

CONICET



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Departamento de  
**QUÍMICA BIOLÓGICA**  
Ranwel Caputto

Facultad de Ciencias Químicas (UNC)

C I Q U I B I C

# Glicosilación de tipo O-GalNAc en el núcleo de células humanas

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**Microbióloga Romina B Cejas**

Director Fernando J Irazoqui

Universidad Nacional de Córdoba

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba-CONICET

31 de Agosto de 2017

*Director de Tesis:*

*Dr. Fernando J. Irazoqui*

*Comisión de Tesis:*

*Dra. Viviana Nicotra*

*Dra. María Elena Álvarez*

*Dra. Ana María Cabanillas*

*Evaluador Externo:*

*Dra. Cecilia D'Alessio*

*Dedicada con amor a mis padres,  
que siempre me incentivaron a seguir mi vocación*

# AGRA DECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada una de las personas que me han acompañado a lo largo de este camino, así como a las instituciones que lo hicieron posible.

Al consejo nacional de investigaciones científicas y técnicas (CONICET), que me ha otorgado la beca con la que he realizado mi Doctorado y ha financiado parte de esta investigación. A la Universidad Nacional de Córdoba y a la facultad de Ciencias Químicas, lugar donde he desarrollado mis tareas tanto de investigación como de docencia y que hoy me permiten acceder a esta titulación. Una vez más, gracias a la educación pública por brindarme la oportunidad de acceder a una formación integral y de calidad. Aprovecho este espacio, para recalcar la importancia de las políticas que apoyan tanto a la educación pública así como el desarrollo del sistema científico y tecnológico. Puedo decir con orgullo que soy parte de la Universidad Nacional y del CONICET, y espero que así como yo, muchos y muchas más podamos ser parte del desarrollo de nuestro país a través de la educación y la ciencia.

A mi comisión de seguimiento y evaluación de tesis, Malena, Viviana y Ana, les agradezco por su predisposición y compromiso a lo largo de estos más de 5 años. Lamento que Ana no nos pueda acompañar en la defensa de esta tesis. Gracias también a la evaluadora externa, Cecilia, por tomarse el trabajo de leer este trabajo y viajar a Córdoba para la defensa.

Gracias al CIQUIBIC. El instituto no sólo es un espacio de trabajo, sino que siempre he encontrado a muchas personas dispuestas a brindar sus conocimientos y recursos. La realización de mi proyecto de tesis no hubiese sido posible sin la ayuda de todos los compañeros de trabajo que me han brindado un consejo, prestado equipos y reactivos, y han compartido su experiencia conmigo. Espero que este espíritu de colaboración siga siempre vigente.

También quiero agradecer a todo el personal de apoyo, que facilitan nuestro trabajo día a día. A “las chicas de cultivo”, Susy y Gabi, siempre dispuestas a ayudar y solucionar problemas. Al equipo de microscopía: Ceci, Carlitos, Marce, no sólo por ser gran parte de este trabajo de tesis y por asistirme todas las horas que he estado en “la cueva” sino también por todo lo compartido, las charlas, los cafés, las pelis, los consejos y el cariño.

Por supuesto que el seno de mi formación Doctoral ha transcurrido junto al equipo Irazoqui-Nores. Gracias a todos ustedes, a los que pasaron, a los que siguen, por siempre ser tan buenas personas. Chari, te quiero agradecer por toda la paciencia que me has tenido y por sobre todo por dar lugar y valor a mi opinión. Para mí es muy importante que el laboratorio sea un espacio de

trabajo donde todos se puedan sentir cómodos y libres, y vos lo has logrado siempre incentivando a que seamos independientes. Gracias por todo eso y por confiar en mí. Gustavo, el tío académico, gracias por la mano que nos has dado siempre. Y por el préstamo de la brujita! Parece que funciona bien. A todos mis compañeros de laboratorio: Samy, Vity, Yani, Nati, Euge, Yoha, Romi, Ricardo. Sin ustedes nada sería igual, gracias por ser tan grandes compañeros, por todo lo que me enseñaron, ¡por todo lo que me han aguantado! y por hacer del laboratorio un lugar de trabajo lindo, sinceramente no sería igual sin ustedes. Chicas gracias de además de ser compañeras, ser amigas. Las quiero mucho.

Mi doctorado por suerte me ha dejado un par de muy buenos amigos, y también me permitió reencontrarme con otros. Eli, gracias por brindarme tu amistad, por abrir las puertas de tu casa, por los asaditos, las charlas, la compañía. Agus, que lindo poder compartir este momento con vos, sabes que sos muy especial para mí. Florentynuchi, gracias también por toda tu buena onda siempre. Carlitos querido, gracias por ser mi amigo, por las largas charlas y consejos, por creer en mí y hacerme partícipe en tus proyectos. Realmente sos una persona que se distingue del resto y gracias a vos muchas cosas han sido diferentes. Entre esas cosas nuestro “English group”, donde también puede conocer a Ash y en más profundidad a Ale, y la verdad que hemos compartido momentos muy lindos juntos.

Gracias a los que están siempre, y desde siempre: mi familia. A mi Papá y mi Mamá, que me han apoyado con mucho amor en todos mis proyectos, y la verdad es que gran parte de lo que hoy soy es gracias a ustedes. A mi hermana que siempre está presente en todos mis pasos y en los momentos importantes de mi vida, y a Luis que también siempre está con nosotros. A mi compañero, Juanmi, gracias por ayudarme en la edición final del trabajo, por las cosas que me has enseñado y por apoyarme en esto. Gracias también por estar a mi lado siempre que lo necesito.

A todos gracias, también a los que no he mencionado, por acompañarme en esta etapa y por compartir la alegría de este día.

# ÍNDICE

• I. ABREVIATURAS .....	1
• II. RESUMEN.....	2
• III. INTRODUCCIÓN .....	4
1. El núcleo celular .....	5
1.1. Organización de la estructura nuclear .....	5
1.2. La envoltura nuclear .....	7
1.2.1 Lámina nuclear y Laminas.....	8
1.2.2 LMNs: Estructura y procesamiento pos-traduccional.....	9
1.2.2.1 Roles de las LMNs .....	10
1.3. Cromatina y territorios cromosómicos .....	11
1.4. Cuerpos nucleares.....	12
1.4.1 Nucléolo .....	13
1.4.2 Speckles.....	14
1.4.3 Para-Speckles .....	15
1.4.4 Cuerpo de Cajal .....	16
1.4.5 Cuerpos de leucemia promielocítica .....	16
2. Modificaciones pos-traduccionales y glicosilación .....	17
2.1. Glicosilación de proteínas .....	19
2.2. Principales tipos de Glicosilación .....	20
2.2.1 N-Glicosilación de proteínas .....	20
2.2.2 O-Glicosilación de proteínas .....	21
2.3. Glicosilación de tipo O-GlcNAc .....	23
2.4. Glicosilación de tipo O-GalNAc .....	25

2.4.1	Biosíntesis de O-GalNAc glicanos.....	26
2.4.2	Polipeptidil GalNAc-Transferasas.....	28
2.4.3	Roles biológicos de los O-GalNAc glicanos .....	29
2.4.4	Estados patológicos asociados a la alteración en la expresión de O-GalNAc glicanos y ppGalNAc-Ts .....	30
• IV.	OBJETIVOS .....	32
1.	Objetivo General.....	33
2.	Objetivos específicos.....	33
• V.	RESULTADOS .....	34
1.	Localización subcelular de ppGalNAc-T3 y ppGalNAc-T2 en diferentes líneas celulares humanas.....	35
2.	Ensayo de especificidad del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 .....	36
3.	Localización nuclear de ppGalNAc-T3 .....	38
4.	Eficiencia del fraccionamiento subcelular .....	44
5.	Disponibilidad de UDP-GalNAc en núcleo.....	46
6.	Análisis de la glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo .....	47
7.	Especificidad de las lectinas VVL y WGA.....	56
8.	Actividad O-GalNAc glicosiltransferasa en nucleoplasma .....	57
9.	Identificación de las proteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas.....	59
10.	Predicción de sitios de O-glicosilación de LMN B1 .....	62
11.	Análisis de correlación entre LMN B1 y O-GalNAc glicosilación .....	63
12.	Ensayo de FRET: O-GalNAc Glicosilación de LMN B1.....	69
• VI.	DISCUSIÓN.....	72
• VII.	CONCLUSIONES .....	86
• VIII.	PERSPECTIVAS .....	88

• IX. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
1. Líneas celulares .....	91
2. SDS-PAGE y Western Blot .....	91
3. Microscopía de fluorescencia .....	93
4. Obtención de núcleos y fraccionamiento subcelular.....	94
5. Expresión y purificación de ppGalNAc-T3 humana.....	95
6. Ensayo de especificidad del anticuerpo.....	96
7. Estudio de distribución subcelular de ppGalNAc-T3.....	97
8. Cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo.....	97
9. Glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleos purificados .....	98
9.1. Obtención de núcleos sobreglicosilados.....	98
9.2. Análisis de glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleos purificados.....	99
9.3. Cuantificación del nivel de glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo.....	99
9.4. Análisis de glicosilación de tipo O-GalNAc y O-GlcNAc en núcleos purificados.....	100
9.5. Reactividad de las lectinas VVL y WGA .....	100
9.6. Remoción del terminal $\alpha$ -GalNAc de proteínas nucleares con la enzima $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa .....	100
9.7. Elongación del terminal Tn en la fracción nuclear.....	101
10. Actividad O-GalNAc glicosil transferasa en nucleoplasma.....	101
10.1. Cuantificación de la actividad ppGalNAc-T en nucleoplasma.....	101
10.2. Actividad GT en la fracción nuclear soluble y glicosilación de histonas .....	102
11. Identificación de proteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas mediante espectrometría de masa .....	103
12. Predicción de sitios de O-GalNAc glicosilación de LMNB1 .....	104
13. Análisis de correlación LMNB1-VVL .....	105



14. Ensayo de FRET: LMNB1-VVL .....	105
• X. BIBLIOGRAFÍA .....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arquitectura nuclear .....	6
Figura 2. Componentes de la envoltura nuclear .....	8
Figura 3. Estructura de las LMNs .....	10
Figura 4. Cuerpos nucleares .....	13
Figura 5. Tipos de glicosilación de proteínas .....	19
Figura 6. Clases comunes de glicoproteínas en mamíferos .....	20
Figura 7. O-GlcNAc glicosilación de proteínas .....	24
Figura 8. Analogía química entre glicosilaciones de tipo O-GlcNAc y O-GalNAc .....	24
Figura 9. O-GalNAc glicosilación de proteínas .....	25
Figura 10. Biosíntesis de O-GalNAc glicanos .....	26
Figura 11. Estructura de la región luminal: dominio lectina y catalítico de las ppGalNAc-Ts. 29	
Figura 12. Localización subcelular de ppGalNAc-T3 y T2 en diferentes líneas celulares .....	35
Figura 13. ppGalNAc-T3 purificada y reconocimiento del anticuerpo .....	36
Figura 14. Ensayo de especificidad de anti-ppGalNAc-T3 .....	37
Figura 15. ppGalNAc-T3 en núcleo de células HeLa .....	39
Figura 16. Vista ortogonal y proyección en Z de ppGalNAc-T3 en núcleo .....	40
Figura 17. ppGalNAc-T3 en células completas y núcleos purificados .....	42
Figura 18. Localización nuclear de ppGalNAc-T3 .....	43
Figura 19. ppGalNAc-T3 en las diferentes fracciones subcelulares .....	44
Figura 20. Obtención de núcleos y chequeo del grado de pureza .....	45

Figura 21. Curva de trabajo para la cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo .....	46
Figura 22. O-Glicosilación de tipo GalNAc y actividad GalNAc-T en núcleos purificados .....	49
Figura 23. Localización nuclear de la O-GalNAc glicosilación .....	50
Figura 24. Cuantificación de la O-GalNAc glicosilación nuclear .....	52
Figura 25. O-glicosilación de tipo GalNAc y GlcNAc en núcleo .....	54
Figura 26. Remoción del terminal O-GalNAc por una glicosidasa .....	55
Figura 27. Extensión del antígeno Tn.....	56
Figura 28. Especificidad de las lectinas VVL y WGA.....	57
Figura 29. Actividad O-GalNAc glicosiltransferasa en la fracción nuclear soluble.....	59
Figura 30. Co-localización de LMN B1 y VVL en núcleos purificados.....	65
Figura 31.Co-localización de LMN B1 y VVL en núcleos sobreglicosilados .....	67
Figura 32. Análisis cuantitativo de co-localización entre LMN B1 y VVL .....	68
Figura 33. Mapa de FRET en núcleos purificados y sobreglicosilados .....	70
Figura 34. Cuantificación del Índice de FRET medio en núcleos purificados y sobreglicosilados .....	71
Figura 35. Anticuerpos comerciales anti-ppGalNAc-T2 y T3.....	92
Figura 36. Esquema de obtención de fracciones subcelulares y su aplicación en el presente estudio.....	95
Figura 37. Histonas de Timo de Vaca .....	102
Figura 38. Glicoproteínas nucleares retenidas por las columnas de afinidad .....	104

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y funciones de los cuerpos nucleares .....	17
Tabla 2. Cuantificación del tamaño y número de las motas de ppGalNAc-T3.....	41
Tabla 3. Cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo .....	47

Tabla 4. Cuantificación de la O-GalNAc glicosilación nuclear .....	53
Tabla 5. Actividad ppGalNAc-T en nucleoplasma .....	58
Tabla 6. Glicoproteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas .....	60
Tabla 7. Glicoproteínas nucleares sobre-O-GalNAc glicosiladas.....	61
Tabla 8. Predicción de sitios de O-Glicosilación de LMNB1.....	62

# ABREVIATURAS

**ABL:** Lectina de *Agaricus bisporus*

**Antígeno T:** Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O-Ser/Thr

**Antígeno Tn:** GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr

**Arg:** Arginina

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ARNr:** Ácido ribonucleico ribosómico

**Asn:** Asparragina

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**C1GalT:** Core 1  $\beta$ 1-3 galactosiltransferasa

**CB:** Cuerpo de Cajal

**CN:** Cuerpo nuclear

**Core 1:** Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O-Ser/Thr

**Cosmc:** Chaperona específica de la enzima Core 1  $\beta$ 1-3 galactosiltransferasa

**CPN:** Complejo del poro nuclear

**C-terminal:** carboxi terminal

**Cuerpos PML:** Cuerpos nucleares de leucemia promielocítica

**DAPI:** 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida

**FGF23:** Factor de crecimiento de fibroblastos 23

**FRET:** Transferencia de energía resonante de Förster

**Gal:** Galactosa

**GALNT:** gen que codifica polipeptidil N-Acetil-galactosaminil transferasa

**GalNAc:** N-Acetil-galactosamina

**Glc:** Glucosa

**GlcNAc:** N-Acetil-glucosamina

**GT:** glicosiltransferasa

**HPA:** Lectina de *Helix pomatia*

**Hyl:** Hidroxilisina

**Hyp:** Hidroxiprolina

**Ig:** Inmunoglobulina

**IP:** Ioduro de Propidio

**KDa:** Kilo Daltons

**LAD:** Dominio de asociación a la lámina

**LD:** Leche descremada

**LMNs:** Laminas

**LMN B1:** Lamina B1

**LN:** Lámina nuclear

**Man:** Manosa

**MPT:** Modificación pos-traducciona

**NETs:** proteínas transmembrana de la envoltura nuclear

**NONO/P54NRB:** *Non-POU domain-containing octamer-binding protein*

**NOR:** Regiones nucleolares organizadoras

**NPD:** *The Nuclear Protein Database*

**N-terminal:** amino terminal

**OGA:** O-GlcNAc-asa

**O-GalNAc glicosilación:** glicosilación de tipo O-N-Acetil-galactosamina

**O-GlcNAc glicosilación:** glicosilación de tipo O-N-Acetil-glucosamina

**OGT:** O-GlcNAc-Transferasa

**OVA:** Ovoalbúmina

**PML:** Cuerpos de leucemia promielocítica

**ppGalNAc-T:** polipeptidil N-Acetil-galactosaminil transferasa

**PBS:** Solución tampón fosfato salina

**PSF/SFPQ:** *Splicing factor, proline- and glutamine-rich*

**PSM:** Espectro de coincidencia de los péptidos o *Peptide Spectrum Matches*

**PSPC1:** *Paraspeckle Protein 1*

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**RE:** Retículo Endoplasmático

**RP:** Riboproteína o Proteína Ribosomal

**SDS-PAGE:** corrida electrofóretica en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio

**SFB:** Suero fetal bovino

**Ser:** Serina

**SLN:** Señal de localización nuclear

**SMN:** Complejo de supervivencia de neuronas motoras

**snoRNPs:** Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas

**snRNPs:** Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas

**TA:** Temperatura ambiente

**Thr:** Treonina

**Trp:** Triptofano

**Tyr:** Tirosina

**UA:** Unidades arbitrarias

**VVL:** Lectina de *Vicia villosa*

**WB:** Western Blot

**WGA:** Lectina de Germen de trigo (Wheat Germ)

# RE SUMEN

El núcleo es una organela altamente compleja y es considerado una de las estructuras más importantes de las células eucariotas. Su complejidad es un reflejo de dos funciones esenciales que cumple en la célula: una de ellas es la organización y replicación del genoma mientras que la otra es la distribución y regulación de la información genética. Diversas proteínas sufren modificaciones postraduccionales en el núcleo, modulando directa o indirectamente la expresión génica y la función celular. Entre algunas de las modificaciones que ocurren en las proteínas nucleares de mamíferos podemos mencionar la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la glicosilación.

La glicosilación es la modificación postraduccional (MPT) más frecuentemente encontrada en las proteínas. Luego de la N-glicosilación, la glicosilación tipo O-N-acetilgalactosamina (O-GalNAc glicosilación) de proteínas es el tipo principal de glicosilación en Eucariotas superiores. La biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc es un proceso complejo que típicamente comienza en Golgi. La familia de isoenzimas polipeptidil-GalNAc-Transferasas (ppGalNAc-T de 1 a la 20) catalizan la transferencia de GalNAc, aportado por el azúcar nucleótido UDP-GalNAc, a los residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) en las proteínas sustrato, iniciando la glicosilación de tipo O-GalNAc. Luego diferentes glicosil transferasas extienden estos glicanos dando como resultado diversos tipos de glicoproteínas complejas. El presente trabajo de tesis doctoral está centrado en el estudio de la glicosilación de tipo O-GalNAc en el núcleo celular. Con este objetivo, el enfoque de este trabajo fue la descripción de la localización nuclear de todos los actores necesarios para el inicio de la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc: la enzima ppGalNAc-transferasa, el sustrato donante de azúcar UDP-GalNAc, la demostración de la actividad nuclear GalNAc-transferasa y la identificación de las proteínas O-GalNAc glicosiladas como los productos de biosíntesis nuclear. Para ello, se utilizaron líneas celulares humanas crecidas en cultivo, a las cuales se les extrajo el núcleo mediante fraccionamiento sub-celular. En particular se estudió la distribución de la enzima ppGalNAc-T3 mediante microscopía confocal y ensayos de western blot en las diferentes fracciones subcelulares. Además, a partir de los núcleos purificados se comprobó la disponibilidad de UDP-GalNAc en esta organela, la cual puede aumentarse

suplementado con un exceso de UDP-GalNAc a los núcleos purificados. Este UDP-GalNAc en exceso es capaz de atravesar la membrana nuclear hacia el interior nuclear y, si estos núcleos son incubados a 37 °C, es posible apreciar la actividad GalNAc-Transferasa nuclear que aumenta en respuesta a la mayor disponibilidad de sustrato. Estos núcleos intactos sobreglicosilados mostraron actividad GalNAc-Transferasa en el interior nuclear, que fue estudiada mediante microscopía confocal y western blot. El nucleoplasma purificado demostró también una importante actividad de ppGalNAc-T. Finalmente las proteínas O-GalNAc glicosiladas en núcleo, purificadas por cromatografía de afinidad, fueron identificadas mediante espectrometría de masa. También se verificó la glicosilación de tipo O-GalNAc sobre una de las proteínas identificadas por el ensayo espectrometría de masa, mediante estudios de co-localización y FRET.

Si bien es conocido que otros tipos de glicosilación, como la de tipo O-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc glicosilación), ocurre en núcleo; este es el primer reporte de que la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc también puede iniciarse en el núcleo celular. En base a este novedoso hallazgo y a la relevancia funcional de las proteínas identificadas que pueden sufrir esta MPT en núcleo, se postula que la glicosilación de tipo O-GalNAc podría cumplir roles claves regulando la homeostasis nuclear.

