., 2009).

Algunas glicosiltransferasas en el RE forman dímeros entre subunidades por medio de puentes disulfuro los cuales han sido encontrados desde el dominio transmembrana y citoplasmático hasta la región “stem” y el dominio catalítico. La relación entre dimerización y actividad enzimática varía de acuerdo a cada proteína. Generalmente, aquellas enzimas diméricas que poseen puentes disulfuro entre subunidades por fuera del dominio catalítico son activas tanto en la forma monomérica como dimérica (Young Jr, 2004). Otras como GM2 sintasa requieren de la dimerización para su actividad (Li et al., 2000). Sin embargo, el **modelo de reconocimiento de pares** remarca la capacidad de oligomerización a partir de interacciones físicas entre las proteínas. La formación de este tipo de complejos ha sido reportada en distintas vías de síntesis de glicanos en el aparato de Golgi. Por ejemplo, se encontró que la GT GlcNAcT-I que inicia la síntesis de N-glicanos complejos interactúa con α manosidasa II (Nilsson et al., 1994) y los complejos fueron el resultado de interacciones entre residuos de aminoácidos cargados ubicados en el lumen de ambas transferasas (Nilsson et al., 1996). A su vez, GlcNAcT-I también interacciona con GlcNAcT-II la cual actúa en el paso siguiente de esta vía de síntesis (Opat et al., 2000). Asimismo, se han descubierto complejos en la glicosilación de glicoesfingolípidos entre enzimas que participan en la biosíntesis de gangliósidos, GM2 Sintasa y GM1 Sintasa (Giraud et al., 2001) y también, entre LaCer Sintasa, GM3 Sintasa y GD3 Sintasa (Giraud and Maccioni, 2003). En ambos casos la formación de complejos fue mediada por el dominio transmembrana y la región flanqueante de estas enzimas; y dichos complejos contenían enzimas que actúan de manera secuencial en sus respectivas vías de síntesis. Por otro lado, en la síntesis de proteoglicanos también existen evidencias de formación de complejos. EXT1 y EXT2 son enzimas que intervienen en la polimerización glucídica del heparán sulfato que forman complejos homo y hetero oligoméricos. El complejo EXT1-

EXT2 presenta una actividad glicosiltransferasa superior a la de sus componentes por separado (McCormick et al., 2000).

1.11 Acetilación de proteínas como modificación postraducciona l en residuos lisina

El grupo ϵ -amino de los residuos lisinas pueden sufrir diferentes modificaciones postraduccionales (MPT) incluyendo acetilación y otras formas de acilación, sumoilación, biotinilación, ubiquitinación y metilación; lo cual genera un gran potencial para la regulación cruzada entre ellas (Yang and Seto, 2008). La acetilación del grupo ϵ -amino de una lisina (generalmente se nombra como acetilación de lisina) es una MPT reversible y difiere de $N\alpha$ -acetilación (llamada acetilación N-terminal) que ocurre en el grupo α -amino en el extremo N-terminal de proteínas citosólicas que están siendo sintetizadas y se cree que es irreversible. Este último, es un evento co-traducciona l que afecta predominantemente a residuos alanina, serina y metionina (Polevoda and Sherman, 2003).

La acetilación de lisina fue originalmente identificada hace más de 40 años en histonas donde su naturaleza transiente regula la interacción de la cromatina y como consecuencia la transcripción de ADN (Yang and Grégoire, 2007). Luego, un gran número de proteínas citosólicas y nucleares fueron descritas en sus formas acetiladas (Xiong and Guan, 2012; Yang and Seto, 2007). Sin embargo, en forma muy reciente se conoció que también ocurre en el lumen de la mitocondria (Choudhary et al., 2009; Kim et al., 2006; Schwer et al., 2006) y del RE (Costantini et al., 2007; Lundby et al., 2012; Pehar and Puglielli, 2013).

Esta MPT afecta la función de las proteínas en diferentes aspectos alterando su conformación, localización subcelular, estabilidad, interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico y actividad enzimática (Choudhary et al., 2014; Xiong and Guan, 2012). Además, la acetilación de lisina ha sido encontrada en un amplio espectro de organismos desde bacterias a humanos (Kim and Yang, 2011; Soufi et al., 2012) indicando que las funciones regulatorias de la acetilación son diversas y conservadas.

Desde un punto de vista bioquímico, la acetilación/deacetilación de lisinas requiere 4 componentes esenciales:

- 1) un aceptor del grupo acetilo (una proteína que tenga residuos lisina disponibles)
- 2) un donador del grupo acetilo: acetil-coenzima A (acetil-CoA).

- 3) Una enzima capaz de transferir el grupo acetilo del donador al aceptor: lisina acetiltransferasa (KAT). Han sido identificadas 22 KATs en humanos y ratón (Lee and Workman, 2007; Roth et al., 2001) las cuales pueden ser agrupadas en 3 familias principales: GCN5, CBP/p300 y MYST (Berndsen and Denu, 2008).
- 4) Una enzima capaz de remover el grupo acetilo: lisina deacetilasa (KDAC). Han sido identificadas 18 KDACs en el genoma humano y de ratón que pertenecen a dos familias distintas con mecanismos catalíticos diferentes: histonas deacetilasas dependiente de Zn^{2+} (HDAC1–11) (Haberland et al., 2009) sirtuinas deacetilasas dependiente del cofactor NAD^+ (SIRT1–7) (Finkel et al., 2009). Las sirtuinas están presentes en el núcleo, citoplasma y mitocondria, mientras las deacetilasas dependientes de Zn^{2+} se localizan predominantemente en el núcleo y citoplasma.

Como consecuencia de la incorporación del grupo acetilo se elimina la carga positiva del grupo ϵ -amino de la lisina como se muestra en la Figura 11, en la reacción catalizada por las KATs. En la sección 1.13 se describirá la maquinaria de acetilación/deacetilación en el RE que ha comenzado a develarse en forma reciente.

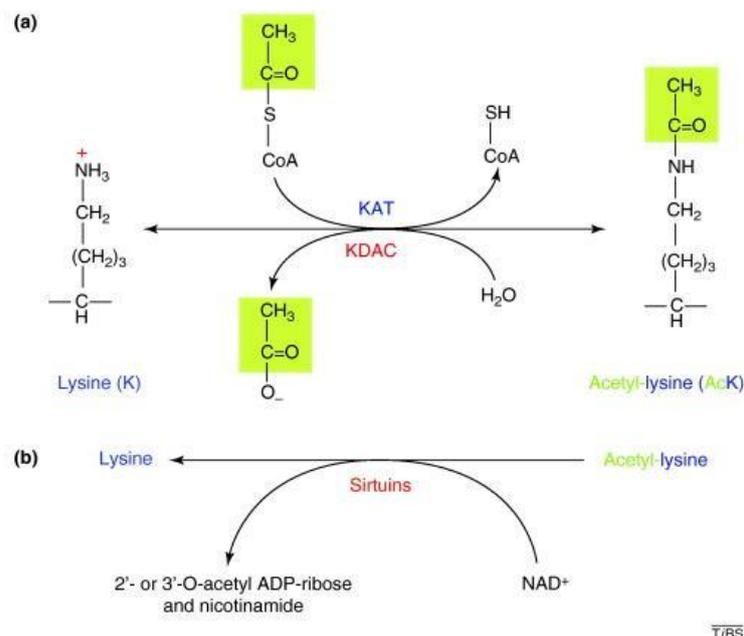


Figura 11: Reacción de acetilación y deacetilación de lisinas

La acetilación es una MPT reversible por lo cual las enzimas lisina acetiltransferasas (KATs) incorporan grupos acetilo a partir del sustrato donador acetil-CoA sobre residuos lisinas en proteínas blanco. Mientras, las enzimas lisina deacetilasas (KDACs) y Sirtuinas remueven grupos acetilo. Extraído y adaptado de (Kim and Yang, 2011)

Es importante destacar que en ciertas condiciones fisiológicas puede ocurrir una acetilación no enzimática que resulta del contacto directo de las proteínas con el

metabolito acetil-CoA de una manera dependiente de su concentración (Guan and Xiong, 2011; Hirschey et al., 2011). Los niveles de acetil-CoA y acetil-fosfato aumentan cuando las células son expuestas a altas concentraciones de glucosa lo que conduce a un aumento de la acetilación (Weinert et al., 2014; Weinert et al., 2013).

1.12 Estudios del acetiloma

Durante la década pasada, los desarrollos en proteómica han impulsado la investigación en torno a la acetilación. Es evidente por el número de sitios identificados con esta modificación que se está poniendo a la altura de otras MPT como fosforilación y ubiquitinación, lo cual resalta su potencial regulatorio (Choudhary et al., 2014).

Al igual que otros tipos de MPT, la acetilación ocurre en una estequiometría baja, es decir, sólo una pequeña fracción de la proteína lleva la MPT. Por este motivo, es un gran desafío la identificación de los péptidos modificados a partir de una muestra compleja. Avances recientes en espectrometría de masa (MS) de alta resolución (Choudhary and Mann, 2010; Jensen, 2006) han permitido tanto la identificación de cientos de sitios de acetilación como su cuantificación relativa en un solo experimento. Diferente tipo de instrumental de MS y metodologías pueden ser usadas para el análisis del acetiloma. Un esquema del procedimiento empleado en la mayoría de los estudios a gran escala se muestra en la Figura 12.

A partir de múltiples estudios de este tipo se ha recogido información muy valiosa. Los análisis han demostrado que los sitios de acetilación son frecuentemente conservados a través de diversos organismos (Beltrao et al., 2012; Weinert et al., 2011; Zhang et al., 2009) y la mayoría de los eventos de acetilación ocurren en proteínas no nucleares (Choudhary et al., 2009; Kim et al., 2006; Zhao et al., 2010).

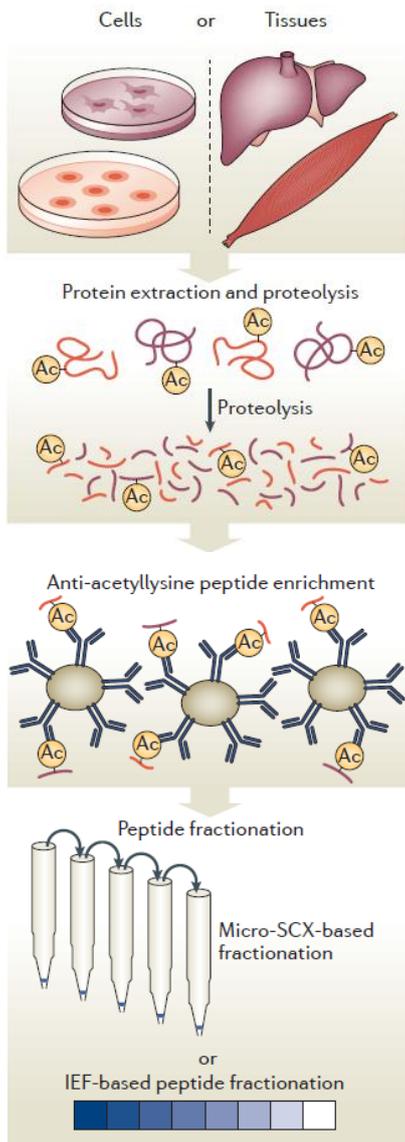


Figura 12: Análisis global de acetilación de lisinas basados en espectrometría de masa

a- Preparación de la muestra. Las proteínas son extraídas a partir de líneas celulares o tejidos con solución de lisis y digeridas en péptidos usando proteasas, usualmente tripsina. La proteólisis de los extractos proteicos genera numerosos péptidos, pero sólo una pequeña fracción está acetilada. Para reducir la complejidad de la muestra y aumentar la selectividad del análisis, los péptidos acetilados son enriquecidos sobre los no acetilados por purificación por inmunofinidad con anticuerpos antilisisina acetilada. La complejidad de la muestra puede ser reducida por métodos de fraccionamiento (cromatografía de intercambio catiónico a microescala o isoelectroenfoco).

También, se ha analizado el contexto de las secuencias de aminoácidos en torno al sitio de acetilación en varios estudios en eucariotas y aunque no se han descritos motivos consenso claros, existen preferencias por ciertos aminoácidos (Lundby et al., 2012). Las KATs frecuentemente se presentan como complejos multiproteicos y sus actividades y especificidades pueden estar influenciadas por las subunidades asociadas (Shahbazian and Grunstein, 2007). La acetilación frecuentemente ocurre en dominios estructurados tales como α -hélices y hojas β y sobre proteínas altamente conservadas como enzimas metabólicas, ribosomas y chaperonas (Choudhary et al., 2009; Zhao et al., 2010). Por el contrario, los sitios fosforilados son encontrados en regiones no estructuradas de proteínas y de rápida evolución y los residuos fosforilados no son altamente conservados (Iakoucheva et al., 2004).

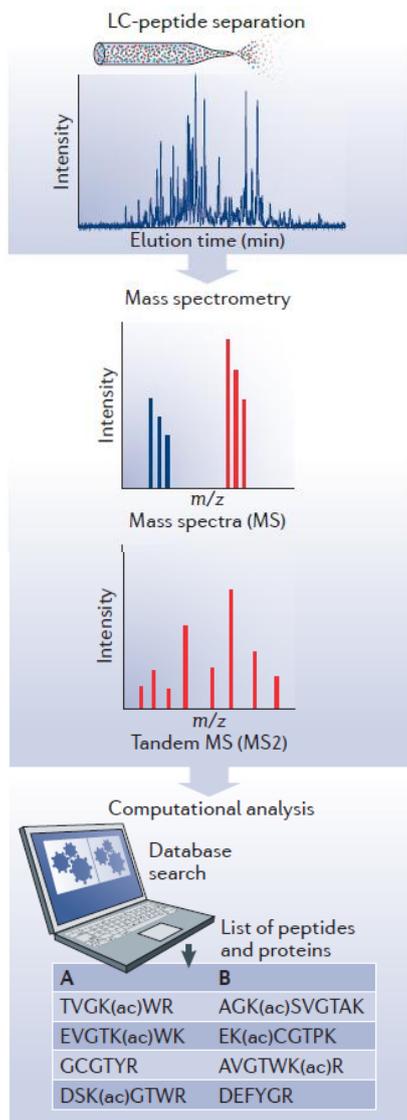


Figura 13: Análisis global de acetilación de lisinas basados en espectrometría de masa

b- Análisis de espectrometría de masas de los péptidos acetilados. Las muestras de los péptidos son separadas por cromatografía líquida a escala de nanoflujo (LC) usando un gradiente de solvente orgánico para eluir los péptidos de las columnas de fase reversa. Los péptidos eluidos son transferidos al espectrómetro de masas donde sufren ionización por *electrospray* y se analizan los péptidos ionizados intactos de acuerdo a su relación masa-carga (m/z). Posteriormente, los péptidos se fragmentan y los espectros de los fragmentos se archivan (MS/MS, espectrometría en tándem). A partir de estos espectros (MS y MS/MS) se deducen las secuencias de los péptidos, la presencia y localización de la modificación postraduccional y se cuantifica la abundancia de los péptidos y proteínas (Choudhary et al., 2014).

Uno de los primeros estudios de gran impacto en el área de acetilómica realizado a partir de una línea celular humana donde se caracterizaron 3600 sitios en 1750 proteínas (Choudhary et al., 2009) generó una base de datos disponible en internet para su consulta y luego, creó el primer programa para predecir sitios de acetilación <http://www.phosida.com> (Gnad et al., 2010). Desde allí en adelante, han surgido nuevos programas para predecir sitios de acetilación con diferentes criterios (Li et al., 2014; Liu et al., 2014; Suo et al., 2012).

1.13 Acetilación de lisinas en el lumen del RE

Descubrimientos recientes reportaron que proteínas de RE, Golgi, de membrana plasmática y del espacio extracelular se encuentran acetiladas. Todas estas proteínas presentan residuos lisina acetilados en la porción luminal (Choudhary et al., 2009; Lundby et al., 2012; Mak et al., 2014; Pehar and Puglielli, 2013). Por lo cual, fue una evidencia

más para la búsqueda de la maquinaria de acetilación en el lumen del RE/Golgi. Sin embargo, en los inicios de la caracterización del acetiloma, en particular en células eucariotas, la baja abundancia de las proteínas de la vía secretora sumado a la naturaleza transiente de esta MPT, llevaron a subestimar la posibilidad de que la acetilación podía ocurrir en estos compartimentos. Para que la reacción de acetilación transcurra deben existir los componentes mencionados en la Sección 1.11. Tal es así, que en la actualidad se ha avanzado en el conocimiento de este tema y varias cuestiones han sido develadas al respecto. En primer lugar, existe un transportador de acetil-CoA que transporta este sustrato del citosol al interior de RE ya que acetil-CoA es una estructura altamente cargada y no puede atravesar la bicapa lipídica. El transportador Acetil-CoA 1 (en inglés Acetyl-CoA Transporter-1) o simplemente AT-1 tiene una localización exclusiva en RE. La traslocación de acetil-CoA es esencial para la función celular ya que la disminución de su expresión en células de mamíferos desencadenó la activación de la maquinaria de autofagia y resultó en la muerte masiva de las células (Jonas et al., 2010; Pehar et al., 2012a). A su vez, AT-1 se encuentra mutado en pacientes afectados por paraplejia espástica autosómica dominante-42 (SPG42) (Lin et al., 2008a) y por el síndrome autosomal recesivo complejo; esta última patología afecta funciones cerebrales vitales cuyos pacientes fallecen a una edad temprana (Huppke et al., 2012). Dada la severidad de los casos se pone de manifiesto la importancia de AT-1.

En segundo lugar, se han identificado al menos dos acetiltransferasas ubicadas también en el RE, las cuales fueron nombradas como ATase1 (también conocida como *camello-like 2* y N-acetiltransferasa 8B) y ATase2 (también conocida como *camello-like 1* y N-acetiltransferasa 8). Las dos acetiltransferasas muestran una identidad de secuencia de 86% a nivel de la secuencia proteica. Ambas poseen una cola citoplasmática corta, un segmento transmembrana y un dominio luminal con actividad catalítica (Ko and Puglielli, 2009). Tienen un peso molecular aparente en geles desnaturizantes alrededor de 28 kDa y 25 kDa, respectivamente. ATase1 y ATase2 son miembros de la familia *camello* que pertenece a la superfamilia de GNAT (N-acetiltransferasa relacionada a Gcn5) de N-acetiltransferasas en la cual la homología entre los miembros de la familia a nivel de la secuencia primaria no es significativa (3-23% identidad de secuencia), pero su estructura es conservada (Dyda et al., 2000; Vetting et al., 2005). ATase1 y ATase2 son expresadas en forma diferencial en una variedad de células inmortalizadas y células primarias y a su vez, parecerían estar expresadas preferentemente en cerebro en humanos y ratón.

Particularmente, se encuentran en altos niveles en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer, por lo cual podría haber una asociación con esta enfermedad. Mientras ATase1 parecería actuar como una forma constitutiva de acetiltransferasa, ATase2 se encuentra regulada a nivel transcripcional en forma más ajustada (Ding et al., 2012). Es probable que ATase1 y ATase2 no sean las únicas acetiltransferasas de RE ya que en experimentos donde se redujo la expresión de ambas, no se produjo una toxicidad celular significativa (Ko and Puglielli, 2009).

Estas acetiltransferasas son capaces de ensamblarse para formar homo y heterodímeros y se asocian con 4-5 miembros del complejo oligosacariltransferasa (OST) cuya función es glicosilar polipéptidos aún no plegados a medida que ingresan al lumen del RE a través del traslocón (Dempski and Imperiali, 2002; Kelleher and Gilmore, 2006). OST transfiere $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ sobre residuos de asparagina iniciando la N-glicosilación como fue descrito en la Sección 1.5.2. Los investigadores proponen que las ATases trabajan de manera coordinada o secuencial con OST para acetilar y así, seleccionar polipéptidos correctamente plegados (Ding et al., 2014). Estudios adicionales son requeridos para determinar si la actividad de estas ATases está limitada sólo a N-glicoproteínas.

Por otro lado, la actividad deacetilasa fue detectada en el lumen del aparato de Golgi (Costantini et al., 2007). Pero la búsqueda en base de datos de proteínas localizadas en Golgi y con dominios similares a otras deacetilasas ya conocidas no arrojó resultados sólidos y tampoco, se intentó aislar la proteína por métodos bioquímicos más tradicionales. Sin embargo, en forma reciente se identificó (Laloti et al., 2013) y se propuso como candidato amfion/C6orf89, una deacetilasa que reside en el cis-Golgi (Ding et al., 2014).

Hasta el momento, las proteínas acetiladas BACE (Costantini et al., 2007) y CD133 (Mak et al., 2014) más exhaustivamente estudiadas coinciden en que la acetilación es vital para que estas puedan atravesar el RE y luego, moverse a través de la vía secretora para ser ancladas a la membrana plasmática. La acetilación formaría parte del sistema de control de plegamiento de proteínas seleccionando aquellas correctamente plegadas etiquetándolas con residuos acetilo sobre ciertas lisinas. De lo contrario, en ausencia de la acetilación éstas son degradadas en el RE por acción de una proteasa (PCSK9/NARC-1) en un mecanismo independiente del proteasoma (Ding et al., 2014; Pehar and Puglielli,

2013). Sin embargo, se desconoce si este mismo mecanismo se aplica a proteínas residentes en RE o Golgi y si es extensivo a todas las proteínas de membrana plasmática.

En nuestro laboratorio se ha comenzado a estudiar la acetilación de ppGalNAc-Ts de origen humano caracterizando cómo afecta a las propiedades de la enzima (Zlocowski et al., 2013; Zlocowski et al., 2011). Tras múltiples esfuerzos por parte de miembros de nuestro laboratorio para detectar ppGalNAc-T2 acetilada *in vivo*, finalmente se confirmó su existencia en ensayos de proteómica llevados a cabo por el laboratorio del Dr. Puglielli (Pehar et al., 2012b) a partir del análisis de fracciones enriquecidas en vesículas de RE. Casi en simultáneo, otro estudio (Lundby et al., 2012) identificó la isoforma ppGalNAc-T9 acetilada a partir de biopsias de músculo esquelético humano sin fraccionamiento de los compartimentos subcelulares.

En vistas de los antecedentes presentados aquí nos preguntamos si los dominios lectina de ppGalNAc-Ts podrían ejercer roles adicionales a los descritos en la actualidad, influyendo en la actividad de glicosiltransferasas próximas en las vías de síntesis de glicanos de tipo O-GalNAc. A su vez, MPT como acetilación que ocurren en el lumen del RE, podrían actuar como otro nivel de control de las propiedades biológicas de ppGalNAc-Ts. En ambos casos, se pretende indagar acerca de los mecanismos de regulación de ppGalNAc-Ts con un impacto en la O-GalNAc glicosilación por ser estas enzimas iniciadoras de este tipo de glicosilación.

2. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo estudiar mecanismos de control de la actividad enzimática que regulan el inicio de la biosíntesis de glicanos del tipo O-GalNAc con dos abordajes diferentes.

2.1 Objetivos específicos

- ❖ En primer lugar, se busca determinar roles funcionales de los dominios lectina de ppGalNAc-Ts en relación a su influencia sobre glicosiltransferasas adyacentes físicamente en el Golgi que participan en la vía de síntesis de estos glicanos. Para lograrlo se han diseñado experimentos para medir actividad enzimática de las glicosiltransferasas estudiadas tanto *in vitro* como *in vivo* y se planificaron ensayos de interacción entre dominios lectina y las glicosiltransferasas involucradas.
- ❖ En segundo lugar, se pretende estudiar el impacto de la acetilación de lisinas como mecanismo de control postraducciona l sobre las propiedades biológicas de ppGalNAc-Ts. Para lo cual, se generaran herramientas para estudiar en forma direccionada el efecto de la acetilación, específicamente, en el dominio lectina de la isoforma ppGalNAc-T3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

Sf9 es una línea celular de insecto derivada de las células de ovario de *Spodoptera frugiperda* que fue adquirida en Invitrogen Argentina.

Por otro lado, la línea celular CHO IdID fue gentilmente cedida por el Dr. Eric P. Bennett (Copenhagen Center for Glycomics, Universidad de Copenhague, Dinamarca).

Para el estudio *in vivo* de la incorporación del primer azúcar en una cadena compleja de oligosacáridos se debe buscar una estrategia para la detección del mismo. Las líneas celulares que producen estructuras simplificadas de O-glicanos homogéneos facilitan el análisis de los sitios de glicosilación generando oligosacáridos truncos. Este es el caso de la línea celular CHO IdID, son células mutantes aisladas a partir de la línea celular de ovario de hámster chino, ampliamente conocida por su sigla en inglés, como células CHO (Chinese hamster ovary). Su nombre se debe a que dichas mutantes expresan un receptor de LDL (del inglés, Low density lipoprotein o lipoproteína de baja densidad) funcionalmente inactivo por la carencia de ciertos O-glicanos lo que lleva a su desestabilización (Kingsley et al., 1986; Kozarsky et al., 1988). Las mutantes IdID carecen de la epimerasa responsable de convertir UDP-Glc a UDP-Gal y UDP-GlcNAc a UDP-GalNAc. Debido a que existen vías alternativas para importar galactosa y GalNAc al interior de las células, la composición de las diferentes clases de glicanos puede ser controlada en estas células por suplementación de galactosa o GalNAc al medio de cultivo (Figura 14). La suplementación con ambos azúcares revierte completamente la deficiencia de azúcares-nucleótidos en la síntesis de oligosacáridos. Otra forma es suplementar las células con glicoproteínas de suero tales como fetuina para contrarrestar el defecto ya que estos dos azúcares son reciclados a partir de la degradación lisosomal de proteínas (Varki et al., 2009). Las células CHO IdID son una herramienta útil para estudiar el inicio de la glicosilación de tipo mucina, ya que al adicionar GalNAc al medio se generarán oligosacáridos truncos quedando éste expuesto como azúcar terminal.

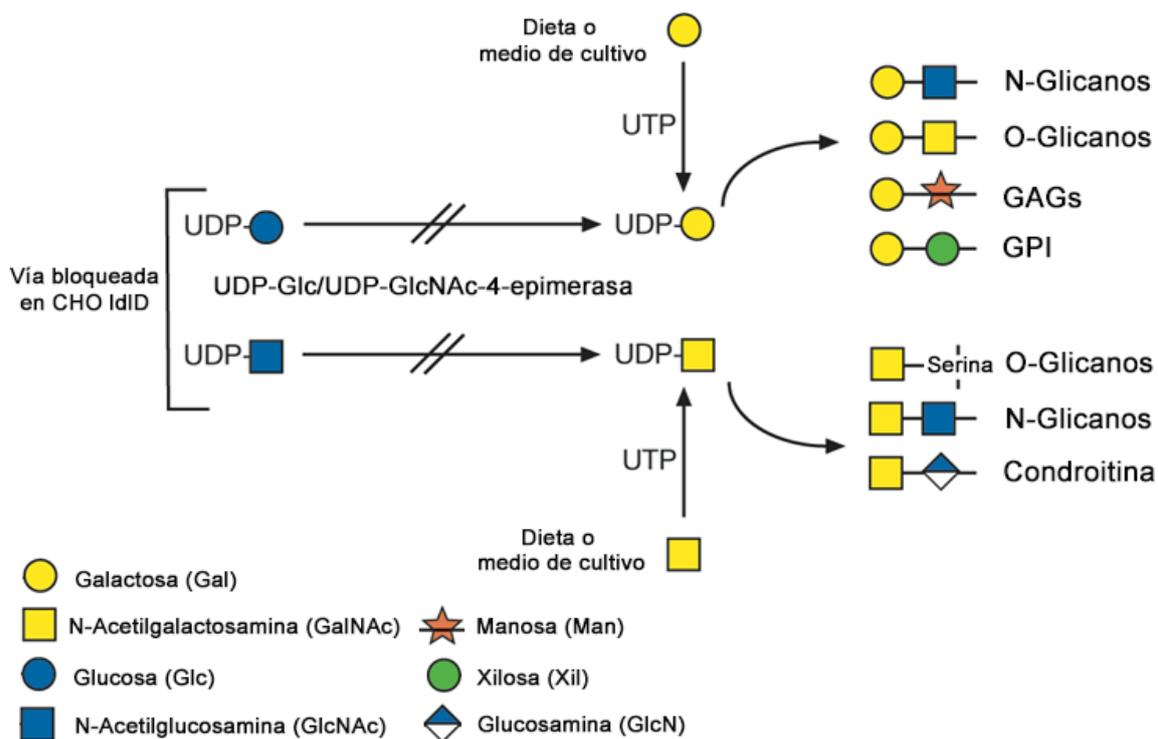


Figura 14: Efecto de las mutaciones en la UDP-Glc/UDP-GlcNAc-4-epimerasa en células CHO Id1D. Los efectos fenotípicos en las células CHO Id1D pueden ser revertidos mediante el agregado al medio de cultivo de Gal y GalNAc, los cuales son necesarios para la síntesis de múltiples N- y O-glicanos. Extraído y adaptado de (Varki et al., 2009).

3.2 Glicopéptido

El O-glicoconjugado MUC1 completamente glicosilado con GalNAc (denominado a partir de aquí MUC1- α GalNAc) fue preparado químicamente a partir de MUC1 humano sintetizado de 60 aminoácidos de longitud (formado por tres secuencias repetidas de 20 aminoácidos: HGVTSPDTRPAGSTAPPA), catalizado en primer lugar por la transferasa recombinante ppGalNAc-T2 y en segunda instancia, por ppGalNAc-T4, O-glicosilando una proporción de 15 moléculas de α GalNAc por cada 60 aminoácidos de MUC1 (Hanisch, 2001).

3.3 Expresión y purificación de enzimas y dominios lectina

3.3.1 Constructos

Las secuencias de ADN codificante de las enzimas ppGalNAc-T2 y -T3 (de origen humano), Core1GalT (de *Drosophila melanogaster*) (C1GalT) y los dominios lectina de T2, T3 y T4 (también de origen humano) fueron clonados en el vector de expresión pAcGP67 (BD-Biosciences) (Figura 15) como fuera descrito previamente por Bennett y col., 1996 y

Wandall y col., 2007 (Bennett et al., 1996; Wandall et al., 2007). Los constructos aquí nombrados fueron facilitados por el Dr. Eric P. Bennett.

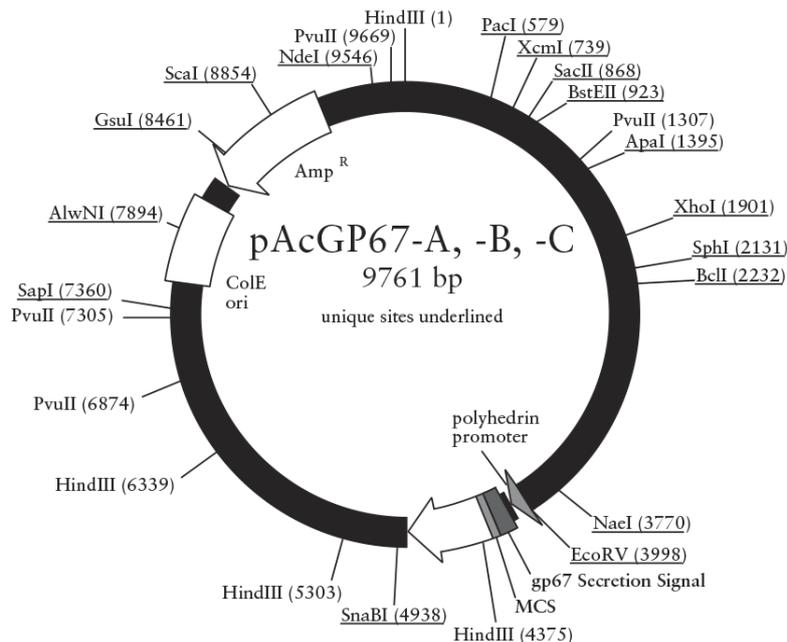


Figura 15: Vector de expresión de las proteínas recombinantes Vector pAcGP67 (BD - Biosciences) en el cual fueron clonados los constructos de las proteínas recombinantes para su expresión en células de insectos. Extraído de https://www.bdbiosciences.com/documents/Baculovirus_vector_system_manual.pdf

Los constructos correspondientes a las enzimas y dominios lectinas carecen de la porción citoplasmática y del dominio transmembrana para su expresión en forma soluble. En el extremo amino terminal de todos los constructos se incorporó una etiqueta de seis histidinas que se utiliza en este trabajo como estrategia de purificación mediante una columna con metal inmovilizado y también, una etiqueta T7, a excepción de ppGalNAc-T3 (Figura 16). Además, cabe destacar que la secuencia de cada proteína es clonada inmediatamente posterior a la señal de secreción de la proteína gp67 que posee el plásmido pAcGP67; lo cual va a permitir que la proteína heteróloga siga la vía secretoria, siendo removido el péptido señal a lo largo de la misma.

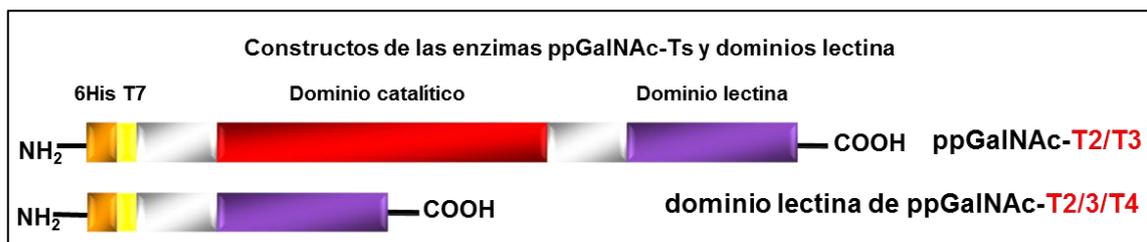


Figura 16: Constructos de las enzimas y dominios lectina

Representación esquemática de los constructos recombinantes para la expresión en forma soluble de las enzimas ppGalNAc-T2 y T3 (incluyendo ambos dominios, catalítico y lectina) y los dominios lectina de ppGalNAc-T2, T3 y T4. En el extremo amino terminal los constructos poseen dos etiquetas, una con 6 histidinas (6His) y otra con la secuencia T7.

3.3.2 Generación de virus recombinantes y expresión de proteínas

Las células de insectos Sf9 fueron crecidas a 27°C en medio Grace (Gibco-Invitrogen) suplementado con antibiótico (ATB) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Los plásmidos pAcGP67-His-proteína fueron co-transfectados con ADN viral lineal, protocolo adaptado a partir del Kit BaculoGold (BD Biosciences) (Figura 17). Los virus recombinantes generados fueron amplificados en células Sf9 crecidas al 80% de confluencia. Se realizaron amplificaciones sucesivas primero en placas de 35mm y luego, de 60mm durante 3 días en cada caso. Previamente a la etapa de producción y purificación, la presencia de la enzima recombinante fue verificada mediante western blot en sobrenadante (del medio de cultivo) y en lisado celular.

El sobrenadante del medio de cultivo se recuperó luego de centrifugar el cultivo a 1500 rpm durante 15 min a 4°C y se utilizó para infectar células Sf9 sembradas en placas de 10 mm al 80% de confluencia. Al cabo de 5 días, se cosecharon las células recuperando la fracción soluble donde se encuentra la proteína de interés para su posterior purificación.

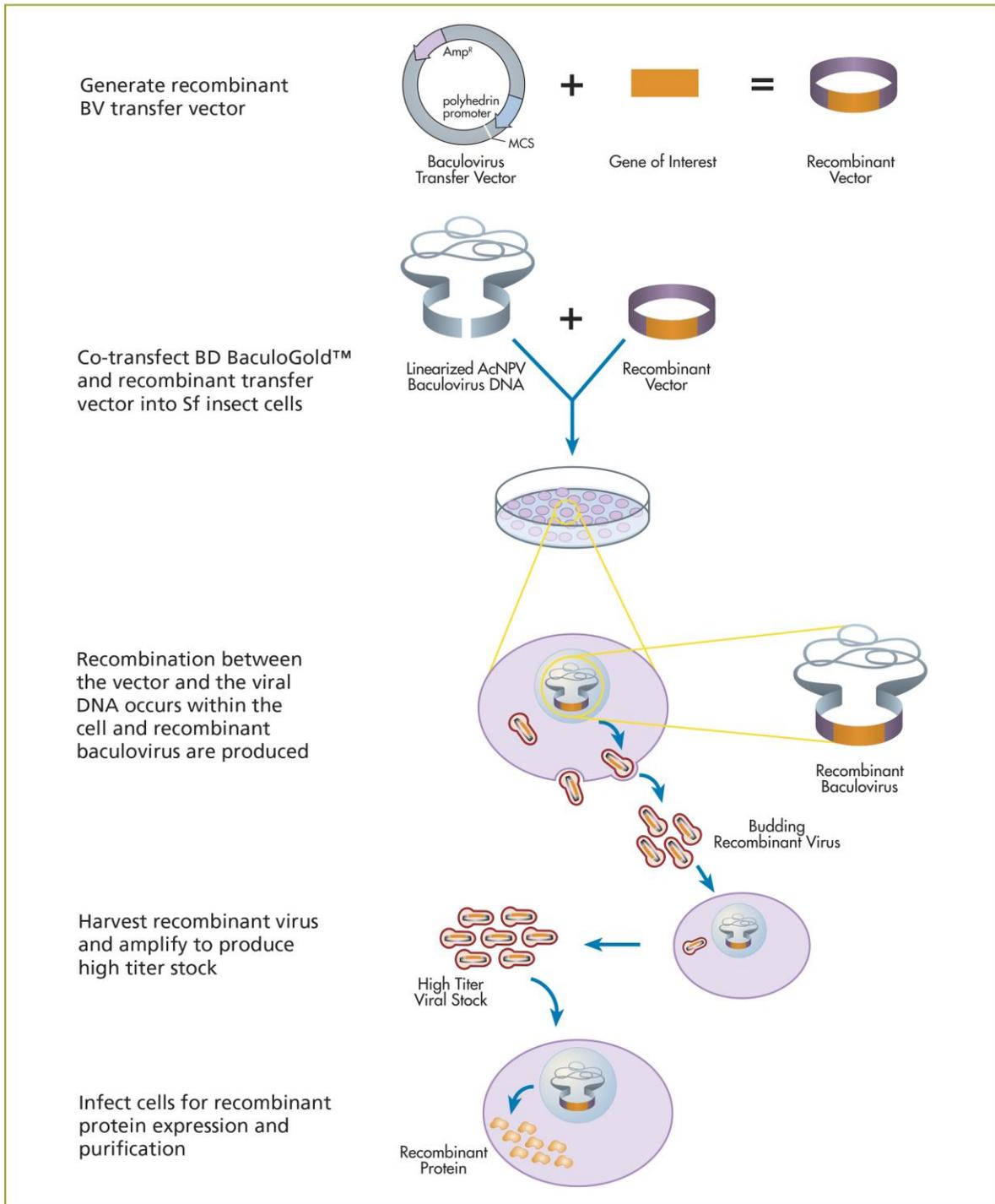


Figura 17: Sistema de expresión de proteínas

Expresión de proteínas recombinantes mediante la generación de Baculovirus recombinantes utilizando el kit BaculoGold™ (BD - Biosciences). Extraído de https://www.bdj.co.jp/pdf/55-02_03-7900030-23-A1.pdf

3.3.3 Purificación de proteínas recombinantes

El medio de cultivo de Sf9 fue sometido a centrifugación a 1500 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue dializado contra solución tampón fosfato salina o PBS (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM) utilizando una membrana con un límite de corte de peso molecular de 10 kDa (Sigma-Aldrich). A la muestra de partida dializada se le adicionó imidazol a una concentración final de 5 mM y luego, se centrifugó a 13.000 rpm por 10

min a 4°C. Las proteínas fueron purificadas usando la resina HisPur™ (Thermo Scientific) con cobalto inmovilizado. Esta resina fue acondicionada con una solución de imidazol 5 mM y a continuación, se agregó la muestra de partida a purificar. Se hicieron lavados escalonados con 5 mM y 40 mM de imidazol. Finalmente, la proteína de interés fue eluida con 150 mM de imidazol. En la Tabla 1 se indica la composición de cada una de las soluciones empleadas para la purificación de proteínas. A continuación, los eluidos se dializaron contra PBS y se concentraron mediante centrifugación (7.500 g) con un filtro Centricon (Millipore) con límite de corte 10 kDa. Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas totales empleando el método de ácido bicinónico (kit Pierce, Thermo Scientific), utilizando albúmina sérica bovina (ASB) como estándar. La pureza de las mismas fue evaluada mediante gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) al 10% y posterior tinción de proteínas totales con Azul Brillante de Coomassie.

Tabla 1: Soluciones utilizadas para la purificación de las proteínas recombinantes

Purificación de proteínas		
Solución Acondicionamiento de la columna	NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 NaCl Imidazol	50mM 300 mM 5 mM
Solución de Lavado I	NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 NaCl Imidazol	50mM 300 mM 5 mM
Solución de Lavado II	NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 NaCl Imidazol	50mM 300 mM 40 mM
Solución de Elución	Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 NaCl Imidazol	50mM 300 mM 150 mM

3.4 Ensayo de actividad GalNAc-transferasa

3.4.1 Ensayo de espectrometría de masas

La reacción enzimática fue realizada en un volumen final de 10 µl conteniendo: cacodilato 25 mM (pH 7,4), MnCl₂ 10 mM, Tritón X-100 0,25%, ppGalNAc-T 0,5 µg/ml y péptido aceptor 20 µM. Los péptidos aceptores ensayados fueron MUC1₂₄ (TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP), MUC2₃₃ (PTTTPITTTTTVTPTPTGTQTPTTPISTTC) y MUC5B₂₇ (SSTPGTTWILTELTATTTESTGSTA) sintetizados por Neosystem (Estrasburgo) o Cancer Research (Reino Unido). Todas las condiciones ensayadas ya sea en presencia o en ausencia de dominios lectina fueron pre-incubadas 1 hora a 4°C. La reacción enzimática se inició mediante la adición de UDP-GalNAc a una concentración final de 100 µM y se

incubó durante 1 h a 37°C. A los productos de la reacción enzimática se les adicionó una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (25 mg/ml) (Sigma-Aldrich) disuelto en una mezcla (2:1) de ácido trifluoracético 0,1% en acetonitrilo acuoso 30% (Rathburn Chemicals, Escocia, Reino Unido). Luego, fueron colocadas en una placa metálica multipocillo para su análisis mediante MALDI-TOF (por sus siglas en inglés, desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador TOF, “tiempo de vuelo”). Los espectros de masas fueron adquiridos con un espectrómetro de masa Voyager-DE equipado con extracción retardada (Perceptive Biosystems). Estos ensayos fueron realizados en el Copenhagen Center for Glycomics (Universidad de Copenhague, Dinamarca), como parte de una colaboración con el Dr. H. Clausen.

3.4.2 Ensayo colorimétrico

Placas multiorificio de poliestireno (Corning Costar) se sensibilizaron con 50 µl de péptido en buffer carbonato (NaHCO₃ 0,1M, NaCl 0,5 M pH 8,3) durante toda la noche a 4°C. Los péptidos evaluados se describieron en el punto anterior 3.4.1. Se removió la solución de sensibilización, se lavaron los pocillos con PBS y se bloquearon con Tween-20 0,1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). La mezcla de la reacción enzimática se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo cacodilato 25 mM (pH 7,4), MnCl₂ 10 mM, Tween-20 0,1%, ppGalNAc-T (0,25-1 µg/ml). En los pocillos que contenían la mezcla de reacción se adicionó según correspondía dominio lectina o buffer cacodilato (control) y las placas fueron pre-incubadas durante 1 hora a 4°C. Luego, se dio inicio a la reacción enzimática con el agregado de UDP-GalNAc 50 µM y las placas fueron incubadas por 15 min a 37°C. La reacción se detuvo succionando la mezcla de los pocillos. Éstos fueron lavados con PBS y a continuación, incubados con la lectina *Helix Pomatia* (HPA: *Helix Pomatia* Agglutinin, su sigla en inglés) conjugada a peroxidasa (HRP: Horse Radish Peroxidase) (Sigma-Aldrich) (1:1000) diluida en PBS con Tween-20 0,05% y lavados nuevamente con PBS. Un esquema de este ensayo se muestra en la Figura 18. El revelado colorimétrico fue llevado a cabo con una solución de o-fenilendiamina 0,5 mg/ml y H₂O₂ 0,02% en buffer citrato de sodio (pH 5,0) a TA y la reacción se detuvo por adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,5 N. Las medidas de absorbancia fueron obtenidas mediante un lector de microplacas (Epoch, Biotek^R Instruments) a 490 nm. El análisis de las curvas de las reacciones enzimáticas mediante ajuste no lineal y la determinación de los parámetros cinéticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 5.00.

En paralelo se realizó una curva con diferentes concentraciones de MUC1- α GalNAc que se adsorbieron directamente a la placa multiorificios y los residuos de GalNAc fueron detectados con HPA-HRP. La concentración de GalNAc incorporada en los glicopéptidos como producto de la reacción enzimática fue calculada por extrapolación a la curva del estándar MUC1- α GalNAc.

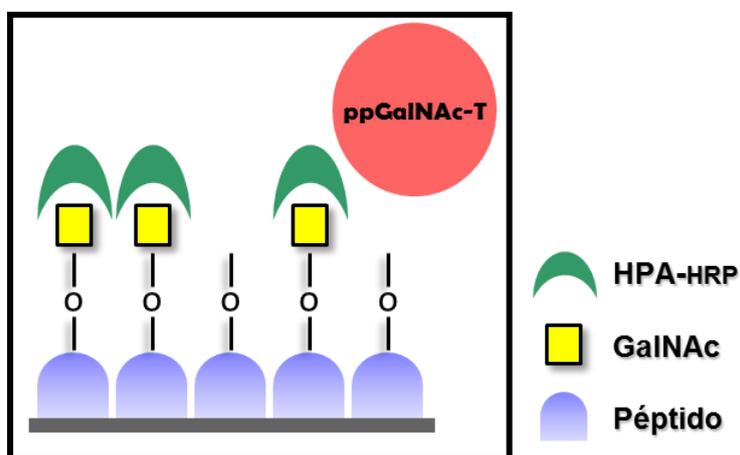


Figura 18: Esquema del ensayo de actividad enzimática con revelado colorimétrico

La enzima ppGalNAc-T incorpora moléculas de GalNAc en los OH de serinas o treoninas del sustrato aceptor, en este caso, péptidos derivados de mucinas inmovilizados en la superficie de las placas. Los residuos de α GalNAc incorporados serán detectados mediante la lectina HPA conjugada a HRP.

3.5 Biotinilación de dominios lectina

El pH de los dominios lectina purificados (con una concentración aproximada de 0,2 mg/ml) fue ajustado a 9 con una solución de NaOH 1 M. Se adicionó N-hidroxi-succinimidil-biotina (Sigma) disuelta en dimetilformamida (10 mg/ml) mezclándose en un agitador orbital durante 2 horas a TA. Las proteínas biotiniladas se dializaron tres veces frente a PBS pH 7,4 y se conservaron a -20°C hasta el momento de ser usadas (Jørgensen et al., 2000).

Además, la biotinilación de dichos dominios lectina fue verificada mediante dot-blot. Membranas de nitrocelulosa fueron sembradas con 1 μl de muestra, se las dejó secar y luego, se bloquearon durante 1 h a TA con PBS Tween-20 0,1%. Seguidamente, se incubaron con estreptavidina conjugada a HRP (Dako Cytomation) (1:1000) diluída en PBS Tween-20 0,05% durante 1 h a TA. Posterior al lavado con PBS, se realizó una reacción colorimétrica utilizando 0,5 mg/ml de 4-cloro-1-naftol y 0,02 % H_2O_2 en citrato de sodio pH 5,0 a TA, deteniéndose la reacción por lavados de la membrana con agua destilada.

3.6 Ensayo de interacción directa de los dominios lectina

Placas multiorificios de poliestireno (Corning Costar) fueron sensibilizadas con proteínas (ppGalNAc-T2, T2lec o mucina submaxilar ovina desialilada (dOSM)) en buffer carbonato

(pH 8,3) durante toda la noche a 4°C, lavadas con PBS, bloqueadas con Tween-20 0,1% en PBS por 1 h a TA y lavadas nuevamente con PBS. Diferentes concentraciones de dominios lectina biotinilados fueron ofrecidas a la placa incubándose durante 2 horas a TA. Luego, los pocillos fueron lavados con PBS e incubados con estreptavidina-HRP (Dako Cytomation) (1:1000) diluída en PBS Tween-20 0,05% durante 1 h a TA y nuevamente, lavados con PBS. La metodología de revelado colorimétrico y lectura de absorbancias fue descrita en 3.4.2.

3.7 Ensayo competitivo de la interacción de los dominios lectina

En este ensayo se procede de manera similar al punto anterior. Sólo que en este caso, los dominios lectina (4 µg/ml) son pre-incubados con diferentes concentraciones de proteínas (ppGalNAc-T2, ASB) o carbohidratos (bencil-α-GalNAc (Bzl-α-GalNAc), metil-α-GlcNAc (Me-α-GlcNAc)) durante 1h a TA previamente a ser agregados a los pocillos.

3.8 Cultivo y transfección de la línea celular CHO IdID

Células CHO IdID fueron cultivadas y mantenidas en estufa a 37°C en 5% de CO₂ en medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”) (GIBCO-Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, estreptomina (100 µg/ml) y penicilina (200 U/ml). Las células CHO IdID se sembraron en placas de 35 mm y fueron transfectadas cuando se encontraban al 80% de confluencia utilizando polietilenimina (PEI) empleando la relación 2:1 (ADN:PEI µg). Se utilizaron los siguientes vectores que codifican enzimas de origen humano (presentan la secuencia completa de la proteína incluyendo la porción citoplasmática y transmembrana): pcDNA3.1-ppGalNAc-T3, pcDNA3.1-ppGalNAc-T3^{D277H} (mutante inactiva catalíticamente con una mutación puntual en el motivo DXH, el cual es determinante para la actividad enzimática, vector cedido por el Dr. Eric P. Bennett) y un vector vacío pcDNA3.1 (Invitrogen) durante 4 horas. La mezcla de transfección fue removida y se adicionó DMEM con 10% de SFB y ATB suplementado con 1,5 mM GalNAc, las células se mantuvieron en cultivo durante 48 hs.

3.9 Western blot

Las células fueron lavadas tres veces con PBS y luego, levantadas con buffer de muestra 4X. Posteriormente, se sonicaron para asegurar la ruptura de las membranas celulares y se hirvieron a 100°C durante 10 min. Los lisados celulares fueron corridos en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) y electrotransferidos a

una membrana de nitrocelulosa (GE-Healthcare) a 350 mA durante 50 min. La membrana se bloqueó durante 30 min a TA con leche descremada (LD) al 3% en PBS, se lavó con PBS y se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-ppGalNAc-T3 (anti-T3) humano (1:500), anti-ppGalNAc-T2 humano (anti-T2) (1:500) (Sigma-Aldrich) y anti-alfatubulina (DM1A) (1:2500) (Sigma-Aldrich). Para la visualización y detección de las bandas se utilizaron anticuerpos secundarios de origen caprino conjugados a fluoróforos: anti-IgG de conejo IRDye® 800 (color verde) y anti-IgG de ratón IRDye® 680 (color rojo), a una dilución 1:20.000 para ambos anticuerpos (LI-COR Biosciences). En todos los casos los anticuerpos fueron diluídos en LD 1% en PBS. El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante el sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR).

Tabla 2: Soluciones utilizadas para la preparación y corrida de geles de poliacrilamida y Western blot (*volumen para un gel PAGE-SDS al 10% de 0,75mm de espesor)

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS		
Gel de apilamiento*	Tris-HCl 0,5M pH 6.8	625ul
	Agua	1500ul
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	325ul
	SDS 10% (p/v)	25ul
	Persulfato de amonio 10% (p/v)	12,5ul
	TEMED	2,5ul
Gel de separación*	Tris-HCl 1,5M pH 8.8	1250ul
	Agua	2000ul
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	1650ul
	SDS 10% (p/v)	50ul
	Persulfato de amonio 10% (p/v)	50ul
	TEMED	5ul
Buffer de muestra 4X	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	6 volúmenes
	Glicerol	4 volúmenes
	SDS	8 % p/v
	Azul de bromofenol	0,4% p/v
	β-mercaptoetanol	5% v/v
Buffer de corrida	Tris-Glicina pH 8,3 (8X)	75ml
	SDS 10% (p/v)	6 ml
	Agua	519ml
Tinción de Azul Brillante de Coomassie		
Solución colorante	Azul de Coomassie R-250	0,1 %
	Metanol	40%
	Ácido acético	10%
Solución Decolorante	Metanol	20%
	Ácido acético Glacial	10%
Western Blot		
Buffer de Transferencia	Buffer de Corrida	540 ml
	Metanol	160 ml

3.10 Citometría de Flujo

Las células CHO IdID transfectadas fueron lavadas tres veces con PBS y luego, incubadas con tripsina 0,25% y EDTA 0,06% durante 3 min a 37°C para su cosecha. Inmediatamente, se inactivó la tripsina con SFB y se lavaron las células con PBS.

A continuación, se procedió a la permeabilización y fijación de las células con las soluciones del Kit eBioscience. Seguidamente, las células fueron tratadas con neuraminidasa de *Clostridium perfringens* 0,1 U/ml (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 45min y lavadas. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-T3 humano (1:100) (Sigma-Aldrich) y VVL (lectina *Vicia villosa*) biotinilada (1:100) (Vector Laboratories Inc.) por 1h, lavadas e incubadas con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa-633 (1:2000) (Life Technologies) y estreptavidina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100) (Dako Cytomation) por 30 min. Para los lavados y diluciones de anticuerpos/neuraminidasa se utilizó el buffer de permeabilización (eBioscience) al cual se le adicionó ASB 1%. Por último, las células fueron resuspendidas en 100 µl de paraformaldehído 1% en PBS hasta el momento de ser analizadas. Las muestras fueron mantenidas a 4°C durante los lavados (que consisten en el agregado de buffer de permeabilización con ASB 1% y posterior centrifugación a 400 g durante 10 min) y las incubaciones con anticuerpos.

Además, se incluyeron dos controles: uno de ellos, corresponde a las células solas (sin el agregado de los anticuerpos primarios y de los fluoróforos) y el segundo, incubando las células con los fluoróforos (la estreptavidina conjugada a FITC y el anticuerpo secundario). Los datos fueron adquiridos con un citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson) y los resultados fueron analizados usando el programa FlowJo versión 7.6.2.

3.11 Cuantificación de terminales α GalNAc en mucina submaxilar ovina

Como las glicoproteínas mucina submaxilar ovina (su sigla en inglés, OSM) y su forma desialilada (dOSM) serán utilizadas como sustratos aceptores de la reacción enzimática de Gal-transferasas, se necesita conocer la cantidad de residuos GalNAc disponibles en las mismas. Para esto, placas multiorificios (Corning Costar) se sensibilizaron con 50 µl de diferentes concentraciones de OSM o dOSM en buffer carbonato (pH 8,3) durante toda la noche a 4°C. El glicopéptido MUC1- α GalNAc fue empleado como estándar, ya que se conoce el número de moléculas de GalNAc terminales por molécula de mucina. Se realizó

una curva con diferentes concentraciones de MUC1- α GalNAc en simultáneo con OSM y dOSM. Los niveles de GalNAc fueron detectados con la lectina HPA-HRP (Sigma-Aldrich) (1:1000) diluída en PBS-Tween 20 0,05%. Los lavados y la reaccion colorimetrica fueron llevados a cabo como se describió en la sección 3.4.2. La concentración de residuos α GalNAc terminal en las glicoproteínas OSM y dOSM fue calculada por extrapolación a la curva del estándar.

3.12 Ensayo de actividad galactosiltransferasa

El ensayo para medir la actividad de la enzima galactosiltransferasa fue realizado mediante un método colorimétrico.

Placas multiorificios fueron activadas con OSM o dOSM en buffer carbonato de sodio 0,1 M pH 8,3 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los pocillos fueron lavados y bloqueados con PBS Tween 20 0,1% durante 1 hora a TA. La mezcla de la reacción enzimática que contenía MES 50 mM (pH 7,0), MnCl₂ 20 mM, Tween 20 0,05%, C1GalT 1 μ g/ml y UDP-Gal 400 μ M fue incubada 2 hs a 37°C con y sin dominios lectina de ppGalNAc-Ts o enzima soluble. Luego, los pocillos fueron lavados con PBS, incubados con la lectina PNA (PNA: Peanut Agglutinin, su sigla en inglés) conjugada a HRP diluída 1:1000 en PBS con Tween 20 0,05% durante 1 h a TA y lavados nuevamente con PBS. La reacción colorimétrica fue llevada a cabo como se describió en la sección 3.4.2.

La glicoproteína, glicoforina, presenta 15 sitios de O-GalNAc glicosilación, en donde cada cadena glucídica presenta terminales Gal β 3GalNAc α Ser/Thr correspondiendo al glicano Core 1 (Dill et al., 1990). Se utilizó la forma desialilada de dicha proteína, asialoglicoforina (ASG, su sigla en inglés) (Sigma), como estándar para cuantificar la concentración de Galactosa incorporada por la enzima C1GalT sobre los sustratos aceptores GalNAc- α -OSM y GalNAc- α -dOSM utilizando la lectina PNA-HRP. PNA reconoce principalmente el disacárido que constituye el Core 1 en O-glicanos (Cummings and Etzler, 2009) cuya estructura fue recién mencionada. El ajuste no lineal de las curvas y el cálculo de los parámetros cinéticos se realizaron como se describió en la sección 3.4.2.

3.13 Predicción de sitios de acetilación en lisinas de ppGalNAc-T3

El uso de programas para predicción de MPT puede ser una herramienta muy útil para direccionar experimentos. A través del servidor ASEB (Acetylation Set Enriched Based) (Li

et al., 2012; Wang et al., 2012) disponible en internet (<http://bioinfo.bjmu.edu.cn/huac/>) analizamos los posibles sitios de acetilación de la proteína ppGalNAc-T3.

3.14 Generación de mutantes: Mutagénesis sitio dirigido

En base a los resultados del programa ASEB, se generaron mutantes sitio específico en la lisina de la posición 626 en el dominio lectina de la enzima ppGalNAc-T3. Como estrategia para estudiar la acetilación de un residuo lisina específico se sustituyó lisina por glutamina, que es conocido por comportarse como un auténtico mimético de acetilación, y por aminoácidos adicionales que no pueden ser acetilados como arginina (pero mimetiza la estructura de lisina manteniendo la carga positiva) y alanina (con carga neutra) (Masumoto et al., 2005). En la Figura 19 se pueden visualizar las cadenas laterales de lisina y demás aminoácidos utilizados para estudiar esta mutación puntual.

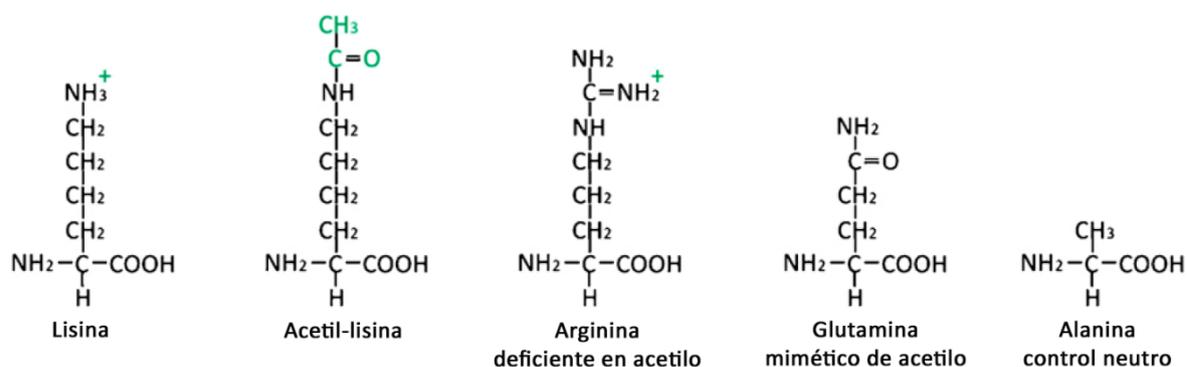


Figura 19: Estructuras de lisina y aminoácidos relacionados

Se muestran las estructuras de lisina, aminoácido susceptible de ser acetilado, su forma acetilada (acetil-lisina), aminoácidos utilizados en experimentos de mutagénesis dirigida para introducir una acetilación artificial (glutamina) y controles no acetilables como arginina y alanina.