### III. INTRODUCCIÓN

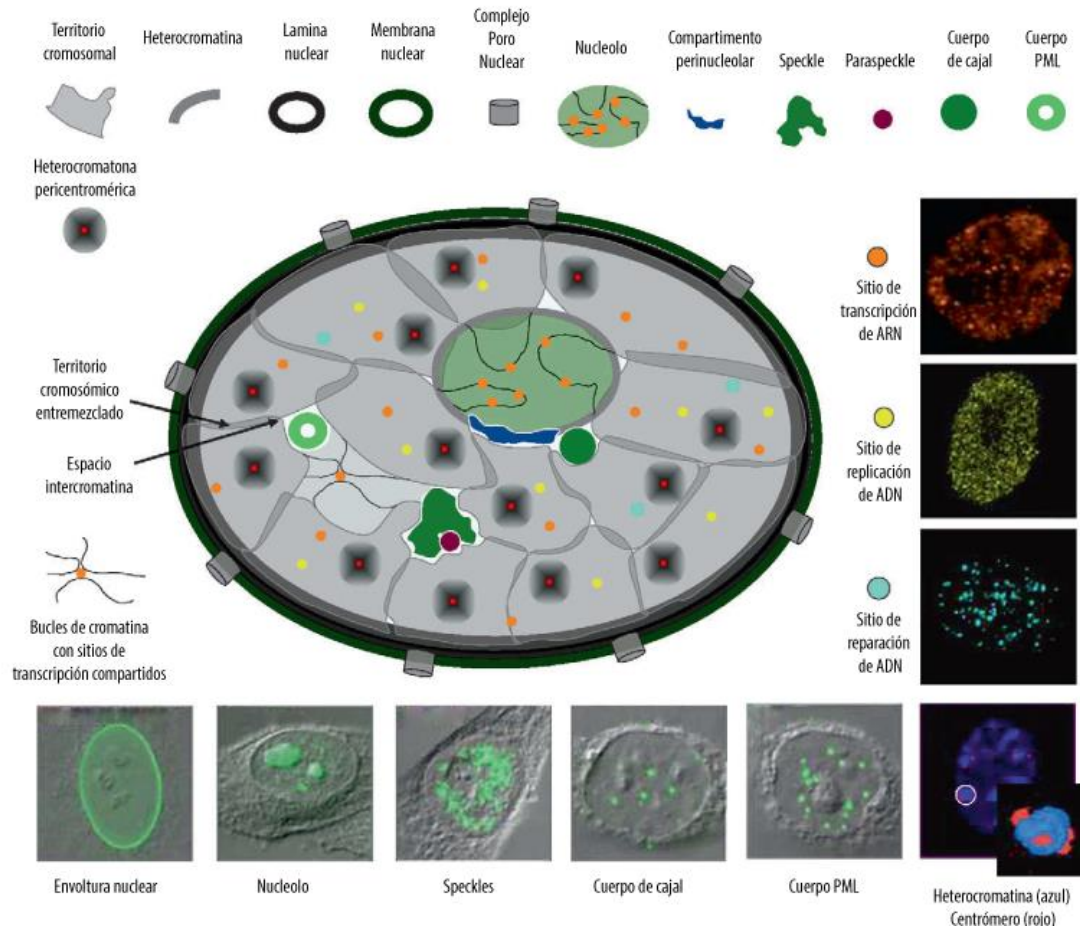


## 1. El núcleo celular

El núcleo es considerado una de las estructuras más importantes de las células eucariotas dado que cumple roles fundamentales en el almacenamiento, propagación, mantenimiento y expresión del material genético que contiene. Antonie Van Leewenhoek (1632-1723) fue el primero en observar la presencia de esta estructura dentro de eritrocitos de salmón bajo el microscopio y fue luego llamado "núcleo" por Robert Brown en el año 1831. Si bien el núcleo celular fue descrito por primera vez hace casi dos siglos, nuestra visión moderna de la arquitectura nuclear se basa principalmente en estudios de las últimas dos décadas. Este sorprendente inicio tardío coincide con el desarrollo de nuevas y poderosas estrategias para investigar la organización espacial de las actividades nucleares en células fijas y vivas (Cremer *et al.* 2004, Lenser *et al.* 2010). Como resultado, se sabe que el núcleo consta de diversos dominios funcionales altamente dinámicos, con intercambio de moléculas. De este modo, el núcleo proporciona una compartimentación funcional dentro de la célula lo que permite mayores niveles de regulación génica (Tripathi y Prasanth 2001). En células de mamíferos, el diámetro medio del núcleo es de aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  y ocupa alrededor del 10% del volumen celular total. El núcleo es una organela altamente compleja, y esta complejidad es un reflejo de dos funciones esenciales que cumple en la célula: una de ellas es la organización y replicación del genoma mientras que la otra es la distribución y regulación de la información genética, lo que incluye la síntesis y el procesamiento de ARNs (codificantes y no codificantes), así como el ensamblado de la maquinaria de traducción (Prasanth y Spector 2007, Woodcock y Ghosh 2010, Shefer *et al.* 2014).

### 1.1. Organización de la estructura nuclear

En células eucariotas la cromatina se encuentra empaquetada en una forma altamente organizada dentro del núcleo, el cual está compuesto por dos compartimentos principales: la envoltura nuclear y el nucleoplasma. Estos a su vez se encuentran organizados en diferentes subestructuras y sub-dominios funcionales. La arquitectura del núcleo celular está determinada por la presencia de dominios subnucleares que incluyen la envoltura nuclear, los territorios cromosómicos y los cuerpos nucleares; así como también dominios más pequeños que se forman en respuesta a funciones específicas como la transcripción de ARN y la replicación y reparación de ADN (Figura 1).



**Figura 1. Arquitectura nuclear**

El núcleo celular en mamíferos se encuentra altamente organizado en diferentes dominios funcionales. La cromatina se organiza en forma de territorios cromosómicos los cuales pueden solaparse o crear el llamado espacio intercromatina (blanco). La heterocromatina constitutiva (gris oscuro en el dibujo central, azul en el panel inferior derecho) se encuentra principalmente como cromatina pericentromérica en parches a lo largo del volumen nuclear, en la periferia nuclear, así como alrededor de los nucleolos. Entre las estructuras distintivas en la periferia del núcleo se incluyen los complejos de poro nuclear, la membrana nuclear (verde oscuro) y la lámina nuclear. Los bucles de cromatina y fábricas de transcripción asociadas pueden encontrarse fuera de los territorios cromosómicos, dentro del nucléolo y el nucleoplasma. Los procesos de transcripción (naranja), replicación (amarillo) y de reparación del ADN (azul claro) suelen ocurrir en pequeños dominios con un diámetro inferior a los 100 nm. En el núcleo de las células, es posible visualizar diversos conjuntos de cuerpos nucleares tales como Speckles, Paraspeckles, compartimento perinuclear, cuerpos de Cajal y cuerpos de leucemia promielocítica (PML) por análisis de inmunofluorescencia confocal (Paneles inferiores). Adaptado de Lenser et al. (2010).

La compleja compartimentación que presenta el núcleo, es de gran importancia dado que cumple diversos roles. La envoltura nuclear ayuda a la separación del contenido citoplasmático del contenido nuclear, lo que es importante para controlar los procesos a ambos lados de la doble membrana nuclear. En algunos casos cuando un proceso citoplasmático necesita ser restringido, ciertos componentes claves son transportados al núcleo, donde interactúan con factores de transcripción para regular la producción de ciertas enzimas de esa vía (Birbach *et al.*

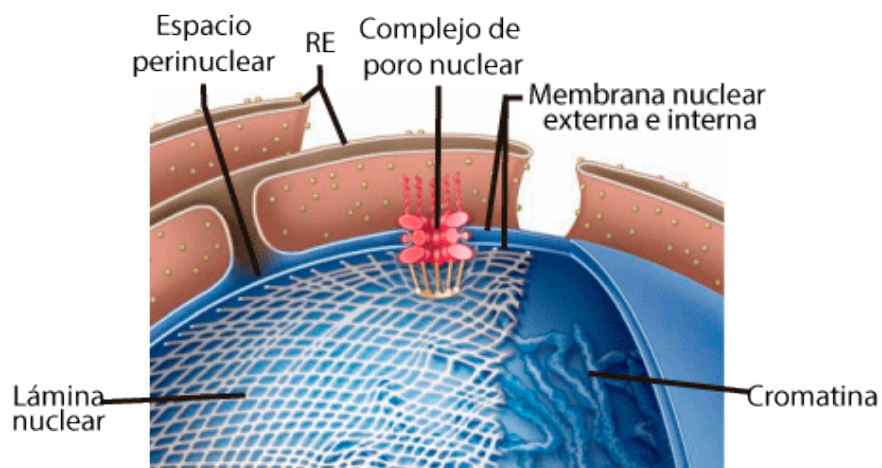
2004). Con el fin de controlar qué genes se están transcribiendo, la célula también separa ciertos factores de transcripción responsables de regular la expresión génica de su acceso físico al ADN evitando una expresión inadecuada. La compartimentación nuclear también ayuda a regular la traducción de ARNm, evitando que los ribosomas traduzcan pre ARNm no procesados lo que daría como resultado proteínas mal formadas y no funcionales (Tripathi y Prasanth 2001).

## 1.2. La envoltura nuclear

La envoltura nuclear es más que una separación inerte entre el interior y el exterior del núcleo. Esta estructura constituye un peaje activo, que controla la importación y exportación de diferentes moléculas. Pero además de su función en el transporte nuclear, también cumple diversos roles en una gran variedad procesos genómicos tales como la transcripción, la reparación del ADN, y la dinámica de la cromatina. Las proteínas localizadas en la superficie interna de la envoltura nuclear (tales como las Láminas, las proteínas de los poros nucleares y las proteínas asociadas a la Lámina) interactúan con la cromatina de una manera dinámica, contribuyendo al establecimiento de dominios topológicos (Starr 2009, Gay y Foiani 2015). Los principales componentes de la envoltura nuclear incluyen: las membranas nucleares interna y externa las cuales se continúan con la del Retículo Endoplásmico (RE), los complejos de poros nucleares que intervienen en el tráfico de moléculas nucleo-citoplásmáticas y la Lámina Nuclear (LN) que se encuentra en contacto con los poros nucleares y la cromatina, cumpliendo roles estructurales y regulatorios (Figura 2).

Tanto la membrana interna como la externa están formadas por diferentes grupos de proteínas. Uno de estos grupos consiste en aproximadamente 30 polipéptidos diferentes, denominados nucleoporinas o Nups, que son los componentes integrales del complejo del poro nuclear (CPN). Estos grandes complejos multiproteicos atraviesan la envoltura nuclear en sitios donde las membranas externa e interna se fusionan (Tran y Wentz 2006, D'Angelo y Hetzer 2008). Los CPN desempeñan un rol esencial celular en la mediación del intercambio de moléculas entre el nucleoplasma y el citoplasma. Los iones y pequeños metabolitos pueden difundirse a través de los CPN, mientras que las moléculas que poseen una masa mayor que 40-60 kDa necesitan ser transportadas activamente (Cook *et al.* 2007). Otro grupo de proteínas son las proteínas de transmembrana de la envoltura nuclear o NETs por sus siglas en inglés, las cuales se localizan en la membrana nuclear interna y tienen roles claves en diversas funciones nucleares

como la organización de la cromatina, la expresión génica y el metabolismo del ADN (Zuleger *et al.* 2013, Robson *et al.* 2014, Wong *et al.* 2014). Un tercer grupo de proteínas son las constituyentes de la membrana nuclear externa. Estas proteínas integrales de membrana poseen un dominio KASH, conectan el núcleo con el citoesqueleto y también interaccionan con proteínas de la membrana nuclear interna que presentan dominios de tipo SUM. Al establecer conexiones entre el citoplasma y el núcleo, las proteínas de la membrana externa intervienen en la ocurrencia de procesos de mecanotransducción, incluyendo el posicionamiento nuclear y los movimientos cromosomales durante la meiosis (Tapley y Starr 2013, Luxton y Starr 2014).



**Figura 2. Componentes de la envoltura nuclear**

Representación de la envoltura nuclear la cual está compuesta por la membrana nuclear interna y externa que se continúa con la del RE, los complejos de poros nucleares que intervienen en el tráfico de moléculas nucleocitoplásmicas y la Lámina nuclear que se encuentra en contacto con los poros nucleares y la cromatina.

### 1.2.1 Lámina nuclear y Laminas

La LN es una compleja red de proteínas estrechamente asociadas a la membrana nuclear interna y conectada a los complejos de poros nucleares y a la cromatina (Aaronson y Blobel 1975, Aebi *et al.* 1986). Los principales componentes de la LN son filamentos intermedios de tipo V, conocidas como Laminas (LMNs). Las LMNs y las proteínas asociadas a LMNs son requeridas para la mayoría de las actividades nucleares, en la mitosis y para vincular el nucleoplasma con las principales redes citoesqueléticas en el citoplasma. Una fracción de las LMNs también se encuentra en el nucleoplasma, donde forman complejos estables y se asocian con proteínas nucleoplasmáticas específicas (Dorner *et al.* 2007, Wagner y Krohne 2007).

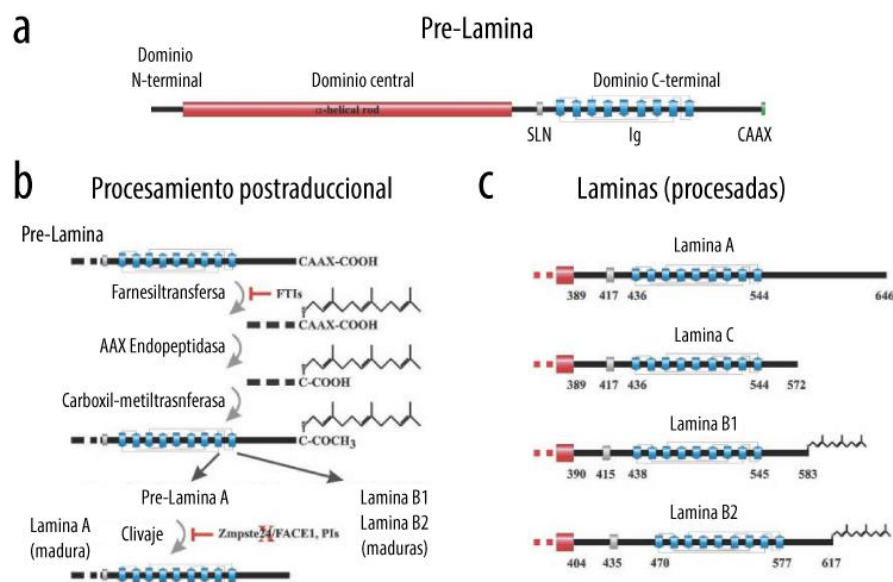
Las LMNs se dividen en tipos A y B en base a su homología de secuencia. En mamíferos se han caracterizado dos LMNs principales de tipo A denominadas LMN A y LMN C, y dos principales de tipo B llamadas LMN B1 y LMN B2. Además de estos tipos principales, también pueden encontrarse otras LMNs menores incluyendo la isoforma LMN AΔ10 (Machiels *et al.* 1996) y las LMNs específicas de células germinales LMN C2 (Furukawa *et al.* 1994) y LMN B3 (Furukawa y Hotta 1993). En cuanto a los genes que codifican estas proteínas, se encuentran presentes en todos los metazoos mientras que están ausentes en plantas y organismos unicelulares (Meier 2001, Melcer *et al.* 2007). Las LMNs B1 y B2 están codificadas por los genes *LMNB1* y *LMNB2* respectivamente, mientras que las de tipo A derivan del gen *LMNA* por empalme alternativo (Luo *et al.* 2014). Cada tipo de célula expresa cantidades específicas de cada tipo LMN y, en algunos casos, su abundancia afecta a la diferenciación celular (Swift *et al.* 2013).

### 1.2.2 LMNs: Estructura y procesamiento pos-traducciona

Como miembros de la familia de los filamentos intermedios, las LMNs tienen una organización de dominio tripartito. Están compuestas por un dominio central largo en alfa hélice, flanqueado por un dominio globular corto en el extremo amino terminal (cabeza) y un dominio carboxi terminal (C-terminal) largo (cola). Las LMNs se autoensamblan en estructuras de orden superior a través de las estructuras de tipo hélice enrollada o *coiled coil* presentes en el dominio central (Herrmann y Foisner 2003). Además, presentan un motivo estructural de tipo inmunoglobulina (Ig) en dominio C-terminal, una señal de localización nuclear (SLN) entre el dominio central y el pliegue tipo Ig y, en el caso de todas las LMNs de tipo B y en la LMN A (pero no de LMN C) contienen un motivo CAAX, que experimenta un extenso procesamiento postraducciona (Figura 3) (Dhe-Paganon *et al.* 2002, Krimm *et al.* 2002).

En la primera etapa de maduración de las LMNs, la enzima Farnesiltransferasa añade un grupo farnesilo a la cisteína del motivo CAAX. A continuación los últimos tres aminoácidos (AAX) son removidos por las Endopeptidasas Rce1 y/o Zmpste24 (FACE2 y FACE1 en humanos, respectivamente). En una siguiente etapa, la Isoprenilcisteína Metiltransferasa metila la cisteína C-terminal farnesilada. Mientras que el procesamiento de las LMNs de tipo B termina en este paso permaneciendo carboxi farnesiladas y metiladas, la LMN A experimenta otro evento de escisión en los últimos 15 aminoácidos de su dominio C-terminal por Zmpste24, resultando en la eliminación de la cisteína carboxi farnesilada y metilada. Como resultado sólo las LMNs de tipo

B se encuentran farnesiladas y metiladas en su estado maduro (Prokocimer *et al.* 2009). Además de sufrir este procesamiento, el dominio C-terminal de las LMNs presenta los sitios de interacción para la mayoría de las proteínas de unión a LMNs, siendo la región más variable de éstas proteínas (Zastrow *et al.* 2004, Dorner *et al.* 2007, Wagner y Krohne 2007). Otras modificaciones postraduccionales conocidas de las LMNs incluyen fosforilación y sumoilación influenciando su localización y dinámica (Kuga *et al.* 2010, Torvaldson *et al.* 2015). Las LMNs también pueden sufrir ADP-ribosilación y N-glicosilación (Ferraro *et al.* 1989, Prokocimer *et al.* 2009, Snider y Omary 2014).



**Figura 3. Estructura de las LMNs**

Estructura de las LMNs y su procesamiento. a. Las pre-LMN: están compuestas por un dominio central en alfa hélice, flanqueado por un dominio N-terminal corto y un dominio C-terminal largo con un pliegue tipo Ig, una SNL y un motivo CAAX. b. Las pre-LMN A, B1 y B2 son procesadas mediante farnesilación, clivaje proteolítico y metilación dando como resultado LMNs B1 y B2 maduras. En el caso de la pre-LMN A es clivada para dar LMN A madura. c. Dominios C-terminales de las LMNs maduras A, C, B1 y B2. Sólo LMN B1 y B2 se encuentran farnesiladas y carboximetiladas. Adaptado de Dechat *et al.* (2008).

### 1.2.2.1 Roles de las LMNs

Las LMNs y sus proteínas asociadas están implicadas en mantener la forma y la resistencia mecánica del núcleo. También participan en la mayoría de las actividades nucleares, incluyendo la organización de la cromatina, la replicación del ADN, la regulación de la transcripción, procesamiento de ARN, la vinculación del núcleo a todas las principales redes de citoesqueleto, apoptosis, meiosis y mitosis (Dechat *et al.* 2008). Modelos de arquitectura nuclear postulan a las LMNs y sus proteínas asociadas como determinantes del posicionamiento cromosómico en todo

el núcleo. De este modo las LMNs estarían, directa o indirectamente, implicadas en el anclaje de la cromatina a la lámina nuclear y también actúan como un almacén nucleoplásmico para organizar la cromatina en otras partes del núcleo (Goldman *et al.* 2002, Dorner *et al.* 2007). La interacción entre LMNs y la cromatina parece implicar los dominios C y N terminales de LMNs y los dominios N y C terminales de las histonas centrales o *core* (Goldberg *et al.* 1999, Mattout *et al.* 2007). Las LMNs también regulan la expresión génica ya que tienen capacidad de unirse directamente no sólo a la cromatina, sino además a los ácidos nucleicos (Rzepecki *et al.* 1998, Mattout-Drubezki y Gruenbaum 2003). Estas regiones genómicas de interacción por lo general se encuentran silenciadas. La LN interacciona con el genoma estableciendo dominios de interacción, en genomas de mamíferos existen alrededor de 1100-1400 dominios de asociación a la Lámina (LADs), que varían su tamaño entre 10 kb a 10 Mb y cubren colectivamente casi el 40% del genoma (Amendola y van Steensel 2014).

Alteraciones en la expresión de LMNs causan diferentes enfermedades. A partir del descubrimiento de que mutaciones en *LMNA* causan distrofia muscular autosómica dominante de Emery-Dreifuss (Bonne *et al.* 1999), se ha avanzado en el conocimiento de un gran número de enfermedades genéticas debidas a mutaciones o al procesamiento postraduccionales alterados de LMNs y otras proteínas de la envoltura nuclear. Estas enfermedades se conocen como laminopatías y la mayoría son causadas por mutaciones en el gen *LMNA*, aunque también pueden verse alteradas proteínas como las LMNs B1 y B2, proteínas asociadas a LMNs y proteínas de unión a LMNs (Maraldi *et al.* 2011). Las laminopatías se manifiestan como patologías diversas incluyendo distrofia muscular, lipodistrofia, neuropatía y síndromes progeroides (Worman y Bonne 2007).

### 1.3. Cromatina y territorios cromosómicos

El genoma contenido en el núcleo celular, presenta un alto grado de organización espacial y funcional. Este tipo de organización no aleatoria del genoma permite la compartimentación funcional del espacio nuclear lo que mejora la eficiencia de la regulación génica y facilita la coordinación de los genes co-regulados.

La cromatina es el estado en que el ADN se encuentra empaquetado dentro del núcleo de las células. El nucleosoma, unidad fundamental de la cromatina, consiste en 147 pb de ADN envuelto alrededor de un octámero de las cuatro histonas *core* (H2A, H2B, H3 y H4). Una de las

características más distintivas de las histonas es que presentan un gran número y tipos de modificaciones postraduccionales (MPTs), variando en sus estados de modificación postraduccionales dentro del nucleosoma. La forma más destacada de la organización estructural del genoma es la compartimentación en heterocromatina y eucromatina. La eucromatina es la forma descondensada de la cromatina en las células interfásicas, conteniendo genes transcritos activamente. Las secuencias reguladoras en estas regiones son accesibles a las nucleasas, presentan CpGs no metiladas e histonas *core* hiperacetiladas. Por el contrario, la heterocromatina se encuentra condensada en interfase y transcripcionalmente inactiva (Tripathi y Prasanth 2001).

En las células que se encuentran en interfase, los cromosomas se descondensan en los llamados territorios cromosómicos, que ocupan distintas regiones bien definidas dentro del volumen nuclear (Cremer *et al.* 2006). Los territorios muestran una organización radial que se correlaciona con su densidad genética: los cromosomas ricos en genes activos ocupan posiciones más internas, mientras que los cromosomas más pobres en genes activos se localizan en la periferia. Las posiciones dentro de estos territorios parecen estar relacionadas con el control de la expresión génica y otras actividades nucleares (Fraser y Bickmore 2007, Lanctot *et al.* 2007). Los territorios cromosómicos vecinos tienen niveles variables de superposición y la cromatina puede hacer lazos de un territorio a otro. El interior de los territorios cromosómicos contiene espacios que permite el acceso de factores reguladores de genes.