Para generar estas mutantes se empleó el kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene; Germany) usando como molde el vector pAcGP67-His-ppGalNAc-T3 (Bennett et al., 1996) y los siguientes cebadores (TAG Copenhagen A/S, Dinamarca):

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados en la generación de las mutantes de ppGalNAc-T3
En color rojo se indica el sitio donde se produce la mutación puntual, subrayado el/los nucleótido/s mutado/s.

Nombre	Secuencia
K626Q	T3K626QF ⁴ : 5'CATCAGATCCACTCCAA CA ATGGATACTTAGCCAA'3
	T3K626QR ⁵ : 5'TTGGCTAAGTATCCATTGTTGGAGTGGATCTGATG'3
K626R	T3K626RF: 5'CATCAGATCCACTCCAA AG ATGGATACTTAGCCAA'3
	T3K626RR: 5'TTGGCTAAGTATCCATCTTTGGAGTGGATCTGATG'3
K626A	T3K626AF: 5'CATCAGATCCACTCCAA GC ATGGATACTTAGCCAA'3
	T3K626AR: 5'TTGGCTAAGTATCCATGCTTGGAGTGGATCTGATG'3

Para la reacción de PCR se utiliza polimerasa PFU (Promega) comenzando con un Hot Start de 30 seg a 95°C seguido de 45 seg a 95°C para el evento de desnaturalización, 60 seg a 55°C para hibridación y 15 min a 68°C de elongación. El ciclo se repite trece (13) veces y culmina con una elongación final de 20 min a 68°C. Confirmada la mutación por secuenciamiento del DNA, se amplificó el vector transformando bacterias X-Mega utilizando estreptomycin como antibiótico de selección. La purificación plasmídica se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit NucleoBond® Xtra MIDI EF (MACHEREY-NAGEL, Alemania).

3.15 Expresión y purificación de las mutantes ppGalNAc-T3K626

A partir de los vectores plasmídicos conteniendo las mutaciones T3K626Q, T3K626R, T3K626A se siguieron las instrucciones del kit de transfección BaculoGold (BD Biosciences) para la producción de los virus recombinantes. Posteriormente, se continuó con la expresión y purificación de la enzima salvaje y las tres enzimas mutantes. Durante estas etapas se procedió según lo detallado en los puntos en 3.3.2 y 3.3.3.

⁴ F: Forward (sentido)

⁵ R: Reverse (antisentido) hace referencia a la dirección de la secuencia del oligonucleótido según el sentido de la hebra de ADN.

3.16 Ensayos de interacción directa de ppGalNAc-T3s

Placas multiorificios de poliestireno (Corning Costar) fueron sensibilizadas con el glicopéptido MUC1- α GalNAc en buffer carbonato (pH 8,3) durante toda la noche a 4°C, lavadas con PBS, bloqueadas con Tween-20 0,1% en PBS por 1 h a TA y lavadas nuevamente con PBS. Diferentes concentraciones de ppGalNAc-T3 o sus mutantes (K626Q y K626A) fueron ofrecidas a la placa incubándose durante 2 horas a TA. Luego, los pocillos fueron lavados con PBS e incubados con anti-ppGalNAc-T3 (anti-T3) humano (1:2000) (Sigma-Aldrich) diluído en PBS Tween-20 0,05% durante 1 h a TA y nuevamente, lavados con PBS. Se ofreció a los pocillos el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (de origen caprino) conjugado a HRP (1:1000) (Abcam) diluído en PBS Tween-20 0,05% durante 1 h a TA y se lavaron con PBS. El revelado colorimétrico y la lectura de absorbancias fueron realizados como se describen en 3.4.2. El procedimiento fue adaptado de (Zlocowski et al., 2013).

3.17 Ensayos de interacción de ppGalNAc-T3s con sustratos glico/peptídicos en presencia de carbohidratos

Placas multiorificios de poliestireno fueron sensibilizadas con el glicopéptido MUC1- α GalNAc, su correspondiente péptido MUC1 (de 60 aminoácidos) y MUC2. A continuación, se procedió de la misma forma que en el punto anterior excepto que ppGalNAc-T3 o sus mutantes (K626Q y K626A) (1 μ g/ml) fueron pre-incubadas con diferentes carbohidratos durante 1 h a TA antes de ser ofrecidas a los pocillos.

3.18 Análisis Estadístico

Las medias fueron comparadas mediante un test t no apareado utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00. Las barras de error en las figuras representan los desvíos estándar de los replicados. La significancia estadística de las diferencias entre las medias se indican como *** (P<0.001), ** (P<0.01), * (P<0.05), o ns (no significativa).

4. RESULTADOS

4.1 Roles funcionales de dominios lectina de ppGalNAc-Ts en el inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc

4.1.1 Expresión y purificación de glicosiltransferasas y dominios lectina

Las enzimas solubles de origen humano ppGalNAc-T2 (T2) y ppGalNAc-T3 (T3) y los dominios lectina de ppGalNAc-T2, T3 y T4 (denominados a partir de aquí como T2lec, T3lec y T4lec), como también, la enzima C1GalT de *Drosophila melanogaster* fueron expresados en células de insectos Sf9 y purificados mediante cromatografía de afinidad. El grado de pureza de las proteínas fue evaluado mediante geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) teñidos con Azul Brillante de Coomassie para apreciar proteínas totales. La Figura 20 muestra que la principal banda proteica obtenida en cada proceso de purificación coincidió con el peso molecular esperado de la proteína recombinante que se estaba expresando.

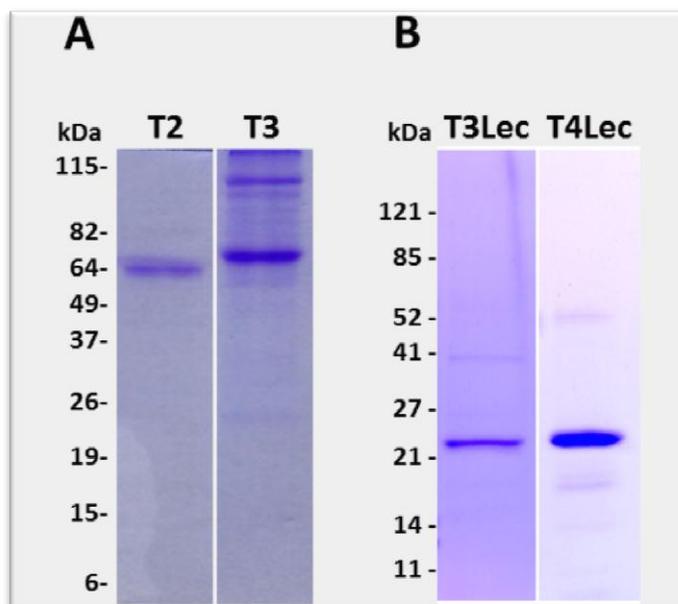


Figura 20: Análisis electroforético de la purificación de proteínas recombinantes PAGE-SDS al 10% teñido con Azul Brillante de Coomassie en el cual se muestra el grado de pureza de las enzimas purificadas en A) ppGalNAc-T2 (T2) y ppGalNAc-T3 (T3) y en B) dominios lectina de ppGalNAc-T3 (T3lec) y ppGalNAc-T4 (T4lec).

4.1.2 Efecto de los dominios lectina sobre la actividad catalítica de ppGalNAc-T2

En primera instancia, se propuso estudiar el efecto de los dominios lectina de ppGalNAc-Ts sobre la actividad catalítica de enzimas que intervienen en el primer paso de la glicosilación de tipo O-GalNAc. Para esto, se analizó la actividad enzimática de ppGalNAc-transferasas utilizando UDP-GalNAc como azúcar donador y péptidos derivados de mucinas como sustratos aceptores. Se evaluó la actividad catalítica de la isoforma ppGalNAc-T2

purificada en presencia de T3lec y T4lec a través de dos metodologías diferentes: espectrometría de masa por MALDI-TOF y ensayos de actividad con revelado colorimétrico.

Mediante espectrometría de masas se evaluó la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 con el péptido MUC1 como sustrato aceptor, en presencia y ausencia de los dominios lectina. Esta técnica permite determinar el número de residuos GalNAc incorporados por péptido y la abundancia relativa de los distintos glicopéptidos generados al cabo de la reacción. Como se aprecia en la Figura 21, en la condición en donde se analiza el péptido MUC1 no glicosilado solo (sin agregado de enzima o dominio lectina), se observa un único pico que corresponde al peso molecular del péptido. Cuando el péptido MUC1 se incubaba con la enzima ppGalNAc-T2 (T2) se puede apreciar la generación de moléculas con un corrimiento espectrométrico hacia estructuras de mayor peso molecular, lo que evidencia la presencia de péptidos glicosilados. Los glicopéptidos derivados de MUC1 se nombrarán como MUC1-1GalNAc, MUC1-2GalNAc y MUC1-3GalNAc conteniendo 1, 2 y 3 moléculas de GalNAc respectivamente. La enzima T2 incorporó de 1-3 moléculas de GalNAc en el péptido MUC1 en ausencia de T3lec o T4lec. Sin embargo, la abundancia relativa de los distintos glicopéptidos generados durante la reacción enzimática se modificó tras incorporar los dominios lectina a la reacción. Es decir, en presencia de estos dominios lectina, el glicopéptido MUC1-3GalNAc está ausente y MUC1-2GalNAc se redujo a 10-20% y a su vez, se incrementó levemente la proporción del péptido no glicosilado. Estos resultados, que muestran una caída en la abundancia de los glicopéptidos con mayor número de residuos GalNAc y un incremento del péptido no glicosilado, indican que ambos dominios lectina ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad catalítica de T2.

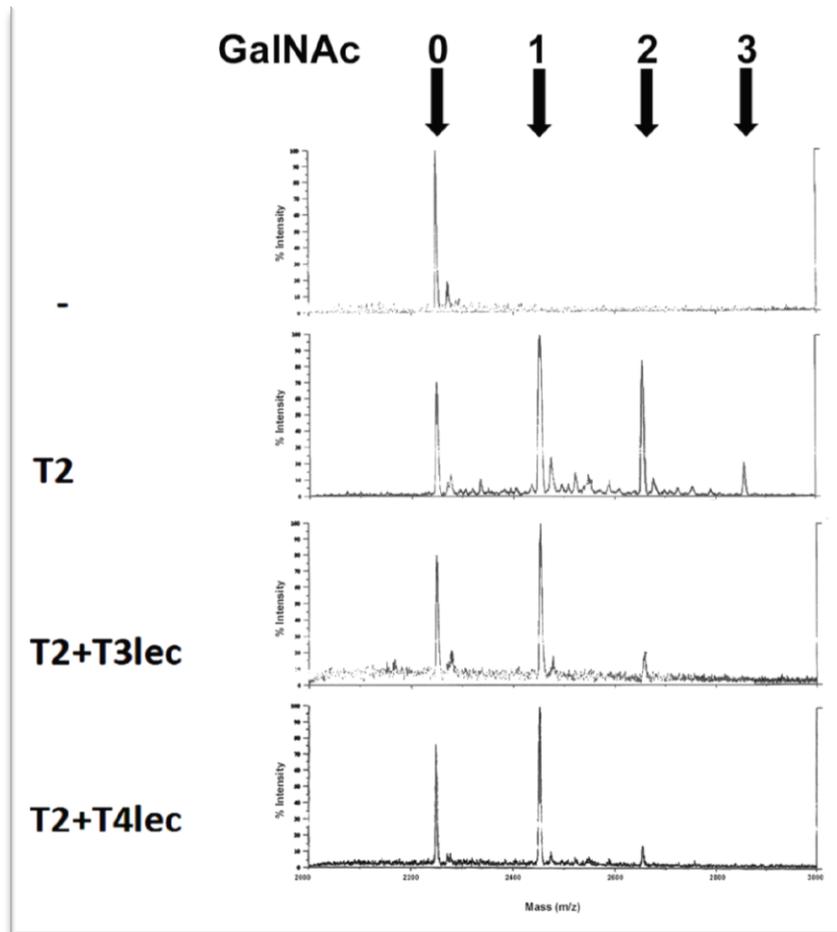


Figura 21: Análisis de espectrometría de masas para examinar los efectos de los dominios lectina sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 (T2)

Los productos de la glicosilación de MUC1 fueron analizados mediante MALDI-TOF. Las flechas indican el número de moléculas de GalNAc incorporadas al péptido aceptor en cada condición: (de arriba hacia abajo) ausencia de T2 (control), presencia de T2, presencia de T2 con agregado de T3lec o T4lec.

La segunda técnica utilizada para los estudios de actividad enzimática permitió realizar análisis cinéticos de la enzima T2 y también, la caracterización del comportamiento de los dominios lectina frente a T2. En estos ensayos los sustratos peptídicos MUC1 y MUC2 fueron inmovilizados a la superficie de una placa multiorificios y se analizó si la presencia de T3lec o T4lec afectaba la actividad GalNAc-transferasa de la enzima T2. El producto de la reacción fue detectado mediante revelado colorimétrico utilizando la lectina HPA que reconoce terminales α GalNAc.

A través de las curvas de cinética enzimática (Figura 22.1 y Figura 22.3) se puede apreciar claramente el efecto inhibitorio de ambos dominios (T3lec y T4lec) sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 usando como sustrato MUC1. Un ajuste no lineal de las curvas se llevó a cabo de acuerdo al modelo de Henri-Michaelis-Menten. A partir de dichas curvas, se calcularon y graficaron los valores de las dobles inversas ($1/V$ versus

$1/[MUC1]$) (Figura 22.2 y Figura 22.4) con el objetivo de caracterizar el tipo de inhibición producido por cada dominio lectina a través del ajuste lineal de los datos utilizando el programa GraphPad. Haciendo este mismo análisis se evaluó el efecto de T3lec y T4lec empleando el péptido MUC2. En las Figura 23.1 y 23.3 se observan los resultados de cinética enzimática los cuales fueron similares a los observados anteriormente para el péptido MUC1, ratificando el efecto inhibitorio causado por los dominios lectina. A su vez, en las Figura 23.2 y Figura 23.4 se muestran las gráficas de dobles inversas (Lineweaver-Burk) para MUC2.

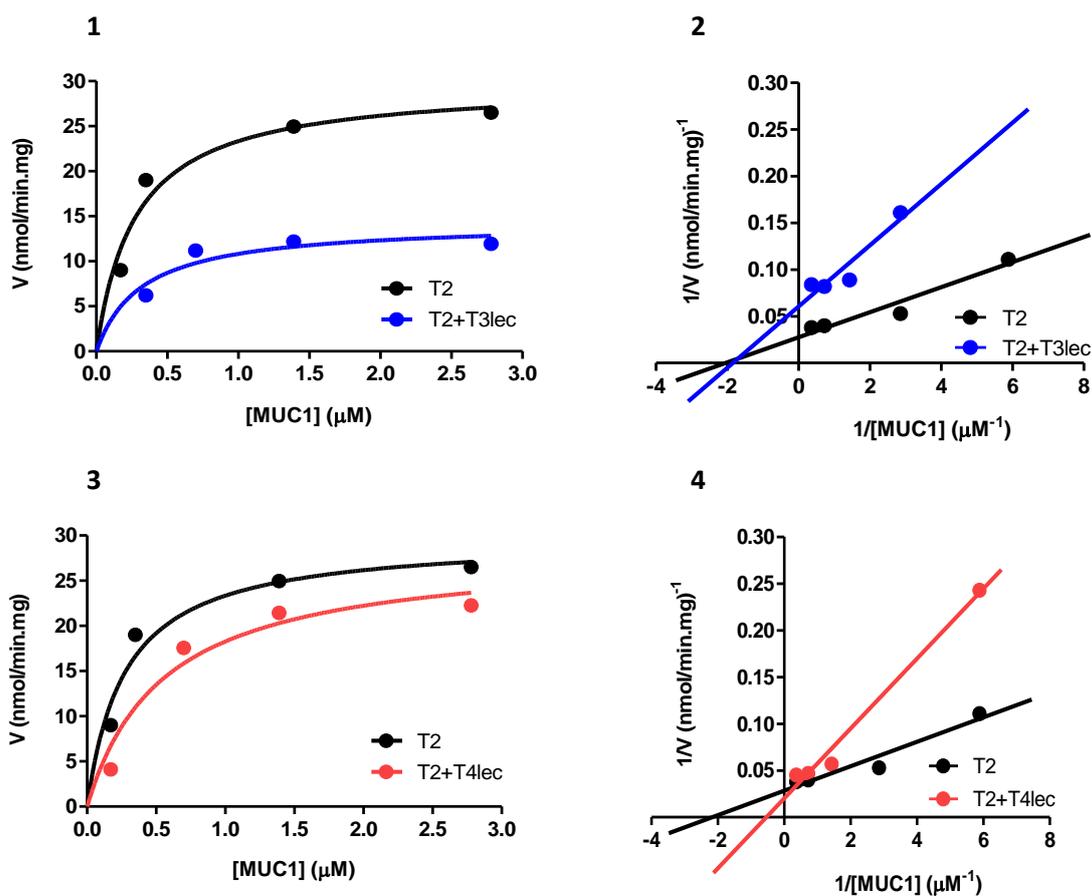


Figura 22: Curvas de cinética de la actividad de ppGalNAc-T2 en presencia de dominios lectina frente a MUC1

Curvas de cinética de la reacción de glicosilación del péptido MUC1 en condiciones de velocidad inicial con la enzima ppGalNAc-T2 (T2) en ausencia de dominio lectina (círculos negros) y en presencia de T3lec (círculos azules) (1) y T4lec (círculos rojos) (3). El ajuste no lineal arrojó R^2 : 0,94 (negro), 0,81 (azul) y 0,94 (rojo). Gráficas de dobles recíprocas de la actividad enzimática en ausencia de lectina (negro), en presencia de 0,16 μM de T3lec (2) o T4lec (4) indican el tipo de inhibición sobre ppGalNAc-T2. El ajuste de las curvas mediante regresión lineal arrojó R^2 : 0,94 (negro), 0,88 (azul) y 0,99 (rojo).

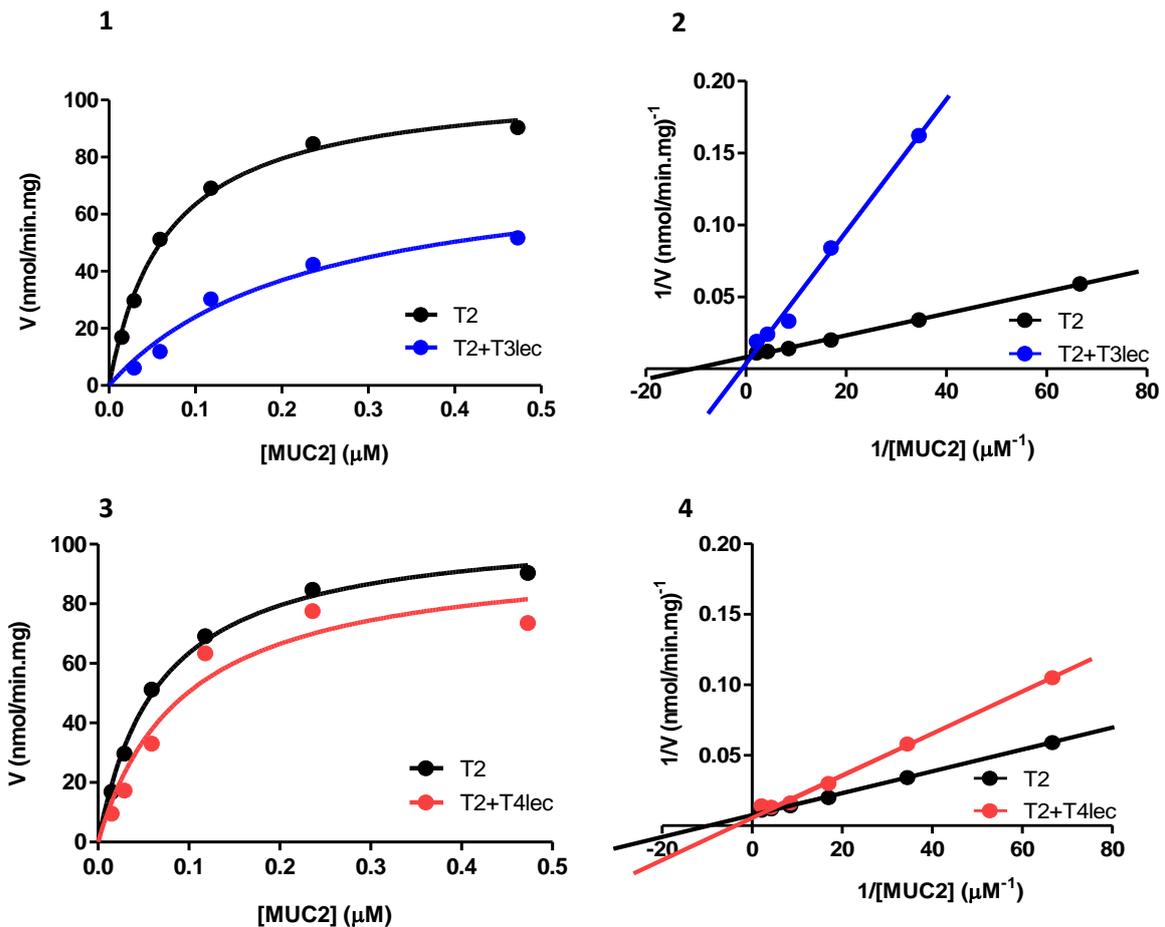


Figura 23: Curvas de cinética de la actividad de ppGalNAc-T2 en presencia de dominios lectina frente a MUC2. Curvas de cinética de la reacción de glicosilación del péptido MUC2 en condiciones de velocidad inicial con la enzima ppGalNAc-T2 (T2) en ausencia de dominio lectina (círculos negros) y en presencia de T3lec (círculos azules) (1) y T4lec (círculos rojos) (3). El ajuste no lineal arrojó R^2 : 0,99 (negro), 0,97 (azul) y 0,94 (rojo). Gráficas de dobles recíprocos de la actividad enzimática en ausencia de lectina (negro), en presencia de 0,16 μM de T3lec (2) o T4lec (4) indican el tipo de inhibición sobre ppGalNAc-T2. El ajuste de las curvas mediante regresión lineal arrojó R^2 : 0,99 para las tres condiciones evaluadas.

Utilizando el programa GraphPad se calcularon los valores de K_m (Constante de Michaelis-Menten) y V_{max} (Velocidad máxima) para cada condición, es decir, en ausencia de dominio lectina y en presencia de dominio lectina T3 o T4, como se muestra en las siguientes tablas. Al analizar los cambios en los parámetros cinéticos se pone de manifiesto el efecto inhibitorio observado gráficamente. Por ejemplo, en presencia de MUC1 (Tabla 4), T3lec produjo una notable disminución de V_{max} y un leve aumento de K_m ; mientras que T4lec generó un incremento de K_m . Cuando el aceptor peptídico fue MUC2 (Tabla 5), se destaca fundamentalmente un importante aumento de 3 veces el K_m acompañado de una disminución moderada de V_{max} en presencia de T3lec. Respecto a T4lec, resultados similares a los obtenidos con el péptido MUC1 fueron observados en donde primó un aumento leve de K_m .

Tabla 4: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T2 en ausencia y en presencia de T3lec y T4lec usando el péptido MUC1 como sustrato

Parámetros cinéticos*	MUC1 ppGalNAc-T2	MUC1 ppGalNAc-T2 + T3lec	MUC1 ppGalNAc-T2 +T4lec
V_{max} (nmol/min.mg)	29,8 ± 2,8*	14,3 ± 2,1	28,4 ± 4,5
K_m (uM)	0,28 ± 0,10	0,32 ± 0,19	0,55 ± 0,28

* Se muestran los valores con su respectivo error estándar

Tabla 5: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T2 en ausencia y en presencia de T3lec y T4lec usando el péptido MUC2 como sustrato

Parámetros cinéticos*	MUC2 ppGalNAc-T2	MUC2 ppGalNAc-T2 + T3lec	MUC2 ppGalNAc-T2 +T4lec
V_{max} (nmol/min.mg)	106,2 ± 3,4	79 ± 13	98 ± 13
K_m (uM)	0,067 ± 0,010	0,231 ± 0,080	0,094 ± 0,035

* Se muestran los valores con su respectivo error estándar

La modificación de los parámetros cinéticos junto a la información gráfica de las dobles inversas permitieron clasificar el tipo de inhibición generada en cada condición. Las constantes de inhibición (K_i o K'_i [prima], según fuera el caso) de cada dominio lectina con la enzima ppGalNAc-T2 fueron calculadas para MUC1 y MUC2 (Tabla 6). Por ejemplo, mientras T3lec se comporta como un inhibidor **no competitivo** cuando el aceptor peptídico es MUC1, T4lec muestra un comportamiento característico de un inhibidor **competitivo**. Por lo que, frente a un mismo péptido aceptor el tipo de inhibición ejercida sobre la enzima T2 es diferente según el dominio lectina que participe. Por otro lado, al analizar el efecto de T3lec y T4lec con el péptido MUC2 vemos que ambos se comportan como inhibidores **competitivos**.

Tabla 6: Constantes de inhibición de T3lec y T4lec sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 con los sustratos peptídicos MUC1 y MUC2

Parámetros inhibitorios*	MUC1		MUC2	
	ppGalNAc-T2 + T3lec	ppGalNAc-T2 +T4lec	ppGalNAc-T2 + T3lec	ppGalNAc-T2 +T4lec
Tipo de Inhibición	No competitiva	Competitiva	Competitiva	Competitiva
K_i (uM)	-	0,166 ± 0,086	0,070 ± 0,024	0,41 ± 0,15
K'_i (uM)	0,148 ± 0,029	-	-	-

* Se muestran los valores con su respectivo error estándar

4.1.3 Efecto de los dominios lectina sobre la actividad catalítica de ppGalNAc-T3

Además, se buscó ampliar el estudio de este efecto inhibitorio producido por los dominios lectina a otras isoformas de la familia de ppGalNAc-Ts. Por esto, se analizó la actividad de la enzima ppGalNAc-T3 (T3) mediante espectrometría de masas utilizando los péptidos MUC1 y MUC5B en ausencia y presencia de T3lec y T4lec. En la Figura 24.1 se muestran los espectros de MALDI-TOF correspondiente al péptido MUC1. Comenzando de arriba hacia abajo, en el primer espectro, en ausencia de enzima T3, se observa la detección de un único pico cuyo peso molecular coincide con el del péptido (no glicosilado). En el espectro siguiente, en presencia de enzima T3, se observa que ésta es capaz de incorporar 1-3 residuos de GalNAc siendo la especie glicopeptídica con 2 GalNAc la más abundante. Es decir, cada nuevo pico que aparece en el espectro significa un aumento del tamaño de los glicopéptidos que coincide con el peso molecular de una molécula de GalNAc. Luego, se aprecia que la presencia T3lec o T4lec en la reacción enzimática produce una reducción relativa en el grado de glicosilación de los péptidos, similar a lo ocurrido para la enzima T2 en presencia de T3lec y T4lec. Nuevamente, se observa un incremento en la proporción del péptido no glicosilado respecto a las especies glicosiladas. Asimismo, en la Figura 24.2, empleando MUC5B como sustrato aceptor, también se puede observar que la presencia de ambos dominios lectina produjo un efecto inhibitorio sobre la glicosilación; provocando que la mayor parte del péptido no se encuentre glicosilado.

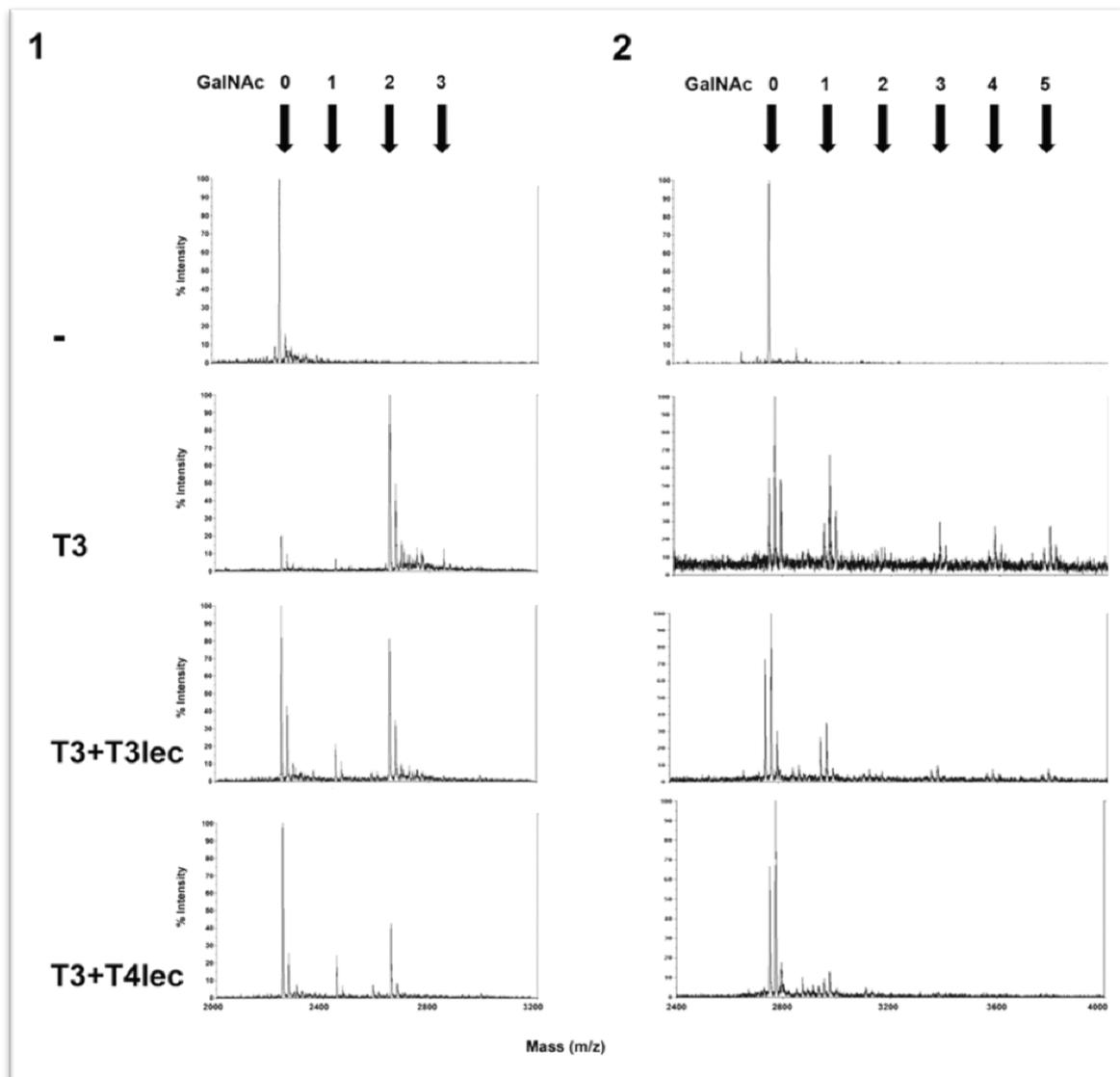


Figura 24: Análisis de espectrometría de masas para examinar los efectos de los dominios lectina sobre la actividad enzimática de ppGalNAc-T3 (T3) Productos de la glicosilación de MUC1 (1) y MUC5B (2) analizados mediante MALDI-TOF. Las flechas indican el número de moléculas de GalNAc incorporadas al péptido aceptor en cada condición: (de arriba hacia abajo) ausencia de T3 (control), presencia de T3, presencia de T3 con agregado de T3lec o T4lec.

Por otro lado, también se realizaron estudios cinéticos con la enzima T3 en presencia de T3lec con los sustratos peptídicos MUC1 y MUC2. En la Figura 25 se exponen las gráficas de cinética enzimática junto a las de dobles inversas para las distintas condiciones ensayadas. Como se puede apreciar, las gráficas revelan un efecto inhibitorio del dominio lectina T3 sobre la actividad de esta enzima ya sea con el péptido MUC1 como MUC2; obteniendo resultados similares a los encontrados para la isoforma T2.

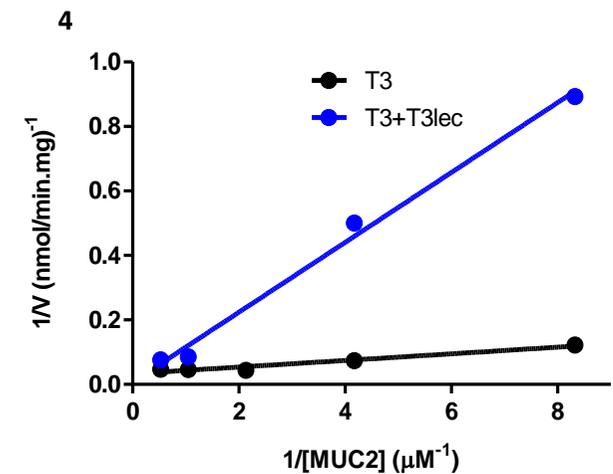
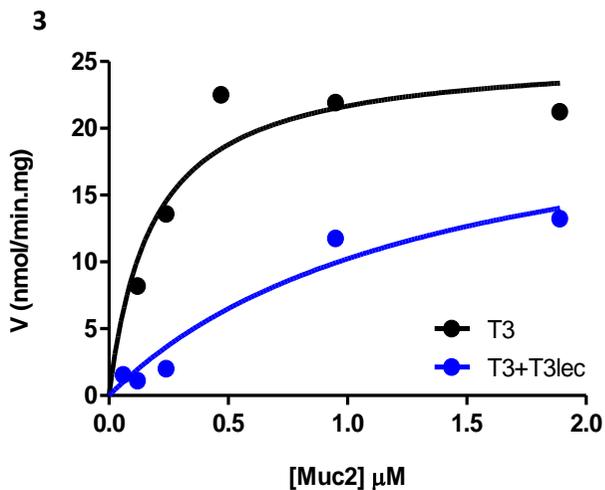
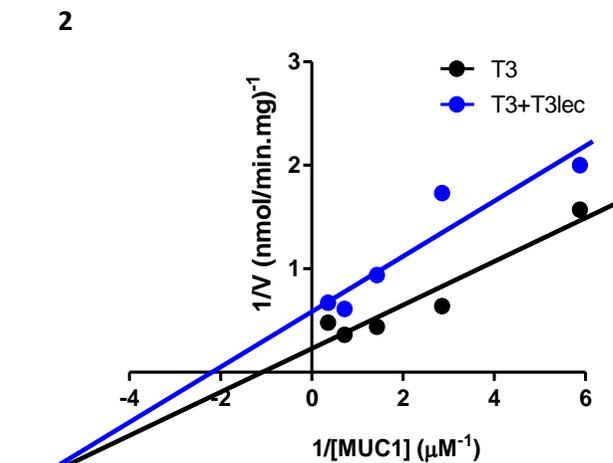
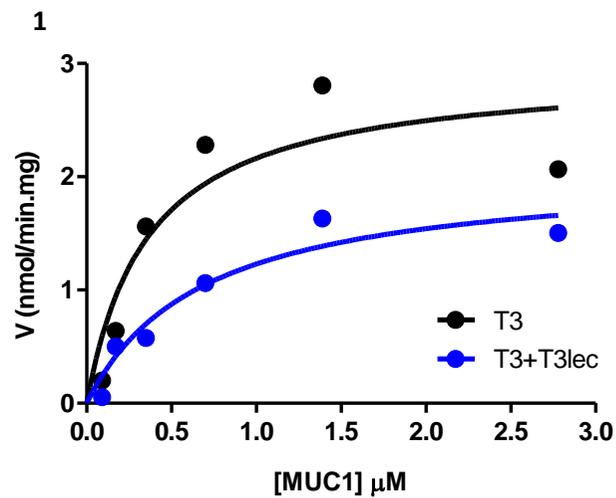


Figura 25: Curvas de cinética de la enzima ppGalNAc-T3 en presencia de dominios lectina frente a MUC1 y MUC2

Curvas de cinética de la reacción de glicosilación del péptido MUC1 (1) y MUC2 (3) en condiciones de velocidad inicial con la enzima ppGalNAc-T3 (T3) en ausencia de dominio lectina (círculos negros) y en presencia de T3lec (círculos azules). El ajuste no lineal arrojó (en Figura 25.1) R^2 : 0,82 (negro), 0,92 (azul) y (en Figura 25.3) R^2 : 0,84 (negro), 0,95 (azul). Gráficas de dobles recíprocas de la actividad enzimática en ausencia de lectina (negro), en presencia de 0,08 μM de T3lec (2) indican el tipo de inhibición sobre ppGalNAc-T2. El ajuste de las curvas mediante regresión lineal arrojó (en Figura 25.2) R^2 : 0,91 (negro), 0,88 (azul) y (en Figura 25.4) R^2 : 0,95 (negro), 0,99 (azul).

En las siguientes tablas se muestran cómo se modifican los valores de los parámetros cinéticos de ppGalNAc-T3 como consecuencia de la inhibición de T3lec. Analizando en primer lugar el efecto de T3lec con el péptido MUC1 (Tabla 7), se observa que tanto V_{max} como K_m están alteradas; disminuyendo, la primera y aumentando la segunda. En cambio, cuando se utiliza el péptido MUC2 (Tabla 8) el principal cambio se da en K_m aumentando cerca de 8 veces su valor en presencia de T3lec.

Tabla 7: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T3 en ausencia y en presencia de T3lec con el péptido MUC1

Parámetros cinéticos*	MUC1 ppGalNAc-T3	MUC1 ppGalNAc-T3 + T3lec
V_{max} (nmol/min.mg)	2,95 ± 0,58	2,07 ± 0,35
K_m (uM)	0,36 ± 0,23	0,68 ± 0,30

*Se muestran los valores con su respectivo error estándar.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de ppGalNAc-T3 en ausencia y en presencia de T3lec con el péptido MUC2

Parámetros cinéticos*	MUC2 ppGalNAc-T3	MUC2 ppGalNAc-T3 + T3lec
V_{max} (nmol/min.mg)	25,7 ± 3,3	24,1 ± 9,1
K_m (uM)	0,183 ± 0,088	1,4 ± 1,0

*Se muestran los valores con su respectivo error estándar.

Los parámetros cinéticos calculados para la enzima ppGalNAc-T3 en presencia de T3lec como así también las gráficas de doble inversas indican que este dominio lectina se comporta como un inhibidor **mixto** con el péptido MUC1 y como un inhibidor **competitivo** con MUC2. La Tabla 9 muestra los valores de K_i o K'_i obtenidos en cada situación.

El conjunto de los resultados generados a partir del análisis de las enzimas T2 y T3 revela que el tipo de inhibición se encuentra condicionado por factores como el péptido aceptor, la enzima (isoforma de ppGalNAc-T) y el dominio lectina interviniente.

Tabla 9: Constantes de inhibición de T3lec en la actividad enzimática de ppGalNAc-T3 con los sustratos peptídicos MUC1 y MUC2

Parámetros inhibitorios*	MUC1	MUC2
	ppGalNAc-T3 + T3lec	ppGalNAc-T3 + T3lec
Tipo de Inhibición	Mixta	Competitiva
Ki (uM)	0,047 ± 0,028	0,012 ± 0,010
Ki' (uM)	0,19 ± 0,10	-

*Se muestran los valores con su respectivo error estándar.

4.1.4 Ensayo de actividad GalNAc-transferasa en un modelo celular

En el siguiente ensayo se pretende evaluar la influencia de los dominios lectina de ppGalNAc-Ts sobre la actividad GalNAc-transferasa en un modelo celular como la línea CHO IdID. A fin de comparar con los resultados obtenidos *in vitro*, en este modelo experimental se emplearán vectores de expresión que codifican para las enzimas ppGalNAc-T3 y su mutante D277H, inactiva catalíticamente, lo cual permite evaluar el efecto de su dominio lectina.

En primer lugar, se optimizó el sistema de detección de terminales α GalNAc en las células CHO IdID mediante citometría de flujo utilizando la lectina VVL conjugada a biotina (VVL-biotina). Se analizó el grado de expresión de terminales α GalNAc en esta línea celular cultivada en ausencia y en presencia del azúcar GalNAc (1,5 mM). Por lo tanto, al adicionar dicho azúcar efectivamente se pudo observar un corrimiento del histograma y un aumento de la mediana de la intensidad de fluorescencia (Figura 26). Esto significa que la adición de GalNAc a las células en cultivo repercute en un mayor grado de GalNAc glicosilación cuyos residuos quedan expuestos como estructuras terminales, facilitando su detección. Esto se debe a la deficiencia del azúcar nucleótido UDP-Gal en las células CHO IdID, necesario para la elongación de las cadenas de O-glicanos.

A continuación, las células CHO IdID fueron transfectadas y la sobreexpresión de la enzima ppGalNAc-T3 (T3) y su mutante ppGalNAc-T3^{D277H} (T3^{D277H}) fue analizada mediante western blot (Figura 27). También, esta figura muestra que no se encontraron niveles detectables de T3 endógena cuando se transfectó con el vector vacío. Se controló si la sobreexpresión de dichas enzimas afectaba el nivel de expresión de otra isoforma presente en células CHO IdID como ppGalNAc-T2, evidenciándose que no se modifica.

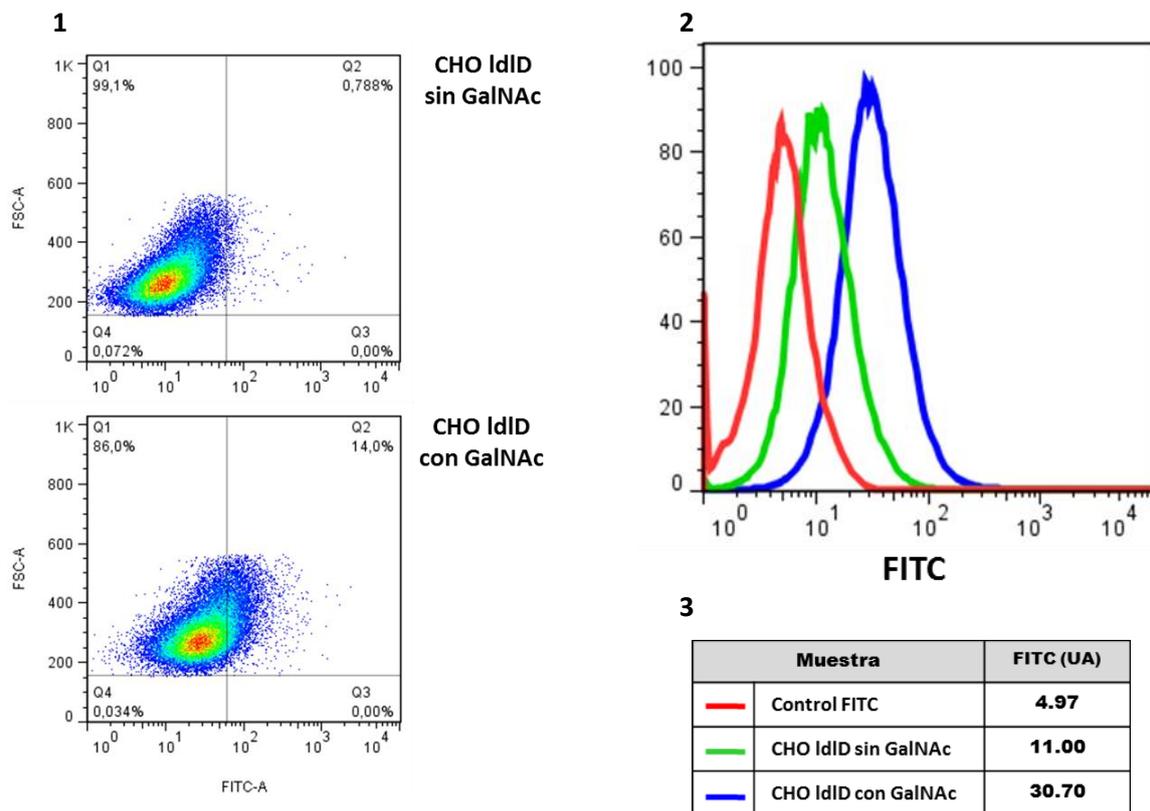


Figura 26: Respuesta de las células CHO IdID frente al agregado de GalNAc analizada por citometría de flujo (1) Gráficos donde se muestra el corrimiento de la población de células a valores más elevados de fluorescencia como consecuencia del agregado de GalNAc. Los niveles de residuos α GalNAc terminales en las células fueron detectados con VVL-biotina y estreptavidina-FITC. La intensidad de fluorescencia de FITC de las distintas condiciones ensayadas (en rojo: control con el fluoróforo estreptavidina-FITC sin agregado de VVL-biotina, en verde: sin agregado de GalNAc, en azul: con agregado de GalNAc) se muestra en el histograma (2) y la mediana en la tabla (3) expresada en unidades arbitrarias.

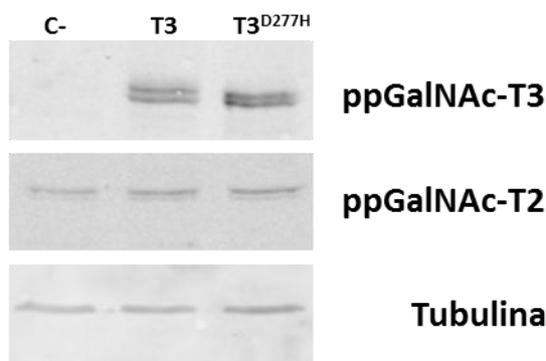


Figura 27: Sobreexpresión de ppGalNAc-T3 y su mutante en CHO IdID. Sobreexpresión de las proteínas T3 y su mutante T3D277H en células CHO IdID, (C-: vector vacío). Los lisados celulares fueron analizados mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-T3, anti-T2 y anti-Tubulina, éste último como control de la carga proteica.

A su vez, las células CHO IdID transfectadas también fueron evaluadas mediante citometría de flujo. La población de células analizada para cada condición fue dividida en población transfectada y no transfectada. Las células que sobreexpresan ppGalNAc-T3s se distinguieron por presentar valores de intensidad de fluorescencia de Alexa-633 (señal producida por la detección de T3 o T3^{D277H} mediante el uso de los anticuerpos anti-T3 y anti-IgG conjugado a Alexa-633) más elevados en comparación al vector vacío, como se observa en la Figura 28.

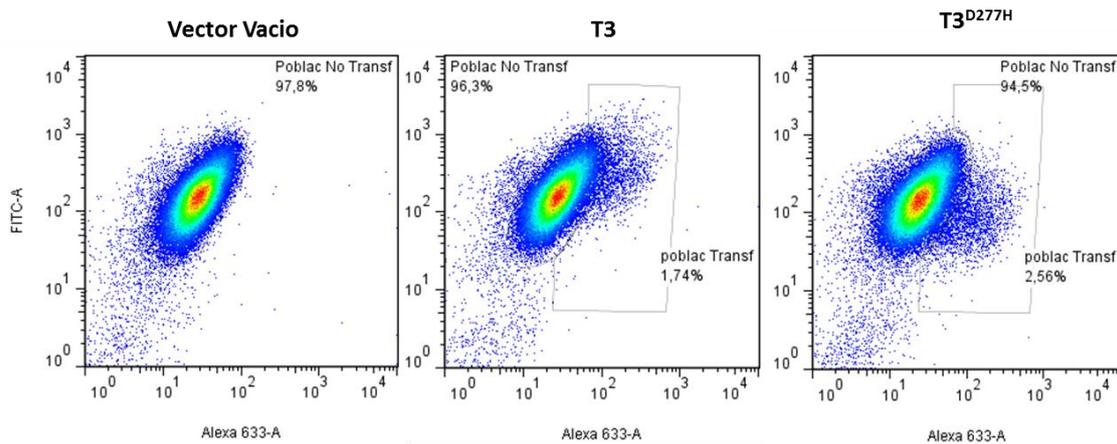


Figura 28: Análisis de la transfección de las células CHO IdID mediante citometría de flujo. Población de células teñidas con los fluoróforos FITC (expresión de residuos GalNAc) y Alexa-633 (sobreexpresión de ppGalNAc-T3s) para las distintas condiciones de transfección evaluadas: vector vacío, T3 y su mutante T3^{D277H}. Las células transfectadas se muestran dentro del área del polígono. La población no transfectada se muestra dentro un área en forma de óvalo.

En base a este criterio, fueron seleccionadas para cuantificar los niveles de GalNAc incorporados a través de la intensidad de fluorescencia de FITC expresándose en unidades arbitrarias. En la Figura 29 se observa que aquellas células que sobreexpresaban T3 mostraron niveles de residuos terminales de GalNAc 2 veces superior a los del vector

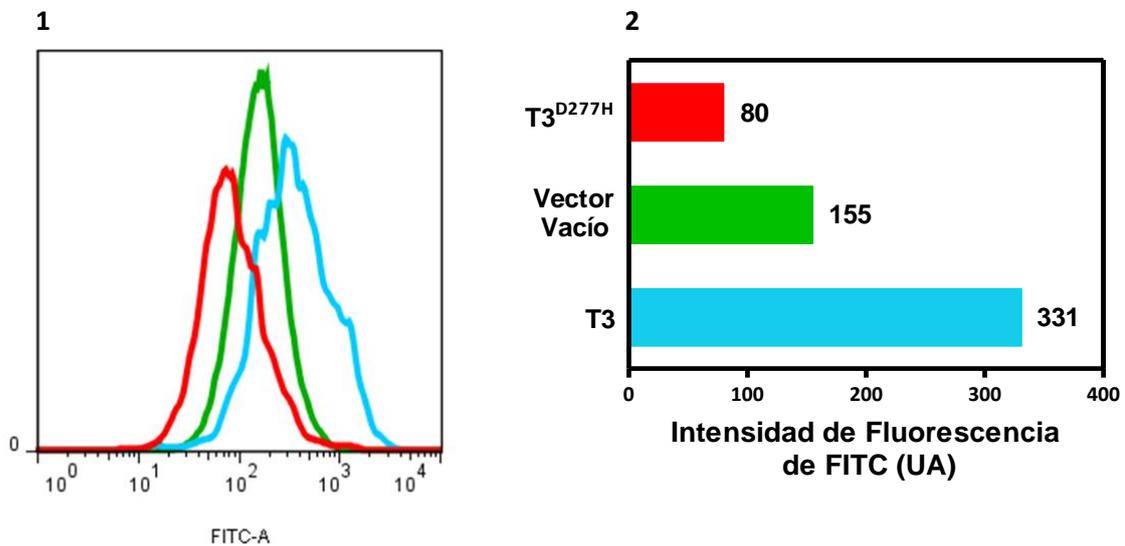


Figura 29: Niveles de expresión de residuos terminales GalNAc en células CHO IdID transfectadas analizados por citometría de flujo

Los niveles de FITC detectados en las células transfectadas corresponden a la señal generada por la detección de residuos GalNAc utilizando la lectina VVL-biotinilada y estreptavidina-FITC. Las medianas de las intensidades de fluorescencias de FITC para cada condición ensayada (en rojo: mutante T3^{D277H}, en verde: vector vacío, en celeste: T3) se muestran en el histograma (1) y en el gráfico de barras (2) expresadas en unidades arbitrarias. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

vacío. Mientras que, las células que sobreexpresan T3^{D277H}, exhibieron la mitad del nivel de expresión de GalNAc respecto al vector vacío. Aquí se puede apreciar que esta mutante (T3^{D277H}) no sólo fue incapaz de transferir GalNAc sino que además, inhibió la glicosilación de otras ppGalNAc-transferases presentes en las células CHO IdID. Estos resultados son similares a los obtenidos en los ensayos *in vitro*.

4.1.5 Interacciones de dominios lectina con ppGalNAc-T2

En vistas del efecto inhibitorio observado sobre la actividad catalítica de ppGalNAc-Ts por parte de los dominios lectina, realizamos ensayos de interacción directa para caracterizar las interacciones entre estas moléculas.

T3lec mostró que es capaz de interactuar con la enzima ppGalNAc-T2, mientras que la unión de T3lec con T2lec no fue significativa (Figura 30.1). Además, la interacción de T3lec con ppGalNAc-T2 se vio incrementada en presencia de los sustratos de la enzima (UDP-GalNAc y MUC1, pero sin el cofactor Mn⁺⁺ para evitar que transcurra la reacción enzimática). Esto indica que el dominio catalítico de ppGalNAc-T2 está participando en la interacción con T3lec. Resultados similares se obtuvieron para T4lec (Figura 30.2). Por lo tanto, se puede concluir que ambos dominios lectina interactúan con el dominio catalítico de la enzima ppGalNAc-T2.

4.1.6 Las interacciones de T3lec y T4lec con ppGalNAc-T2 no están mediadas por glicanos

Con el objetivo de profundizar en la descripción de esta interacción se emplearon ensayos de competencia para indagar sobre la especificidad y la participación de glicanos en este reconocimiento.

La enzima ppGalNAc-T2, usada como competidor, inhibió la interacción de T3lec y T4lec cuando ppGalNAc-T2 se encontraba adsorbida al soporte. Cuando la proteína ASB fue utilizada como competidor, a modo de control, no tuvo un efecto inhibitorio; demostrando la especificidad de la interacción entre dominio lectina-ppGalNAc-T2 (Figura 30.3 y Figura 30.4).

Estos mismos ensayos de competencia se realizaron, usando en esta ocasión, distintos carbohidratos como potenciales inhibidores de esta interacción. Bzl- α -GalNAc y Me- α -GlcNAc no tuvieron un efecto inhibitorio en la unión de T3lec y T4lec a ppGalNAc-T2 (Figura 31.1 y Figura 31.2). En un ensayo similar, Bzl- α -GalNAc y Me- α -GlcNAc fueron evaluados como potenciales inhibidores de la interacción de T3lec y T4lec con la mucina dOSM que

presenta múltiples terminales GalNAc α -Ser/Thr (Figura 31.3 y Figura 31.4). En este caso, Bzl- α -GalNAc inhibió de manera significativa la interacción de ambos, T3lec (CI50⁶: 5 mM) y T4lec (CI50: 8 mM) con dOSM. Mientras, Me- α -GlcNAc no produjo tal efecto inhibitor. Dado que T3lec y T4lec reconocen residuos terminales GalNAc de glicoproteínas como también fue descrito por (Pedersen et al., 2011; Wandall et al., 2007; Yoshimura et al., 2012) y en virtud, de que Bzl- α -GalNAc no muestra efecto inhibitorio alguno en la interacción de T3lec y T4lec con ppGalNAc-T2, esto indica que no participan residuos glucídicos en la interacción dominio lectina-ppGalNAc-T2.

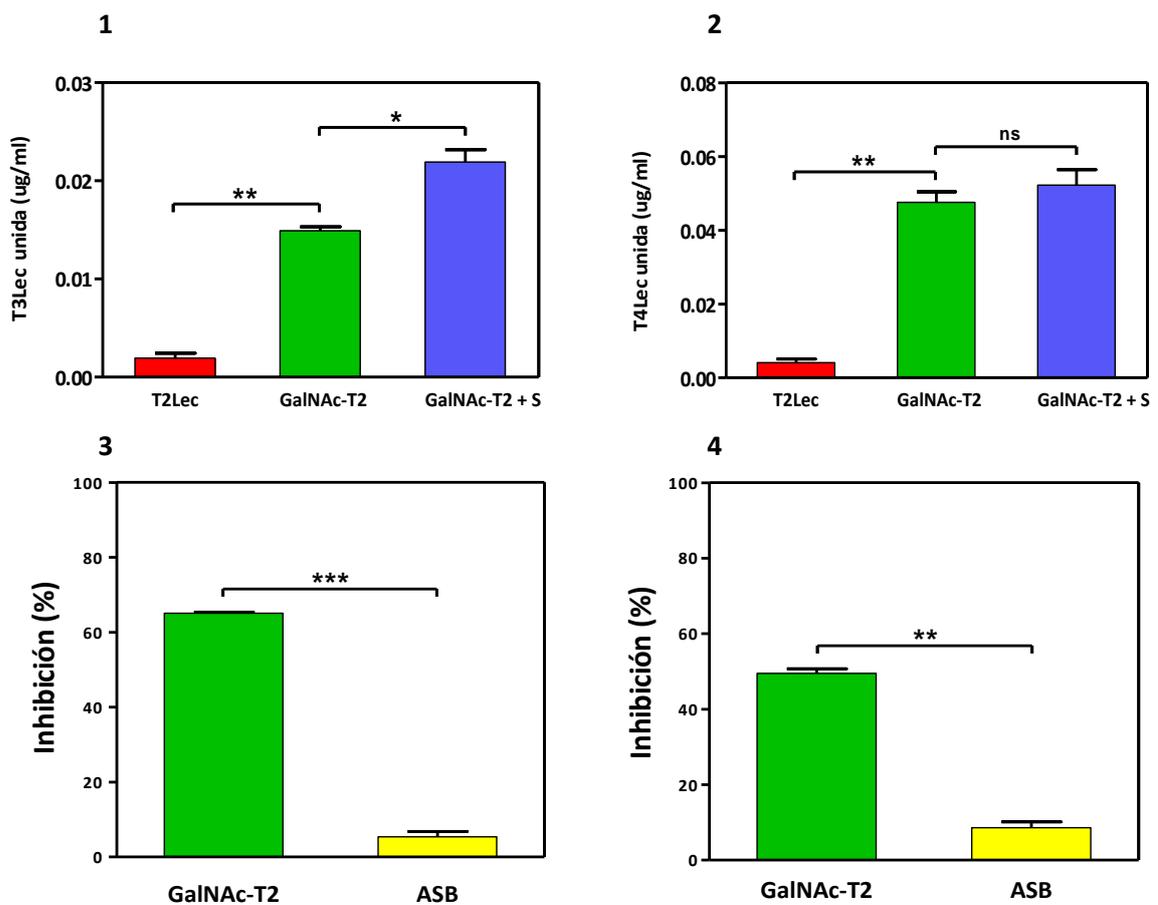


Figura 30: Interacción de los dominios lectina con la enzima ppGalNAc-T2
 Estudio de las interacciones entre los dominios lectina T3 (izquierda) y T4 (derecha) y ppGalNAc-T2. Ensayo de interacción directa con T2lec (rojo), ppGalNAc-T2 (verde) y ppGalNAc-T2 con la adición de sustratos (azul). La especificidad de interacción se evaluó a partir de ensayos de competencia usando a ppGalNAc-T2 (verde) o ASB (amarillo) como potenciales inhibidores.

⁶ CI50: concentración del inhibidor que redujo un 50% la interacción entre las moléculas estudiadas.