#### **1.4. Cuerpos nucleares**

En el nucleoplasma, muchos de los componentes nucleares, incluyendo ácidos nucleicos y proteínas, se organizan formando complejos de moléculas funcionalmente relacionadas que llevan a cabo diversos roles nucleares específicos. Si bien se ha sabido sobre la presencia de estos sub-dominios nucleares durante mucho tiempo, la composición y función de muchos de ellos no son aún comprendidas en su totalidad. Uno de estos sub-dominios nucleares son los cuerpos nucleares (CN) los cuales tienen un papel fundamental en la expresión génica: intervienen en el procesamiento del ARN y participan en la transcripción y síntesis de ribosomas, entre otras funciones (Morimoto y Boerkoel 2013). Los CN típicamente se sitúan en los espacios intercromatina de los territorios cromosómicos, y han sido caracterizados principalmente a nivel morfológico. La ausencia de membranas alrededor de los CNs permite que sus componentes se



intercambien más libremente con el nucleoplasma circundante, lo que les da la característica de ser dinámicos. La mayoría de los componentes proteicos de los CNs también se distribuyen difusamente en los espacios intercromatina, a concentraciones más bajas. Entre los CN más destacados podemos incluir el Nucleolo, Speckles, Paraspeckles, los Cuerpos de Cajal (CBs) y Cuerpos de leucemia promielocítica (PML).

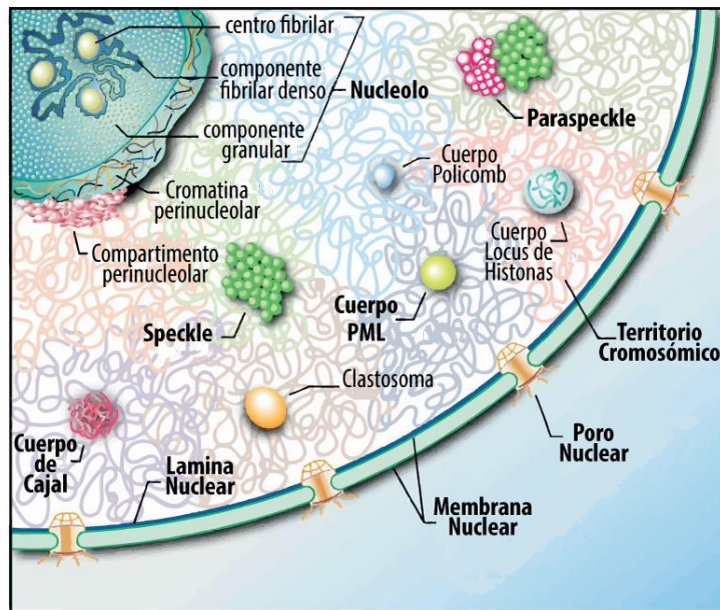


Figura 4. Cuerpos nucleares

Representación del núcleo interfásico de mamíferos y diversidad de CNs. El espacio intercromatina es altamente organizado, dinámico y alberga múltiples cuerpos nucleares tales como el cuerpo de Cajal, Clastosomas, Cuerpos Locus de hisonas, Speckle, Nucleolo, Paraspeckles, Compartimento perinucleolar, Cuerpos PML y Policomb. El nucleolo se compone de centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular y está rodeado por heterocromatina perinucleolar. Adaptado de Mao *et al.* (2011).

#### 1.4.1 Nucléolo

El nucléolo es una estructura nuclear prominente y por lo tanto fácilmente visible y distinguible mediante técnicas de microscopía, siendo uno de los CN más estudiados. En el núcleo de mamíferos normalmente pueden encontrarse entre 1 y 4 nucléolos, abarcando en conjunto hasta un tercio del volumen nuclear. Entre los roles que cumple este subdominio nuclear se destaca la biogénesis de ribosomas: es el sitio donde ocurre la transcripción de ADN<sub>r</sub>, maduración de ARN ribosómicos (ARN<sub>r</sub>) y de producción de ribosomas. Si bien es la función más conocida de esta estructura nuclear, el nucléolo también está involucrado en el control del ciclo celular y en la respuesta ante el estrés celular (Pestov *et al.* 2001, Boulon *et al.* 2010). El primer paso en la biogénesis de ribosomas es la transcripción del ADN<sub>r</sub> por la ARN polimerasa I, lo que

conduce a la síntesis del ARNr del precursor 47S. Este pre-ARNr es co- o post-transcripcionalmente procesado por las Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs) para generar ARNrs 5.8S, 18S y 28S. Además, estos ARNrs se ensamblan con proteínas ribosómicas para formar las subunidades pre-ribosómicas pequeña y grande. Finalmente estas subunidades se exportan por separado al citoplasma, donde se someten a las etapas finales de procesamiento para convertirse en subunidades ribosómicas maduras 40S y 60S (Tripathi y Prasanth 2001).

Los nucléolos de mamíferos están constituidos por tres componentes morfológicamente distintos: los centros fibrilares, el componente fibrilar denso y el componente granular (Figura 4). Cada nucléolo contiene varios centros fibrilares, rodeados por una capa de componente fibrilar denso, que a su vez está rodeado por el componente granular (Carmo-Fonseca *et al.* 2000). Los centros fibrilares contienen cientos de copias de repetidos de genes en tándem que codifican ARNr en varios loci cromosómicos denominados regiones nucleolares organizadoras (NOR) (Hadjiolov 2012). De todos estos genes, sólo un subconjunto es normalmente activo y los templados transcritos activamente tienen una ubicación más periférica, extendiéndose al componente fibrilar denso. El componente fibrilar denso por lo tanto, contiene transcritos nacientes de ARNr (pre-ARNrs). La biogénesis del ARNr implica una serie compleja de reacciones de procesamiento post-transcripcional, siendo el componente granular el sitio donde ocurren los eventos tardíos de procesamiento (Carmo-Fonseca *et al.* 2000). El nucléolo está constituido por diversas proteínas, habiéndose identificado alrededor de 700 proteínas nucleolares humanas mediante análisis múltiple de espectrometría de masa (Coute *et al.* 2006). Muchas de las proteínas nucleolares pueden estar presentes en otras localizaciones celulares y acumularse transitoriamente en los nucléolos a través de diversas señales celulares. Entre los componentes nucleolares clave se incluyen: la Nucleofosmina, Nucleolina, Fibrilarina, Proteína 1 de tipo NHP2, Proteínas nucleolares 56 y 58, Disquerina, GAR1, NHP2, Proteína nucleolar 10, Chaperona de Fosfoproteína nucleolar 140 kDa, ARN Polimerasa I y proteínas de las subunidades ribosómicas 40S y 60S (Ahmad *et al.* 2009).

#### 1.4.2 Speckles

Los gránulos de intercromatina o Speckles (ya que muestran un patrón de distribución punteado) son agrupaciones de gránulos electro-densos que se encuentran en los espacios de intercromatina del núcleo, cerca de sitios de transcripción altamente activos. Estos CNs son muy

dinámicos pudiendo variar su tamaño, forma y número en diferentes tipos celulares e inclusive en una misma célula según los niveles de expresión génica y en respuesta a las señales que influyen los conjuntos de factores de transcripción y empalme activos disponibles (Melcak *et al.* 2000).

Los Speckles funcionan como sitios de almacenamiento y modificación de pre-ARNm y de factores de empalme, desde donde son activamente reclutados a los sitios de transcripción. Por lo tanto ARNs y factores de procesamiento y empalme de ARNm son abundantes en este CN, aunque muchas otras proteínas también forman parte de estas estructuras (Spector y Lamond 2011). Alrededor de 180 proteínas diferentes componen los Speckles, incluyendo ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), subunidades del spliceosoma, factores de empalme, quinasas, fosfatasa, factores de transcripción y proteínas estructurales (Saitoh *et al.* 2004). Aunque la mayoría de los Speckles aparentemente no contienen ADN en analogía con las repeticiones en tándem de ADNr nucleolar, genes altamente expresados se pueden encontrar asociados a los Speckles, lo que es consistente con el importante rol que cumplen coordinando el suministro y/o reciclaje factores transcripción y de procesamiento de pre-ARNm (Spector y Lamond 2011).

### 1.4.3 Para-Speckles

Los Paraspeckles son uno de los CN más recientemente identificados. En un estudio de espectrometría de masa de nucleolos humanos purificados a partir de células HeLa, se identificaron 271 proteínas de las cuales alrededor del 30% eran novedosas (Andersen *et al.* 2002). En estudios subsiguientes y mediante análisis de co-localización, se encontró que estas proteínas no coincidían ni se superponían directamente con marcas de estructuras subnucleares previamente conocidas y se los llamó "Paraspeckles" porque fueron observados en el espacio intercromatina cercanos a los Speckles (Fox *et al.* 2002). Los Paraspeckles son CNs pequeños, de tamaño y distribución irregular variando su número según el tipo celular (Fox y Lamond 2010). El papel biológico preciso de los Paraspeckles no es aún del todo comprendido, pero sin embargo es ampliamente aceptado que contribuyen a la regulación transcripcional y al procesamiento de ARNs mediante un mecanismo de retención nuclear de los mismos.

Las proteínas principales que componen los Paraspeckles son SFPQ/PSF (Factor de empalme rico en prolina y glutamina; *Splicing factor, proline- and glutamine-rich*), NONO/

P54NRB (Proteína de unión a octámero de contención de dominio no-POU; *Non-POU domain-containing octamer-binding protein*) y PSPC1 (Proteína de Paraspeckle 1; *Paraspeckle Protein 1*), todas ellas proteínas de unión a ARN y miembros de la familia DBHS. Las proteínas de esta familia están involucradas en la transcripción y procesamiento de la ARN Polimerasa II, incluyendo la iniciación, terminación y empalme. SFPQ y NONO también están involucrados en la retención nuclear de ARNs hiper-editados. PSPC1 cicla entre los paraspeckles y el nucléolo en forma transcripción-dependiente sugiriendo que estas estructuras nucleares se encuentran relacionadas (Fox y Lamond 2010). Los paraspeckles, además de componerse de proteínas, también están constituidos por ARNs específicos. Uno de ellos es el ARN Ctn que está implicado en el control de la expresión génica por retención nuclear de ARN. El otro es NEAT1, un ARN no codificante abundante en los Paraspeckles el cual sirve como componente arquitectónico esencial para la formación y mantenimiento de estos CNs (Clemson *et al.* 2009, Chen y Carmichael 2009).

#### 1.4.4 Cuerpo de Cajal

Los cuerpos de Cajal reciben su nombre de su descubridor, Santiago Ramón y Cajal, siendo uno de los primeros CN no nucleolares observados (Gall 2003). El cuerpo de Cajal está implicado en una serie de funciones relacionadas con el procesamiento de ARN, específicamente en la maduración de ARNs pequeños nucleares y nucleolares (snoARN y snARN), modificación de ARNms de histonas y el tráfico y ensamble de RNPs (Tripathi y Prasanth 2001, Machyna *et al.* 2013).

Los componentes del Cuerpo de Cajal incluyen la proteína marcadora Coilina, proteínas del complejo de supervivencia de neuronas motoras (SMN) y diferentes tipos de RNPs. La Coilina, proteína abundante del cuerpo Cajal, interactúa con varios componentes del cuerpo Cajal y probablemente contribuye en la biogénesis de ARNs de telomerasas y en el procesamiento de ARNs nucleares pequeños (Carmo-Fonseca *et al.* 2000, Verheggen *et al.* 2002, Gall 2003).

#### 1.4.5 Cuerpos de leucemia promielocítica

Los cuerpos de leucemia promielocítica (Cuerpos PML) son CNs asociados a la matriz nuclear que regulan diversas funciones nucleares incluyendo la replicación del ADN, la transcripción y el silenciamiento epigenético. El rasgo característico de estos CNs es la presencia

de la proteína PML que forma la capa exterior de estos cuerpos y recluta a un grupo diverso de proteínas no relacionadas, que sólo son similares entre sí en la capacidad de ser sumoiladas (Tripathi y Prasanth 2001). La proteína PML es modificada postraduccionalmente por fosforilación o sumoilación y está implicada en la regulación de la estabilidad de los cuerpos PML y biogénesis de este CN (Bernardi y Pandolfi 2007). Los cuerpos PML son estructuras dinámicas que favorecen el secuestro y la liberación de proteínas, median sus modificaciones post-traduccionales y promueven eventos nucleares específicos en respuesta a diversos factores que desencadenan estrés celular incluyendo las infecciones virales, el daño al ADN y estrés oxidativo (Lallemant-Breitenbach y de The 2010).

A continuación en la Tabla 1 se resume las características principales de cada uno de los CN descritos, así como los roles que cumplen en el núcleo celular.

Tabla 1. Características y funciones de los cuerpos nucleares

Cuerpo nuclear	Número	Tamaño (μ)	Componentes clave	Función
<b>Nucleolo</b>	1-4	0,5-8	Maquinaria de ARNpolI	Transcripción y procesamiento de ARNr y ensamble de subunidades ribosómicas Modificación y ensamble de ARNs y RNPs
<b>Speckles</b>	25-50	0,8-1,8	Factores de empalme de ARNm	Almacenamiento, ensamble y modificación de factores de empalme de pre-ARN
<b>Paraspeckles</b>	10-20	0,2-1	PSF, NONO, PSPC1 NEAT1 (ARNnc)	Regulación de ARNm mediante retención nuclear Edición de ARN
<b>Cuerpo de Cajal</b>	1-10	0,1-2	Coilina, SMN	Biogénesis, maduración y reciclado de pequeños ARN
<b>Cuerpo PML</b>	10-30	0,1-1	Proteína PML	Respuesta a muchas formas de estrés, defensa viral y estabilidad del genoma mediante secuestro, modificación y degradación de proteínas asociadas

Principales características y funciones putativas de los cuerpos nucleares

## 2. Modificaciones pos-traduccionales y glicosilación

Las MPTs tienen roles críticos regulando la función y localización de las proteínas, y también participan regulando interacciones en diversos procesos biológicos. Si bien existen diversas MPTs, los principales tipos de modificaciones covalentes de proteínas que ocurren en la célula son la fosforilación, acetilación, metilación, ubiquitinación y glicosilación (Walsh *et al.* 2005).

Diversas proteínas sufren modificaciones postraduccionales en el núcleo, afectando directa o indirectamente la expresión génica y la función celular. Entre algunas de las

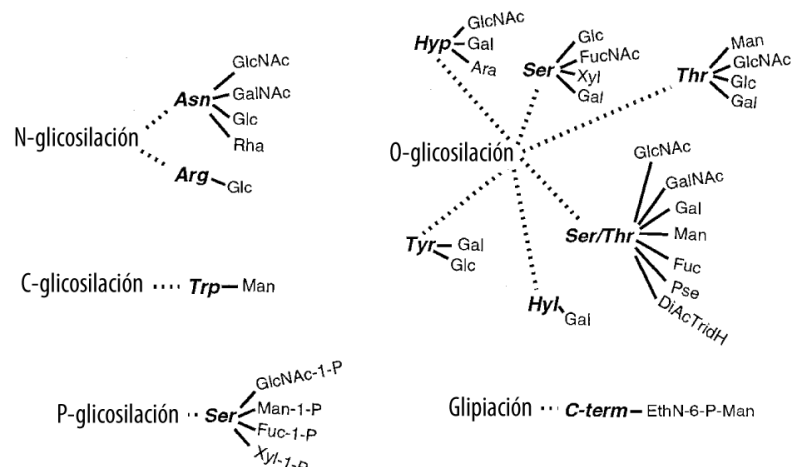
modificaciones que ocurren en las proteínas nucleares de mamíferos podemos mencionar la acetilación, la metilación, fosforilación, ubiquitinación y glicosilación. Estas MPTs se caracterizan por ser dinámicas, existiendo una intercomunicación o *cross-talk* entre ellas. Puede ocurrir más de un tipo de modificación en una misma proteína e inclusive, más de un tipo de MPT puede ocurrir en un determinado sitio. Como resultado, diferentes tipos de MPT compiten en el núcleo celular, muchas veces cumpliendo funciones antagónicas. Un ejemplo típico de proteínas nucleares altamente modificadas son las histonas, donde diferentes MPTs ocurren principalmente en sus colas N-terminales, siendo claves en la regulación de la dinámica de la cromatina (Strahl y Allis 2000, Berger 2002). La metilación de lisinas es una MPT común en las histonas, siendo de gran importancia para la regulación epigenética en eucariotas. La metilación puede estar asociada con la activación o el silenciamiento de genes, dependiendo de los residuos presentes en estas proteínas que se metilan (Sims *et al.* 2003). Además de las histonas, la metilación de lisina también ocurre en proteínas que regulan la transcripción y la cromatina (Zhang *et al.* 2015). La acetilación de lisinas, es una MPT que regula la transcripción de genes modificando proteínas como los son las histonas así como a una variedad de factores de transcripción y receptores nucleares. La acetilación de las histonas *core* se encuentra asociada con la activación transcripcional (Berger 2002, Wang *et al.* 2011). La fosforilación nuclear cumple un rol fundamental al afectar el dominio CTD de la ARN polimerasa (Phatnani y Greenleaf 2006). La función más conocida de la fosforilación de histonas tiene lugar durante la respuesta celular al daño del ADN afectando principalmente a la histona H2A (X) (Rossetto *et al.* 2012). El pequeño modificador relacionado con la ubiquitina (SUMO) ha demostrado modificar covalentemente un gran número de proteínas con funciones importantes en muchos procesos celulares incluyendo la expresión génica, la estructura de la cromatina, la transducción de señales y el mantenimiento del genoma. La maquinaria enzimática que añade y elimina SUMO es similar a la de ubiquitinación. La modificación de factores de transcripción e histonas por ubiquitinación se asocia generalmente con el aumento de la expresión génica, mientras que la modificación de estas moléculas nucleares por sumoilación se asocia generalmente con la disminución de la expresión génica. En algunos casos, SUMO y ubiquitina pueden competir directamente por la modificación de lisinas blanco (Gill 2004).

En cuanto a la glicosilación en el núcleo celular, hasta la fecha el único tipo conocido que ocurre en el núcleo es la O-GlcNAc glicosilación. Algunos ejemplos de proteínas nucleares que

son O-GlcNAc glicosiladas incluyen histonas, proteínas del complejo del poro nuclear, factores de transcripción y también proteínas codificadas por oncogenes (Wells *et al.* 2001, Sakabe *et al.* 2010) (Li y Kohler 2014). La O-GlcNAc glicosilación es análoga a la fosforilación, ya que cumple roles en la señalización celular y presenta una interacción extensa con ésta última dado que compiten por los mismos sitios de unión en varias proteínas. Éste tipo de glicosilación también se solapa con la ubiquitinación en el núcleo celular (Hart *et al.* 2011, Ruan *et al.* 2013).

## 2.1. Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es probablemente la MPT más común y extendida, siendo comúnmente encontrada en eucariotas, mientras que es menos usual en Eubacteria y Archaea (Wacker *et al.* 2002, Young *et al.* 2002). Se sabe que al menos 30 monosacáridos y 8 aminoácidos diferentes participan en este tipo de enlace covalente, pudiéndose agrupar la glicosilación de proteínas en 5 categorías o tipos según la naturaleza del enlace glicopeptídico (Spiro 2002) (Figura 5). En muchos casos más de un tipo de unión azúcar-aminoácido puede ocurrir en la misma proteína, e inclusive en diversos sitios, dependiendo de la maquinaria enzimática y naturaleza de dicha proteína. De esta manera una proteína codificada por un único gen puede presentar múltiples glicofomas. Desde el punto de vista funcional, la relevancia biológica de esta microheterogeneidad se desconoce y los mecanismos que la generan aún no están claros (Varki *et al.* 2009).



**Figura 5. Tipos de glicosilación de proteínas**

Representación diagramática de los 5 tipos de glicosilación, mostrando los tipos de aminoácidos y monosacáridos intervinientes en el enlace glicopeptídico. Las abreviaciones para aminoácidos se refieren a Asn: Asparagina, Arg: Arginina, Trp: Triptofano, Ser: Serina, Hyp: Hidroxiprolina, Hyl: Hidroxilisina, Tyr: Tirosina. Adaptado de Spiro (2002).

## 2.2. Principales tipos de Glicosilación

Si bien en una célula pueden ser sintetizados varias clases de glicanos, los principales tipos de glicosilación que ocurren en las proteínas son la N-glicosilación y la O-glicosilación (Figura 6). Cada uno de los tipos de glicosilación presenta su propio camino biosintético inicial, el cual se encuentra conservado en todos los metazoos. A nivel estructural, en los N-glicanos el carbohidrato está generalmente unido a la proteína a través del nitrógeno amida de un residuo de Asn mientras que en los O-glicanos el carbohidrato se une a través del oxígeno de un grupo hidroxilo de una Ser, Thr o Hyl (Varki y Chrispeels 1999).

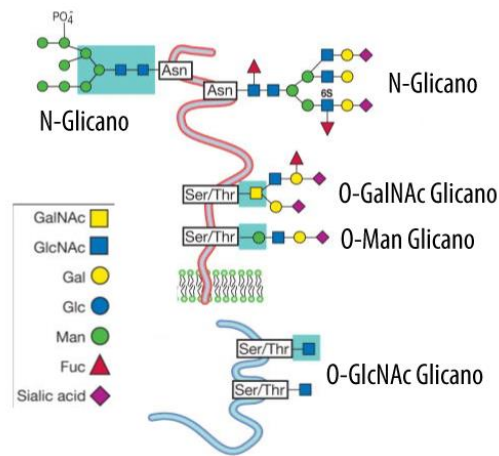


Figura 6. Clases comunes de glicoproteínas en mamíferos

Diagrama de proteínas modificadas con los principales tipos de glicosilación. En los N-glicanos los carbohidratos se unen en Asn mientras que en los O-glicanos el carbohidrato se une a través de una Ser o Thr. Nótese que más de un tipo de glicosilación puede ocurrir en una misma proteína. Adaptado de Varki *et al.* (2009).

### 2.2.1 N-Glicosilación de proteínas

La biosíntesis de N-glicanos en todos los organismos eucariotas comienza en el 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 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 traslocada a través de la membrana del RE. 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). 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  $\alpha$ -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 mantienen 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 y 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).

### 2.2.2 O-Glicosilación de proteínas

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 la N-glicosilación. Además, el inicio de la O-glicosilación (la incorporación del primer azúcar al polipéptido) es catalizada por diversas GTs que poseen diferente especificidad de sustrato en contraste con la N-glicosilación que involucra un complejo multiproteico denominado oligosacariltransferasa (OST) y produce un único tipo de unión (GlcNAc $\beta$ 1-Asn) (Stanley 2009). Las GTs que inician la síntesis de O-glicanos producen un amplio rango de uniones mediadas por oxígeno entre las cuales se encuentran las de tipo O-GalNAc, O-GlcNAc, O-Fuc, 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.

Es importante tener en cuenta que, a diferencia de la N-glicosilación, la O-glicosilación es más compleja y por ende, más difícil de estudiar. La conformación final de una glicoproteína dependerá de múltiples factores. Algunos de los motivos por los cuales es un desafío estudiar la O-glicosilación son los siguientes:

- *Carecen de una secuencia consenso de aminoácidos.* Si bien la O-glicosilación ocurre en aminoácidos particulares (Ver Figura 5), no se conoce una secuencia consenso que prediga en cuales aminoácidos fehacientemente ocurrirá la unión del carbohidrato. Se han desarrollado diferentes herramientas bioinformáticas de predicción de O-glicosilación y, aunque han mejorado a lo largo de los años, ninguna de ellas es del todo satisfactoria (Hansen *et al.* 1998, Chen *et al.* 2008).

- *Hay una gran diversidad de enzimas que inician la glicosilación.* Un mismo aminoácido puede ser sitio blanco de más de una GT. Para hacerlo aún más complejo, también existen diversas isoformas para un tipo de enzima. Este es el caso de las enzimas que inician la O-glicosilación de tipo N-Acetil-galactosamina: se conocen 20 isoformas. Cada una de ellas con una afinidad particular por el sustrato (lo que puede llevar a la competencia entre isoformas) y un patrón de expresión que depende del tipo celular, tipo de tejido y estadio del desarrollo.

- *La densidad y número de sitios glicosilados puede ser muy alto.* Esto ocurre típicamente en los O-glicanos de tipo mucina donde la glicosilación es muy heterogénea, pudiendo variar el perfil de glicosilación con diferentes factores como por ejemplo el medio de cultivo.

- *Depende de su localización subcelular.* La localización subcelular donde ocurre la glicosilación y la distribución de GTs afectará el tipo de glicano sintetizado. Dado que los O-glicanos son típicamente sintetizados en forma secuencial por diferentes conjuntos de enzimas que agregan distintos azúcares al mismo O-glicano naciente, cambios en el orden de acción enzimática afectan el tipo de O-glicano sintetizado (Skrincosky *et al.* 1997, Sewell *et al.* 2006).

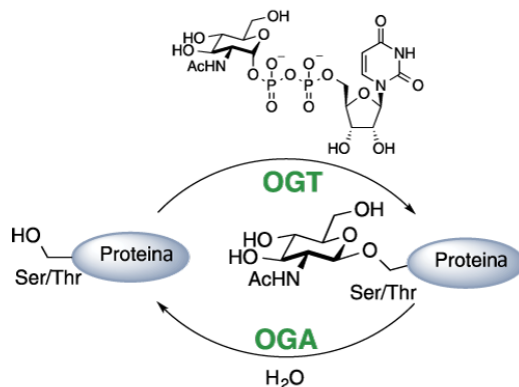
A continuación se amplía sobre las clases de O-glicosilación de proteínas pertinentes al presente trabajo de tesis.

### 2.3. Glicosilación de tipo O-GlcNAc

La glicosilación de tipo O-GlcNAc (O-GlcNAc glicosilación) es un tipo de modificación particular, ya que difiere en varios aspectos de los demás tipos de O-glicosilación pero químicamente es muy similar a la O-GalNAc glicosilación.

A diferencia de los otros tipos de O-glicosilación, la O-GlcNAc glicosilación es una modificación de monosacárido simple ya que involucra la unión de un único residuo de N-acetilglucosamina en los residuos Ser y Thr de proteínas nucleo-citoplasmáticas. Otra particularidad de esta glicosilación es su dinamismo: el residuo O-GlcNAc es agregado y removido de las proteínas mediante las enzimas intracelulares O-GlcNAc-transferasa (OGT) y O-GlcNAc-asa (OGA), respectivamente (Figura 7). Este dinamismo, el ciclado rápido como consecuencia de la actividad celular y sus roles en la transducción de señales hacen que la O-GlcNAc glicosilación se parezca más a la fosforilación que a los otros tipos de glicosilación (Zeidan y Hart 2010). Más aún, la O-GlcNAc glicosilación tiene una extensa interacción con la fosforilación y la 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 (Zhang *et al.* 2003, Liu *et al.* 2004).

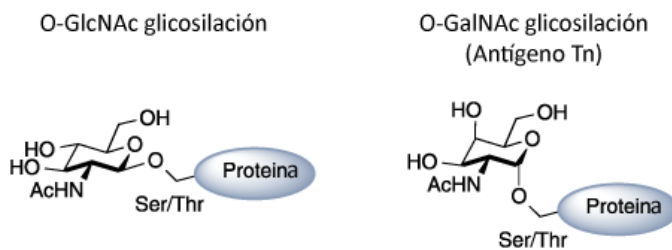
La enzima OGT se diferencia de las demás GTs no sólo en su actividad biológica sino también en su localización subcelular. Mientras que las GTs responsables de la O-glicosilación se encuentran típicamente en la vía secretoria, diferentes isoformas de OGT se encuentran en citoplasma, mitocondria y núcleo (Wells *et al.* 2002). 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). La O-GlcNAc glicosilación cumple diversos roles en la regulación de la transcripción incluyendo funciones que abarcan la modulación de la ARN Polimerasa II (Ranuncolo *et al.* 2012) y de factores de transcripción (Özcan *et al.* 2010), histonas y demetilinas asociadas al ADN (Fujiki *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2014). Este tipo de glicosilación también modifica a diversas quinasas, su actividad y especificidad (Dias *et al.* 2012, Bullen *et al.* 2014). Un aumento agudo en la O-GlcNAc glicosilación protege a las células del daño inducido por el estrés, mientras que 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).



**Figura 7. O-GlcNAc glicosilación de proteínas**

Las enzimas O-GlcNAc-transferasa (OGT) y O-GlcNAc-asa (OGA) son las responsables de la O-GlcNAc glicosilación dinámica que ocurre en los residuos Ser y Thr de proteínas nucleocitoplasmáticas. Adaptado de Janetzko y Walker (2014).

En cuanto a la similitud química o estructural de la O-GlcNAc glicosilación con la O-GalNAc glicosilación (Figura 8), cabe destacar que ambos tipos de modificación ocurren sobre los residuos Ser y Thr de las proteínas, sobre secuencias no consenso de aminoácidos. El azúcar nucleótido dador UDP-GalNAc puede surgir de dos rutas. Una es la reacción directa de GalNAc-1-P con UTP, donde GalNAc-1-P es formado por una quinasa específica. UDP-GalNAc también puede formarse por epimerización de UDP-GlcNAc utilizando la misma NAD-epimerasa que convierte UDP-Glc a UDP-Gal (Varki et al. 2009). Por lo tanto, los monosacáridos GalNAc y GlcNAc son análogos químicos, y si bien terminales O-beta-N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) y O-alfa-N-acetilgalactosamina (O-GalNAc) de las glicoproteínas son reconocidos diferencialmente en un alto grado por ciertas lectinas y anticuerpos, debe tenerse en cuenta que al ser epímeros GalNAc y GlcNAc no pueden ser diferenciados por ciertas técnicas como la espectroscopia de masa.



**Figura 8. Analogía química entre glicosilaciones de tipo O-GlcNAc y O-GalNAc**

La estructura química de los residuos de azúcares de proteínas O-GlcNAc glicosiladas y el Antígeno Tn son similares, diferenciándose por la orientación espacial del grupo oxhidrilo en el Carbono 4 y por el tipo de enlace glicosídico.

## 2.4. Glicosilación de tipo O-GalNAc

La glicosilación de tipo O-N-Acetil-galactosamina (O-GalNAc glicosilación), es el tipo de glicosilación más frecuente dentro del grupo de O-glicosilaciones. La O-GalNAc glicosilación sólo ocurre en Eumetazoos, encontrándose esta MPT en el 10% de las proteínas humanas. Estos tipos de O-glicanos se caracterizan por presentar un enlace glicosídico donde el azúcar GalNAc se encuentra covalentemente  $\alpha$ -unido al grupo oxhidrilo (OH) de las serina o Thr de la proteína (Figura 9), y luego este primer azúcar es típicamente extendido por diversas enzimas. Este tipo de glicoproteínas se la conoce como O-GalNAc glicanos, aunque también se las suele llamar O-glicanos de tipo mucina ya que las mucinas y proteínas similares son los sustratos clásicos conteniendo secuencias repetitivas de prolina, Thr y Ser densamente O-glicosiladas de manera heterogénea (Hanisch 2001, Hang y Bertozzi 2005). Si bien es común que las proteínas que atraviesan este tipo de glicosilación se encuentren altamente glicosiladas, también pueden presentar sólo uno o unos pocos O-GalNAc glicanos en su estructura. Las proteínas O-GalNAc glicosiladas están involucradas en diversos roles esenciales incluyendo interacciones célula-célula, célula-matriz y huésped-patógeno; afectan el funcionamiento del sistema inmune y median funciones complejas durante el desarrollo.

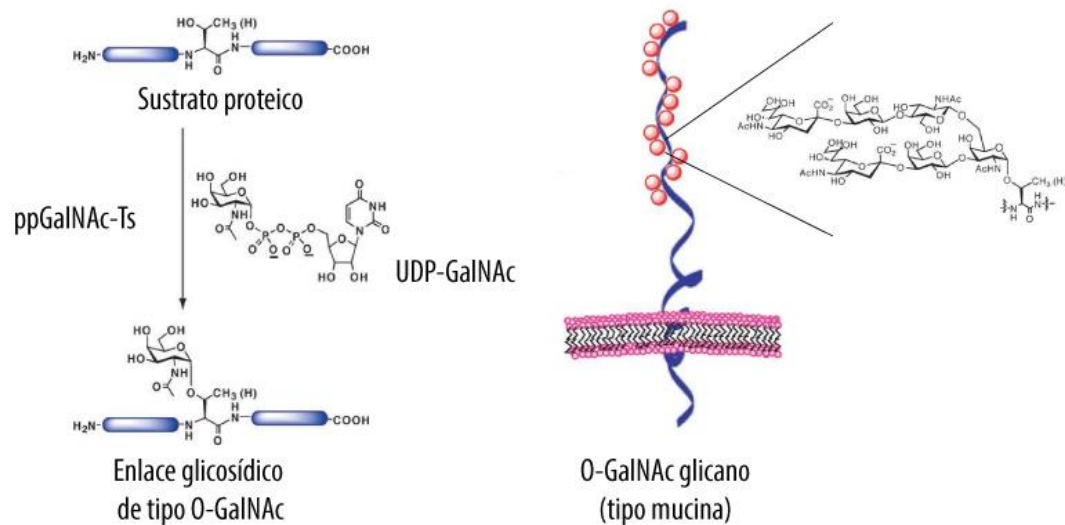


Figura 9. O-GalNAc glicosilación de proteínas

La formación del enlace glicosídico de tipo O-GalNAc (imagen izquierda) es iniciada por enzimas específicas y ocurre mediante la unión covalente a partir del azúcar dador UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de Ser o Thr presentes en la proteína aceptora. Se representa la O-GalNAc glicosilación (esferas rojas) de tipo mucina sobre una proteína de membrana (imagen derecha).

### 2.4.1 Biosíntesis de O-GalNAc glicanos

La biosíntesis de O-GalNAc glicanos es un proceso complejo el cual típicamente ocurre en el complejo de Golgi. La O-GalNAc glicosilación es iniciada por las enzimas polipeptidil GalNAc-Transferasas (ppGalNAc-Ts) y luego la estructura generada es extendida por numerosas y específicas GTs, dando como resultado una gran variedad de O-GalNAc glicoproteínas (Figura 10).

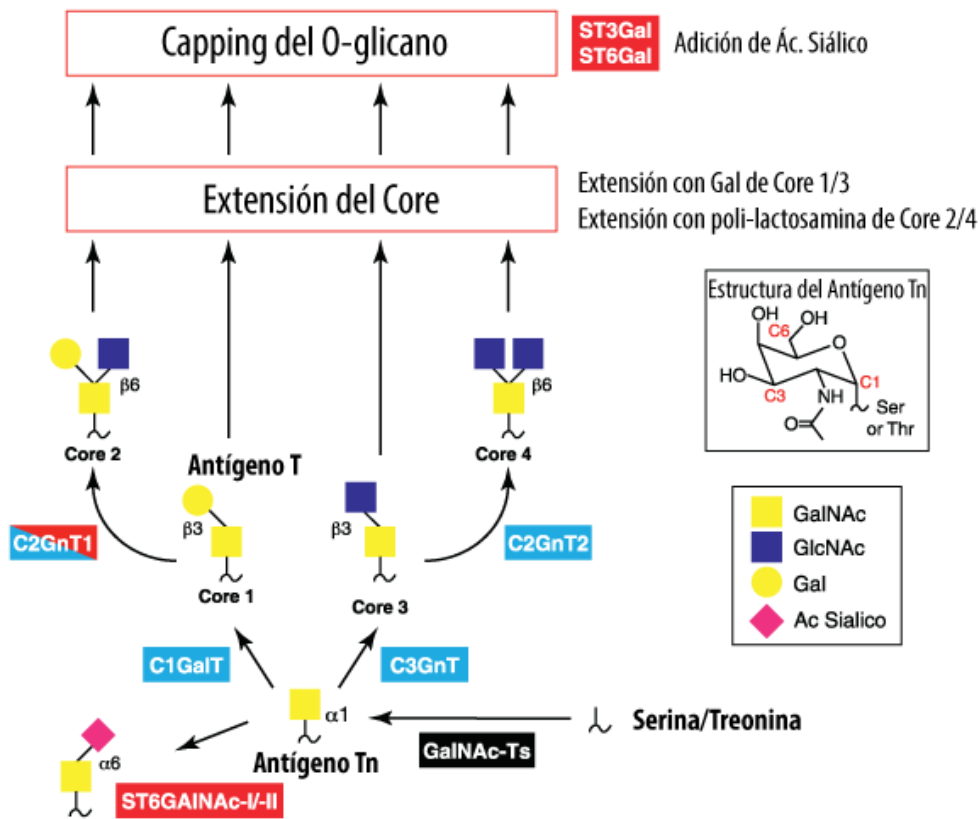


Figura 10. Biosíntesis de O-GalNAc glicanos

La O-glicosilación de tipo mucina es iniciada por una de las 20 isoformas de ppGalNAc-Ts formando el antígeno Tn (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr), el cual puede ser elongado por core 1 sintasa (C1GalT) o por Core 3 sintasa (C3GnT). Estos Cores son luego ramificados por Core 2 sintasas para formar Core 2 y Core 4 glicanos. Estas estructuras pueden ser elongadas por cadena de N-acetilglucosamina o finalizadas por la adición de fucosa o ácido siálico. Las cadenas de oligosacáridos pueden finalizar en forma prematura por la acción de sialiltransferasas sobre las estructuras de Core 1 (antígeno T) y sobre el antígeno Tn para dar lugar a SialiT y SialiTn, respectivamente. Adaptado de Gill *et al.* (2011).

El primer paso de la O-GalNAc glicosilación es llevada a cabo por la familia de iso-enzimas ppGalNAc-Ts, las cuales transfieren N-acetilgalactosamina del azúcar dador, UDP-GalNAc, a los residuos Ser o Thr del polipéptido aceptor formando la unión GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr (Clausen y

Bennett 1996) también conocido como antígeno Tn. El gran número de isoformas de enzimas que controlan este primer paso hace que este tipo 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 finalizando prematuramente la biosíntesis de la cadena de O-glicanos. Cabe destacar que el agregado de ácido siálico (*capping*) no permite la acción de las enzimas subsiguientes.

En un paso siguiente, luego de haber sido adicionado el azúcar GalNAc, se une covalentemente otro monosacárido, paso catalizado por enzimas “cores” para generar glicanos de tipo Core 1 o Core 3. En la mayoría de los tejidos se sintetizan glicanos de tipo Core 1: la galactosa es agregada por la enzima Core 1  $\beta$ 1-3 galactosiltransferasa (C1GalT) al GalNAc existente, generándose el glicano Core 1 (Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O) también conocido como antígeno T (Gill *et al.* 2011). La enzima C1GalT requiere de una chaperona específica llamada Cosmc, la cual se une a C1GalT y asegura su actividad en Golgi (Varki *et al.* 2009). Los glicanos de tipo Core 1 también pueden sufrir sialilación tras la incorporación de ácido siálico por la acción catalítica de ST3Gal- y ST6Gal-sialiltransferasas. En el caso de los glicanos de tipo Core 3, éstos son usualmente sintetizados en tejidos de colon. Para la síntesis de este tipo de glicanos el azúcar N-acetilglucosamina (GlcNAc) es agregado por la enzima Core 3 sintasa (C3GnT), la cual genera glicanos Core 3 (GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-O).

Luego los glicanos de tipo Core 1 pueden ser extendidos mediante el agregado de GlcNAc por la enzima  $\beta$ 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (C2GnT1) para producir glicanos de tipo Core 2. La enzima  $\beta$ 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa 2 (C2GnT2) incorpora GlcNAc sobre los glicanos tipo 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  $\beta$ 4GalT4 o por repeticiones de polilactosamina (Gal-GlcNAc) a través de la acción en forma alternada de las enzimas  $\beta$ 4GalT y  $\beta$ 3GnT. Por otro lado, los glicanos Core 3 pueden ser extendidos sólo a través de la adición de galactosa por  $\beta$ 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).

#### 2.4.2 Polipeptidil GalNAc-Transferasas

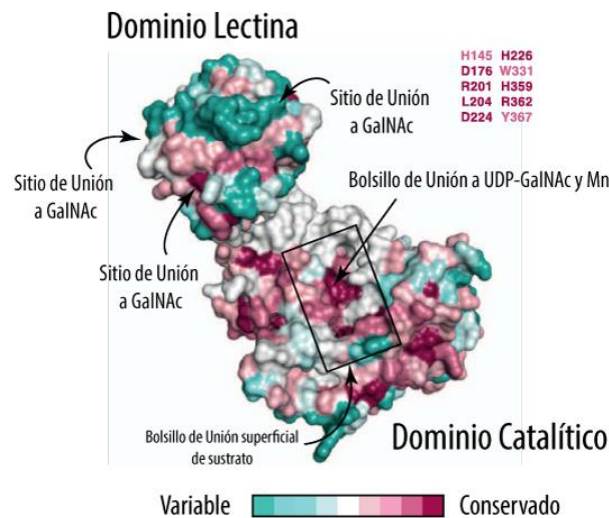
Las ppGalNAc-Ts son una gran familia de enzimas evolutivamente conservadas siendo las responsables del inicio de la O-GalNAc glicosilación. Todas ellas transfieren GalNAc a las proteínas, sin embargo cada una presenta una afinidad por sustrato particular (lo que puede llevar a competencia entre isoformas) y difieren en su patrón de expresión el cual depende del tipo celular, tipo de tejido y estado del desarrollo (Kingsley *et al.* 2000, Nakayama *et al.* 2014). Además, el número de enzimas varía entre diferentes organismos: *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens* expresan 9, 12 y 20 isoformas de ppGalNAc-Ts, respectivamente (Tian y Ten Hagen 2009). Este gran número de enzimas que controlan el paso inicial, hacen que la O-GalNAc glicosilación sea única entre los diferentes tipos de glicosilación de proteínas. Cabe destacar que las ppGalNAc-Ts no se encuentran en levaduras ni en plantas (Hashimoto *et al.* 2009).

En cuanto a las características estructurales de las ppGalNAc-Ts, estas enzimas son proteínas de membrana tipo II con un tamaño de entre 60 y 80 KDa. 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). Ésta última porción luminal presenta diferentes regiones (Figura 11): una región tallo o “*stem*” que presenta longitud variable, el dominio catalítico con actividad GalNAc transferasa 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). Los dominios 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, influenciando en la especificidad de sustrato mediada por lectina (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 y Drickamer 2001). Este módulo de unión a carbohidratos se encuentra en muchos reinos incluyendo procariotas y adopta una conformación llamada “ *$\beta$ -trefoil*” semejante a una hoja de trébol compuesta por tres repeticiones homólogas designadas



en orden desde el extremo N-terminal: subdominios  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que presumiblemente han evolucionado a través de eventos de duplicación de genes (Hazes, 1996; Rutenber et al., 1987). Estudios de las especificidades de unión a carbohidrato de los dominios lectina de las ppGalNAc-Ts han demostrado una alta especificidad por GalNAc y por glicopéptidos que contengan GalNAc, pero no por glicopéptidos que posean O-glicanos elongados (Wandall *et al.* 2007, Pedersen *et al.* 2011). Además los dominios lectina de diferentes isoformas también presentan selectividades de sustrato diferenciales (Pedersen et al. 2011).