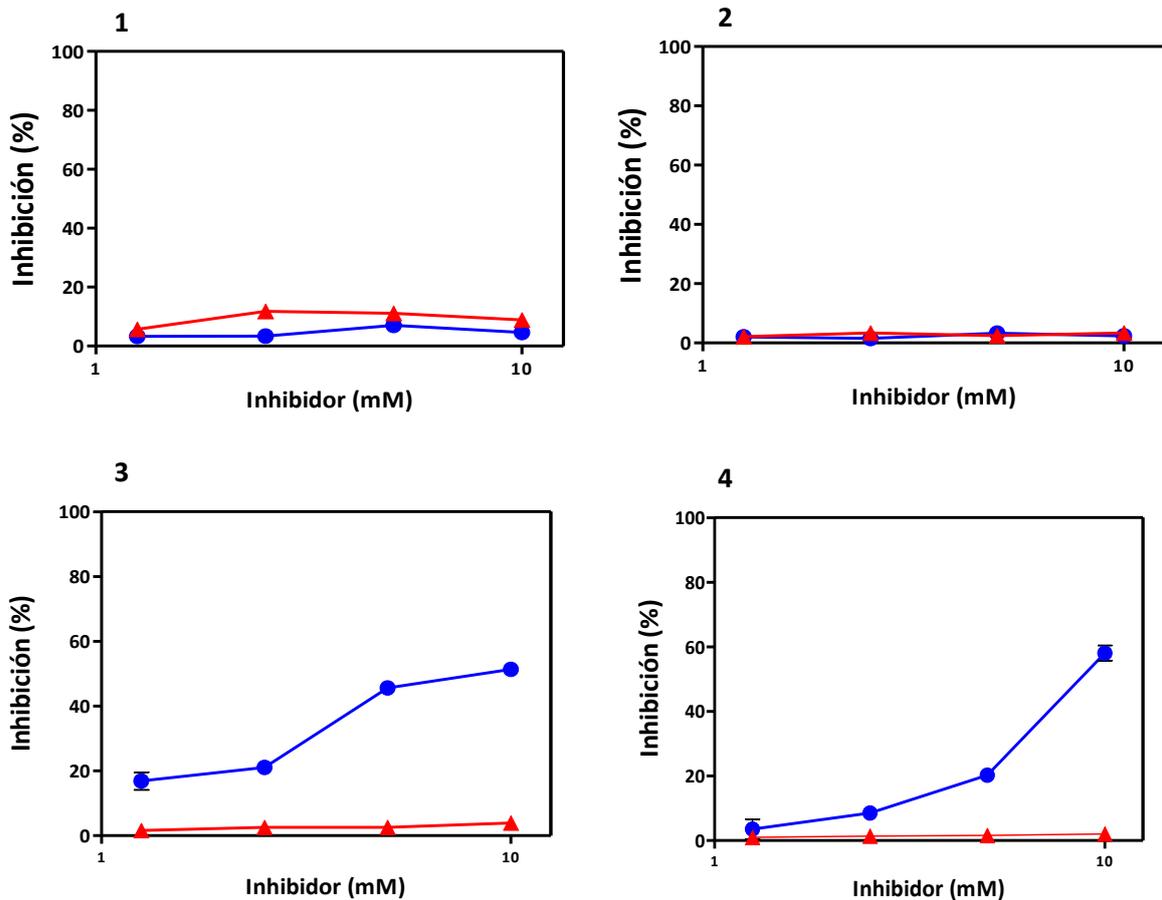


Figura 31: Relevancia de glicanos en la interacción entre dominios lectina y ppGalNAc-T2. Ensayos de competencia utilizando carbohidratos como potenciales inhibidores de la interacción T3lec (izquierda) y T4lec (derecha). Efecto de BzI- α -GalNAc (círculos azules) y Me- α -GlcNAc (triángulos rojos) en la interacción con pGalNAc-T2 (1-2) y con dOSM (3-4).

4.1.7 Efecto de los dominios lectina sobre la actividad Galactosiltransferasa de C1GalT

En este ensayo se buscó responder si los dominios lectina de ppGalNAc-Ts podían tener un efecto regulatorio sobre otras enzimas próximas físicamente en el Golgi. Por esto, evaluamos la influencia de dichos dominios lectina en el segundo paso de la glicosilación de tipo O-GalNAc; teniendo en cuenta que el producto de reacción de las enzimas ppGalNAc-Ts corresponde al sustrato de la enzima C1GalT. Esta última, cataliza la incorporación de galactosa para permitir que la cadena de oligosacáridos continúe elongándose.

La cinética enzimática de C1GalT fue estudiada en presencia y ausencia de dominios lectina de ppGalNAc-Ts. El efecto de T2lec, T3lec y T4lec sobre la actividad galactosiltransferasa (Gal-T) de C1GalT se muestra en la Figura 32. T3lec tuvo un efecto activador sobre la actividad enzimática. Sin embargo, T2lec y T4lec no produjeron ningún cambio significativo sobre la actividad Gal-T.

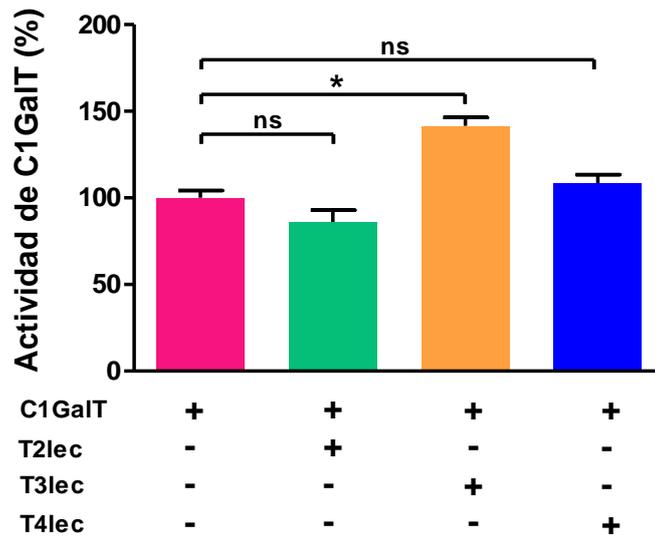


Figura 32: Actividad Gal-transferasa (Gal-T) en presencia de dominios lectina. Actividad Gal-T de C1GalT en ausencia de dominios lectina de ppGalNAc-Ts (rosa) y en presencia de T2lec (verde), T3lec (naranja), T4lec (azul)

Los gráficos de cinética enzimática (Figura 33) y de dobles inversas (Figura 34) junto al análisis de las modificaciones en los parámetros cinéticos que se encuentran en la Tabla 10, permiten visualizar claramente la activación enzimática de C1GalT como consecuencia de la presencia de T3lec.

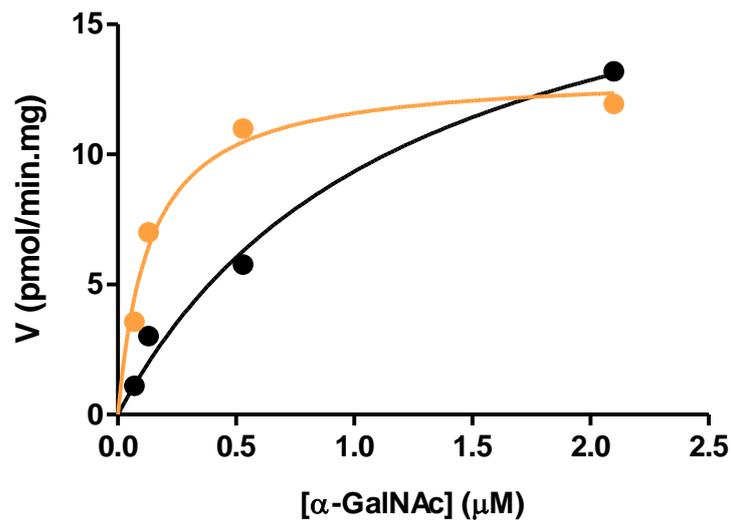


Figura 33: Cinética enzimática de C1GalT en presencia de T3lec. Actividad de C1GalT evaluada en ausencia (círculos negros) y en presencia (círculos naranjas) de T3lec con la glicoproteína dOSM como sustrato aceptor. El ajuste no lineal arrojó R^2 : 0.98 (negro) y 0.96 (naranja).

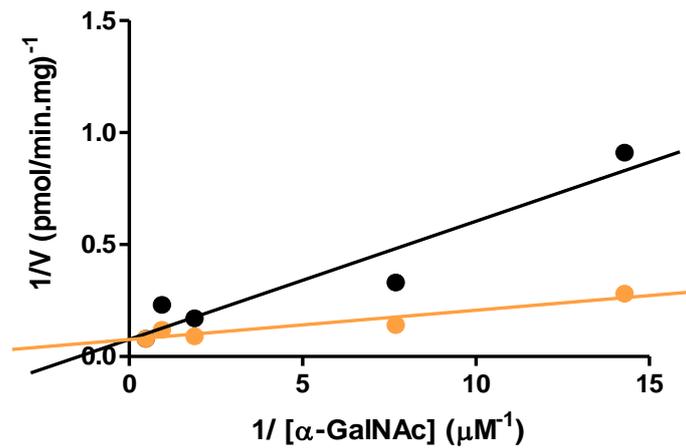


Figura 34: Efecto activador de T3lec en la actividad de C1GalT
 Gráfico de dobles inversas en donde se muestra la habilidad de T3lec como molécula activadora de la catálisis, el ajuste lineal de las curvas arrojó R^2 : 0.91 (negro) y 0.89 (naranja).

Tabla 10: Parámetros cinéticos de C1GalT en ausencia y presencia de T3lec con dOSM como glicoproteína aceptora

Parámetros cinéticos*	C1GalT	C1GalT +T3lec
V_{\max} (pmol/min.mg)	$20,6 \pm 3,6$	$13,2 \pm 1,0$
K_m (uM)	$1,21 \pm 0,45$	$0,140 \pm 0,036$

*Se muestran los valores derivados del ajuste no lineal junto a su correspondiente error estándar.

A su vez, se evaluó si la enzima ppGalNAc-T3 reproducía el efecto ejercido por el dominio lectina de T3. Se midió la actividad Gal-T de C1GalT en presencia y ausencia de ppGalNAc-T3; y de la enzima T3 (sin C1GalT) como control. Efectivamente, se pudo corroborar su habilidad como molécula activadora que se evidencia a través de las gráficas de cinéticas (Figura 35) y en la alteración de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) (Tabla 11).

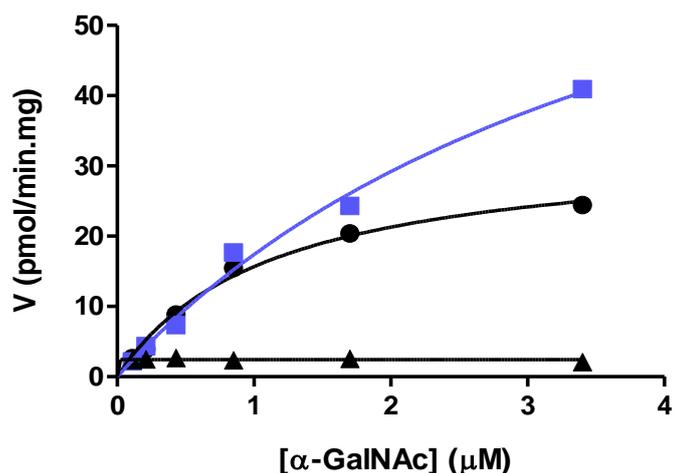


Figura 35: Cinética enzimática de C1GalT en presencia de T3 enzima
 Actividad Gal-T de C1GalT en ausencia (círculos negros) y en presencia de ppGalNAc-T3 (cuadrados azules) y de ppGalNAc-T3 (sin C1GalT) (triángulos negros) con la glicoproteína OSM como sustrato aceptor. El ajuste no lineal en los dos primeros casos arrojó R^2 : 0.99 para ambas gráficas.

Tabla 11: Parámetros cinéticos de C1GalT en ausencia y presencia de ppGalNAc-T3 con OSM como glicoproteína aceptor

Parámetros cinéticos*	C1GalT	C1GalT + ppGalNAc-T3
V_{max} (pmol/min.mg)	$33,1 \pm 2,2$	90 ± 17
K_m (uM)	$1,12 \pm 0,18$	$4,2 \pm 1,2$

*Se muestran los valores derivados del ajuste no lineal junto a su correspondiente error estándar.

4.2 Efecto de la acetilación de lisinas en las propiedades biológicas de ppGalNAc-T3

4.2.1 Predicción de sitios de acetilación en ppGalNAc-T3

El análisis de la secuencia de aminoácidos de ppGalNAc-T3 para determinar los residuos de lisinas con mayor probabilidad de ser acetilados fue llevado a cabo utilizando el programa ASEB (Li et al., 2012; Wang et al., 2012). De acuerdo a este programa, dentro del 3% de los valores de mayor probabilidad de acetilación se hallan 3 sitios putativos entre los cuales se incluyen K126 (P=0.0001), K626 (P=0.0004) y K129 (P=0.0043) como se muestra en la Figura 36. De modo que, cuanto más bajo es el valor P, mayor es la probabilidad de que una determinada lisina sea acetilada. En particular, K626 se localiza en el subdominio γ del dominio lectina de ppGalNAc-T3 y forma parte de uno de los tres motivos estructurales QXW (siendo X=K), claves para que las lectinas tipo R adopten un plegamiento semejante a una hoja de trébol. A su vez, el dominio lectina de la isoforma ppGalNAc-T2 también presenta un motivo QXW (donde X=K) en el subdominio β . Esta lisina (K521) se reportó acetilada en condiciones de ensayos *in vitro* (Zlocowski et al., 2011).

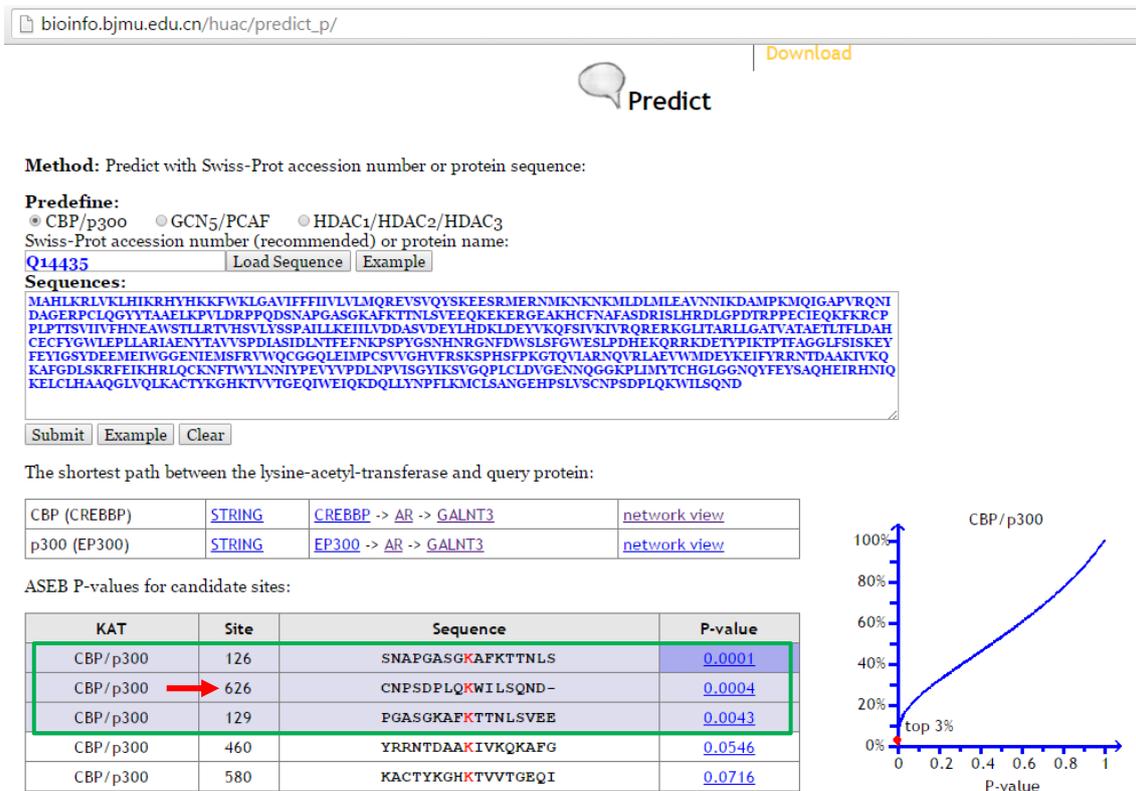


Figura 36: Resultados del análisis de la secuencia de la proteína ppGalNAc-T3 con el servidor ASEB. La flecha roja indica el residuo K626 que presenta una alta probabilidad de ser acetilado, el cual se ubica en el dominio lectina de la enzima ppGalNAc-T3.

4.2.2 Generación y expresión de proteínas mutantes de ppGalNAc-T3K626

Basándonos en los datos previos y debido a la importancia de los motivos QXW para el plegamiento de las proteínas con dominios tipo ricina como las ppGalNAc-Ts, se decidió estudiar la relevancia de la acetilación del residuo K626 de la isoforma ppGalNAc-T3. Para esto, se realizó una mutante puntual en dicho aminoácido con el propósito de simular acetilación (K626Q) y dos mutantes adicionales (K626R y K626A) como controles; con el fin de estudiar el impacto de esta modificación postraduccional sobre las propiedades biológicas de la enzima.

Partiendo de las construcciones que codifican para ppGalNAc-T3 salvaje (T3) y las mutantes aquí estudiadas (T3K626Q, T3K626R y T3K626A) se generaron los virus recombinantes correspondientes. Para verificar la generación exitosa de estos virus y por consiguiente, la expresión de cada una de las proteínas, se evaluó la presencia de éstas en el sobrenadante de medio de cultivo mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 (Figura 37).

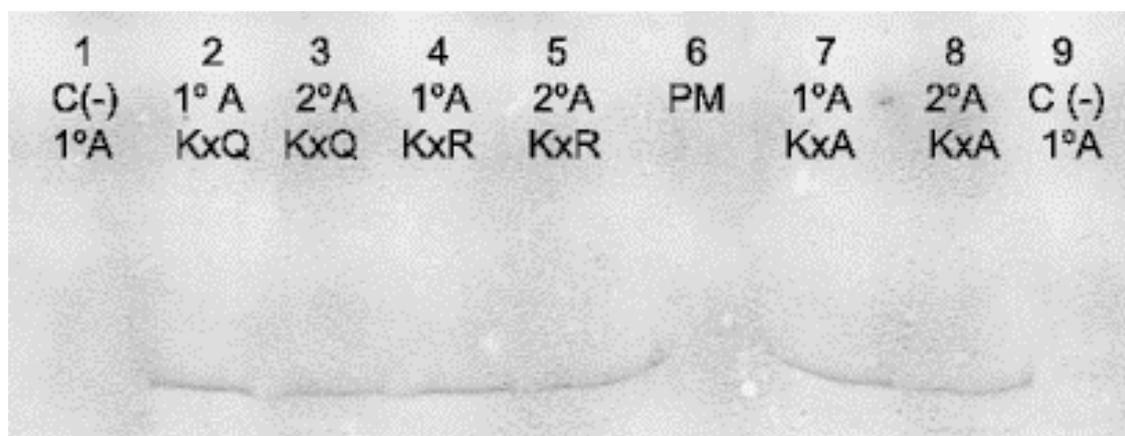


Figura 37: Detección de las mutantes ppGalNAc-T3 en la lisina 626 (KxQ, KxR y KxA) mediante Western blot. A modo de “screening” previo al escalado y purificación de las proteínas, se sembraron los sobrenadantes de medio de cultivo correspondiente a la primera (1°A) y segunda (2°A) amplificación de los virus recombinantes. En ambos extremos se sembró como control negativo (C-) medio de cultivo sin infectar. PM: marcador de peso molecular.

Una vez confirmada la expresión de las distintas ppGalNAc-T3s, se aumentó la escala de cultivo de las células Sf9 las cuales fueron infectadas con los respectivos virus. A partir del sobrenadante de dichos cultivos, se purificaron las distintas proteínas por cromatografía de afinidad. En la Figura 38 se muestra la purificación de T3 y sus mutantes. La concentración de proteína fue calculada utilizando el método de ácido bicinonínico (de acuerdo a 3.3.3). Las cuatro enzimas fueron purificadas simultáneamente y se obtuvieron

concentraciones y niveles de pureza similares entre sí. La mutante T3K626R mostró ser inestable durante las etapas de cuantificación de proteínas y medición de la actividad enzimática por lo cual no fue incluida en los estudios posteriores.

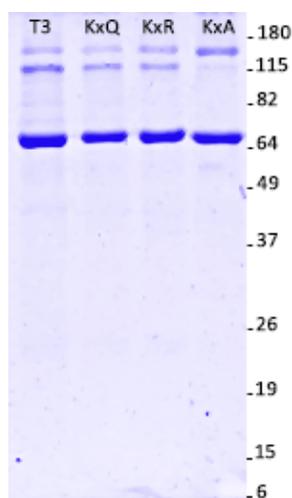


Figura 38: Grado de purificación de ppGalNAc-T3 y sus mutantes PAGE-SDS 10% de la proteínas ppGalNAc-T3 (T3), T3K626Q (KxQ), T3K626R (KxR) y T3K626A (KxA) teñido para visualizar proteínas totales con Azul Brillante de Coomassie.

4.2.3 Ensayo de actividad enzimática de ppGalNAc-T3s

Se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática para caracterizar el comportamiento de las mutantes T3K626 frente a los péptidos MUC1 y MUC2 mediante un método de revelado colorimétrico. Se evaluaron en paralelo T3 y las mutantes T3K626Q y T3K626A. La Figura 39 muestra que las mutantes en K626 poseen menor actividad catalítica que la enzima salvaje. Utilizando al péptido MUC2 como sustrato aceptor de la reacción enzimática, se puede apreciar una importante diferencia entre los valores de V_{max} de estas tres enzimas; mostrando una disminución muy significativa en las mutantes T3K626A y T3K626Q respecto a T3. Por otra parte, en los valores de K_m no se observaron diferencias notables entre dichas enzimas (Tabla 12).

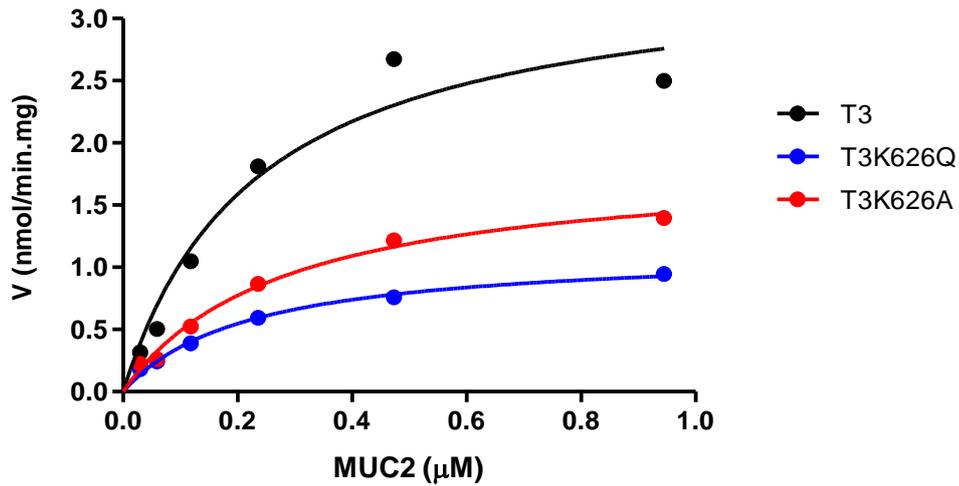


Figura 39: Cinética enzimática de T3, T3K626Q y T3K626A frente al péptido MUC2
 Gráfico de velocidad versus concentración de sustrato aceptor (en negro T3, en azul T3K626Q y en rojo T3K626A). El ajuste no lineal arrojó R^2 : 0.92 (negro), 0.97 (azul) y 0.96 (rojo).

Por otro lado, el péptido MUC1 también fue utilizado como sustrato aceptor de la unión covalente de α GalNAc catalizada por T3 y sus mutantes. En la Figura 40 se observa una disminución de los valores de V_{max} de las mutantes respecto a T3 salvaje. Sin embargo, al emplear este péptido aceptor la diferencia en el valor de V_{max} entre las mutantes no es tan amplia como el caso de MUC2.

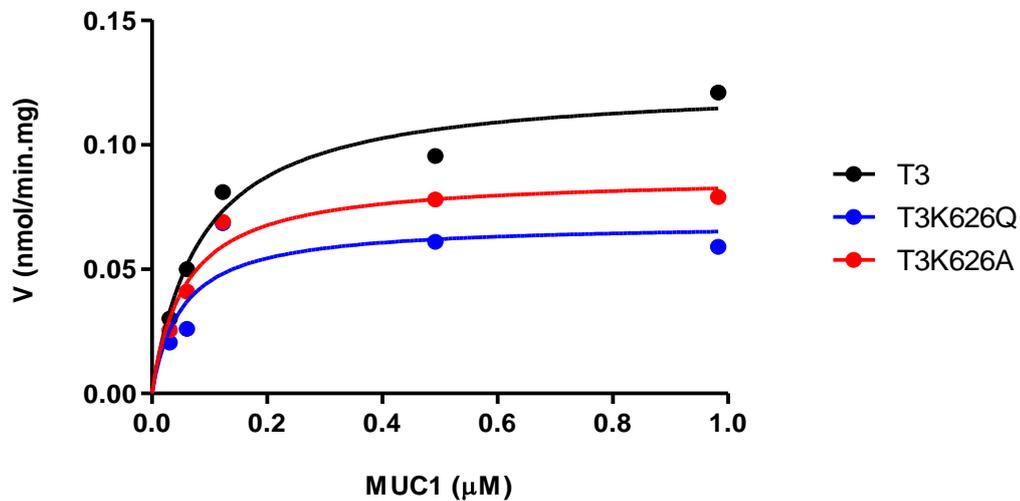


Figura 40: Cinética enzimática de T3, T3K626Q y T3K626A frente al péptido MUC1
 Gráfico de velocidad versus concentración de sustrato aceptor (en negro T3, en azul T3K626Q y en rojo T3K626A). El ajuste no lineal arrojó R^2 : 0.95 (negro), 0.65 (azul) y 0.90 (rojo).

Estos resultados indicarían que la mutación puntual, ya sea la sustitución KxQ o KxA afecta la catálisis de manera similar en ambas enzimas, pero no así la afinidad de la enzima por su sustrato ya que principalmente produce un cambio en los valores de V_{max} sin producir alteraciones notables en K_m (Tabla 12).

Tabla 12: Parámetros cinéticos de T3, T3K626Q, T3K626A frente a los péptidos MUC2 y MUC1

Péptido	Parámetros cinéticos*	Enzimas		
		T3	T3K626Q	T3K626A
MUC2	V_{max} (nmol/min.mg)	$3,44 \pm 0,37$	$1,142 \pm 0,061$	$1,85 \pm 0,15$
	K_m (uM)	$0,234 \pm 0,066$	$0,218 \pm 0,031$	$0,280 \pm 0,056$
MUC1	V_{max} (nmol/min.mg)	$0,1245 \pm 0,0061$	$0,0685 \pm 0,0087$	$0,0873 \pm 0,0051$
	K_m (uM)	$0,086 \pm 0,015$	$0,052 \pm 0,026$	$0,059 \pm 0,013$

*Se muestran los valores derivados del ajuste no lineal junto a su correspondiente error estándar.

4.2.4 Ensayos de interacción de ppGalNAc-T3s con O-glicanos

El glicopéptido MUC1- α GalNAc adsorbido en placas multiorificios fue incubado con distintas concentraciones de T3 o sus mutantes para analizar la influencia de la acetilación en K626 de T3 en la interacción con O-glicanos. La Figura 41 muestra que las mutantes en K626 poseen una menor capacidad de interacción con MUC1- α GalNAc.

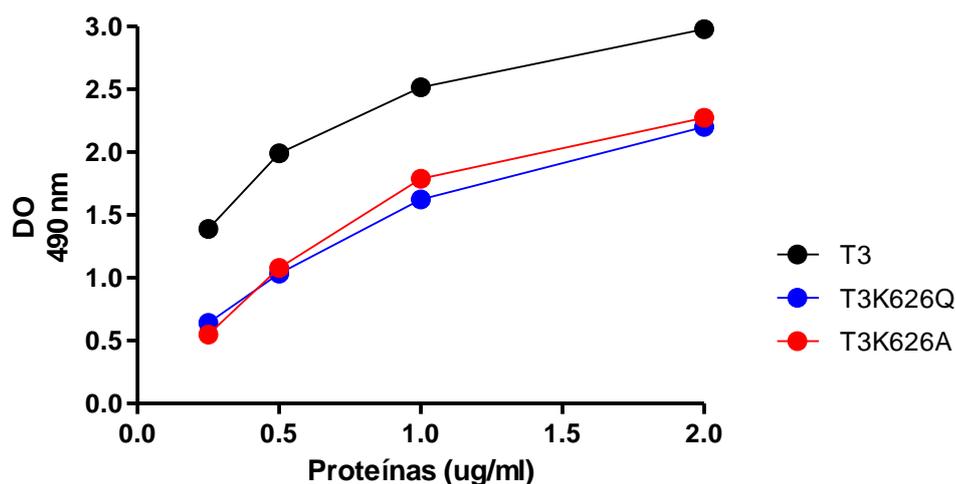


Figura 41: Interacción entre la enzima T3 y sus mutantes con MUC1- α GalNAc. Interacción directa entre las enzimas T3 (negro), T3K626Q (azul) y T3K626A (rojo) y el glicopéptido MUC1- α GalNAc expresada como lecturas de absorbancia (490 nm) en función de la concentración de proteína.

4.2.5 Rol del carbohidrato en la interacción de ppGalNAc-T3s con MUC1- α GalNAc

Dado que los dominios lectina de ppGalNAc-Ts reconocen residuos de glicanos, preferentemente terminales α GalNAc (Wandall et al., 2007; Yoshimura et al., 2012), una batería de glicósidos⁷ de GalNAc fueron ensayados como potenciales inhibidores de la interacción entre ppGalNAc-T3s y MUC1- α GalNAc (Figura 42.1-3).