**Figura 11. Estructura de la región luminal: dominio lectina y catalítico de las ppGalNAc-Ts**

Representación de la estructura de la región luminal de ppGalNAc-T2. El dominio lectina y catalítico de las ppGalNAc-Ts trabajan juntos para seleccionar potenciales sitios de glicosilación. Conservación de los residuos en base a las 20 isoformas encontradas en *Homo sapiens*. Adaptado de Gill et al. (2011).

### 2.4.3 Roles biológicos de los O-GalNAc glicanos

Los glicanos de tipo O-GalNAc más abundantes presentes mamíferos son las mucinas. Este tipo O-GalNAc glicanos densamente glicosilados se encuentran en gran cantidad en la superficie celular y secretados de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, como así también, en los ojos. En estos tejidos cumplen roles esenciales al hidratar y proteger el epitelio constituyendo una barrera física para los patógenos, por ejemplo, atrapando bacterias (Hang y Bertozzi 2005, Varki et al. 2009). Las glicoproteínas de membrana GlyCAM-1, CD34 y PSGL-1 cumplen roles mediando adhesiones célula-célula (Varki et al. 2009). 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). Otro atributo de estos glicanos es que confieren protección frente a la degradación de proteasas; ya sea en mucinas 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). La O-GalNAc glicosilación ha sido tradicionalmente considerada que ocurre en grupos densos en las mucinas y en los dominios mucina de las proteínas, de allí que se la suele llamar O-glicosilación de tipo mucina. Sin embargo, análisis de proteomas completos recientes han demostrado que la O-GalNAc glicosilación está ampliamente distribuida en la mayoría de las proteínas que pasan a través de la vía secretoria y que la mayoría tienen uno o pocos O-glicanos aislados (Steentoft *et al.* 2013, Vakhrushev *et al.* 2013). Un ejemplo de O-glicosilación sitio específica es el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), donde la O-glicosilación regula la función de esta proteína al prevenir su inactivación por una pro-proteína convertasa (Kato *et al.* 2006). 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).

#### **2.4.4 Estados patológicos asociados a la alteración en la expresión de O-GalNAc glicanos y ppGalNAc-Ts**

Las alteraciones en la glicosilación son una característica común en varios estados patológicos. Un ejemplo claro de ello son las células cancerosas, que comúnmente expresan glicanos en niveles atípicos y/o con estructuras diferentes a las encontradas en células normales. La O-glicosilación aberrante de tipo mucina representa uno de los cambios postraduccionales asociados a cáncer más abundantes. Las alteraciones en las estructuras de las O-glicoproteínas en cáncer tienen diversas consecuencias biológicas y patológicas ya que, los ligandos responsables de las interacciones entre las células y su microambiente, se encuentran cambiados. Como resultado, el crecimiento celular y la supervivencia, la capacidad de invadir y hacer metástasis, las interacciones con las lectinas y los receptores de superficie celular y con las células del sistema inmunológico se encuentran alterados (Pinho y Reis 2015).

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 *et al.* 1996, Kim y Varki 1997, Ono y Hakomori 2003). Una característica

común de los tumores es la sobre-expresión de O-GalNAc glicanos truncados, como el antígeno T (Core 1), el antígeno Tn (GalNAc-Ser/thr) y sus formas sialiladas (Sialil T y Sialil Tn, respectivamente) (Kudelka *et al.* 2015). La expresión de O-glicanos truncados se correlaciona generalmente con un peor pronóstico y con una menor sobrevida global (Springer 1984). En referencia a las ppGalNAc-Ts dado que diferentes isoformas presentan especificidad de sustrato y patrón de expresión particulares, cambios en el repertorio exacto de ppGalNAc-Ts pueden producir alteraciones en la O-glicosilación dando lugar a fenotipos de cáncer. El gen de ppGalNAc-T3 (también conocido como GALNT3) se encuentra sobre-expresado en tumores ováricos epiteliales y se asocia con intervalos de menor supervivencia y libre de progresión en pacientes con enfermedad avanzada (Wang *et al.* 2014). Las isoformas ppGalNAc-T6 y ppGalNAc-T14 se encuentran elevadas en carcinomas de mama y gástrico, lo que también los convierte en potenciales biomarcadores de tejido (Berois *et al.* 2006, Gomes *et al.* 2009). ppGalNAc-T14 se expresa heterogéneamente en la mayoría de los cánceres de mama y juega un papel crítico en la invasión y migración en este tipo de cánceres mediante la regulación de la actividad de MMP-2 y la expresión de algunos genes de transición epitelio-mesenquimales (Huanna *et al.* 2015).

Otra patología relacionada con la alteración en la expresión de en ppGalNAc-Ts es un desorden metabólico denominado calcinosis tumoral familiar. En esta patología ocurre una pérdida en la función de ppGalNAc-T3, lo que produce la enfermedad que se caracteriza por una hiperfosfatemia (Topaz *et al.* 2004). Tal como fue mencionado, ppGalNAc-T3 es requerida para la glicosilación de un residuo específico de FGF23 lo que previene su clivaje e inactivación por acción de una proteasa (*proteas convertase* o PC) e induce la secreción del FGF23 intacto (Kato *et al.* 2006). La pérdida de ppGalNAc-T3 lleva a un incremento en la secreción de la región C-terminal clivada de FGF23 lo que inhibe la señalización y la reabsorción renal de fosfato (Goetz *et al.* 2010). De forma similar, en el metabolismo lipídico, los niveles elevados en el suero de triglicéridos y de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) están asociados con la pérdida de ppGalNAc-T2 (Kathiresan *et al.* 2008). ppGalNAc-T2 glicosila la Thr226 próxima al sitio de procesamiento de furina de la proteína tipo angiopoyetina tipo 3 (ANGPTL3), lo que inhibe el procesamiento y permite la secreción de la ANGPTL3 completa. El clivaje N-terminal de ANGPTL3 inhibe la lipasa endotelial, la lipasa lipoproteica y la lipasa hepática de triacilglicerol alterando el metabolismo lipídico (Schjoldager *et al.* 2010).

#### **IV. OBJETIVOS**

## 1. Objetivo General

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la Glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo de células humanas e identificar las proteínas nucleares capaces de ser O-GalNAc glicosiladas.

## 2. Objetivos específicos

- En primer lugar se busca caracterizar la distribución sub-celular de las ppGalNAc-Ts T2 y T3, haciendo énfasis en su ubicación nuclear en las líneas celulares HeLa, MCF7, T-47 D y SK-N-AS utilizando diferentes herramientas experimentales.
- Analizar la distribución nuclear de ppGalNAc-T3 en células HeLa, tanto en células enteras como en núcleos purificados y nucleoplasma.
- Determinar la disponibilidad del sustrato donante de GalNAc, UDP-GalNAc, en el nucleoplasma de células HeLa y cuantificar el azúcar nucleótido en dicha fracción.
- Estudiar la actividad de tipo O-GalNAc glicosiltransferasa tanto en núcleos purificados como en el nucleoplasma de células HeLa, utilizando una estrategia que permite aumentar el nivel de O-GalNAc glicosilación nuclear.
- Identificar las proteínas nucleares que son sustrato aceptor de este tipo de glicosilación, a partir de glicoproteínas nucleocitoplasmáticas purificadas a partir de células HeLa.
- Finalmente se pretende demostrar la glicosilación de tipo O-GalNAc sobre una proteína nuclear mediante la obtención de núcleos purificados de células HeLa previamente transfectadas con la proteína de interés.

## V. RESULTADOS

## 1. Localización subcelular de ppGalNAc-T3 y ppGalNAc-T2 en diferentes líneas celulares humanas

La expresión y distribución subcelular de las enzimas ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 fue evaluada en diferentes líneas celulares tumorales humanas mediante inmunofluorescencia. Para ello las células fijadas fueron procesadas utilizando anticuerpos comerciales específicos para cada una de las isoformas (ver materiales y métodos SDS-PAGE y Western Blot), que luego fueron revelados con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 546 (rojo). Los núcleos fueron teñidos utilizando 2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida (DAPI). Como puede observarse en la Figura 12, la isoforma ppGalNAc-T2 presenta una marcación característica de Golgi, sin distribución nuclear aparente en las líneas celulares ensayadas. Por otra parte, la isoforma ppGalNAc-T3 presenta una distribución de tipo punteada, incluyendo la presencia de múltiples puntos por célula, los cuales coinciden con el núcleo celular (marcado en azul con DAPI) en las líneas celulares HeLa, MCF7 y SK-N-AS. ppGalNAc-T3 también muestra el patrón de distribución característico de Golgi, con marcación en forma de “media luna” perinuclear en las líneas celulares HeLa y MCF7.

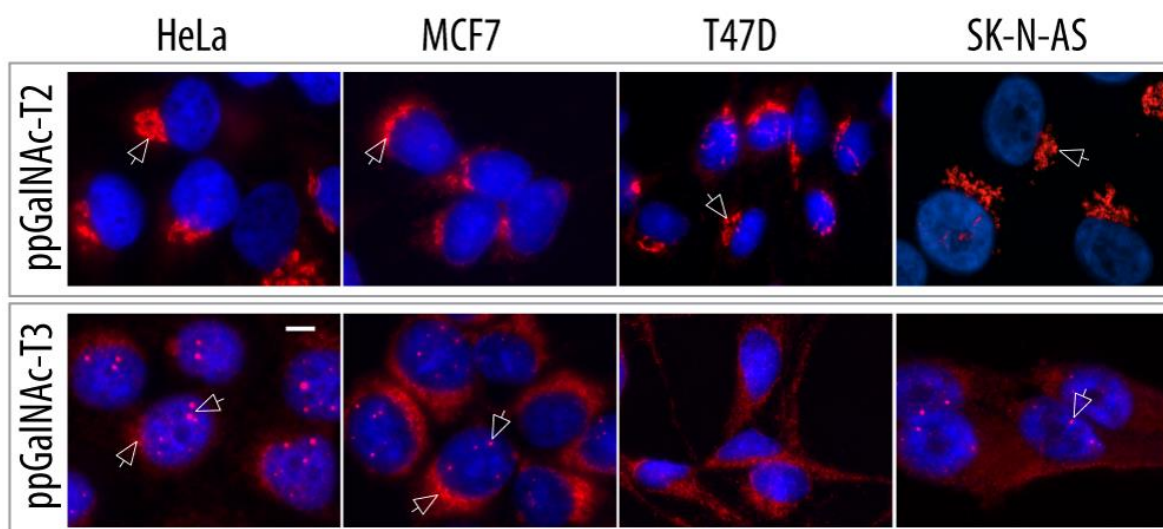


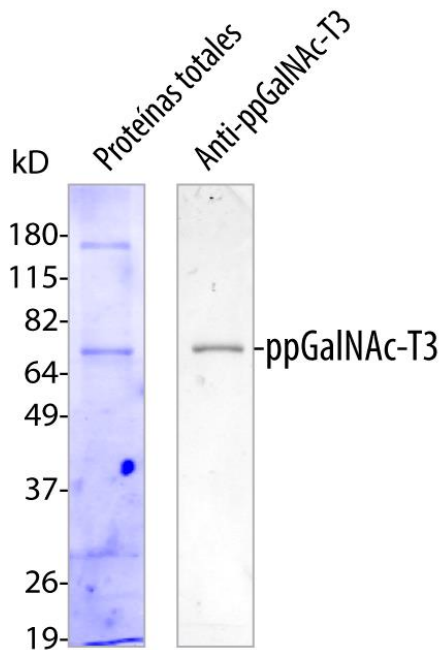
Figura 12. Localización subcelular de ppGalNAc-T3 y T2 en diferentes líneas celulares

La localización subcelular de las enzimas ppGalNAc-T2 (panel superior) y ppGalNAc-T3 (panel inferior) fue evaluada en diferentes líneas celulares humanas mediante microscopía de inmunofluorescencia. Las células fijadas se tiñeron con DAPI (azul) y las ppGalNAc-Ts fueron detectadas mediante el uso de anticuerpos comerciales específicos anti-ppGalNAc-T2 o anti-ppGalNAc-T3, revelados con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa 546 (Rojo). Las líneas celulares ensayadas incluyeron: HeLa (cuello uterino), MCF7 (mama), T47D (glándula mamaria) y SK-N-AS (médula ósea). Las flechas resaltan la distribución de ppGalNAc-T3 en núcleo y Golgi (perinuclear), y de ppGalNAc-T2 en Golgi. Se muestra la barra de escala, la cual equivale a 10µm.

## 2. Ensayo de especificidad del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3

Se diseñó un ensayo donde se enfrenta el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 con la proteína recombinante purificada ppGalNAc-T3, de forma de evaluar el reconocimiento de este anticuerpo hacia ppGalNAc-T3 presente en el núcleo de celular.

En primer lugar se verificó la purificación de la proteína recombinante ppGalNAc-T3, la cual fue previamente expresada en células de insecto, según se detalla en materiales y métodos. Por lo tanto, se analizó la proteína purificada en SDS-PAGE 10% con tinción con azul brillante de Coomassie para evaluar proteínas totales. Además, la muestra fue electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa e incubada con el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 para verificar el reconocimiento hacia dicha proteína. En la Figura 13 se muestra la proteína recombinante purificada teñida por azul brillante de Coomassie, la cual presenta la movilidad esperada (72 KDa) y un alto grado de pureza. Como puede verse en el WB, el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 reconoce la proteína purificada de 72 KDa.



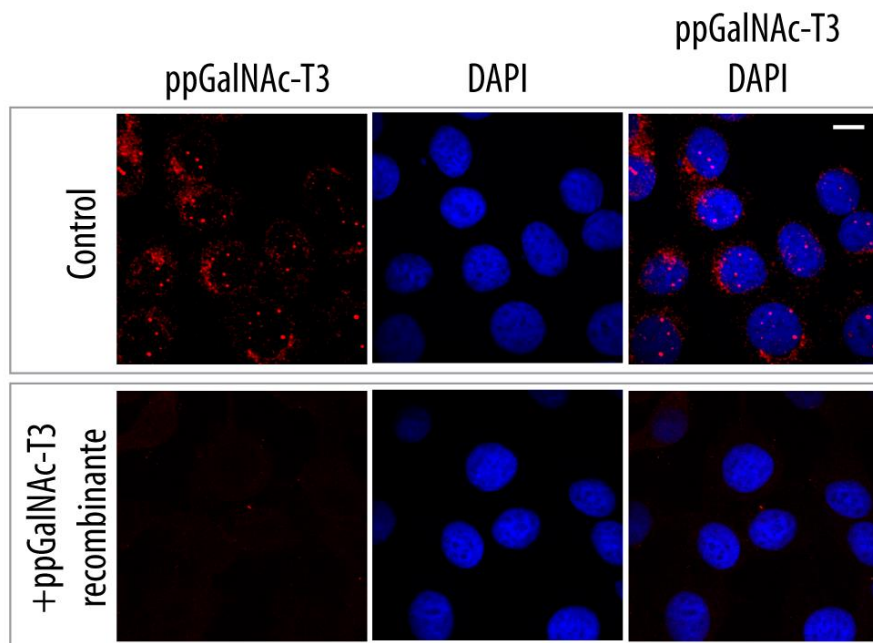
**Figura 13. ppGalNAc-T3 purificada y reconocimiento del anticuerpo**

SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie (izquierda) mostrando la proteína recombinante ppGalNAc-T3 purificada. Mediante WB (derecha) se observa el reconocimiento del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 hacia la proteína de 72 KDa.

Una vez verificados el grado de pureza de la enzima recombinante así como la reactividad del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 (ver también figura 35), se realizó un ensayo para evaluar la



especificidad de reconocimiento del anticuerpo hacia la proteína ppGalNAc-T3 expresada *in vivo*. Para ello células HeLa crecidas en cubreobjetos y fijadas, fueron incubadas con el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 y la proteína ppGalNAc-T3 recombinante purificada, o con el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 sin la proteína recombinante (condición control). Luego el reconocimiento específico del anticuerpo fue testeado por microscopía confocal de fluorescencia. En ambos casos los núcleos se tiñeron con DAPI. En la Figura 14 se muestra una imagen representativa de la inmuntinción de ppGalNAc-T3 con el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 (rojo) en células HeLa fijadas (control). Puede apreciarse el patrón de marcación moteado en la zona nuclear y marcación perinuclear característica de las ppGalNAc-Ts (Golgi). Luego, cuando la proteína ppGalNAc-T3 purificada recombinante es co-incubada con el anticuerpo durante la inmuntinción, se observa la pérdida de la marcación (señal roja) en las células. Esto nos indica que la marcación en la zona nuclear y perinuclear efectivamente corresponde a la proteína ppGalNAc-T3, ya que cuando se ofrece esta proteína de forma soluble en cantidades saturantes es capaz de secuestrar el anticuerpo perdiéndose la marcación en las células.



**Figura 14. Ensayo de especificidad de anti-ppGalNAc-T3**

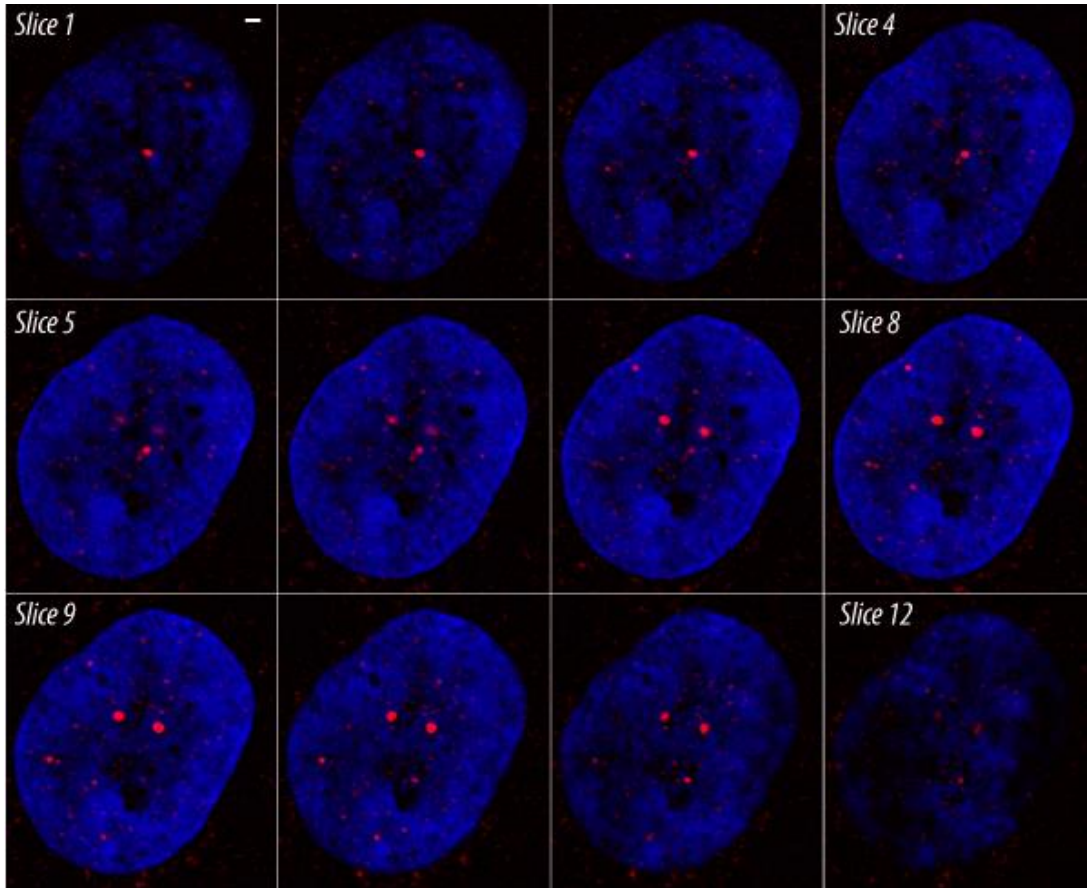
El reconocimiento del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3, utilizado para estudiar la proteína ppGalNAc-T3 en núcleo, se testeó ofreciendo ppGalNAc-T3 purificada recombinante durante la inmuntinción. ppGalNAc-T3 se detecta en núcleo y Golgi con el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 (rojo) en células HeLa fijadas (control) (panel superior), mientras que la señal se pierde cuando ppGalNAc-T3 purificada recombinante es co-incubada con el anticuerpo (panel inferior). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes muestran (de izquierda a derecha) los canales individuales de la señal de anti ppGalNAc-T3, DAPI y el modo compuesto (combinación de ambos canales). La barra de escala equivale a 10µm.

### 3. Localización nuclear de ppGalNAc-T3

Luego de explorada la presencia de ppGalNAc-T3 en diferentes líneas celulares, se procedió a estudiar en mayor profundidad la marcación que coincidiría con una distribución nuclear.

Mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio confocal, se estudió la coincidencia de la marcación de ppGalNAc-T3 con marcadores nucleares utilizando como herramienta la toma de imágenes a lo largo de la profundidad de la célula. De esta forma se puede evaluar si fehacientemente ppGalNAc-T3 se distribuye dentro del núcleo celular.

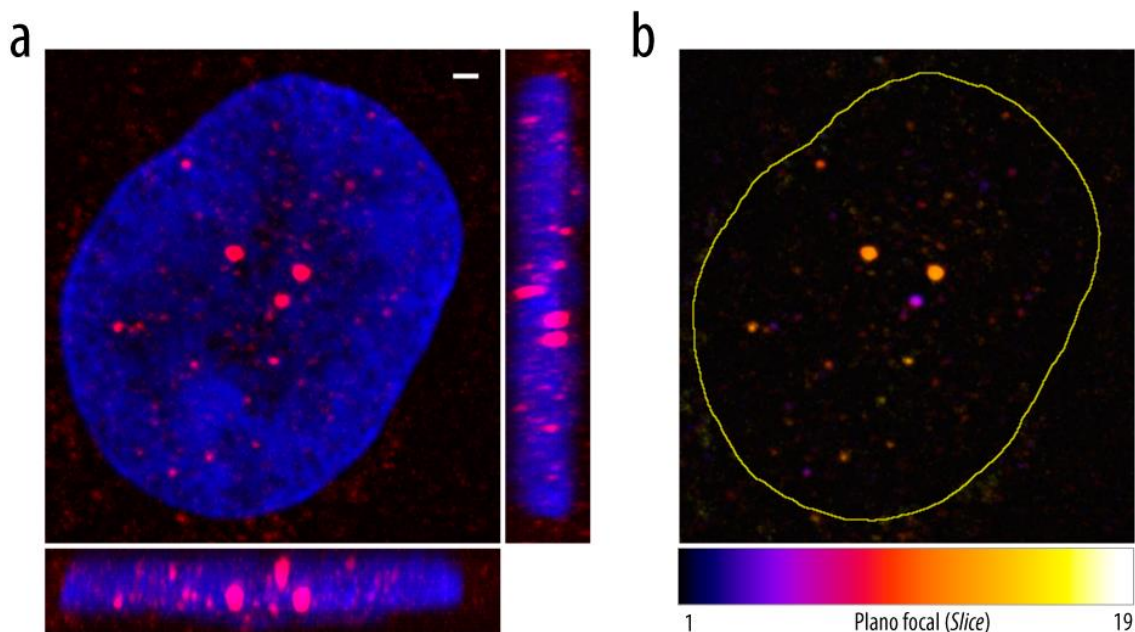
Células HeLa crecidas en cubreobjetos fueron fijadas e inmunomarcadas mediante incubación con el anticuerpo primario anti-ppGalNAc-T3 y luego con anticuerpo secundario conjugado a Alexa 546 (rojo) y DAPI (azul). Utilizando un microscopio confocal se tomaron imágenes de alta resolución con un espaciado en Z cada 46 nm, a lo largo de todo el volumen de la célula de forma de muestrear el espacio nuclear. De esta forma se obtiene una pila de imágenes, compuesta por imágenes de diferentes planos focales o *Slices*. En la Figura 15 se muestran los diferentes planos nucleares, numerados del 1 al 12 donde se aprecia que ppGalNAc-T3 (rojo) muestra una distribución en forma punteada o moteada. Este patrón de ppGalNAc-T3 en forma de motas, presenta tamaño variable y se distribuyen en diferentes alturas del núcleo, marcado en azul. En el siguiente link <https://drive.google.com/file/d/0B8K7rUsOgNlddExMNXk3R1hDam8/view?usp=sharing> se puede acceder a un video donde se observa la distribución de ppGalNAc-T3 a través de los 12 planos nucleares.



**Figura 15. ppGalNac-T3 en núcleo de células HeLa**

Imágenes de microscopía confocal donde se muestra la distribución de ppGalNac-T3 (puntos rojos) en diferentes planos nucleares (Slices 1 al 12) de una célula representativa. El núcleo fue teñido con DAPI y la barra de escala equivale a 1  $\mu$ m.

Para visualizar mejor la distribución dentro del volumen nuclear y apreciar el número y diferencia en tamaño del patrón moteado, se realizó una reconstrucción en vista ortogonal (X, Z e Y, Z) y una proyección máxima en Z, respectivamente, de la pila de imágenes en cuestión. En este caso se incluyeron 19 planos, ya que también se tuvieron en cuenta planos por encima y debajo del núcleo. En la Figura 16 a se muestra una proyección máxima en Z donde puede observarse el patrón moteado de ppGalNac-T3, donde cada uno de estas motas presenta tamaño variable. Además se incluyeron las vistas ortogonales en X-Z (a la derecha de la proyección) e Y-Z (debajo de la proyección) (Figura 16 a), este tipo de representación de la información permite observar de forma clara la distribución dentro del núcleo de ppGalNac-T3 que coincide con la ocurrencia de la señal de DAPI. En la Figura 16 b, se representaron cada uno de los planos focales con un color diferente. De esta manera se denota la presencia de ppGalNac-T3 en diferentes alturas del volumen nuclear.



**Figura 16. Vista ortogonal y proyección en Z de ppGalNAc-T3 en núcleo**

Distribución de ppGalNAc-T3 dentro del volumen nuclear. a. Proyección máxima en Z y sus correspondientes vistas ortogonales en X-Z (derecha) e Y-Z (debajo). Se observa el patrón moteado de ppGalNAc-T3 (rojo) que se distribuye dentro del núcleo celular (azul). La barra de escala equivale a 1  $\mu\text{m}$ . b. Proyección máxima en Z donde se colorearon los diferentes planos focales en los que se localiza ppGalNAc-T3, según la tabla de colores presentada. En amarillo se delimita el contorno nuclear.

Adicionalmente, se cuantificó el tamaño (diámetro de Feret) y número de las motas o partículas de ppGalNAc-T3 presentes en núcleo, por célula. Según lo documentado en la Tabla 2, el número de partículas cuantificadas por núcleo celular alcanza un máximo de 42 ( $33 \pm 9$  partículas de ppGalNAc-T3/ núcleo celular) y tienen un diámetro medio de  $0,301 \pm 0,038 \mu\text{m}$ . El diámetro de las partículas puede variar entre 0,103 y 1,215  $\mu\text{m}$  presentando la mayoría de las partículas de ppGalNAc-T3 un tamaño menor a las 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El tamaño y patrón de distribución observado para ppGalNAc-T3 sugiere que la enzima podría encontrarse asociada con algún tipo de CN como por ejemplo Speckles, Paraspeckles, cuerpos PML o bien una combinación de ellos basado en el número de partículas detectadas. Si bien tradicionalmente las ppGalNAc-Ts se encuentran asociadas a membrana, ppGalNAc-T3 detectada en forma nuclear no presenta un patrón de distribución que sugiera localizarse en la membrana nuclear.

Cabe destacar que no siempre se aprecia este número de partículas de ppGalNAc-T3 en el núcleo de las células y núcleos purificados mostrados en las diferentes imágenes de este trabajo. Una de las causas se debe a que cuanto mayor son estas partículas, presentan mayor nivel de fluorescencia debido a que la proteína se encuentra en más cantidad. Por este motivo, resulta

difícil observar las partículas de menor tamaño e intensidad sin exceder el rango dinámico de la imagen. Además, el número de partículas varía dependiendo del plano nuclear que se visualiza (Figura 15). Es por estas razones que se muestran las proyecciones axiales como estrategia para resumir la información presente en todos los planos.

**Tabla 2. Cuantificación del tamaño y número de las motas de ppGalNAc-T3**

<b>Número total de partículas</b>	<b>Partículas Diámetro&gt;0,5</b>	<b>Partículas 0,5&gt;Diámetro&gt;0,25</b>	<b>Partículas Diámetro&lt;0,25</b>	<b>Diámetro Medio</b>	<b>Diámetro Máximo</b>	<b>Diámetro Mínimo</b>
25	3	12	10	0,327	0,859	0,103
33	4	14	15	0,318	0,893	0,103
42	4	10	28	0,258	1,215	0,103

Cuantificación del tamaño (diámetro de Feret, en  $\mu\text{m}$ ) y número de partículas de ppGalNAc-T3 por núcleo celular (n=3). Se muestran el número de partículas de tamaño grande (Diámetro mayor a  $0,5 \mu\text{m}$ ), medio (Diámetro entre  $0,5 \mu\text{m}$  y  $0,25 \mu\text{m}$ ) y pequeño (Diámetro menor a  $0,25 \mu\text{m}$ ) por núcleo celular; así como los valores medios, máximos y mínimos del diámetro de dichas partículas.

En adición a estos estudios, también se exploró el patrón de distribución de ppGalNAc-T3 en núcleos purificados. Con este fin, núcleos intactos purificados a partir de células HeLa fueron colocados en cubreobjetos previamente tratados con poli-lisina lo que permite su adhesión al vidrio. Una vez fijados fueron inmunomarcados con el anticuerpo primario anti-ppGalNAc-T3 y con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (verde), y como marcador nuclear se utilizó Ioduro de Propidio (IP) (rojo) el cual se intercala en el ADN así como el ARN. También se incluyeron células completas crecidas en cubreobjetos, para comparar los patrones de marcación. La obtención de imágenes se realizó por medio de un microscopio confocal. En la Figura 17 puede observarse que el patrón característico de ppGalNAc-T3 de motas en el núcleo, sigue manteniéndose aún luego del fraccionamiento subcelular. En el caso de la marcación perinuclear correspondiente a Golgi, se encuentra en las células completas mientras que se pierde en los núcleos purificados. Además en estas imágenes puede notarse que en los núcleos purificados ppGalNAc-T3 se encuentra en la mayoría de ellos, presentando número y tamaño variable de motas por núcleo. También puede apreciarse que los núcleos siguen manteniendo su integridad posterior al proceso de purificación.

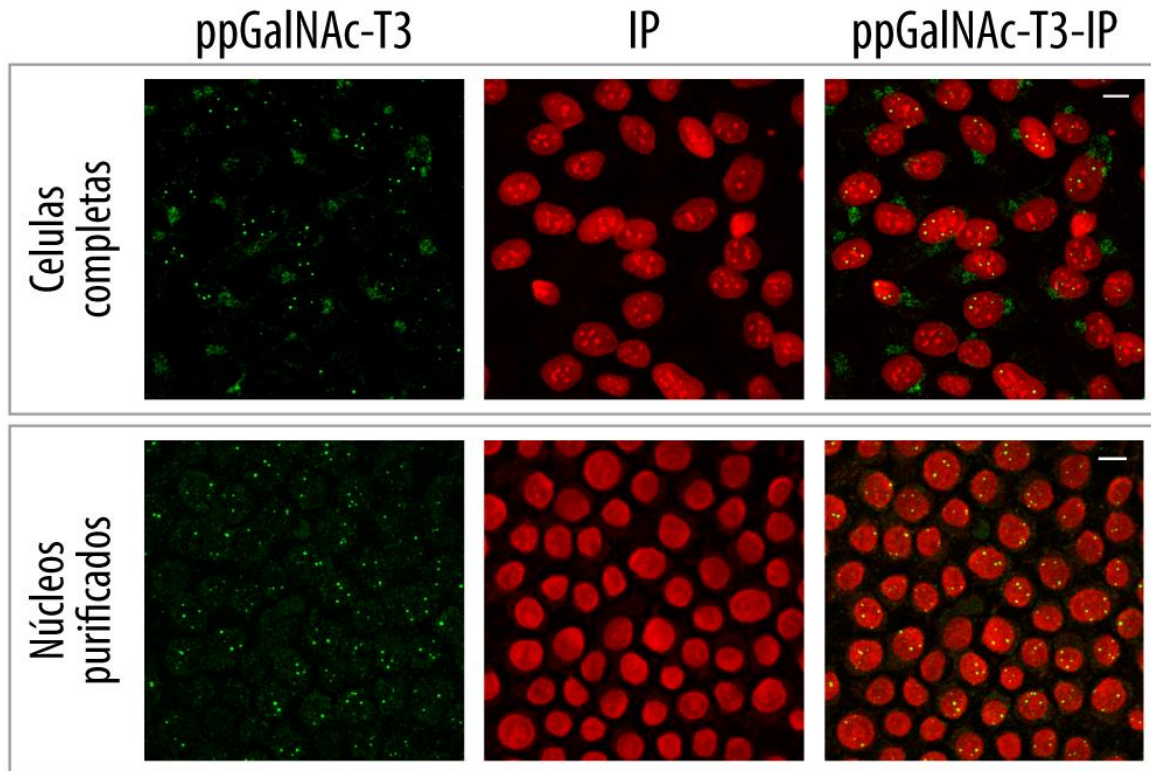
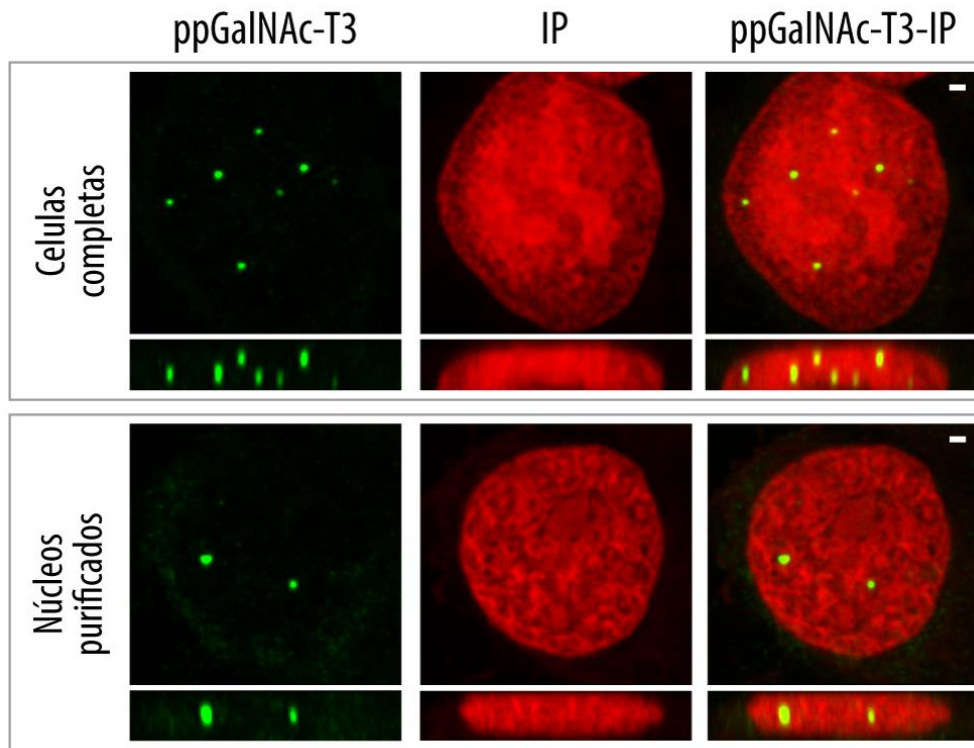


Figura 17. ppGalNAc-T3 en células completas y núcleos purificados

La localización subcelular de ppGalNAc-T3 en núcleos purificados se estudió por microscopía confocal. ppGalNAc-T3 se detecta con el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 (verde) tanto en células HeLa (panel superior) así como en núcleos purificados (panel inferior). En ambos casos los núcleos fueron teñidos con IP (rojo). Las imágenes representativas muestran (de izquierda a derecha) los canales individuales de la señal de anti ppGalNAc-T3 en verde, de IP en rojo y el modo compuesto (combinación de ambos canales). La barra de escala equivale a 10 $\mu$ m.

También se tomaron imágenes en Z, es decir, incluyendo la profundidad del volumen nuclear/celular para explorar la distribución dentro del núcleo. En este caso las imágenes confocales fueron obtenidas a mayor aumento para obtener detalles de la distribución subcelular.

En la Figura 18 se aprecia el patrón moteado de ppGalNAc-T3 (verde), el cual se mantiene en los núcleos purificados. Según puede observarse en las reconstrucciones en vista axial (Y,Z), en ambas condiciones (células completas y núcleos purificados) las partículas nucleares de ppGalNAc-T3 se encuentran dentro del núcleo, coincidiendo con la señal de IP (rojo).



**Figura 18. Localización nuclear de ppGalNAc-T3**

La localización de ppGalNAc-T3 dentro del núcleo se analizó mediante microscopía confocal en células completas y núcleos purificados. ppGalNAc-T3 (verde) se encuentra distribuida dentro del núcleo tanto en células completas (panel superior) así como en núcleos purificados (panel inferior). En ambos casos los núcleos fueron teñidos IP (rojo). Las imágenes representativas muestran (de izquierda a derecha) los canales individuales de la señal de anti ppGalNAc-T3 o IP y el modo compuesto (combinación de ambos canales). Para cada una de estas imágenes se muestra la vista ortogonal (Y, Z). La barra de escala equivale a 1 $\mu$ m.

En adición, se estudió la presencia de ppGalNAc-T3 en las diferentes fracciones subcelulares. Para ello, células HeLa fueron sometidas a fraccionamiento subcelular y las fracciones de Citoplasma, Núcleo y Nucleoplasma, así como las células completas fueron sometidas a 4-20% SDS-PAGE y electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con Anti ppGalNAc-T3 y con anticuerpos dirigidos contra marcadores de compartimentos celulares (Golgi, RE, citosol y núcleo).

En el WB que se muestra en la Figura 19, se aprecia claramente la presencia de ppGalNAc-T3 en la fracción nuclear. También se observa una pequeña cantidad de ppGalNAc-T3 en nucleoplasma. Además la proteína es detectada en las células completas y en la fracción citoplasmática, tal como es de esperarse según su distribución típica en membrana. Fueron incluidos en el ensayo la detección de marcadores de Golgi (Anti-Golgin97), RE (Anti-Calreticulina), Citosol (Anti- $\alpha$ -Tubulina) y Núcleo (Anti-Histona 3). Se observan todos los marcadores en las células completas, los

marcadores de Golgi, RE, citosol y ppGalNAc-T3 en la fracción Citoplasmática, mientras que el marcador nuclear y ppGalNAc-T3 se encuentran en cantidades apreciables en las fracciones Nuclear y cantidades similares a núcleo de histona en Nucleoplasma, mientras que ppGalNAc-T3 se encuentra en una pequeña cantidad en esta última fracción. Estos resultados coinciden con la observación de ppGalNAc-T3 distribuida en núcleo mediante microscopía confocal. Se observa claramente en el ensayo de Western blot que una fracción de ppGalNAc-T3 se distribuye en membrana y, aunque no se conoce que estas enzimas posean una señal de localización nuclear, es clara su distribución en el núcleo de células HeLa.

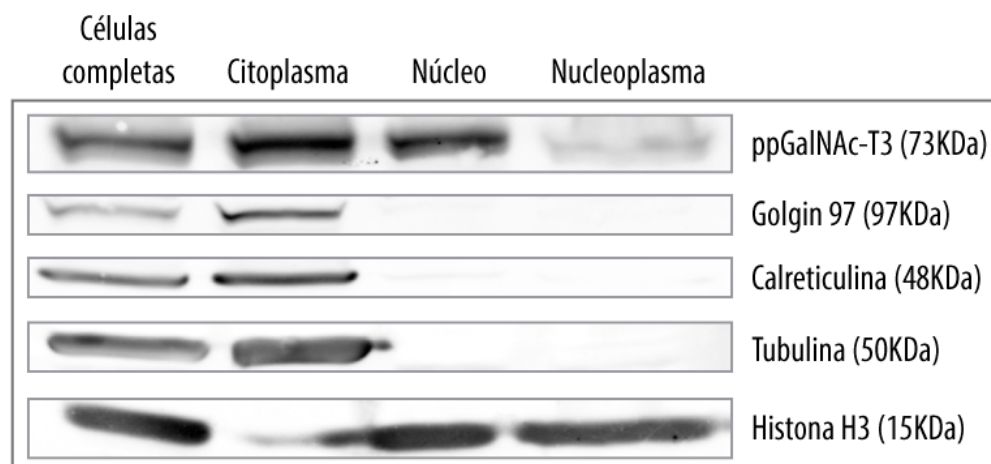


Figura 19. ppGalNAc-T3 en las diferentes fracciones subcelulares

En el Western Blot se detecta la presencia de ppGalNAc-T3 en células completas y en las fracciones de Citoplasma, Núcleo y Nucleoplasma junto con los marcadores de organelas Golgin 97 (Golgi), Calreticulina (RE),  $\alpha$ -Tubulina (Citosol) y la Histona H3 (Núcleo) en. ppGalNAc-T3 es detectado en todas las fracciones, con una clara localización en la fracción nuclear.

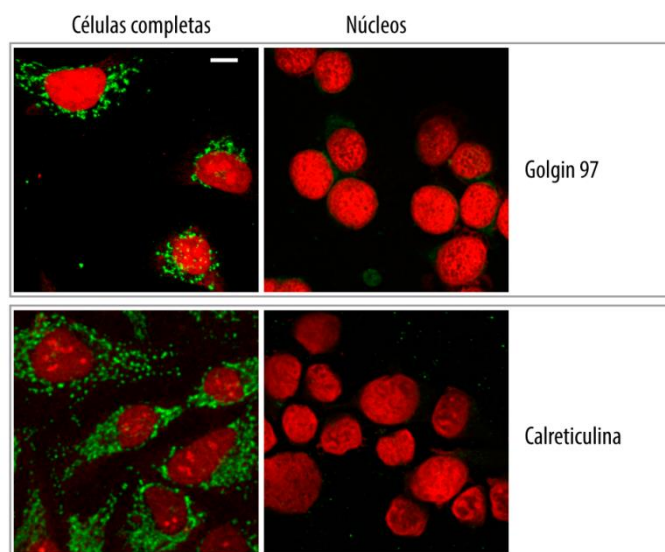
#### 4. Eficiencia del fraccionamiento subcelular

En este ensayo se evaluó la integridad de los núcleos purificados obtenidos, así como el grado de pureza de la fracción nuclear y de nucleoplasma, a partir del fraccionamiento subcelular de células HeLa. Las células completas lisadas y fracciones equivalentes de Citoplasma, Núcleos y de Nucleoplasma fueron sembradas en un gel de policarilamida 4-20% y sometidas a corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), y luego electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Mediante Western Blot (WB) se evaluó la presencia de marcadores de diferentes compartimentos celulares incluyendo: Golgi (Anticuerpo Anti-Golgin97), RE (Anticuerpo Anti-Calreticulina), Citosol (Anticuerpo Anti- $\alpha$ -Tubulina) y Núcleo (Anticuerpo Anti-Histona 3) tal



como se muestra en la Figura 19. Se observan todos los marcadores en las células completas, marcadores de Golgi, RE y citosol en la fracción Citoplasmática, mientras que sólo se observa el marcador nuclear en cantidades apreciables en las fracciones Nuclear y de Nucleoplasma.