⁷ Glicósido: un glicano que contiene al menos un enlace glicosídico a otro glicano o a una aglicona (porción no glucídica de un glicoconjugado o glicósido unida al glicano a través del azúcar terminal reductor) Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. Hart, and M. Etzler. 2009. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

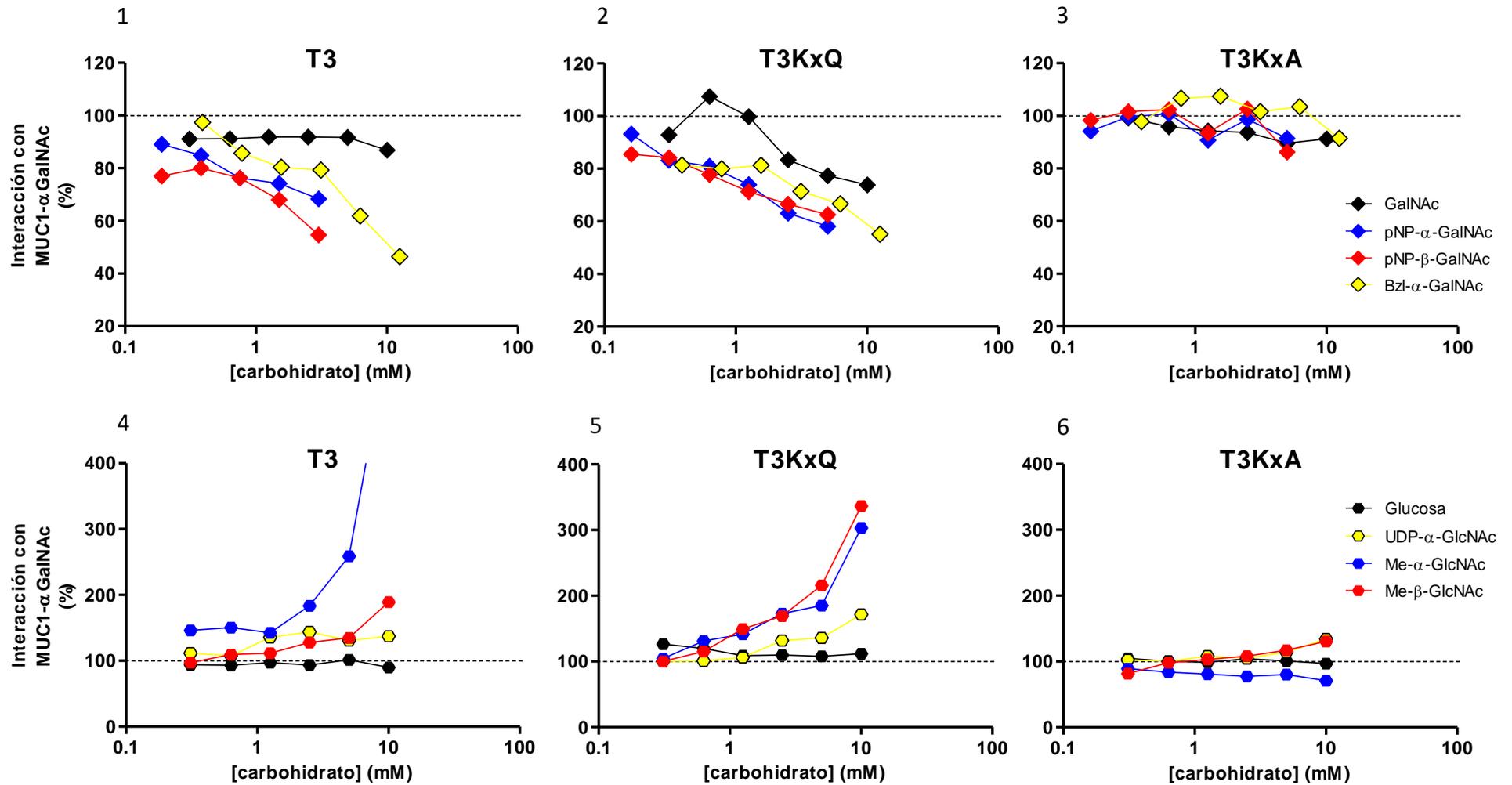


Figura 42: Efecto de glicósidos en la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1- α GalNAc. Efecto de glicósidos de GalNAc y GlcNAc en la interacción de T3 (1 y 4), T3K626Q (2 y 5) y T3K626A (3 y 6) con el glicopéptido MUC1- α GalNAc. El grado de interacción de las enzimas con MUC1- α GalNAc se expresa como porcentaje de unión en función de la concentración de glicósido.

Cuando se estudió la interacción de T3 salvaje con MUC1- α GalNAc se pudo apreciar que la presencia de GalNAc prácticamente no afectó dicha interacción (Figura 42.1). No obstante, un claro efecto inhibitorio de la interacción fue observado cuando se ensayaron diferentes concentraciones de glicósidos derivados de GalNAc. Bzl- α -GalNAc redujo el 50% de la capacidad de interacción (CI50) a 10 mM; siendo pNP- β -GalNAc el glicósido que mostró mayor capacidad inhibitoria (CI50: 3 mM) (Tabla 13). La mutante T3K626Q mostró diferencias en la capacidad de reconocimiento a carbohidratos respecto a la enzima T3 salvaje. Por ejemplo, GalNAc mostró un mayor efecto inhibidor de la interacción aunque sin alcanzar el 50% de inhibición y en este caso, el glicósido alfa (pNP- α -GalNAc) mostró un efecto inhibidor superior al glicósido beta (pNP- β -GalNAc). Por otra parte, la interacción de la mutante T3K626A con MUC1- α GalNAc no pudo ser inhibida significativamente por ninguno de los derivados de GalNAc evaluados. De este modo, se pone en evidencia la importancia del residuo K626 del dominio lectina de ppGalNAc-T3 en el reconocimiento a GalNAc. Estos resultados se resumen en la Tabla 13.

Por otra parte, se estudió el efecto de glicósidos de GlcNAc en la interacción de ppGalNAc-T3s con MUC1- α GalNAc (Figura 42.4-6). T3 salvaje mostró un llamativo incremento en la interacción al glicopéptido MUC1- α GalNAc en presencia de metil glicósidos de GlcNAc (Figura 42.4). Una concentración de 3 mM de Me- α -GlcNAc fue suficiente para aumentar al doble la interacción (CA200)⁸ de la enzima salvaje con el glicopéptido. Mientras que, Me- β -GlcNAc mostró menor CA200 (10 mM) y ningún efecto fue observado por la presencia de glucosa (Tabla 14). T3K626Q también mostró un importante incremento en la interacción con MUC1- α GalNAc en presencia de glicósidos de GlcNAc (Figura 42.5). En esta mutante, Me- β -GlcNAc se mostró más activador (CA200: 4 mM) que Me- α -GlcNAc (CA200: 6 mM), lo que demuestra que la mutación puntual K626Q influye en el efecto ejercido por glicósidos de GlcNAc estimulando la interacción con MUC1- α GalNAc. Por otra parte, la mutación K626A de ppGalNAc-T3 muestra que la enzima pierde la capacidad de aumentar la interacción con MUC1- α GalNAc en presencia de glicósidos de GlcNAc. Estos resultados muestran que K626 es importante tanto en el reconocimiento a GalNAc por parte del dominio lectina, como así también, en la capacidad de interacción con glicósidos de GlcNAc que estimulan su unión al glicopéptido MUC1- α GalNAc.

⁸ CA200: concentración del activador que aumenta al 200% la interacción entre las moléculas estudiadas.

Tabla 13: Concentración de carbohidrato que reduce un 50% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1- α GalNAc

Enzimas	Carbohidratos			
	GalNAc	Bzl- α -GalNAc	pNP- α -GalNAc	pNP- β -GalNAc
T3	>>10 mM	10 mM	>3 mM	3 mM
T3K626Q	>10 mM	>10 mM	5 mM	>5 mM
T3K626A	>>10 mM	>>12,5 mM	>>5 mM	>>5 mM

Tabla 14: Concentración de carbohidrato que aumenta al 200% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1- α GalNAc

Enzimas	Carbohidratos			
	Glucosa	UDP- α -GlcNAc	Me- α -GlcNAc	Me- β -GlcNAc
T3	>>10 mM	> 10 mM	3 mM	10 mM
T3K626Q	>>10 mM	> 10 mM	6 mM	4 mM
T3K626A	>>10 mM	>>10 mM	>>10 mM	>>10 mM

4.2.6 Influencia de glicósidos en la interacción de ppGalNAc-T3s con péptidos

En función de los resultados previos, se seleccionó un monosacárido con efecto activador (Me- α -GlcNAc) y otro, con efecto inhibitor (Bzl- α -GalNAc) sobre la interacción de ppGalNAc-T3s con el glicopéptido MUC1- α GalNAc. En esta ocasión se pretendió evaluar la capacidad de interacción de las enzimas T3, T3K626Q y T3K626A hacia el péptido MUC1 (no glicosilado) en presencia de dichos glicósidos para determinar la importancia de la porción peptídica en dicha interacción.

Para las tres enzimas estudiadas aquí, se observó un aumento de la unión de las proteínas al péptido MUC1 en presencia de ambos glicósidos (Figura 43.1-3). Para la enzima T3 salvaje, el incremento en la interacción a MUC1 en presencia de Me- α -GlcNAc o Bzl- α -GalNAc fue similar, produciendo AC200: 10 mM en ambos casos. La mutación K626Q modificó esta capacidad de activación de la interacción respecto a T3 mostrando mayor activación en presencia de Bzl- α -GalNAc (AC200: 5 mM) y menor activación con Me- α -GlcNAc (a 10 mM no llegó al 200% de interacción con el péptido). La mutante T3K626A mostró que ambos glicósidos generaron similar grado de activación (AC200: 8 mM para ambos) en la interacción de la enzima con MUC1 (Tabla 15).

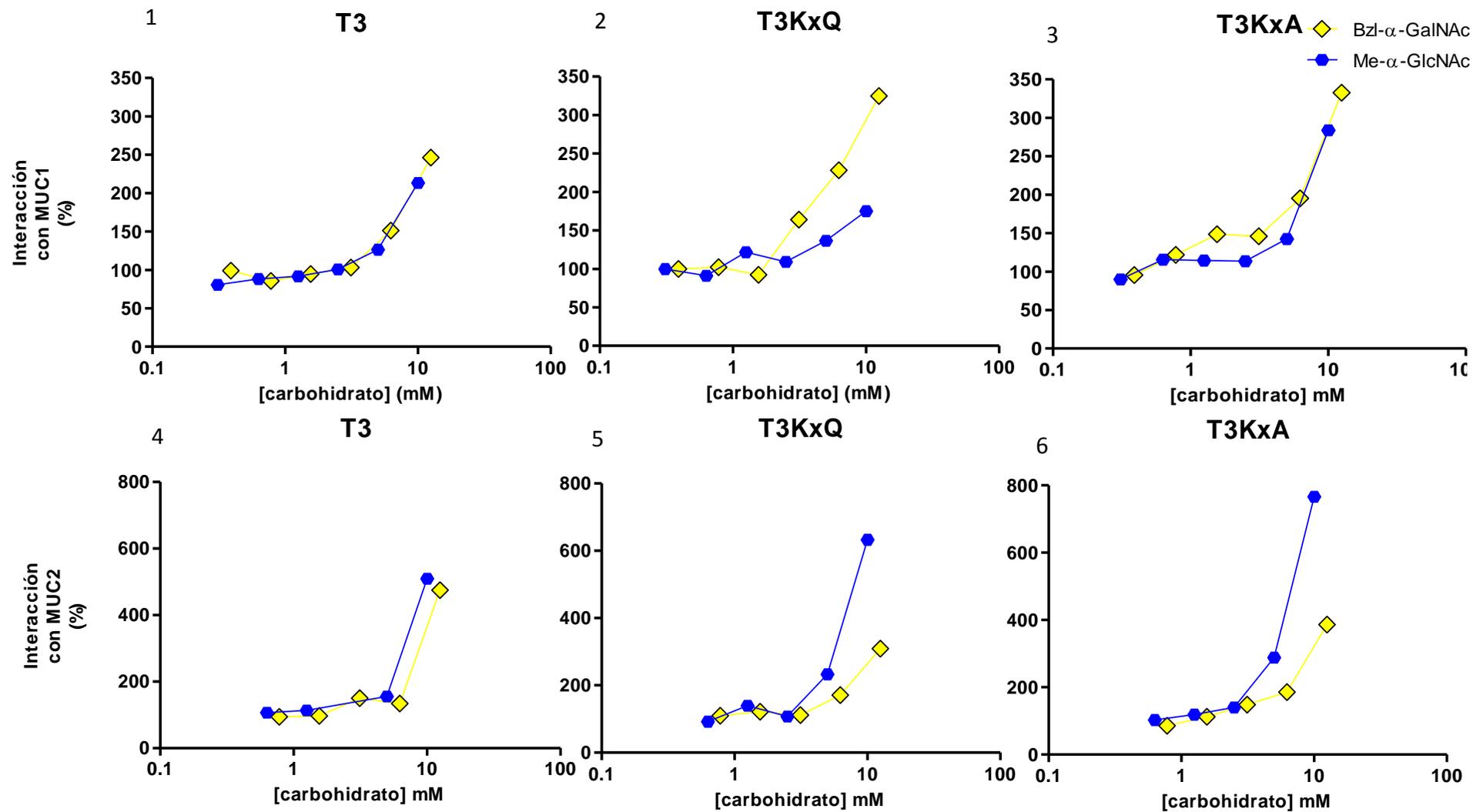


Figura 43: Efecto de Me- α -GlcNAc y BzI- α -GalNAc sobre la interacción de T3 y sus mutantes con los péptidos MUC1 y MUC2. Efecto de Me- α -GlcNAc y BzI- α -GalNAc sobre la interacción de las enzimas T3, T3K626Q y T3K626A con los péptidos MUC1 (1, 2 y 3) y MUC2 (4, 5 y 6). El grado de interacción con MUC1 o MUC2 se expresa como porcentaje de unión en función de la concentración de carbohidrato.

A su vez, en vistas del efecto activador observado en presencia de ambos carbohidratos con el péptido MUC1 buscamos estudiar si ese efecto era dependiente de la secuencia peptídica. Por lo tanto, a continuación evaluamos la interacción de las enzimas con el péptido MUC2 en presencia de Bzl- α -GalNAc y Me- α -GlcNAc. En las Figura 43.4-6 se puede apreciar que ambos glicósidos estimularon la interacción de las tres enzimas aquí estudiadas con MUC2, al igual que sucedió con MUC1. En el caso de T3, la activación producida por uno u otro azúcar fue similar (AC200: 7 y 8 mM). Sin embargo, Me- α -GlcNAc (AC200: 4 mM para T3K626Q y 3 mM para T3K626A) ejerció un efecto activador mayor sobre ambas mutantes; en oposición a los resultados obtenidos con el péptido MUC1 donde el efecto activador se vio favorecido en presencia de Bzl- α -GalNAc (Tabla 16).

Tabla 15: Concentración de glicósido que aumenta al 200% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC1

Enzimas	Glicósidos	
	Bzl- α -GalNAc	Me- α -GlcNAc
T3	10 mM	10 mM
T3K626Q	5 mM	> 12,5 mM
T3K626A	8 mM	8 mM

Tabla 16: Concentración de glicósido que aumenta al 200% la interacción de T3 y sus mutantes a MUC2

Enzimas	Glicósidos	
	Bzl- α -GalNAc	Me- α -GlcNAc
T3	8 mM	7 mM
T3K626Q	8 mM	4 mM
T3K626A	7 mM	3 mM

5. DISCUSIÓN

La glicosilación es la modificación química más frecuente y compleja que se observa sobre proteínas y lípidos en las células. Es crítica para la vida multicelular y su carencia o supresión frecuentemente desencadena enfermedades (Hennet and Cabalzar, 2015). Los glicanos maduros en cualquiera sitio de glicosilación podrían ser tan simples como un único monosacárido o tan complejos como un polímero de más de 200 monosacáridos, potencialmente modificados con fosfato, sulfato, acetato o fosforilcolina (Stanley, 2011). Debido a la complejidad y dinamismo de las modificaciones de los glicanos, aún no se puede explicar cómo la secuencia de reacciones enzimáticas está orquestada para garantizar la fidelidad en la síntesis de cientos de glicanos diferentes sin un templado, en presencia de enzimas que compiten por un mismo sustrato aceptor proteico y se localizan en el mismo subcompartimento de Golgi (Rabouille et al., 1995).

En particular, este trabajo de tesis pretende contribuir a comprender el complejo rompecabezas que significa la regulación de la maquinaria de biosíntesis de O-glicanos de tipo mucina. La primer parte de este estudio se enfocó en descifrar la significancia de los dominios lectina de ppGalNAc-Ts en el inicio de este camino biosintético, en el cual participan la familia de enzimas ppGalNAc-Ts, involucradas en la incorporación del primer azúcar (GalNAc), y la enzima C1GalT que cataliza la transferencia de galactosa, generando así el glicano Core 1 (Bennett et al., 2012).

Primeramente, se estudió la actividad de la enzima ppGalNAc-T2 en presencia de los dominios lectina T3 y T4 mediante dos métodos (espectrometría de masas y ensayo colorimétrico) que brindan información diferente y complementaria. Ambos dominios lectina produjeron un efecto inhibitorio en la actividad enzimática. Cuando T3lec o T4lec se adicionaron a la reacción, en los ensayos de espectrometría de masas se observó una desaparición de los picos correspondientes a los glicopéptidos con mayor número de GalNAc (MUC1-2GalNAc y MUC1-3GalNAc) y un aumento de la proporción del péptido sin glicosilar y de MUC1-1GalNAc. Como la capacidad de reconocimiento a GalNAc de T3lec y T4lec está muy bien establecida (Pedersen et al., 2011; Wandall et al., 2007) cabe la posibilidad de que estos dominios lectina se unan a los residuos de GalNAc recientemente incorporados sobre el aceptor peptídico. De este modo, al estar unido al glicopéptido el dominio lectina interferiría en la unión de la enzima para que ésta continúe incorporando nuevas moléculas de GalNAc en los múltiples sitios glicosilables que presenta el péptido.

Si este fuera el caso, al menos sería necesario la incorporación de una molécula de GalNAc y se observaría una disminución del péptido sin glicosilar y en consecuencia, una acumulación de las especies glicopeptídicas con menor número de GalNAc ya que la incorporación de las siguientes estaría impedida. Sin embargo, el péptido sin glicosilar se acumula descartando la posibilidad de que ocurra un impedimento estérico. Por lo cual, T3lec y T4lec estarían interactuando con la enzima y no con los glicopéptidos que se van generando a medida que la reacción de glicosilación transcurre.

También, la influencia de estos dominios lectina sobre la actividad de ppGalNAc-T2 fue evaluada a través de estudios de cinética enzimática mediante un ensayo colorimétrico, confirmando el efecto inhibitorio observado anteriormente. En estos ensayos se buscó caracterizar la naturaleza inhibitoria de cada dominio lectina. En el caso de T3lec, este dominio lectina tuvo un comportamiento diferente según el péptido evaluado. Frente a MUC1, el tipo de inhibición fue de tipo no competitiva (afectando V_{max}), mientras frente a MUC2 fue de tipo competitiva (se refleja en el cambio principalmente de K_m). Este análisis muestra que T3lec afecta la catálisis en el primer caso, e interfiere con la unión del sustrato, en la segunda condición. Además, una característica que se desprende de los estudios de cinética y se ve reflejada en los valores de K_i es que el efecto inhibitorio ejercido por T3lec fue similar o superior a T4lec al utilizar el péptido MUC1 y MUC2, respectivamente.

Los estudios de actividad enzimática también fueron llevados a cabo con la isoforma ppGalNAc-T3. Los resultados de espectrometría masas son similares a los obtenidos con ppGalNAc-T2, de modo que tanto T3lec como T4lec son capaces de inhibir la actividad de ppGalNAc-T3. El efecto de los dominios lectina es aún más notable al evaluar el péptido MUC5B en relación a MUC1 apreciándose el péptido sin glicosilar como la especie predominante. Por este motivo, el efecto de T3lec y T4lec no estaría asociado a la interacción con el residuo α GalNAc. En el análisis de cinética enzimática, T3lec nuevamente mostró un efecto inhibitorio sobre la enzima ppGalNAc-T3 que difiere según el péptido aceptor. Cabe destacar que en la inhibición de la actividad enzimática en presencia de MUC1, T3lec se comportó como un inhibidor no competitivo con ppGalNAc-T2 y como un inhibidor mixto con ppGalNAc-T3. Estos dos tipos de inhibidores se unen tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato. Por otro lado, en presencia de MUC2 la inhibición siempre fue de tipo competitiva, en la cual el inhibidor compite con el

sustrato por la unión al sitio catalítico de la enzima. Esto revelaría que el péptido influye en la interacción de T3lec con la enzima. No así con T4lec, el cual se mostró como un inhibidor competitivo en todos los casos evaluados, indicando que este dominio lectina no reconoce el complejo enzima-sustrato.

Los ensayos de cinética hacen notar que el comportamiento de cada dominio lectina es diferente mostrando un efecto inhibitorio distinto, tal vez debido a las características propias de cada dominio lectina cuya conformación es conservada pero difieren significativamente en su secuencia primaria (Kubota et al., 2006) y por lo tanto, los sitios de interacción serían diferentes en cada caso.

Con el propósito de estudiar el inicio de la O-GalNAc glicosilación *in vivo*, se utilizó un modelo celular robusto como la línea celular CHO IdID (Kato et al., 2006). Aquí se evaluó la influencia del dominio T3lec en la actividad GalNAc-transferasa del repertorio de ppGalNAc-Ts de estas células. Para este fin, se empleó un constructo de la enzima T3 cuya mutación D277H lleva a la pérdida de la actividad enzimática, pudiéndose estudiar las propiedades de su dominio lectina sin el aporte del dominio catalítico. Así se observó una disminución de la actividad GalNAc-transferasa en células transfectadas con T3D277H (que simula un dominio lectina) en relación a la muestra control. De este modo, se demostró que *in vivo* T3lec tiene la capacidad de inhibir el inicio de la O-GalNAc glicosilación, de manera similar a lo observado *in vitro*.

Varios estudios llevados a cabo a fines de 1960 y principios de 1970 mostraron que las glicosiltransferasas tienden a existir como complejos en las células. Desde entonces, diferentes estudios bioquímicos y de biología celular han provisto evidencia de la existencia de estos complejos en todas las células eucariotas y también, en bacterias (Kellokumpu et al., 2015). Este concepto ha sido retomado por algunos investigadores en la actualidad quienes han hallado que glicosiltransferasas de Golgi forman complejos homoméricos y/o heteroméricos dentro de las vías de N- y O-glicosilación en células de mamíferos utilizando métodos basados en imágenes de células vivas (Hassinen et al., 2011).

En vistas de estos antecedentes se buscó profundizar acerca de la interacción entre las ppGalNAc-Ts y los dominios lectina aquí estudiados. Los ensayos de interacción mostraron que T3lec y T4lec se unen a ppGalNAc-T2 de manera específica; ya que dicha interacción pudo ser inhibida por la presencia de ppGalNAc-T2 en solución pero no por

otra proteína como ABS. Además, se observó que la interacción de los dominios lectina con ppGalNAc-T2 no es afectada por la presencia de Bzl- α -GalNAc o Me- α -GlcNAc; lo que demostró que las interacciones entre las ppGalNAc-Ts y T3lec-T4lec no están mediadas por glicanos.

Éste fue un dato sorpresivo ya que estos dominios lectina se caracterizan por su capacidad de reconocimiento a residuos GalNAc o derivados de este azúcar (Pedersen et al., 2011). Si bien es singular, no es desconocido el hecho de que ciertas lectinas medien funciones celulares a través de interacciones proteína-proteína más allá de sus propiedades de unión a glicanos. Galectina-3, un miembro de la familia de galectina interactúa con residuos β -galactósidos de glicoproteínas de la matriz y de la superficie celular a través de su dominio de reconocimiento a carbohidratos y con proteínas intracelulares a través de asociaciones péptido-péptido mediante su dominio N-terminal (Iacobini et al., 2003). Otro ejemplo es el dominio tipo lectina C de lecticanos, una familia de proteoglicanos de sulfato de condroitina, que se une a tenascina-R de manera independiente de carbohidrato (Aspberg et al., 1997).

Además, Hassinen y col. (Hassinen et al., 2011) reportaron que *in vivo* la isoforma ppGalNAc-T6 es capaz de formar complejos homoméricos. Por lo que es muy probable que existan este tipo de complejos con otras isoformas de ppGalNAc-Ts e inclusive entre isoformas diferentes. Tal vez, este tipo de asociaciones podría requerir de interacciones transientes y dinámicas en las cuales estas ppGalNAc-Ts en ciertas ocasiones actuarían como monómeros y entre otras condiciones se verían favorecidas las interacciones con ppGalNAc-Ts de su proximidad. Recientemente, tal como en este trabajo de tesis, se ha encontrado que pueden ocurrir asociaciones que inhiban un determinado paso enzimático. GnT1IP es una proteína de membrana tipo II (con homología de secuencia a genes de glicosiltransferasas cuya actividad aún no ha sido demostrada) que se asocia a través de su dominio luminal a MGAT1, una N-acetilglucosaminiltransferasa que inicia la síntesis de N-glicanos complejos e híbridos, inhibiendo su actividad (Huang et al., 2015). Lo interesante es que GnT1IP no interacciona con otras GlcNAc-transferasas del medial Golgi (MGAT2, MGAT3, MGAT4B o MGAT5) y a su vez, MGAT1 forma heterómeros con MGAT2 (Hassinen et al., 2010; Nilsson et al., 1994) los cuales no se desestabilizan por la unión GnT1IP ya que éste último se une de manera no competitiva a través de un sitio diferente a MGAT1 (Huang et al., 2015). A su vez, este ejemplo muestra la existencia de

asociaciones entre glicosiltransferasas en donde una de ellas (MGAT1) puede sufrir efectos opuestos por la interacción en simultáneo con diferentes proteínas.

Posteriormente, en este trabajo se evaluó si dominios lectina de ppGalNAc-Ts eran capaces de afectar la actividad de otras enzimas de la misma vía de síntesis de O-glicanos, específicamente C1GalT, en la etapa subsiguiente de la O-GalNAc glicosilación. Se observó que en este paso, T3lec mostraba un efecto activador sobre la actividad galactosiltransferasa de C1GalT, generando un efecto contrapuesto al observado sobre la actividad de las enzimas ppGalNAc-Ts. En ensayos de cinética enzimática se puso de manifiesto el efecto activador a través del cambio en los parámetros, principalmente, una disminución de K_m que denota un aumento de la afinidad de la enzima por el sustrato. Luego, el efecto activador sobre la actividad de C1GalT fue reproducido por la presencia de la enzima ppGalNAc-T3 que incluye tanto el dominio catalítico como lectina; evidenciando el rol fundamental del dominio lectina de esta isoforma en la activación enzimática de C1GalT. Sin embargo, la curva de activación como consecuencia de la presencia de ppGalNAc-T3 en la reacción de glicosilación fue diferente a la obtenida con T3lec. Los parámetros cinéticos si bien se modificaron no lo hicieron de la misma manera. Es decir, tanto K_m como V_{max} se vieron aumentados. Probablemente, esto podría deberse a que se trata de proteínas diferentes y a que se utilizaron distintos sustratos aceptores para medir la actividad enzimática.

Estos resultados están en concordancia con hallazgos de otros autores (Hassinen et al., 2011) que indican que ppGalNAc-T6 y C1GalT forman un complejo heteromérico que incrementa la síntesis del glicano Core 1. Casualmente, ppGalNAc-T6 y ppGalNAc-T3 exhiben una similitud de secuencia elevada a través de la región codificante, con una estructura genómica idéntica y con especificidad de sustratos similares (Bennett et al., 1999) aunque con patrones de expresión disímiles; por lo cual pertenecen a la misma subfamilia Ic de ppGalNAc-Ts (Bennett et al., 2012). Adicionalmente, Hassinen y col. (Hassinen et al., 2011) reportaron la formación de heterómeros entre la ppGalNAc-T6 y las enzimas que sintetizan las estructuras Core 3 y Core 6, aunque no se detectaron heterómeros entre ppGalNAc-T6 y las enzimas que sintetizan Core 2 y Core 4. Por lo tanto, es muy probable que ppGalNAc-T6 y ppGalNAc-T3 compartan también la cualidad de establecer interacciones con glicosiltransferasas vecinas como mecanismo de regulación de la actividad enzimática.

Otro aspecto importante son los dominios involucrados en la interacción entre glicosiltransferasas. De acuerdo al estudio realizado por Hassinen y col. (Hassinen et al., 2011) los experimentos de intercambio de dominios entre glicosiltransferasas de la vía de síntesis de glicanos de tipo O-GalNAc mostraron que las interacciones homo/heteroméricas estaban mediadas preferentemente (por encima del 85%) por el dominio luminal. Este dato es coincidente con los resultados aquí presentados pudiendo agregar que, específicamente, los dominios lectinas de ppGalNAc-Ts son las moléculas efectoras en las interacciones homo/ heteroméricas. Un resultado de gran importancia que surgió de los ensayos de interacción directa consistió en que estos dominios lectina (T3lec y T4lec) interaccionaban principalmente con el dominio catalítico de ppGalNAc-T2.

Previamente, el dominio lectina de ppGalNAc-Ts ha sido descrito por trabajar de manera concertada con el dominio catalítico de su propia enzima uniéndose a residuos GalNAc ya incorporados sobre el polipéptido aceptor favoreciendo la generación de glicanos densamente O-GalNAc glicosilados (Wandall et al., 2007). No obstante, los resultados de esta tesis apuntan a otro mecanismo de control en donde un determinado dominio lectina, por interacción proteína-proteína con el dominio catalítico de una glicosiltransferasa próxima, regula su actividad catalítica. Existen casos interesantes de proteínas que se han comportado como inhibidores de la actividad enzimática como la familia de proteínas Kunitz-STI que es un paradigma de inhibidor de proteasas en particular y del reconocimiento de proteína-proteína en general. Curiosamente, esta familia es miembro de la superfamilia de proteínas con plegamiento β -trefoil al igual que los dominios lectinas de ppGalNAc-Ts (Azarkan et al., 2011). Por otro lado, en acuerdo con el efecto activador del dominio lectina de ppGalNAc-T3, las lectinas fúngicas *Macrolepiota procera* (MpL) y *Clitocybe nebularis* (CNL), proteínas con plegamiento β -trefoil, produjeron un aumento de la actividad proteasa de tripsina y papaína (Žurga et al., 2015).

La capacidad del plegamiento β -trefoil para mantener “loops” que varían en gran medida en longitud, secuencia y conformación, principalmente, en la superficie de las proteínas sugiere la creación de múltiples sitios de contacto (Murzin et al., 1992). La superfamilia de proteínas con plegamiento β -trefoil tiene una alta plasticidad lo que le permite interactuar con diferentes moléculas como ADN, carbohidratos y proteínas (Azarkan et al., 2011; Wilson and Kovall, 2006). Existen varios ejemplos en la bibliografía de

interacciones proteína-proteína que involucran a proteínas con este plegamiento β -trefoil (Azarkan et al., 2011; Murzin et al., 1992).

Para finalizar, los resultados aquí expuestos indican un rol regulatorio del plegamiento β -trefoil de ppGalNAc-Ts en la actividad enzimática de glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc. T3lec y T4lec redujeron la actividad enzimática de ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 y a su vez, T3lec incrementó la actividad C1GalT. Todos los resultados, en conjunto, sugieren que el plegamiento β -trefoil de ppGalNAc-Ts funciona como una “llave” que bloquea o activa la síntesis de determinados glicanos.

En el siguiente esquema (Figura 44), a modo de resumen, se propone un mecanismo de interacción entre dominios lectinas de ppGalNAc-Ts y enzimas que intervienen en el primer y segundo paso de la O-GalNAc glicosilación; mostrando el rol fundamental de los dominios lectina en la regulación del inicio de esta biosíntesis.

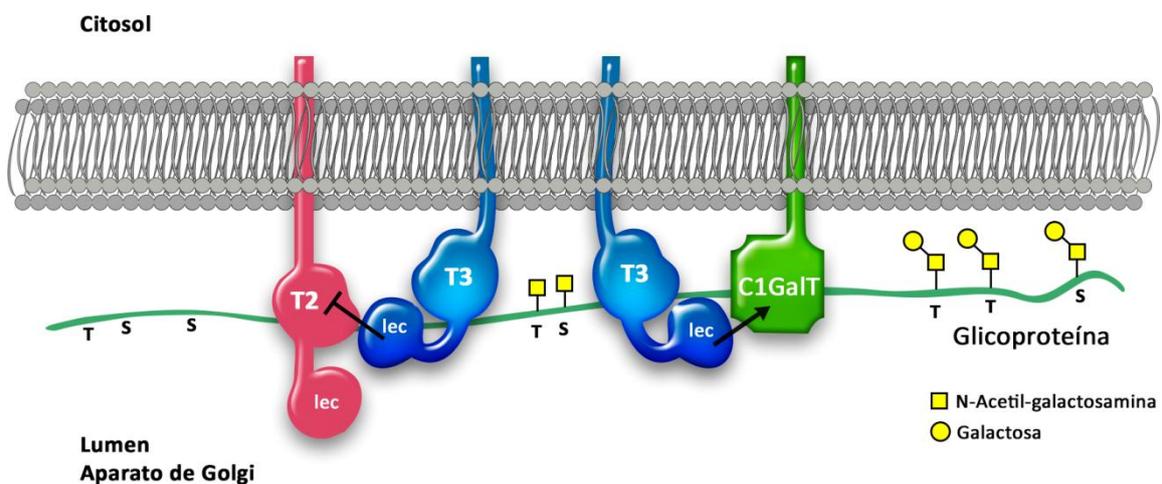


Figura 44: Esquema del mecanismo de interacción propuesto para los dominios lectina de ppGalNAc-Ts. A modo de ejemplo se muestra el dominio lectina de ppGalNAc-T3 (**lec**) interaccionando con dominios catalíticos de glicosiltransferasas próximas en la membrana inhibiendo la actividad GalNAc-transferasa y favoreciendo la actividad galactosiltransferasa. **Lec: dominio lectina, T2: dominio catalítico de ppGalNAc-T2, C1GalT: Core 1 galactosiltransferasa.**

Dado los antecedentes de acetilación *in vivo* de las isoformas humanas ppGalNAc-T2 y -T9 (Lundby et al., 2012; Pehar et al., 2012b) y el interés de este trabajo por el estudio de los dominios lectina de las ppGalNAc-Ts, la segunda parte de esta tesis se focalizó en estudiar la significancia de un sitio de acetilación en el dominio lectina de ppGalNAc-T3 (T3). La elección de K626 estuvo basada en los resultados generados por el programa ASEB, que mostró una alta probabilidad de acetilación para dicha lisina y sobre la cual se realizó una mutación que simula acetilación.

K626 se encuentra en uno de los tres motivos QXW que presentan los dominios lectina de ppGalNAc-Ts localizado precisamente en el subdominio γ , en donde X es un residuo lisina. Es importante destacar que las tres regiones QXW constituyen motivos fundamentales en la generación del pliegue en forma de hoja de trébol (β -trefoil fold) característico de esta familia de lectinas (tipo-R) (Hazes, 1996). El reemplazo de lisina por glutamina es bien aceptado como una mutación que simula acetilación, y en forma adicional se realizaron dos mutantes a modo de control sustituyendo la lisina en la posición 626 por arginina y alanina con el propósito de evaluar cómo impactan dichas mutaciones en las propiedades biológicas de la enzima.

Las mutantes de T3 generadas por mutagénesis dirigida (T3K626Q y T3K626A) mostraron menor actividad enzimática que la forma salvaje en presencia de los dos sustratos peptídicos evaluados (MUC1 y MUC2). Las mutaciones KxQ y KxA afectaron principalmente la catálisis ya que produjeron alteraciones significativas en el valor de V_{max} . Del mismo modo, en la mayoría de las enzimas metabólicas la acetilación de lisinas produce un efecto negativo sobre su actividad enzimática (Xiong and Guan, 2012). Mientras que la mutante T3K626R mostró un alto grado de inestabilidad en solución, por lo cual no se pudo llevar adelante su estudio.

Por otra parte, debido a que los dominios lectina tienen la propiedad de reconocer carbohidratos, se estudió la importancia de este aminoácido en la capacidad de interacción de estas mutantes con el glicopéptido MUC1- α GalNAc. Aquí se pudo apreciar una interacción disminuída de las dos mutantes respecto a T3 salvaje. Esto demuestra que la K626 del dominio lectina de T3 es importante en el reconocimiento a glicanos, como así también, para las propiedades catalíticas de la enzima. Resultados similares fueron descritos previamente para la isoforma T2, donde una mutante en la lisina 521 del subdominio β (QKW) del dominio lectina, ppGalNAc-T2K521Q, mostró menor actividad

catalítica y propiedades de unión a glicanos alteradas respecto a la forma salvaje de la enzima (Zlocowski et al., 2013).

En ensayos de competencia en donde se evalúa la interacción de las T3s con el glicopéptido MUC1- α GalNAc en presencia de GalNAc y de glicósidos derivados de GalNAc, la mutante T3K626Q mostró una menor interacción con el glicopéptido cuando estaba presente GalNAc respecto a T3 salvaje; esto muestra que la mutación induce un reconocimiento levemente mayor por este azúcar. Pero las diferencias fueron más evidentes con la mutante T3K626A, la cual no pudo ser inhibida por GalNAc ni por ninguno de los glicósidos de GalNAc analizados. Este resultado indica que la mutación KxA produjo una perturbación mayor en el sitio de reconocimiento a glicanos respecto a la mutación KxQ, destacando la importancia del residuo K626 en dicho reconocimiento.

Trabajos de alineamiento de secuencia y modelado molecular han sugerido que existe un sitio putativo de unión a galactosa o GalNAc en el subdominio α de los dominios lectina de la mayoría de las ppGalNAc-Ts y de T3 en particular (Imberty et al., 1997; Kubota et al., 2006). Un estudio de mutagénesis sitio específica demostró que un residuo de asparagina altamente conservado dentro de este subdominio en la enzima T3 es clave para el reconocimiento de GalNAc (Yoshimura et al., 2012). Sin embargo, la mutación aquí estudiada localizada en el subdominio γ también mostró afectar tanto la actividad catalítica como la capacidad de unión a GalNAc.

Un resultado sorprendente se observó al analizar la interacción de estas enzimas a MUC1- α GalNAc en presencia de glicósidos de GlcNAc (UDP- α -GlcNAc, Me- α -GlcNAc y Me- β -GlcNAc). La interacción de T3 salvaje y la mutante T3K626Q con el glicopéptido se incrementó significativamente como consecuencia de la presencia de estos glicósidos en solución. La mutación K626Q afectó el grado de activación en la interacción de la enzima con MUC1- α GalNAc generada por los glicósidos de GlcNAc. Mientras que Me- α -GlcNAc es mayor activador que Me- β -GlcNAc (CA200: 10/3) en la interacción de T3 salvaje con MUC1- α GalNAc, la mutante T3K626Q mostró que el glicósido β es mayor activador que el α . Por otra parte, la mutación K626A anula la capacidad activadora de los glicósidos de GlcNAc. Estos resultados indican que la presencia de glicósidos de GlcNAc induce cambios en el dominio lectina de T3 que conducen al aumento del reconocimiento de residuos GalNAc. Las mutaciones en K626 de T3 alteran el efecto activador de glicósidos de GlcNAc en el reconocimiento de la enzima por MUC1- α GalNAc.

Este llamativo efecto activador de los glicósidos también se estudió en la interacción de T3s con los péptidos MUC1 y MUC2. Nuevamente, se pudo apreciar un efecto activador de la interacción, ahora tanto de T3 salvaje como de sus mutantes; evidenciando que las mutaciones aquí evaluadas no generaron cambios muy importantes en la capacidad de interacción con la porción peptídica, no así con el glicopéptido. Aquí se ensayaron glicósidos derivados de GalNAc y GlcNAc, y ambos se comportaron como activadores de la interacción con péptidos. Es de destacar que la capacidad de los glicósidos en aumentar la capacidad de interacción de T3s está condicionada por la secuencia peptídica. Por ejemplo, la mutante T3K626Q (que simula un sitio acetilado en K626) es activada en mayor medida por BzI- α -GalNAc cuando el péptido es MUC1; pero cuando el péptido es MUC2, la mutante es más sensible a la activación por Me- α -GlcNAc. Esto muestra que dicha mutante es críticamente influenciada por el tipo de glicósido en la interacción proteína-péptido en comparación a T3 salvaje, en cuyo caso la activación es similar para ambos glicósidos empleando uno u otro péptido.

Estos resultados sugieren la presencia de un sitio de unión a GlcNAc en el dominio lectina de T3 que no ha sido descrito hasta el momento. A su vez, la presencia de derivados de GlcNAc que estimulan el reconocimiento de T3 tanto por residuos GalNAc como por péptidos sin glicosilar, muestra a estos glicósidos como moléculas solubles que podrían modular la interacción de la enzima con potenciales sustratos glico/peptídicos. El residuo K626 por ser un sitio sensible a la influencia de derivados de GlcNAc plantea la posibilidad de que MPTs en esta lisina puedan afectar la interacción de T3 con glicoconjugados y proteínas.

Mutaciones en el gen de T3 (GALNT3) resultan en calcinosis tumoral familiar y Síndrome de Hiperfosfatemia e Hiperosteosis los cuales son desórdenes autosomales recesivos caracterizados por calcificación de los tejidos blandos e hiperfosfatemia. Un modelo de estudio de ratón para ambas enfermedades mostró que la mutación homocigota W589R en el dominio lectina de GALNT3 desencadenaba la patología (Duncan et al., 2011; Esapa et al., 2009). Este W589 es parte del motivo QXW de T3 (subdominio beta del dominio lectina) lo que muestra que una mutación puntual (mutación sin sentido que implica la sustitución del aminoácido) es suficiente para causar una patología, revelando la importancia del motivo QXW en la función de la proteína T3. En el presente trabajo de tesis se describe que mutaciones en QKW (subdominio γ del dominio lectina) de GALNT3

humano genera una proteína inestable (T3K626R) o proteínas con menor actividad GalNAc-tranferasas (T3K626Q y T3626A). Además, estas mutaciones afectaron la capacidad de reconocimiento a carbohidrato del dominio lectina, como así también, la interacción proteína-proteína del pliegue β -trefoil modulada por glicósidos. Todos estos resultados destacan la importante contribución del dominio lectina en la fisiología de T3 en humanos.

6. CONCLUSIONES

En cuanto a la influencia de los dominios lectina de ppGalNAc-Ts en la actividad de enzimas que intervienen en el inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc:

- Los dominios T3lec y T4lec se comportaron como inhibidores de la actividad GalNAc-transferasa de las enzimas ppGalNAc-T2 y T3 y su efecto inhibitor se encuentra influenciado por el péptido aceptor, la isoforma de ppGalNAc-T que cataliza la reacción enzimática y la isoforma que actúa como molécula reguladora.
- El efecto inhibitor fue corroborado utilizando el modelo celular de la línea celular CHO IdID.
- La inhibición está mediada por interacciones proteína-proteína entre el dominio lectina de una isoforma (dominio regulador) con el dominio catalítico de otra isoforma (dominio efector).
- El dominio T3lec y la enzima ppGalNAc-T3 (conteniendo los dominios catalítico y lectina) incrementaron la actividad Gal-transferasa de la enzima C1GalT.

En cuanto al efecto de la acetilación de la lisina 626 del dominio lectina de ppGalNAc-T3:

- Las mutaciones K626Q y K626A produjeron una disminución en la actividad enzimática y en el reconocimiento de O-glicanos de la enzima ppGalNAc-T3.
- La interacción de la enzima ppGalNAc-T3 con el glicopéptido MUC1- α GalNAc fue inhibida por glicósidos de GalNAc y activada por glicósidos de GlcNAc. A su vez, la presencia de los glicósidos Bzl- α -GalNAc y Me- α -GlcNAc incrementaron el reconocimiento de ppGalNAc-T3 hacia péptidos derivados de mucinas.
- La mutación K626Q modificó la capacidad de reconocimiento al glicopéptido MUC1- α GalNAc respecto a la enzima salvaje. Principalmente, en presencia de glicósidos de GlcNAc aumentó su interacción con el glicopéptido. Mientras que, K626A produjo la pérdida de la capacidad de activación o inhibición en la unión al glicopéptido en presencia de glicósidos.
- La mutación K626Q incrementó el grado de activación en el reconocimiento a sustratos peptídicos producido por la presencia de Bzl- α -GalNAc y Me- α -GlcNAc.

7. PERSPECTIVAS

Para que la interacción entre los dominios lectinas de ppGalNAc-Ts y los dominios catalíticos de glicosiltransferasas u otras enzimas residentes de Golgi ocurra deberían darse tres condiciones: en primer lugar, **proximidad física** por lo cual el par de proteínas debería encontrarse en el mismo compartimento del aparato de Golgi. En segundo lugar, **flexibilidad en las estructuras proteicas**, es decir, la región conectora que separa el dominio catalítico y lectina de ppGalNAc-Ts o la región tallo o “stem” podrían tener un rol importante en el acercamiento de un dominio lectina a un dominio catalítico de una misma isoforma o de una isoforma diferente o bien a otra glicosiltransferasa para formar un complejo homomérico o heteromérico, respectivamente. Por último, **complementariedad de secuencias**. Esto supone de acuerdo al modelo de reconocimiento de pares (Nilsson et al., 2009) la existencia de interacciones de baja afinidad, alta especificidad. Es decir, especificidad de reconocimiento de ciertos residuos o motivos estructurales entre una y otra proteína.

La primera condición de proximidad se cumple y de hecho, se ha comentado sobre la formación de complejos homo/heteroméricos. A su vez, se generan preguntas muy interesantes sobre las cuales seguir indagando como por ejemplo la importancia de la región tallo de estas ppGalNAc-Ts para la cual aún se desconocen sus funciones y presenta una gran variabilidad entre las distintas isoformas ya sea en longitud como en composición. La región tallo podría estar simulando un brazo flexible dando mayor libertad de movimiento al dominio lectina que se encuentra en el extremo carboxilo terminal de ppGalNAc-Ts. Esto mismo ocurre con la región conectora del dominio catalítico y lectina. Por último y no menos importante, esta tesis demostró que el dominio lectina de ppGalNAc-Ts participa en la formación de estos complejos homo/heteroméricos modulando en forma diferencial enzimas de la misma vía de síntesis. Se abre un camino para el estudio de las estructuras β -trefoil como plataformas que dictan la síntesis de glicanos. En el futuro resta por develar las secuencias o regiones de aminoácidos implicadas en estas interacciones.

En cuanto al segundo aspecto abordado en esta Tesis, el efecto de derivados de GlcNAc sobre la enzima T3 y su mutante T3K626Q será profundizado; por lo cual se plantean experimentos tendientes a responder si derivados de GlcNAc como el azúcar nucleótido UDP-GlcNAc que puede hallarse en el lumen del Golgi, podrían ejercer un efecto modulador sobre T3 o su mimético T3K626Q. Por último, y muy importante se buscará caracterizar un posible sitio de unión a GlcNAc en el dominio lectina de T3.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, F.P., F. Padilla, A. Cuesta, and A.E.C. López. 2003. Zoología aplicada. Ediciones Díaz de Santos.
- Aryal, R.P., T. Ju, and R.D. Cummings. 2014. Identification of a novel protein binding motif within the T-synthase for the molecular chaperone Cosmc. *Journal of Biological Chemistry*. 289:11630-11641.
- Aspberg, A., R. Miura, S. Bourdoulous, M. Shimonaka, D. Heinegård, M. Schachner, E. Ruoslahti, and Y. Yamaguchi. 1997. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:10116-10121.
- Azarkan, M., S. Martinez-Rodriguez, L. Buts, D. Baeyens-Volant, and A. Garcia-Pino. 2011. The plasticity of the β -trefoil fold constitutes an evolutionary platform for protease inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 286:43726-43734.
- Barratt, J., J. Feehally, and A.C. Smith. 2004. Pathogenesis of IgA nephropathy. *In* Seminars in nephrology. Vol. 24. Elsevier. 197-217.
- Beck, R., M. Ravet, F. Wieland, and D. Cassel. 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS letters*. 583:2701-2709.
- Beltrao, P., V. Albanèse, L.R. Kenner, D.L. Swaney, A. Burlingame, J. Villén, W.A. Lim, J.S. Fraser, J. Frydman, and N.J. Krogan. 2012. Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell*. 150:413-425.
- Bennett, E., H. Hassan, and H. Clausen. 1996. cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3. *The Journal of biological chemistry*. 271:17006.
- Bennett, E.P., H. Hassan, U. Mandel, M.A. Hollingsworth, N. Akisawa, Y. Ikematsu, G. Merckx, A.G. van Kessel, S. Olofsson, and H. Clausen. 1999. Cloning and Characterization of a Close Homologue of Human UDP-N-acetyl- α -d-galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-T3, Designated GalNAc-T6 EVIDENCE FOR GENETIC BUT NOT FUNCTIONAL REDUNDANCY. *Journal of Biological Chemistry*. 274:25362-25370.
- Bennett, E.P., U. Mandel, H. Clausen, T.A. Gerken, T.A. Fritz, and L.A. Tabak. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*. 22:736-756.

- Berger, E.G. 1999. Tn-syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1455:255-268.
- Berndsen, C.E., and J.M. Denu. 2008. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Current opinion in structural biology*. 18:682-689.
- Bond, M.R., and J.A. Hanover. 2015. A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of cell biology*. 208:869-880.
- Bray, S.J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 7:678-689.
- Brockhausen, I. 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports*. 7:599-604.
- Brockhausen, I., Schachter, H, Stanley, P. 2009. O-GalNAc Glycans. *In* Essentials of glycobiology. e.a. Varki A, editor. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 115–128.
- Bullen, J.W., J.L. Balsbaugh, D. Chanda, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, D. Neumann, and G.W. Hart. 2014. Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry*. 289:10592-10606.
- Byrd, J.C., and R.S. Bresalier. 2004. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 23:77-99.
- Clausen, H., and E.P. Bennett. 1996. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology*. 6:635.
- Costantini, C., M. Ko, M. Jonas, and L. Puglielli. 2007. A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem. J*. 407:383-395.
- Cummings, R., and M. Etzler. 2009. Chapter 45: antibodies and lectins in glycan analysis. *Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Press, Woodbury, New York*.
- Chai, W., C.T. Yuen, H. Kogelberg, R.A. Carruthers, R.U. Margolis, T. Feizi, and A.M. Lawson. 1999. High prevalence of 2-mono-and 2, 6-di-substituted Manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *European Journal of Biochemistry*. 263:879-888.
- Chia, J., K.M. Tham, D.J. Gill, E.A. Bard-Chapeau, and F.A. Bard. 2014. ERK8 is a negative regulator of O-GalNAc glycosylation and cell migration. *Elife*. 3:e01828.

- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, and M. Mann. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325:834-840.
- Choudhary, C., and M. Mann. 2010. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nature reviews Molecular cell biology*. 11:427-439.
- Choudhary, C., B.T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, and M. Mann. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15:536-550.
- Dalziel, M., C. Whitehouse, I. McFarlane, I. Brockhausen, S. Gschmeissner, T. Schwientek, H. Clausen, J.M. Burchell, and J. Taylor-Papadimitriou. 2001. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *Journal of Biological Chemistry*. 276:11007-11015.
- de Bernabé, D.B.-V., K.-i. Inamori, T. Yoshida-Moriguchi, C.J. Weydert, H.A. Harper, T. Willer, M.D. Henry, and K.P. Campbell. 2009. Loss of α -dystroglycan laminin binding in epithelium-derived cancers is caused by silencing of LARGE. *Journal of Biological Chemistry*. 284:11279-11284.
- Dempski, R.E., and B. Imperiali. 2002. Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Current opinion in chemical biology*. 6:844-850.
- Dennis, J.W., K.S. Lau, M. Demetriou, and I.R. Nabi. 2009. Adaptive Regulation at the Cell Surface by N-Glycosylation. *Traffic*. 10:1569-1578.
- Dias, W.B., W.D. Cheung, and G.W. Hart. 2012. O-GlcNAcylation of kinases. *Biochemical and biophysical research communications*. 422:224-228.
- Dill, K., S. Hu, E. Berman, A.A. Pavia, and J.M. Lacombe. 1990. One- and two-dimensional NMR studies of the N-terminal portion of glycophorin A at 11.7 Tesla. *Journal of protein chemistry*. 9:129-136.
- Ding, Y., C.D. Dellisanti, M.H. Ko, C. Czajkowski, and L. Puglielli. 2014. The Endoplasmic Reticulum-based Acetyltransferases, ATase1 and ATase2, Associate with the Oligosaccharyltransferase to Acetylate Correctly Folded Polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*. 289:32044-32055.
- Ding, Y., M.H. Ko, M. Pehar, F. Kotch, N.R. Peters, Y. Luo, S.M. Salamat, and L. Puglielli. 2012. Biochemical inhibition of the acetyltransferases ATase1 and ATase2 reduces β -secretase (BACE1) levels and A β generation. *Journal of Biological Chemistry*. 287:8424-8433.
- Dodd, R.B., and K. Drickamer. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*. 11:71R-79R.

- Duncan, E.L., P. Danoy, J.P. Kemp, P.J. Leo, E. McCloskey, G.C. Nicholson, R. Eastell, R.L. Prince, J.A. Eisman, and G. Jones. 2011. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet.* 7:e1001372.
- Dyda, F., D.C. Klein, and A.B. Hickman. 2000. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annual review of biophysics and biomolecular structure.* 29:81-103.
- Dyrskjøt, L., M.S. Ostensfeld, J.B. Bramsen, A.N. Silaharoglu, P. Lamy, R. Ramanathan, N. Fristrup, J.L. Jensen, C.L. Andersen, and K. Zieger. 2009. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer research.* 69:4851-4860.
- Elhammer, A.P., R.A. Poorman, E. Brown, L.L. Maggiora, J. Hoogerheide, and F. Kezdy. 1993. The specificity of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase as inferred from a database of in vivo substrates and from the in vitro glycosylation of proteins and peptides. *Journal of Biological Chemistry.* 268:10029-10038.
- Ellies, L.G., S. Tsuboi, B. Petryniak, J.B. Lowe, M. Fukuda, and J.D. Marth. 1998. Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity.* 9:881-890.
- Endo, T. 1999. O-mannosyl glycans in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1473:237-246.
- Esapa, C., R. Head, C. Chan, E. Crane, M. Cheeseman, T. Hough, E. McNally, A. Carr, G. Thomas, and M. Brown. 2009. A mouse with a Trp589Arg mutation in N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (Galnt3) provides a model for familial tumoural calcinosis.
- Finkel, T., C.-X. Deng, and R. Mostoslavsky. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature.* 460:587-591.
- Fritz, T.A., J.H. Hurley, L.-B. Trinh, J. Shiloach, and L.A. Tabak. 2004. The beginnings of mucin biosynthesis: The crystal structure of UDP-GalNAc: polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:15307-15312.
- Fritz, T.A., J. Raman, and L.A. Tabak. 2006. Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc: polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Journal of Biological Chemistry.* 281:8613-8619.

- Fujiki, R., T. Chikanishi, W. Hashiba, H. Ito, I. Takada, R.G. Roeder, H. Kitagawa, and S. Kato. 2009. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature*. 459:455-459.
- Fujimoto, Z., A. Kuno, S. Kaneko, S. Yoshida, H. Kobayashi, I. Kusakabe, and H. Mizuno. 2000. Crystal structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -xylanase containing xylan-binding domain. *Journal of molecular biology*. 300:575-585.
- Garner, B., A.H. Merry, L. Royle, D.J. Harvey, P.M. Rudd, and J. Thillet. 2001. Structural Elucidation of the N-andO-Glycans of Human Apolipoprotein (a) ROLE OF O-GLYCANS IN CONFERRING PROTEASE RESISTANCE. *Journal of Biological Chemistry*. 276:22200-22208.
- Gaziel-Sovran, A., M.F. Segura, R. Di Micco, M.K. Collins, D. Hanniford, E.V.-S. de Miera, J.F. Rakus, J.F. Dankert, S. Shang, and R.S. Kerbel. 2011. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer cell*. 20:104-118.
- Gerken, T.A., O. Jamison, C.L. Perrine, J.C. Collette, H. Moinova, L. Ravi, S.D. Markowitz, W. Shen, H. Patel, and L.A. Tabak. 2011. Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*. 286:14493-14507.
- Gerken, T.A., L. Revoredo, J.J. Thome, L.A. Tabak, M.B. Vester-Christensen, H. Clausen, G.K. Gahlay, D.L. Jarvis, R.W. Johnson, and H.A. Moniz. 2013. The lectin domain of the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases (ppGalNAc Ts) acts as a switch directing glycopeptide substrate glycosylation in an N-or C-terminal direction, further controlling mucin type O-glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*. 288:19900-19914.
- Gill, D.J., H. Clausen, and F. Bard. 2011. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends in cell biology*. 21:149-158.
- Gill, D.J., K.M. Tham, J. Chia, S.C. Wang, C. Steentoft, H. Clausen, E.A. Bard-Chapeau, and F.A. Bard. 2013. Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:E3152-E3161.
- Giraud, C.G., J.L. Daniotti, and H.J. Maccioni. 2001. Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98:1625-1630.
- Giraud, C.G., and H.J. Maccioni. 2003. Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278:40262-40271.

- Gnad, F., S. Ren, C. Choudhary, J. Cox, and M. Mann. 2010. Predicting post-translational lysine acetylation using support vector machines. *Bioinformatics*. 26:1666-1668.
- Guan, K.-L., and Y. Xiong. 2011. Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends in biochemical sciences*. 36:108-116.
- Gurvich, N., F. Perna, A. Farina, F. Voza, S. Menendez, J. Hurwitz, and S.D. Nimer. 2010. L3MBTL1 polycomb protein, a candidate tumor suppressor in del (20q12) myeloid disorders, is essential for genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:22552-22557.
- Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson. 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*. 10:32-42.
- Hagen, F., B. Van Wuyckhuysse, and L. Tabak. 1993. Purification, cloning, and expression of a bovine UDP-GalNAc: polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 268:18960-18965.
- Hagen, F.K., B. Hazes, R. Raffo, and L.A. Tabak. 1999. Structure-Function Analysis of the UDP-N-acetyl-d-galactosamine: PolypeptideN-acetylgalactosaminyltransferase ESSENTIAL RESIDUES LIE IN A PREDICTED ACTIVE SITE CLEFT RESEMBLING A LACTOSE REPRESSOR FOLD. *Journal of Biological Chemistry*. 274:6797-6803.
- Hang, H.C., and C.R. Bertozzi. 2005. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 13:5021-5034.
- Hanisch, F.-G. 2001. O-glycosylation of the mucin type. *Biological chemistry*. 382:143-149.
- Harris, R.J., and M.W. Spellman. 1993. O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology*. 3:219-224.
- Hart, G.W. 2014. Three decades of research on O-GlcNAcylation—a major nutrient sensor that regulates signaling, transcription and cellular metabolism. *Frontiers in endocrinology*. 5.
- Hart, G.W., C. Slawson, G. Ramirez-Correa, and O. Lagerlof. 2011. Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annual Review of Biochemistry*. 80:825-858.
- Hashimoto, K., T. Tokimatsu, S. Kawano, A.C. Yoshizawa, S. Okuda, S. Goto, and M. Kanehisa. 2009. Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional characterization of glycans. *Carbohydrate research*. 344:881-887.

- Hassinen, A., F.M. Pujol, N. Kokkonen, C. Pieters, M. Kihlström, K. Korhonen, and S. Kellokumpu. 2011. Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 286:38329-38340.
- Hassinen, A., A. Rivinoja, A. Kauppila, and S. Kellokumpu. 2010. Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *Journal of Biological Chemistry*. 285:17771-17777.
- Hazes, B. 1996. The (QxW) 3 domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Science*. 5:1490-1501.
- Hennet, T., and J. Cabalzar. 2015. Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycolyx dysfunction. *Trends in biochemical sciences*.
- Hirschey, M., T. Shimazu, J.-Y. Huang, B. Schwer, and E. Verdin. 2011. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Vol. 76. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 267-277.
- Hofsteenge, J., K.G. Huwiler, B. Macek, D. Hess, J. Lawler, D.F. Mosher, and J. Peter-Katalinic. 2001. C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *Journal of Biological Chemistry*. 276:6485-6498.
- Homa, F., T. Hollander, D. Lehman, D. Thomsen, and A.P. Elhammer. 1993. Isolation and expression of a cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 268:12609-12616.
- Hooper, N., E. Karran, and A. Turner. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321:265-279.
- Huang, H.-H., A. Hassinen, S. Sundaram, A.-N. Spiess, S. Kellokumpu, and P. Stanley. 2015. Gnt1IP-L specifically inhibits MGAT1 in the Golgi via its luminal domain. *eLife*. 4:e08916.
- Huppke, P., C. Brendel, V. Kalscheuer, G.C. Korenke, I. Marquardt, P. Freisinger, J. Christodoulou, M. Hillebrand, G. Pitelet, and C. Wilson. 2012. Mutations in SLC33A1 cause a lethal autosomal-recessive disorder with congenital cataracts, hearing loss, and low serum copper and ceruloplasmin. *The American Journal of Human Genetics*. 90:61-68.
- Iacobini, C., L. Amadio, G. Oddi, C. Ricci, P. Barsotti, S. Missori, M. Sorcini, U. Di Mario, F. Pricci, and G. Pugliese. 2003. Role of galectin-3 in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 14:S264-S270.