Los núcleos purificados (núcleos completos sin lisar) también fueron evaluados, de manera complementaria, mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como puede apreciarse en la Figura 20, células HeLa completas y Núcleos purificados fueron analizados utilizando los marcadores de Golgi Golgin 97 y de RE Calreticulina, ambos se muestran en color verde. Los núcleos fueron teñidos con IP que se observa en color rojo. Los marcadores de Golgi y RE se observan claramente en las células crecidas en cultivo, mostrando los patrones de distribución característicos para cada una de las organelas. Luego del fraccionamiento subcelular, la marcación nuclear persiste mientras que se nota de forma clara la pérdida de los marcadores citoplasmáticos. Esto concuerda con las observaciones realizadas en el ensayo de WB. Además, los núcleos siguen manteniendo su morfología característica e integridad luego de ser sometidos a este proceso.



**Figura 20. Obtención de núcleos y chequeo del grado de pureza**

El fraccionamiento subcelular a partir de células HeLa fue evaluado con diferentes marcadores de organelas y mediante distintas metodologías. Se muestra una imagen obtenida mediante microscopía confocal de células y núcleos purificados, ambos fueron fijados y procesados por inmunofluorescencia utilizando los marcadores Golgin 97 y Calreticulina (Verde) e IP (Rojo). Los marcadores evaluados muestran una distribución característica de Golgi (Golgin 97) o RE (Calreticulina), respectivamente, en las células completas. La señal de los marcadores citoplasmáticos se pierde en los núcleos purificados. Se muestra la barra de escala, la cual equivale a 10µm.

## 5. Disponibilidad de UDP-GalNAc en núcleo

En base al hallazgo de la presencia de ppGalNAc-T3 en el núcleo celular, se estudió la disponibilidad de UDP-GalNAc en el núcleo de células HeLa, ya que éste azúcar nucleótido es dador de GalNAc en la unión covalente a Ser/Thr catalizada por las ppGalNAc-Transferasas. Para ello se procedió a realizar un fraccionamiento subcelular y se evaluó la presencia de UDP-GalNAc mediante un ensayo enzimático en diferentes fracciones subcelulares. El ensayo enzimático consistió en la inmovilización del sustrato aceptor (MUC2) en una placa multiorificios a la cual se le agrega la enzima recombinante purificada ppGalNAcT-2 y, como fuente de UDP-GalNAc, la muestra a analizar. Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C para permitir la actividad enzimática, la generación del glicopéptido GalNAc $\alpha$ MUC2 es detectada con el uso de la lectina VVL biotinilada que es capaz de reconocer dicho terminal en las proteínas. Posteriormente la lectina es detectada con Estreptavidina conjugada a peroxidasa y revelada coloriméticamente. En una primera instancia se utilizaron distintas concentraciones de un estándar de UDP-GalNAc, con el propósito de generar una curva de trabajo. En la Figura 21 se aprecia una linealidad adecuada de la curva de trabajo, en un rango de concentraciones en el orden nM de UDP-GalNAc.

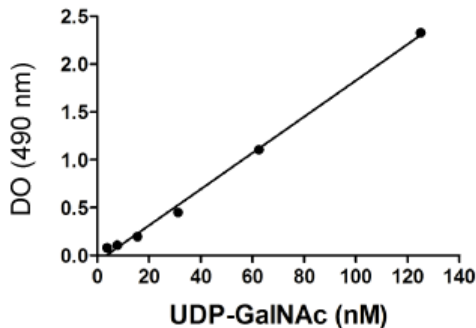


Figura 21. Curva de trabajo para la cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo

Para la determinación del azúcar nucleótido UDP-GalNAc en fracciones subcelulares de células HeLa, en primera instancia se realizó una curva de trabajo con concentraciones conocidas de UDP-GalNAc. De esta forma se detectó la densidad óptica (DO) a 490 nm, resultante de la actividad de ppGalNAcT-2 sobre el sustrato proteico MUC2.

La concentración de UDP-GalNAc se midió en el nucleoplasma obtenido de células HeLa, y adicionalmente en la fracción citoplasmática y de lavado final previo al lisado de los núcleos. Además, se cuantificó la concentración de UDP-GalNAc en el nucleoplasma de núcleos previamente incubados con UDP-GalNAc durante 1 hora (Nucleoplasma + UDP-GalNAc), así como en el lavado final correspondiente previo a la obtención del nucleoplasma.

A continuación en la Tabla 3 se muestran los valores de la cuantificación de UDP-GalNAc, los cuales hacen referencia a la concentración media de UDP-GalNAc ( $\mu\text{M}$ ) y su correspondiente desviación estándar.

Tabla 3. Cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo

Fracción	Citoplasma	Lavado	Nucleoplasma	Lavado final + UDP-GalNAc	Nucleoplasma + UDP-GalNAc
UDP-GalNAc ( $\mu\text{M}$ )	$24 \pm 2,7$	$0,015 \pm 0,005$	$0,330 \pm 0,052$	$0,060 \pm 0,009$	$0,510 \pm 0,098$

La concentración de UDP-GalNAc se midió en la fracción citoplasmática y en el nucleoplasma de núcleos previamente incubados sin (Nucleoplasma) o con UDP-GalNAc (Nucleoplasma + UDP-GalNAc), así como en los lavados finales correspondientes, antes de obtener el nucleoplasma. Los valores mostrados hacen referencia a la concentración media de UDP-GalNAc ( $\mu\text{M}$ ) y la correspondiente desviación estándar.

El mayor valor de concentración de UDP-GalNAc fue detectado en la fracción citoplasmática ( $24 \mu\text{M}$ ) tal como era de esperarse, ya que aquí es donde se sintetiza este azúcar. En el buffer correspondiente al último lavado de los núcleos se detecta una cantidad muy baja de UDP-GalNAc, mientras que la concentración de UDP-GalNAc que se logra cuantificar en nucleoplasma es de  $0,33 \mu\text{M}$ , demostrando la presencia del sustrato dador de GalNAc de ppGalNAc-transferasas en esta última fracción. Cuando los núcleos son previamente sobreglicosilados, el UDP-GalNAc detectado en nucleoplasma es de  $0,51 \mu\text{M}$ . Esta es una mayor concentración que lo presente endógenamente en núcleo, mostrando el ingreso de UDP-GalNAc al núcleo celular. Además la cantidad de UDP-GalNAc detectada en nucleoplasma es notablemente menor a la cuantificada en los respectivos lavados, demostrando que el azúcar en la fracción nuclear no es una contaminación de la fracción citoplasmática. Más aún, se estima que el valor de UDP-GalNAc en nucleoplasma sería mayor, perdiéndose por difusión desde el interior nuclear hacia el *buffer* de lavado.

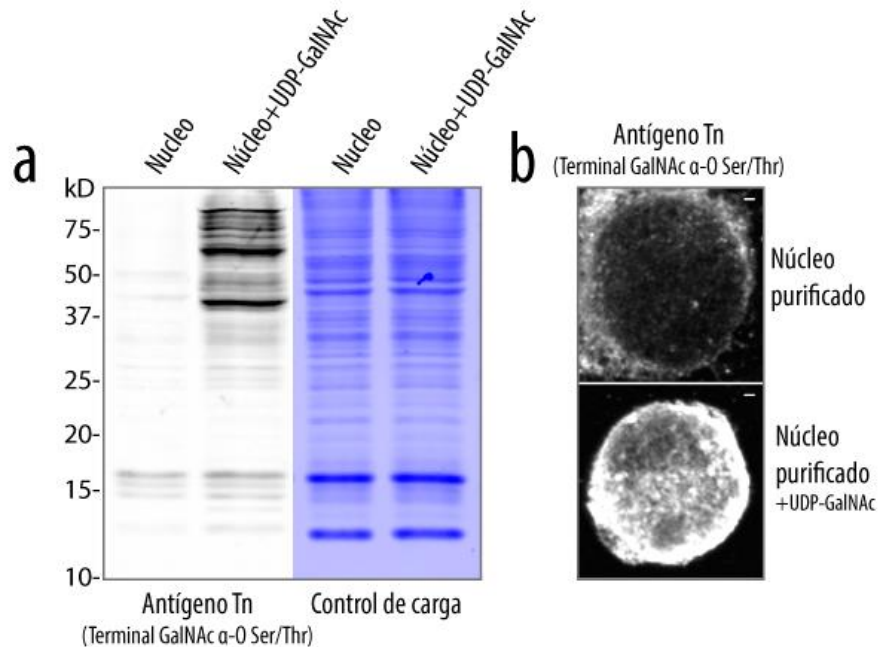
## 6. Análisis de la glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo

Dadas las evidencias que soportan la presencia de al menos una isoforma de ppGalNAc-T en el núcleo celular, sumado a la detección del sustrato UDP-GalNAc en nucleoplasma y su evidente capacidad para ingresar al núcleo, se estudió la O-glicosilación de tipo GalNAc y la actividad GalNAc-transferasa en núcleo. Con este propósito, se utilizó un modelo de estudio de la O-GalNAc glicosilación que incluye la obtención de núcleos purificados intactos a partir de células HeLa los cuales son posteriormente incubados sin o con el azúcar dador UDP-GalNAc durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo de incubación, los núcleos son lavados sucesivamente, y se analiza la

O-GalNAc glicosilación en estos núcleos, resultante de la actividad transferasa de ppGalNAc-T/s presente en esta organela. De ahora en más se denominará como “Núcleos sobreglicosilados” a estos núcleos purificados pre-incubados con UDP-GalNAc.

Para la detección de los glicanos de tipo O-GalNAc, se utilizaron las lectinas biotiniladas HPA (Lectina de *Helix pomatia*) o VVL (Lectina de *Vicia villosa*) que luego son reveladas con Estreptavidina conjugada a IR dye 800, o Alexa 488, o peroxidasa para su análisis mediante WB, microscopía de fluorescencia o ensayos colorimétricos en placa, respectivamente. Ambas lectinas, si bien son de diferentes orígenes, son capaces de reconocer por igual el terminal  $\alpha$ GalNAc unido a Ser y Thr presentes en las proteínas.

En la Figura 22 se muestra la O-GalNAc glicosilación detectada con HPA en núcleos purificados (O-GalNAc glicosilación endógena) y en núcleos purificados incubados con UDP-GalNAc. En el WB de la Figura 22 a, se observa un notable aumento en el nivel de O-GalNAc glicosilación en núcleos purificados cuando los mismos son pre-incubados con el azúcar UDP-GalNAc. En forma simultánea se realizó un SDS-PAGE que fue teñido con azul de Coomassie, el cual se utilizó como control de la carga. Este aumento en el nivel de O-GalNAc glicosilación también fue estudiado mediante microscopía confocal. En la Figura 22 b, se muestra una imagen correspondiente al mejor plano nuclear de un núcleo purificado donde se aprecia un nivel bajo de glicosilación (endógena) dentro del núcleo, así como también presencia de señal en la periferia del núcleo. Luego del agregado de UDP-GalNAc, la O-GalNAc glicosilación aumenta marcadamente en correspondencia de lo observado en el WB, notándose marcación dentro del núcleo.

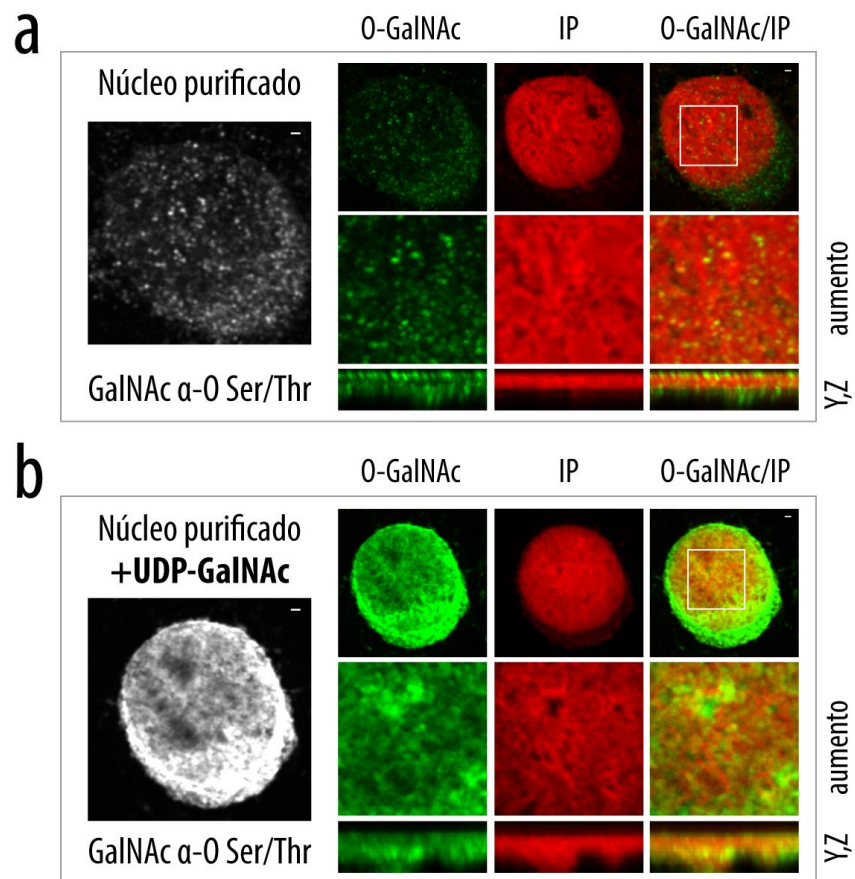


**Figura 22. O-Glicosilación de tipo GalNAc y actividad GalNAc-T en núcleos purificados**

O-Glicosilación de tipo GalNAc, detectada con la lectina HPA, en núcleos purificados a partir de células HeLa y en núcleos preincubados con UDP-GalNAc. La lectina HPA, al igual que VVL, reconoce los terminales  $\alpha$ GalNAc en las proteínas. Dichas lectinas conjugadas a biotina pueden ser luego detectadas con Estreptavidina, conjugada a fluoróforos. a. A la izquierda se muestra un WB revelado con HPA biotinilada y estreptavidina, donde se aprecia el aumento del nivel de O-GalNAc glicosilación en núcleos purificados respecto a cuándo son incubados con UDP-GalNAc. El SDS-PAGE teñido con Azul Brillante de Coomassie (izquierda) muestra el control de carga. b. Microscopía confocal de fluorescencia mostrando en escala de grises, la presencia de terminales O-GalNAc detectados con la Lectina HPA biotinilada y estreptavidina, en núcleos purificados (O-GalNAc glicosilación endógena) y en núcleos sobreglicosilados. En ambos casos se muestra la señal correspondiente al mejor plano nuclear. La barra de escala equivale a  $1\mu\text{m}$ .

En un paso siguiente se estudió en forma más detallada la distribución de la O-GalNAc glicosilación en núcleos purificados mediante microscopía confocal, utilizando como herramienta el análisis en profundidad de las muestras analizadas. Con este fin, núcleos purificados o núcleos purificados pre-incubados con UDP-GalNAc fueron colocados en cubreobjetos poli-lisinados, fijados e incubados con la lectina VVL que según fue previamente mencionado, reconoce de forma específica el terminal O-GalNAc Ser/Thr de las proteínas, al igual que HPA. Luego la Lectina es revelada con Estreptavidina conjugada a Alexa 488. Además los núcleos fueron teñidos con IP, para estudiar la distribución de la O-GalNAc glicosilación en referencia a este marcador nuclear. Según se muestra en la Figura 23, la O-GalNAc glicosilación detectada con VVL (verde), aumenta drásticamente cuando los núcleos purificados son incubados durante una hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con UDP-GalNAc. Si se analizan las imágenes que muestran la composición y los canales individuales para el terminal O-GalNAc (verde) e IP (rojo), puede notarse que hay una leve señal dentro del núcleo con un patrón puntillado en los núcleos incubados sin UDP-GalNAc (Figura 23 a). Con la incubación de la

núcleos purificados con UDP-GalNAc (Figura 23 b), aumenta de forma clara la señal de O-GalNAc glicosilación dentro del núcleo. En la Figura 23 también se incluye una región aumentada (aumento) que corresponde a la zona nuclear delimitada por la selección rectangular. Allí es posible apreciar en mayor detalle la señal de O-GalNAc glicosilación nuclear. Además se incluye una vista ortogonal (Y, Z) de la pila de imágenes de cada condición, que corresponde a la región nuclear aumentada. En las vistas ortogonales, también mostradas en modo composición y en sus canales individuales se denota que la O-GalNAc glicosilación endógena (Figura 23 a) presenta una distribución en la periferia y en la interfaz del núcleo, con un patrón de tipo puntillado. En el caso de los núcleos sobreglicosilados (Figura 23 b) la distribución en esta región coincide claramente con el marcador nuclear, indicando que la O-GalNAc glicosilación se distribuye dentro del núcleo.

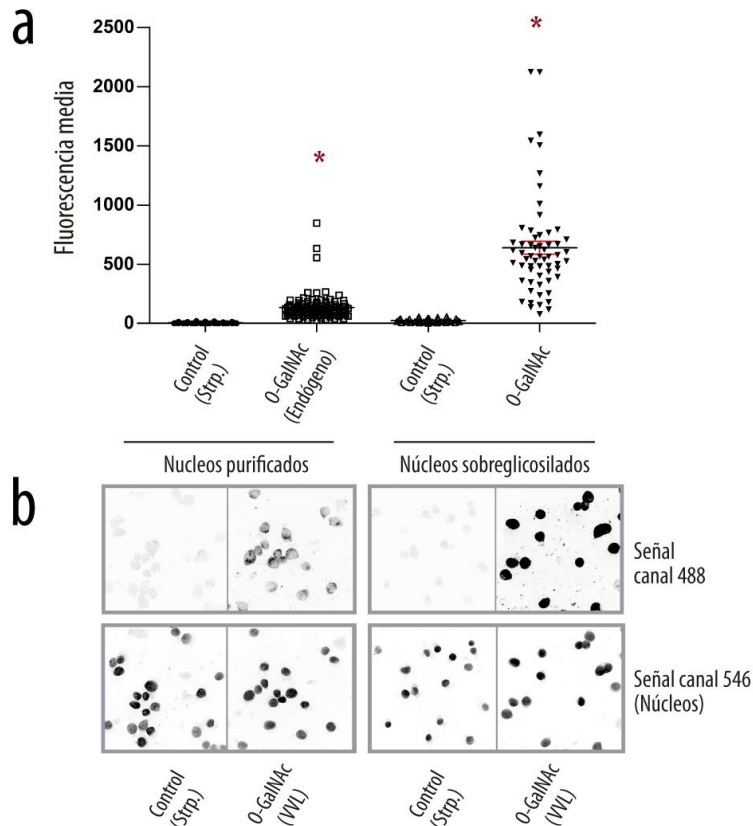


**Figura 23. Localización nuclear de la O-GalNAc glicosilación**

Núcleos purificados a. incubados sin UDP-GalNAc o b. incubados con UDP-GalNAc fueron analizados por microscopía confocal de fluorescencia con el objetivo de apreciar la distribución nuclear de la O-GalNAc glicosilación. La O-GalNAc glicosilación, detectada con VVL, aumenta drásticamente ante la presencia de UDP-GalNAc. Se muestran la composición y los canales individuales para el terminal O-GalNAc (verde) e IP (rojo) del plano nuclear en ambas condiciones. También se muestra una región aumentada (aumento), marcada por la selección rectangular en blanco y la vista ortogonal de esta región nuclear (Y, Z) en modo composición y para los canales individuales en cada una de las condiciones. La barra de escala equivale a 1  $\mu$ m.

También se cuantificó el nivel de O-GalNAc glicosilación en núcleos sobreglicosilados respecto a los niveles detectados de glicosilación endógena, para tener un parámetro cuantitativo del grado de aumento en la glicosilación en esta condición. Mediante la toma de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia, se determinó el nivel de fluorescencia correspondiente a O-GalNAc glicosilación, por núcleo. Los núcleos purificados fueron fijados sobre cubreobjetos polilisinados y posteriormente procesados para fluorescencia. Las condiciones analizadas incluyeron preparados de núcleos purificados incubados con la lectina VVL (biotinilada) y posteriormente con estreptavidina-Alexa488 para detectar los glicanos de tipo O-GalNAc endógeno. Como control se incubaron los preparados con Estreptavidina-Alexa488, sin la presencia de VVL. También se analizaron muestras de núcleos purificados sobreglicosilados que fueron incubados con la lectina VVL (biotinilada) y posteriormente con estreptavidina-Alexa488 para detectar el terminal O-GalNAc y en este caso el control correspondiente a esta condición fueron preparados de núcleos sobreglicosilados los cuales fueron incubados sólo con Estreptavidina-Alexa488. De esta forma con los controles utilizados, que excluyen el uso de la lectina, se puede discriminar marcación inespecífica que podría provenir de proteínas nucleares biotiniladas. En todas las condiciones los núcleos fueron marcados con IP, siendo este marcador utilizado para determinar el plano nuclear en las imágenes que fueron obtenidas en modo X, Y, Z.

En la Figura 24 a, se encuentran graficados los valores de intensidad media individuales obtenidos para cada uno de los núcleos en las condiciones analizadas. También en la Figura 24 b se muestran imágenes en campo 60X representativas, correspondientes a las condiciones analizadas y mostradas en la gráfica. En estas imágenes se aprecia la señal nuclear (IP, Canal 546) y la señal de Glicosilación o inespecífica (O-GalNAc o Control, respectivamente; Canal 488) en escala de grises invertida.



**Figura 24. Cuantificación de la O-GalNAc glicosilación nuclear**

La O-GalNAc glicosilación en núcleos purificados (glicosilación endógena) y en sobreglicosilados se cuantificó mediante microscopía confocal. Preparados fijados con Núcleos purificados o Núcleos purificados pre-incubados con UDP-GalNAc fueron procesados sin lectina (Control) o con VVL biotinilada (O-GalNAc) y luego los se reveló con Estreptavidina-Alexa 488. a. Grafico mostrando la intensidad media de fluorescencia del canal 488 por núcleo en cada condición. b. Imágenes representativas de cada condición. Señal de glicosilación (O-GalNAc) o inespecífica (Control) en campos 60X (panel superior, canal 488). Los núcleos se tiñeron con IP (panel inferior, canal 546). Para ambos canales, las imágenes representativas analizadas se muestran en escala de grises (LUT invertida). (\*) Significancia estadística ( $p < 0,005$ ) medida por prueba *test de ANOVA*.