- Iakoucheva, L.M., P. Radivojac, C.J. Brown, T.R. O'Connor, J.G. Sikes, Z. Obradovic, and A.K. Dunker. 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic acids research*. 32:1037-1049.
- Imberty, A., V. Piller, F. Piller, and C. Breton. 1997. Fold recognition and molecular modeling of a lectin-like domain in UDP-GalNac: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Protein engineering*. 10:1353-1356.
- Iwai, T., N. Inaba, A. Naundorf, Y. Zhang, M. Gotoh, H. Iwasaki, T. Kudo, A. Togayachi, Y. Ishizuka, and H. Nakanishi. 2002. Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc: GalNAc-peptide β 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans. *Journal of Biological Chemistry*. 277:12802-12809.
- Jensen, O.N. 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7:391-403.
- Jonas, M.C., M. Pehar, and L. Puglielli. 2010. AT-1 is the ER membrane acetyl-CoA transporter and is essential for cell viability. *Journal of cell science*. 123:3378-3388.
- Jørgensen, C.S., N.H. Heegaard, A. Holm, P. Højrup, and G. Houen. 2000. Polypeptide binding properties of the chaperone calreticulin. *European Journal of Biochemistry*. 267:2945-2954.
- Ju, T., K. Brewer, A. D'Souza, R.D. Cummings, and W.M. Canfield. 2002a. Cloning and expression of human core 1 β 1, 3-galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 277:178-186.
- Ju, T., and R.D. Cummings. 2002. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 β 3-galactosyltransferase. *Proceedings of the national academy of sciences*. 99:16613-16618.
- Ju, T., and R.D. Cummings. 2005. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature*. 437:1252-1252.
- Ju, T., R.D. Cummings, and W.M. Canfield. 2002b. Purification, characterization, and subunit structure of rat core 1 β 1, 3-galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 277:169-177.
- Ju, T., G.S. Lanneau, T. Gautam, Y. Wang, B. Xia, S.R. Stowell, M.T. Willard, W. Wang, J.Y. Xia, and R.E. Zuna. 2008. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Research*. 68:1636-1646.
- Julien, S., E. Adriaenssens, K. Ottenberg, A. Furlan, G. Courtand, A.-S. Vercoutter-Edouart, F.-G. Hanisch, P. Delannoy, and X. Le Bourhis. 2006. ST6GalNAc I expression in

MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 16:54-64.

Kahai, S., S.-C. Lee, D.Y. Lee, J. Yang, M. Li, C.-H. Wang, Z. Jiang, Y. Zhang, C. Peng, and B.B. Yang. 2009. MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7. *PLoS One*. 4:e7535.

Kato, K., C. Jeanneau, M.A. Tarp, A. Benet-Pagès, B. Lorenz-Depiereux, E.P. Bennett, U. Mandel, T.M. Strom, and H. Clausen. 2006. Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*. 281:18370-18377.

Kato, K., H. Takeuchi, A. Kanoh, U. Mandel, H. Hassan, H. Clausen, and T. Irimura. 2001. N-acetylgalactosamine incorporation into a peptide containing consecutive threonine residues by UDP-N-acetyl-D-galactosaminide: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*. 11:821-829.

Kelleher, D.J., and R. Gilmore. 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*. 16:47R-62R.

Kellokumpu, S., A. Hassinen, and T. Glumoff. 2015. Glycosyltransferase complexes in eukaryotes: long-known, prevalent but still unrecognized. *Cellular and Molecular Life Sciences*:1-21.

Kim, G.-W., and X.-J. Yang. 2011. Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends in biochemical sciences*. 36:211-220.

Kim, S.C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, and L. Xiao. 2006. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular cell*. 23:607-618.

Kim, Y.J., and A. Varki. 1997. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate journal*. 14:569-576.

Kim, Y.S., J. Gum Jr, and I. Brockhausen. 1996. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconjugate journal*. 13:693-707.

Kingsley, D.M., K.F. Kozarsky, L. Hobbie, and M. Krieger. 1986. Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-GalUDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell*. 44:749-759.

Kitazume, S., Y. Tachida, R. Oka, K. Shirotani, T.C. Saido, and Y. Hashimoto. 2001. Alzheimer's β -secretase, β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98:13554-13559.

- Ko, M.H., and L. Puglielli. 2009. Two endoplasmic reticulum (ER)/ER Golgi intermediate compartment-based lysine acetyltransferases post-translationally regulate BACE1 levels. *Journal of Biological Chemistry*. 284:2482-2492.
- Kozarsky, K., D. Kingsley, and M. Krieger. 1988. Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85:4335-4339.
- Kroes, R.A., G. Dawson, and J.R. Moskal. 2007. Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *Journal of neurochemistry*. 103:14-24.
- Kubota, T., T. Shiba, S. Sugioka, S. Furukawa, H. Sawaki, R. Kato, S. Wakatsuki, and H. Narimatsu. 2006. Structural basis of carbohydrate transfer activity by human UDP-GalNAc: polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10). *Journal of molecular biology*. 359:708-727.
- Kureishy, N., V. Sapountzi, S. Prag, N. Anilkumar, and J.C. Adams. 2002. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays*. 24:350-361.
- Lalioi, V.S., S. Vergarajauregui, A. Villasante, D. Pulido, and I.V. Sandoval. 2013. C6orf89 encodes three distinct HDAC enhancers that function in the nucleolus, the Golgi and the midbody. *Journal of cellular physiology*. 228:1907-1921.
- Lang, T., G.C. Hansson, and T. Samuelsson. 2007. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:16209-16214.
- Lee, K.K., and J.L. Workman. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews Molecular cell biology*. 8:284-295.
- Li, J., T. Yen, M. Allende, R. Joshi, J. Cai, W. Pierce, E. Jaskiewicz, D. Darling, B. Macher, and W. Young Jr. 2000. Disulfide bonds of GM2 synthase homodimers. Antiparallel orientation of the catalytic domains. *The Journal of biological chemistry*. 275:41476.
- Li, T., Y. Du, L. Wang, L. Huang, W. Li, M. Lu, X. Zhang, and W.-G. Zhu. 2012. Characterization and prediction of lysine (K)-acetyl-transferase specific acetylation sites. *Molecular & Cellular Proteomics*. 11:M111. 011080.
- Li, Y., M. Wang, H. Wang, H. Tan, Z. Zhang, G.I. Webb, and J. Song. 2014. Accurate in silico identification of species-specific acetylation sites by integrating protein sequence-derived and functional features. *Scientific reports*. 4.
- Lin, P., J. Li, Q. Liu, F. Mao, J. Li, R. Qiu, H. Hu, Y. Song, Y. Yang, and G. Gao. 2008a. A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42). *The American Journal of Human Genetics*. 83:752-759.

- Lin, Y.R., B. Reddy, and K.D. Irvine. 2008b. Requirement for a core 1 galactosyltransferase in the *Drosophila* nervous system. *Developmental dynamics*. 237:3703-3714.
- Liu, C., J.A. Gaspar, H.J. Wong, and E.M. Meiering. 2002. Conserved and nonconserved features of the folding pathway of hisactophilin, a β -trefoil protein. *Protein science*. 11:669-679.
- Liu, K., A.J. Paterson, F. Zhang, J. McAndrew, K.I. Fukuchi, J.M. Wyss, L. Peng, Y. Hu, and J.E. Kudlow. 2004. Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. *Journal of neurochemistry*. 89:1044-1055.
- Liu, Z., Y. Wang, T. Gao, Z. Pan, H. Cheng, Q. Yang, Z. Cheng, A. Guo, J. Ren, and Y. Xue. 2014. CPLM: a database of protein lysine modifications. *Nucleic acids research*. 42:D531-D536.
- Loo, L.W., M. Tiirikainen, I. Cheng, A. Lum-Jones, A. Seifried, J.M. Church, R. Gryfe, D.J. Weisenberger, N.M. Lindor, and S. Gallinger. 2013. Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 52:450-466.
- Lundby, A., K. Lage, B.T. Weinert, D.B. Bekker-Jensen, A. Secher, T. Skovgaard, C.D. Kelstrup, A. Dmytriyev, C. Choudhary, and C. Lundby. 2012. Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell reports*. 2:419-431.
- Luo, Y., K. Koles, W. Vorndam, R.S. Haltiwanger, and V.M. Panin. 2006a. Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats. *Journal of Biological Chemistry*. 281:9393-9399.
- Luo, Y., A. Nita-Lazar, and R.S. Haltiwanger. 2006b. Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats. *Journal of Biological Chemistry*. 281:9385-9392.
- Mak, A.B., M. Pehar, A.M. Nixon, R.A. Williams, A.C. Uetrecht, L. Puglielli, and J. Moffat. 2014. Post-translational regulation of CD133 by ATase1/ATase2-mediated lysine acetylation. *Journal of molecular biology*. 426:2175-2182.
- Manya, H., A. Chiba, A. Yoshida, X. Wang, Y. Chiba, Y. Jigami, R.U. Margolis, and T. Endo. 2004. Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:500-505.
- Manya, H., T. Suzuki, K. Akasaka-Manya, H.-K. Ishida, M. Mizuno, Y. Suzuki, T. Inazu, N. Dohmae, and T. Endo. 2007. Regulation of Mammalian Protein O-

Mannosylation PREFERENTIAL AMINO ACID SEQUENCE FOR O-MANNOSE MODIFICATION. *Journal of Biological Chemistry*. 282:20200-20206.

- Masumoto, H., D. Hawke, R. Kobayashi, and A. Verreault. 2005. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature*. 436:294-298.
- Matsuura, A., M. Ito, Y. Sakaidani, T. Kondo, K. Murakami, K. Furukawa, D. Nadano, T. Matsuda, and T. Okajima. 2008. O-linked N-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 283:35486-35495.
- McBride, D.S., I. Brockhausen, and F.W. Kan. 2005. Detection of glycosyltransferases in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviduct and evidence for the regulation of O-glycan biosynthesis during the estrous cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1721:107-115.
- McCormick, C., G. Duncan, K.T. Goutsos, and F. Tufaro. 2000. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:668-673.
- Moloney, D.J., V.M. Panin, S.H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K.D. Irvine, and R.S. Haltiwanger. 2000. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature*. 406:369-375.
- Mukasa, R., T. Homma, T. Ohtsuki, O. Hosono, A. Souta, T. Kitamura, M. Fukuda, S. Watanabe, and C. Morimoto. 1999. Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *International immunology*. 11:259-268.
- Mukhopadhyay, D. 2000. The Molecular Evolutionary History of a Winged Bean α -Chymotrypsin Inhibitor and Modeling of Its Mutations Through Structural Analyses. *Journal of molecular evolution*. 50:214-223.
- Müller, R., A.J. Hülsmeier, F. Altmann, K. Ten Hagen, M. Tiemeyer, and T. Hennet. 2005. Characterization of mucin-type core-1 β 1-3 galactosyltransferase homologous enzymes in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal*. 272:4295-4305.
- Muntoni, F., S. Torelli, and M. Brockington. 2008. Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics*. 5:627-632.
- Murzin, A.G., A.M. Lesk, and C. Chothia. 1992. β -trefoil fold: patterns of structure and sequence in the kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *Journal of molecular biology*. 223:531-543.

- Narimatsu, Y., Y. Ikehara, H. Iwasaki, C. Nonomura, T. Sato, H. Nakanishi, and H. Narimatsu. 2008. Immunocytochemical analysis for intracellular dynamics of C1GalT associated with molecular chaperone, Cosmc. *Biochemical and biophysical research communications*. 366:199-205.
- Nguyen, J.T., D.P. Evans, M. Galvan, K.E. Pace, D. Leitenberg, T.N. Bui, and L.G. Baum. 2001. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *The Journal of Immunology*. 167:5697-5707.
- Nilsson, J., J. Nilsson, G. Larson, and A. Grahn. 2010. Characterization of Site Specific O-Glycan Structures within the Mucin-Like Domain of α -Dystroglycan from Human Skeletal Muscle. *Glycobiology*:cwq082.
- Nilsson, T., C.E. Au, and J.J. Bergeron. 2009. Sorting out glycosylation enzymes in the Golgi apparatus. *FEBS letters*. 583:3764-3769.
- Nilsson, T., M. Hoe, P. Slusarewicz, C. Rabouille, R. Watson, F. Hunte, G. Watzele, E. Berger, and G. Warren. 1994. Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *The EMBO journal*. 13:562.
- Nilsson, T., C. Rabouille, N. Hui, R. Watson, and G. Warren. 1996. The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells. *Journal of Cell Science*. 109:1975-1989.
- Nilsson, T., P. Slusarewicz, M.H. Hoe, and G. Warren. 1993. Kin recognition: a model for the retention of Golgi enzymes. *FEBS letters*. 330:1-4.
- Nomoto, M., H. Izumi, T. Ise, K. Kato, H. Takano, G. Nagatani, K. Shibao, R. Ohta, T. Imamura, and M. Kuwano. 1999. Structural basis for the regulation of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-3 gene expression in adenocarcinoma cells. *Cancer research*. 59:6214-6222.
- O'Connell, B., L.A. Tabak, and N. Ramasubbu. 1991. The influence of flanking sequences on O-glycosylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 180:1024-1030.
- Okajima, T., A. Xu, L. Lei, and K.D. Irvine. 2005. Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science*. 307:1599-1603.
- Ono, M., and S. Hakomori. 2003. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconjugate journal*. 20:71-78.
- Opat, A., F. Houghton, and P. Gleeson. 2000. Medial Golgi but not late Golgi glycosyltransferases exist as high molecular weight complexes. Role of luminal

- domain in complex formation and localization. *The Journal of biological chemistry*. 275:11836-11845.
- Opat, A.S., C. van Vliet, and P.A. Gleeson. 2001. Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes. *Biochimie*. 83:763-773.
- Ornitz, D.M., and N. Itoh. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2:1-12.
- Özcan, S., S.S. Andrali, and J.E. Cantrell. 2010. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 1799:353-364.
- Pak, J.E. 2010. Structural and Functional Characterization of Leukocyte Core 2 β 1,6Nacetylglucosaminyltransferase *In* Department of Molecular Genetics. Vol. Thesis for the degree of Doctor of Philosoph. University of Toronto.
- Pedersen, J.W., E.P. Bennett, T.-B.S. Katrine, M. Meldal, A.P. Holmér, O. Blixt, E. Cló, S.B. Levery, H. Clausen, and H.H. Wandall. 2011. Lectin domains of polypeptide GalNAc transferases exhibit glycopeptide binding specificity. *Journal of Biological Chemistry*. 286:32684-32696.
- Pehar, M., M.C. Jonas, T.M. Hare, and L. Puglielli. 2012a. SLC33A1/AT-1 protein regulates the induction of autophagy downstream of IRE1/XBP1 pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 287:29921-29930.
- Pehar, M., M. Lehnus, A. Karst, and L. Puglielli. 2012b. Proteomic assessment shows that many endoplasmic reticulum (ER)-resident proteins are targeted by Nε-lysine acetylation in the lumen of the organelle and predicts broad biological impact. *Journal of Biological Chemistry*. 287:22436-22440.
- Pehar, M., and L. Puglielli. 2013. Lysine acetylation in the lumen of the ER: a novel and essential function under the control of the UPR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1833:686-697.
- Perrine, C.L., A. Ganguli, P. Wu, C.R. Bertozzi, T.A. Fritz, J. Raman, L.A. Tabak, and T.A. Gerken. 2009. Glycopeptide-preferring polypeptide GalNAc transferase 10 (ppGalNAc T10), involved in mucin-type O-glycosylation, has a unique GalNAc-O-Ser/Thr-binding site in its catalytic domain not found in ppGalNAc T1 or T2. *Journal of Biological Chemistry*. 284:20387-20397.
- Piller, F., V. Piller, R.I. Fox, and M. Fukuda. 1988. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 263:15146-15150.
- Pinho, S., N.T. Marcos, B. Ferreira, A.S. Carvalho, M.J. Oliveira, F. Santos-Silva, A. Harduin-Lepers, and C.A. Reis. 2007. Biological significance of cancer-associated sialyl-

Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer letters*. 249:157-170.

- Polevoda, B., and F. Sherman. 2003. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *Journal of molecular biology*. 325:595-622.
- Ponting, C.P., and R.B. Russell. 2000. Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all β -trefoil proteins. *Journal of molecular biology*. 302:1041-1047.
- Rabouille, C., N. Hui, F. Hunte, R. Kieckbusch, E.G. Berger, G. Warren, and T. Nilsson. 1995. Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *Journal of cell science*. 108:1617-1627.
- Raman, J., T.A. Fritz, T.A. Gerken, O. Jamison, D. Live, M. Liu, and L.A. Tabak. 2008. The catalytic and lectin domains of UDP-GalNAc: polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase function in concert to direct glycosylation site selection. *Journal of Biological Chemistry*. 283:22942-22951.
- Ranuncolo, S.M., S. Ghosh, J.A. Hanover, G.W. Hart, and B.A. Lewis. 2012. Evidence of the involvement of O-GlcNAc-modified human RNA polymerase II CTD in transcription in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 287:23549-23561.
- Roth, J., Y. Wang, A.E. Eckhardt, and R.L. Hill. 1994. Subcellular localization of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-mediated O-glycosylation reaction in the submaxillary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91:8935-8939.
- Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry*. 70:81-120.
- Rottger, S., J. White, H.H. Wandall, J.-C. Olivo, A. Stark, E.P. Bennett, C. Whitehouse, E.G. Berger, H. Clausen, and T. Nilsson. 1998. Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science*. 111:45-60.
- Ruan, H.-B., Y. Nie, and X. Yang. 2013. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination. *Molecular & Cellular Proteomics*. 12:3489-3497.
- Rutenber, E., M. Ready, and J.D. Robertus. 1987. Structure and evolution of ricin B chain. *Nature*. 326:624-626.

- Sakaidani, Y., K. Furukawa, and T. Okajima. 2010. Chapter Sixteen-O-GlcNAc Modification of the Extracellular Domain of Notch Receptors. *Methods in enzymology*. 480:355-373.
- Schjoldager, K.T.-B.G., M.B. Vester-Christensen, E.P. Bennett, S.B. Levery, T. Schwientek, W. Yin, O. Blixt, and H. Clausen. 2010. O-glycosylation modulates proprotein convertase activation of angiopoietin-like protein 3-possible role of polypeptide GalNAc-transferase-2 in regulation of concentrations of plasma lipids. *Journal of Biological Chemistry*:jbc. M110. 156950.
- Schwer, B., J. Bunkenborg, R.O. Verdin, J.S. Andersen, and E. Verdin. 2006. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:10224-10229.
- Schwientek, T., E.P. Bennett, C. Flores, J. Thacker, M. Hollmann, C.A. Reis, J. Behrens, U. Mandel, B. Keck, and M.A. Schäfer. 2002. Functional Conservation of Subfamilies of Putative UDP-N-acetylgalactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and Mammals ONE SUBFAMILY COMPOSED OF I (2) 35Aa IS ESSENTIAL IN *DROSOPHILA*. *Journal of Biological Chemistry*. 277:22623-22638.
- Shahbazian, M.D., and M. Grunstein. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76:75-100.
- Smalheiser, N.R., S.M. Haslam, M. Sutton-Smith, H.R. Morris, and A. Dell. 1998. Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *Journal of Biological Chemistry*. 273:23698-23703.
- Smith, R.D., and V.V. Lupashin. 2008. Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation. *Carbohydrate research*. 343:2024-2031.
- Soufi, B., N.C. Soares, V. Ravikumar, and B. Macek. 2012. Proteomics reveals evidence of cross-talk between protein modifications in bacteria: focus on acetylation and phosphorylation. *Current opinion in microbiology*. 15:357-363.
- Springer, G.F. 1984. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*. 224:1198-1206.
- Stalnaker, S.H., K. Aoki, J.-M. Lim, M. Porterfield, M. Liu, J.S. Satz, S. Buskirk, Y. Xiong, P. Zhang, and K.P. Campbell. 2011a. Glycomic analyses of mouse models of congenital muscular dystrophy. *Journal of Biological Chemistry*. 286:21180-21190.
- Stalnaker, S.H., S. Hashmi, J.-M. Lim, K. Aoki, M. Porterfield, G. Gutierrez-Sanchez, J. Wheeler, J.M. Ervasti, C. Bergmann, and M. Tiemeyer. 2010. Site mapping and

characterization of O-glycan structures on α -dystroglycan isolated from rabbit skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 285:24882-24891.

Stalnaker, S.H., R. Stuart, and L. Wells. 2011b. Mammalian O-mannosylation: unsolved questions of structure/function. *Current opinion in structural biology*. 21:603-609.

Stanley, P. 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3:a005199.

Stanley, P., Schachter, H, Taniguchi N. 2009. N-Glycans. In *Essentials of glycobiology*. e.a. Varki A, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY. 101–114.

Steenfot, C., S.Y. Vakhrushev, H.J. Joshi, Y. Kong, M.B. Vester-Christensen, T. Katrine, B. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, and N.B. Pedersen. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO journal*. 32:1478-1488.

Sun, Q., T. Ju, and R.D. Cummings. 2011. The transmembrane domain of the molecular chaperone Cosmc directs its localization to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 286:11529-11542.

Suo, S.-B., J.-D. Qiu, S.-P. Shi, X.-Y. Sun, S.-Y. Huang, X. Chen, and R.-P. Liang. 2012. Position-specific analysis and prediction for protein lysine acetylation based on multiple features.

Szul, T., and E. Sztul. 2011. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology*. 26:348-364.

Taylor, M.E., and K. Drickamer. 2006. Introduction to glycobiology.

Ten Hagen, K.G., T.A. Fritz, and L.A. Tabak. 2003. All in the family: the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*. 13:1R-16R.

Teslovich, T.M., K. Musunuru, A.V. Smith, A.C. Edmondson, I.M. Stylianou, M. Koseki, J.P. Pirruccello, S. Ripatti, D.I. Chasman, and C.J. Willer. 2010. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 466:707-713.

Topaz, O., D.L. Shurman, R. Bergman, M. Indelman, P. Ratajczak, M. Mizrachi, Z. Khamaysi, D. Behar, D. Petronius, and V. Friedman. 2004. Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nature genetics*. 36:579-581.

Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, and J. Marth. 1998. *Essentials of glycobiology*, 1999.

- Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. Hart, and M. Etzler. 2009. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Vavasseur, F., J.-M. Yang, K. Dole, H. Paulsen, and I. Brockhausen. 1995. Synthesis of O-glycan core 3: Characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R β 3-N-acetylglucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology*. 5:351-357.
- Vetting, M.W., L.P.S. de Carvalho, M. Yu, S.S. Hegde, S. Magnet, S.L. Roderick, and J.S. Blanchard. 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Archives of biochemistry and biophysics*. 433:212-226.
- Wacker, M., D. Linton, P.G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S.M. Haslam, S.J. North, M. Panico, H.R. Morris, A. Dell, and B.W. Wren. 2002. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*. 298:1790-1793.
- Wandall, H.H., F. Irazoqui, M.A. Tarp, E.P. Bennett, U. Mandel, H. Takeuchi, K. Kato, T. Irimura, G. Suryanarayanan, and M.A. Hollingsworth. 2007. The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation. *Glycobiology*. 17:374-387.
- Wang, L., Y. Du, M. Lu, and T. Li. 2012. ASEB: a web server for KAT-specific acetylation site prediction. *Nucleic acids research*. 40:W376-W379.
- Wang, Y., T. Ju, X. Ding, B. Xia, W. Wang, L. Xia, M. He, and R.D. Cummings. 2010. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:9228-9233.
- Wang, Y., L. Shao, S. Shi, R.J. Harris, M.W. Spellman, P. Stanley, and R.S. Haltiwanger. 2001. Modification of Epidermal Growth Factor-like Repeats with O-Fucose MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF A NOVEL GDP-FUCOSE PROTEINO-FUCOSYLTRANSFERASE. *Journal of Biological Chemistry*. 276:40338-40345.
- Weinert, B.T., V. Iesmantavicius, T. Moustafa, C. Schölz, S.A. Wagner, C. Magnes, R. Zechner, and C. Choudhary. 2014. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular systems biology*. 10:716.
- Weinert, B.T., V. Iesmantavicius, S.A. Wagner, C. Schölz, B. Gummesson, P. Beli, T. Nyström, and C. Choudhary. 2013. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Molecular cell*. 51:265-272.
- Weinert, B.T., S.A. Wagner, H. Horn, P. Henriksen, W.R. Liu, J.V. Olsen, L.J. Jensen, and C. Choudhary. 2011. Proteome-wide mapping of the *Drosophila* acetylome

demonstrates a high degree of conservation of lysine acetylation. *Science signaling*. 4:ra48-ra48.

- White, T., E.P. Bennett, K. Takio, T. Sørensen, N. Bonding, and H. Clausen. 1995. Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 270:24156-24165.
- Wilson, I., Y. Gavel, and G. Von Heijne. 1991. Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochem. J.* 275:529-534.
- Wilson, J.J., and R.A. Kovall. 2006. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell*. 124:985-996.
- Xia, L., T. Ju, A. Westmuckett, G. An, L. Ivanciu, J.M. McDaniel, F. Lupu, R.D. Cummings, and R.P. McEver. 2004. Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. *The Journal of cell biology*. 164:451-459.
- Xiong, Y., and K.-L. Guan. 2012. Mechanistic insights into the regulation of metabolic enzymes by acetylation. *The Journal of cell biology*. 198:155-164.
- Yang, X.-J., and E. Seto. 2008. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Molecular cell*. 31:449-461.
- Yang, X., and E. Seto. 2007. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*. 26:5310-5318.
- Yang, X.J., and S. Grégoire. 2007. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein N ϵ -and O-acetylation. *EMBO reports*. 8:556-562.
- Yeh, J.-C., E. Ong, and M. Fukuda. 1999. Molecular cloning and expression of a novel β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches. *Journal of Biological Chemistry*. 274:3215-3221.
- Yokota, S., K. Ogawara, R. Kimura, F. Shimizu, T. Baba, Y. Minakawa, M. Higo, A. Kasamatsu, Y. Endo-Sakamoto, and M. Shiiba. 2013. Protein O-fucosyltransferase 1: A potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. *International journal of oncology*. 43:1864-1870.
- Yoshimura, Y., A.S. Nudelman, S.B. Lavery, H.H. Wandall, E.P. Bennett, O. Hindsgaul, H. Clausen, and S.-I. Nishimura. 2012. Elucidation of the sugar recognition ability of the lectin domain of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 by using unnatural glycopeptide substrates. *Glycobiology*. 22:429-438.

- Young Jr, W. 2004. Organization of Golgi glycosyltransferases in membranes: complexity via complexes. *The Journal of membrane biology*. 198:1-13.
- Young, N.M., J.-R. Brisson, J. Kelly, D.C. Watson, L. Tessier, P.H. Lanthier, H.C. Jarrell, N. Cadotte, F.S. Michael, and E. Aberg. 2002. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*. 277:42530-42539.
- Yu, L.-G., N. Andrews, Q. Zhao, D. McKean, J.F. Williams, L.J. Connor, O.V. Gerasimenko, J. Hilkens, J. Hirabayashi, and K. Kasai. 2007. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 282:773-781.
- Zhang, F., K. Su, X. Yang, D.B. Bowe, A.J. Paterson, and J.E. Kudlow. 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*. 115:715-725.
- Zhang, J., R. Sprung, J. Pei, X. Tan, S. Kim, H. Zhu, C.-F. Liu, N.V. Grishin, and Y. Zhao. 2009. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 8:215-225.
- Zhang, Q., X. Liu, W. Gao, P. Li, J. Hou, J. Li, and J. Wong. 2014. Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *Journal of Biological Chemistry*. 289:5986-5996.
- Zhao, S., W. Xu, W. Jiang, W. Yu, Y. Lin, T. Zhang, J. Yao, L. Zhou, Y. Zeng, and H. Li. 2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*. 327:1000-1004.
- Zlocowski, N., V. Lorenz, E.P. Bennett, H. Clausen, G.A. Nores, and F.J. Irazoqui. 2013. An acetylation site in lectin domain modulates the biological activity of polypeptide GalNAc-transferase-2. *Biological chemistry*. 394:69-77.
- Zlocowski, N., V.G. Sendra, V. Lorenz, M.A. Villarreal, A. Jorge, Y. Núñez, E.P. Bennett, H. Clausen, G.A. Nores, and F.J. Irazoqui. 2011. Catalytic and glycan-binding abilities of ppGalNAc-T2 are regulated by acetylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 410:140-145.
- Žurga, S., J. Pohleven, J. Kos, and J. Sabotič. 2015. β -Trefoil structure enables interactions between lectins and protease inhibitors that regulate their biological functions. *Journal of biochemistry*:mvv025.

9. PUBLICACIONES

Como parte de este trabajo de Tesis Doctoral se generaron las siguientes publicaciones:

- Zlocowski N, Sendra VG, **Lorenz V**, Villarreal MA, Jorge A, Núñez Y, Bennett EP, Clausen H, Nores GA, Irazoqui FJ. Catalytic and glycan-binding abilities of ppGalNAc-T2 are regulated by acetylation. *Biochemical and biophysical research communications* 2011; 410:140-145.
- Zlocowski N, **Lorenz V**, Bennett EP, Clausen H, Nores GA, Irazoqui FJ. An acetylation site in lectin domain modulates the biological activity of polypeptide GalNAc-transferase-2. *Biological chemistry* 2013; 394:69-77.
- **Lorenz V**, Ditamo Y, Cejas RB, Carrizo ME, Bennett EP, Clausen H, Nores GA, Irazoqui FJ. Extrinsic functions of lectin domains in O-GalNAc glycan biosynthesis (Manuscrito en consideración).
- **Lorenz V**, Cejas RB, Bennett EP, Clausen H, Irazoqui FJ. Intrinsic effect of an acetylation site in lectin domain of ppGalNAc-T3 (Manuscrito en preparación).