En la Tabla 4 se incluyen los resultados obtenidos en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia del canal 488 (correspondiente a la señal de glicosilación o inespecífica (controles), según si es la condición incubada con o sin la lectina, respectivamente). En dicha tabla puede apreciarse que los niveles de intensidad de fluorescencia media obtenidos en núcleos purificados son de 4,9 UA para el control (sin VVL) y de 135,4 UA cuando se detectan los terminales GalNAc con la lectina VVL (O-GalNAc glicosilación endógena). En núcleos sobreglicosilados, los valores fueron de 23,9 UA para la señal inespecífica (sin VVL) y 638,9 utilizando la lectina VVL. La señal correspondiente a la presencia de glicanos tipo O-GalNAc en núcleo es significativamente mayor a la señal inespecífica presente en los controles para cada condición analizada, evidenciando la detección del terminal Tn y no de biotinilación nuclear, en presencia de la lectina. Cuando los



núcleos purificados son sobreglicosilados con el azúcar UDP-GalNAc, la señal de O-GalNAc glicosilación aumenta alrededor de 5 veces respecto a los niveles endógenos detectados en núcleos purificados. Este aumento significativo en los niveles de glicosilación en presencia de UDP-GalNAc, muestra que los núcleos poseen una importante capacidad catalítica de tipo GalNAc-transferasa.

Tabla 4. Cuantificación de la O-GalNAc glicosilación nuclear

<b>Fluorescencia (UA)</b>	<b>Control Núcleos</b>	<b>Glicosilación endógena</b>	<b>Control Núcleos Sobreglicosilados</b>	<b>Sobreglicosilación</b>
Media	4,9	135,4	23,9	638,9
Mediana	3,5	116,5	19,6	565,8
Desv estándar	4,4	109,8	14,7	427,9
Mínimo	0,0	26,5	2,6	77,3
Máximo	19,8	847,2	56,5	2124,3
n	67	104	36	60

Cuantificación de la señal de fluorescencia (UA) nuclear correspondiente a la O-GalNAc glicosilación endógena y la O-GalNAc glicosilación en núcleos sobreglicosilados. Se incluyeron controles de señal no específica (sin lectina) para cada una de las condiciones, respectivamente (Control Núcleos y Control Núcleos Sobreglicosilados). Los valores estadísticos corresponden a la Media, Mediana, Desviación Estándar, Máximo y Mínimo de los valores de fluorescencia calculados. También se incluye el número de núcleos incluidos en cada condición (n).

Adicionalmente se trabajó en demostrar que la glicosilación que se está estudiando en este trabajo de tesis es diferente de la ya conocida O-glicosilación de tipo GlcNAc nuclear. Con este propósito, se realizaron estudios utilizando la lectina de germen de trigo (WGA) para la detección de glicanos terminales de tipo O-GlcNAc. Núcleos purificados y Núcleos purificados incubados con los azúcares UDP-GalNAc o UDP-GlcNAc fueron analizados mediante WB con las lectinas VVL y WGA. La Figura 25 muestra el aumento en el nivel de terminales de tipo O-GalNAc en núcleos incubados UDP-GalNAc y detectados con la lectina VVL, mientras que cuando los núcleos purificados son incubados con UDP-GlcNAc el patrón de glicosilación detectado con esta lectina se asemeja los núcleos sin el agregado de azúcar nucleótido. En el caso de los terminales de tipo O-GlcNAc revelados con la lectina WGA, el patrón de glicosilación nuclear no presenta cambios cuando los núcleos purificados son incubados con UDP-GalNAc o UDP-GlcNAc, respecto a la condición sin el agregado de azúcares.

En la siguiente sección (sección 7), se incluye un ensayo realizado para comprobar la reactividad de las lectinas VVL y WGA utilizadas para detectar los terminales glicoproteicos.

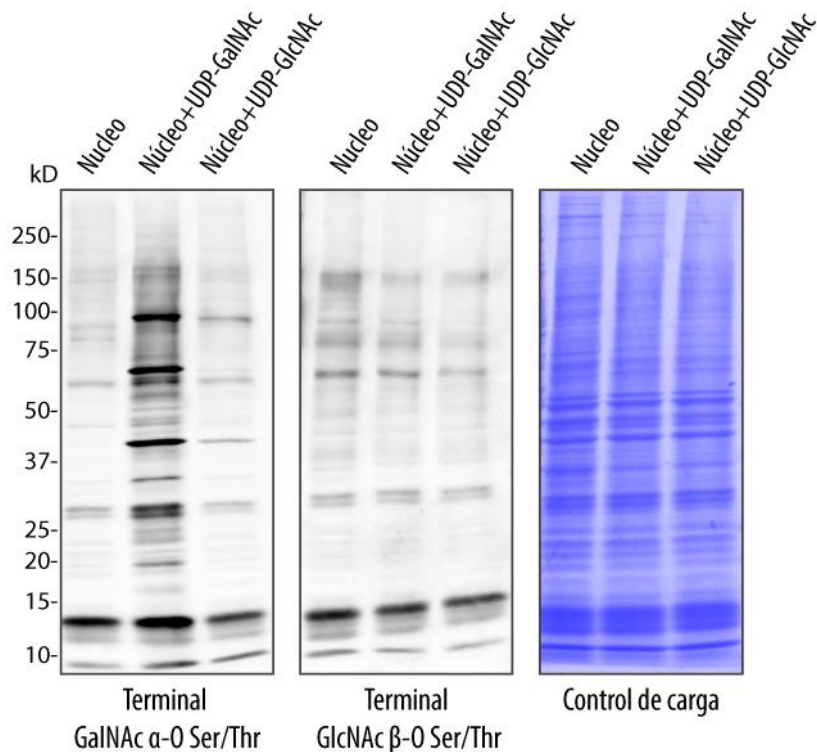
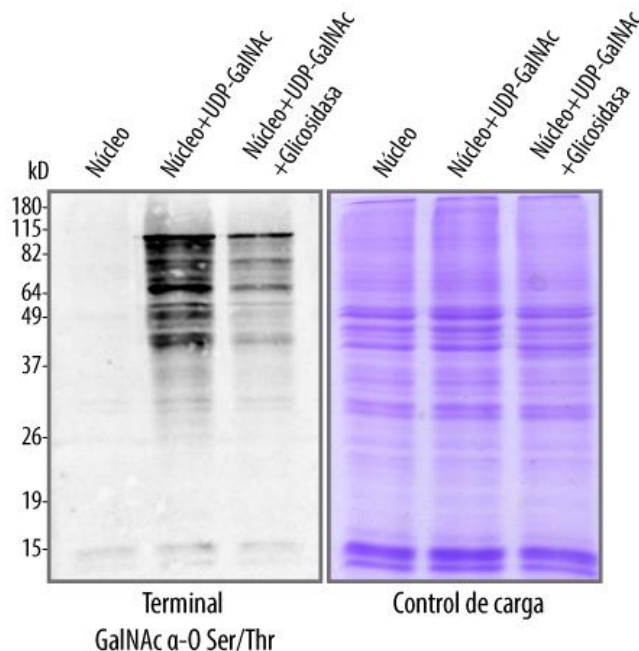


Figura 25. O-glicosilación de tipo GalNAc y GlcNAc en núcleo

La O-GalNAc glicosilación de proteínas en núcleo se detectó con la lectina VVL mientras que la O-GlcNAc glicosilación se reveló con lectina WGA. Las muestras ensayadas incluyeron: Núcleos purificados, Núcleos purificados incubados con UDP-GalNAc y Núcleos purificados incubados con UDP-GlcNAc. Como control de carga se incluyó un SDS-PAGE teñido con Azul Brillante de Coomassie.

Otro ensayo que se realizó, fue la verificación de la eliminación del terminal  $\alpha$ GalNAc de las proteínas con la enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa. En este testeo, fueron analizadas muestras de núcleos purificados, núcleos purificados incubados con UDP-GalNAc o núcleos sobreglicosilados que posteriormente fueron tratados con  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa. Estas muestras se analizaron por SDS-PAGE (control de carga) y WB con lectina HPA que, así como la lectina VVL, reconoce fuertemente proteínas glicosiladas de tipo O-GalNAc. En la Figura 26 se aprecia como el tratamiento con la  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa provoca una disminución en la señal que corresponde a la presencia de terminales de tipo O-GalNAc en las proteínas. Esta disminución en la interacción de la lectina cuando la muestra sobreglicosilada con UDP-GalNAc se incuba con O-GalNAc glicosidasa, indica que las proteínas reconocidas por la lectina fehacientemente se encuentran O-GalNAc glicosiladas.



**Figura 26. Remoción del terminal O-GalNAc por una glicosidasa**

Núcleos purificados previamente incubados con UDP-GalNAc fueron tratados con la enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa. En el WB se muestra la disminución en el reconocimiento del terminal O-GalNAc de las proteínas glicosiladas luego de la exposición a la glicosidasa. Se incluye un SDS-PAGE teñido con Coomassie como control de carga.

Posteriormente se estudió la capacidad de elongación del terminal GalNAc $\alpha$ Ser/Thr (antígeno Tn) a Gal $\beta$ 3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr (antígeno T) de las glicoproteínas, en la fracción nuclear. En este caso los núcleos purificados fueron incubados con UDP-GalNAc, o con UDP-GalNAc y posteriormente con UDP-Gal. Se utilizaron las lectinas HPA y la lectina de *Agaricus bisporus* (ABL) para detectar los terminales GalNAc- $\alpha$  Ser/Thr y Gal- $\beta$ -GalNAc- $\alpha$ - Ser/Thr, respectivamente. En la Figura 27 puede observarse que la señal de reconocimiento al antígeno Tn con HPA aumenta con el agregado de UDP-GalNAc, respecto de los núcleos incubados sin azúcar. Luego cuando los núcleos son incubados con UDP-GalNAc y UDP-Gal la señal correspondiente a la detección del antígeno Tn disminuye. En cuanto a la señal de detección del antígeno T por parte de ABL, los niveles en los núcleos incubados sin azúcar y en los núcleos con UDP-GalNAc resultan similares. En la condición donde los núcleos son incubados con UDP-GalNAc y UDP-Gal la señal aumenta, evidenciando la biosíntesis de antígeno T. Por lo tanto, el aumento de la señal de antígeno Tn en núcleos incubados con UDP-GalNAc y la posterior pérdida de la señal cuando se incuban con UDP-GalNAc y UDP-Gal, sumado a el aumento en el nivel de antígeno T en núcleos incubados con UDP-GalNAc y UDP-Gal indican que el terminal O-GalNAc en las proteínas de núcleos purificados presenta capacidad de extensión.

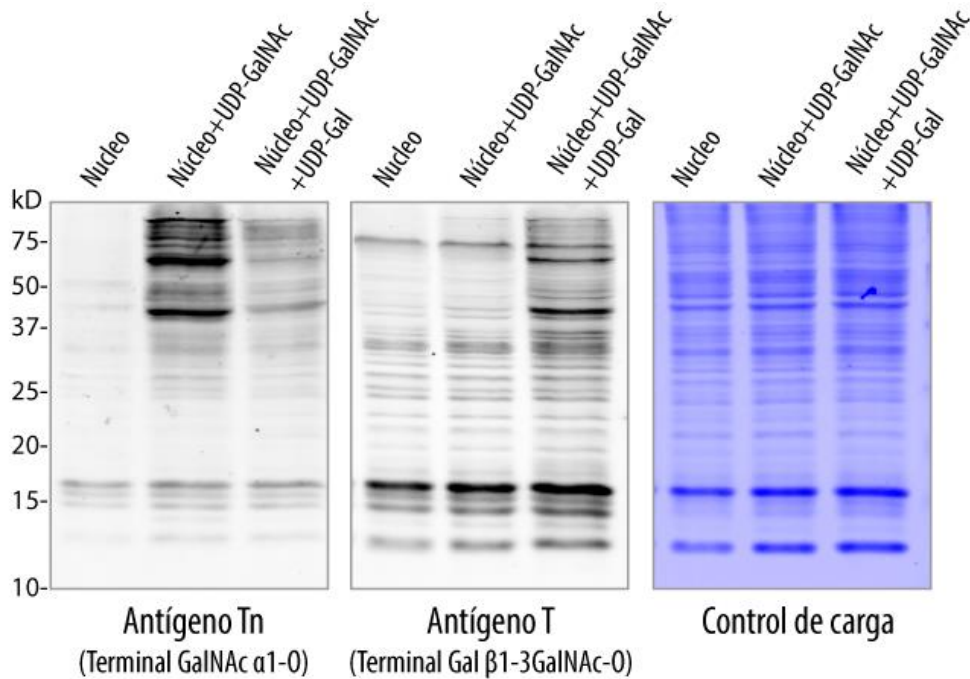


Figura 27. Extensión del antígeno Tn

Núcleos purificados fueron incubados sin azúcar nucleótido, con UDP-GalNAc, o con UDP-GalNAc y UDP-Gal. En el WB de la izquierda se muestra las proteínas con terminales GalNAc- $\alpha$ -O-Ser/Thr (Antígeno Tn) mientras que en el WB central los terminales Gal- $\beta$ -GalNAc- $\alpha$ -O-Ser/Thr (Antígeno T). Se incluye un SDS-PAGE teñido con Azul Brillante de Coomassie como control de carga.

## 7. Especificidad de las lectinas VVL y WGA

Este ensayo tuvo como objetivo comprobar la reactividad de las lectinas VVL y WGA, utilizadas en diversos ensayos para detectar terminales de tipo GalNAc y GlcNAc en las proteínas, respectivamente. Para ello, se realizó un ensayo colorimétrico en placa donde se inmovizaron diferentes concentraciones de las proteínas no glicosiladas Albúmina Sérica Bovina (BSA) y MUC1, y de glicoproteínas conteniendo N-glicanos con GlcNAc terminal como Ovoalbúmina (OVA) o con el terminal O-GalNAc, como MUC1Tn. Luego la batería de proteínas no glicosiladas-glicosiladas fue enfrentada a las lectinas VVL o WGA biotiniladas, como forma de analizar la reactividad y especificidad de reconocimiento de ambas lectinas. En la Figura 28 se muestran las gráficas de Densidad Óptica a 490 nm (DO 490 nm) luego del revelado colorimétrico en función de la concentración de proteína. En la sección *a* de la Figura 28 es posible apreciar que la lectina VVL reconoce el terminal GalNAc presente en MUC1Tn, mientras que no muestra reconocimiento por la glicoproteína OVA ni por las proteínas BSA y MUC1. . Por otra parte, la lectina WGA (Figura 28 b) reconoce principalmente los terminales  $\beta$ GlcNAc presentes en OVA, y en menor medida, a MUC1Tn

sin mostrar reconocimiento por las proteínas no glicosiladas BSA y MUC1. Los resultados obtenidos confirman que ambas lectinas son funcionales y capaces de reconocer los terminales de glicanos que estamos estudiando. Es importante destacar que la lectina VVL reconoce los terminales de tipo  $\alpha$ GalNAc en la glicoproteína MUC1Tn de manera muy específica, sin mostrar reconocimiento por terminales de tipo GlcNAc presentes en OVA. Se ha reportado también que la lectina WGA además de detectar el terminal  $\beta$ GlcNAc, también puede reconocer residuos de ácido siálico en las proteínas (Kim 2011, Ma y Hart 2014).

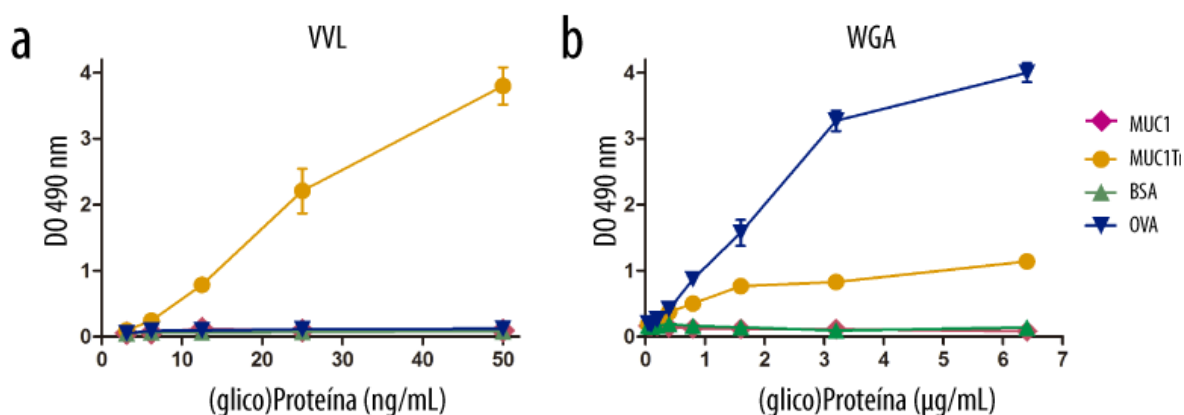


Figura 28. Especificidad de las lectinas VVL y WGA

Especificidad de reconocimiento de las lectinas VVL (a) y WGA (b) frente a las proteínas no glicosiladas BSA (triángulos verdes) y MUC1 (rombos magenta), o las glicoproteínas OVA (triángulos invertidos azules) y MUC1Tn (círculos naranja). El ensayo colorimétrico en placa evidencia el reconocimiento de las lectinas hacia las glicoproteínas, mediante el análisis de la Densidad óptica a 490 nm (DO 490nm) en función de la concentración de proteínas.

## 8. Actividad O-GalNAc glicosiltransferasa en nucleoplasma

Este ensayo se realizó con el fin de estudiar la actividad de tipo ppGalNAc transferasa en el interior nuclear. Para ello, se cuantificó la actividad ppGalNAc-transferasa en el citoplasma y en el nucleoplasma de células HeLa para lo cual se realizó un fraccionamiento subcelular y dicha actividad fue determinada mediante un ensayo enzimático en placa. Este ensayo consistió en la inmovilización del sustrato peptídico MUC1 al cual se le ofreció la muestra a analizar (citoplasma, lavado o nucleoplasma), en presencia de un exceso del azúcar dador UDP-GalNAc. Finalmente se midió el producto (GalNAc $\alpha$ MUC1) generado. El cálculo de la actividad ppGalNAc-T se realizó mediante una curva de trabajo, para lo cual se adsorbieron en placas multiorificios distintas concentraciones conocidas del glicopéptido GalNAc $\alpha$ MUC1 purificado como estándar (ver Figura 28). La actividad enzimática fue expresada en unidades internacionales (U) por mg de proteínas totales, donde 1U

corresponde a los  $\mu\text{moles } \alpha\text{GalNAc}$  unidos por minuto y las proteínas totales fueron cuantificadas por el método del ácido bicinonínico, según se describe en materiales y métodos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la cuantificación de la actividad ppGalNAc-T en las diferentes fracciones analizadas. La actividad enzimática de tipo ppGalNAc-T en nucleoplasma corresponde a niveles de  $6,65 \mu\text{U/mg}$ , mientras que en citoplasma dicha actividad alcanza  $86,3 \mu\text{U/mg}$ . No se detectó actividad transferasa en la fracción de lavado.

Tabla 5. Actividad ppGalNAc-T en nucleoplasma

Fracción	Actividad ppGalNAc-T ( $\mu\text{U/mg}$ )
Citoplasma	$86,3 \pm 7,3$
Lavado final	ND
Nucleoplasma	$6,65 \pm 0,27$

Actividad ppGalNAc-T ( $\mu\text{U/mg}$  proteínas) en las fracciones citoplasmática, de lavado y nucleoplasma de células HeLa. Los valores mostrados se acompañan de su respectiva desviación estándar. ND: Sin detección mediante el método utilizado.

Adicionalmente se analizó la actividad O-GalNAc glicosiltransferasa sobre proteínas nucleares, en la fracción nuclear soluble. Para ello el nucleoplasma de células HeLa fue obtenido mediante extracción no salina que consta de la lisis nuclear mediante sonicado en *buffer* TBS y posterior centrifugación. Luego el extracto nuclear soluble resultante fue incubado con UDP-GalNAc o con UDP-GalNAc en presencia de histonas purificadas. Las muestras se analizaron mediante WB con el uso de la lectina VVL para detectar el terminal O-GalNAc en las proteínas nucleares.

En el WB de la Figura 29 se aprecia las muestras que fueron sembradas para su análisis que incluyen el nucleoplasma obtenido a partir células HeLa, al cual se les suministró un exceso de UDP-GalNAc y fue incubado a  $-20^\circ\text{C}$  o  $37^\circ\text{C}$  durante una hora. Se aprecia un claro aumento en la señal de O-GalNAc glicosilación cuando el extracto nuclear soluble se incubaba a  $37^\circ\text{C}$  mostrando la presencia de actividad O-GalNAc glicosiltransferasa en esta fracción. Además histonas purificadas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con un exceso de UDP-GalNAc y con el extracto nuclear soluble como fuente enzimática, o con las enzimas recombinantes ppGalNAc-T2, ppGalNAc-T3 o sin enzimas (control). Puede observarse el aumento en el nivel de O-GalNAc glicosilación de las histonas en presencia de las enzimas ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 así como cuando las histonas son incubadas con la fracción soluble de núcleo, mostrando una vez más la actividad de ppGalNAc transferasa/s en el nucleoplasma y su capacidad de glicosilar proteínas nucleares. Las enzimas ppGalNAc-T2 y

ppGalNAc-T3 son capaces de glicosilar histonas *in vitro*, mostrando también la fracción nucleoplasmática actividad GalNAc-Transferasa que resulta en un patrón de glicosilación sobre estas histonas similar a la de las enzimas purificadas. En las histonas purificadas pueden diferenciarse las 4 histonas core las cuales presentan de menor a mayor movilidad electroforética: H3 (15,3 KDa), H2a (14 KDa), H2b (13,8 KDa) y H4 (11,3 KDa) (Figura 37) (Johns 1964, Elgin y Weintraub 1975).

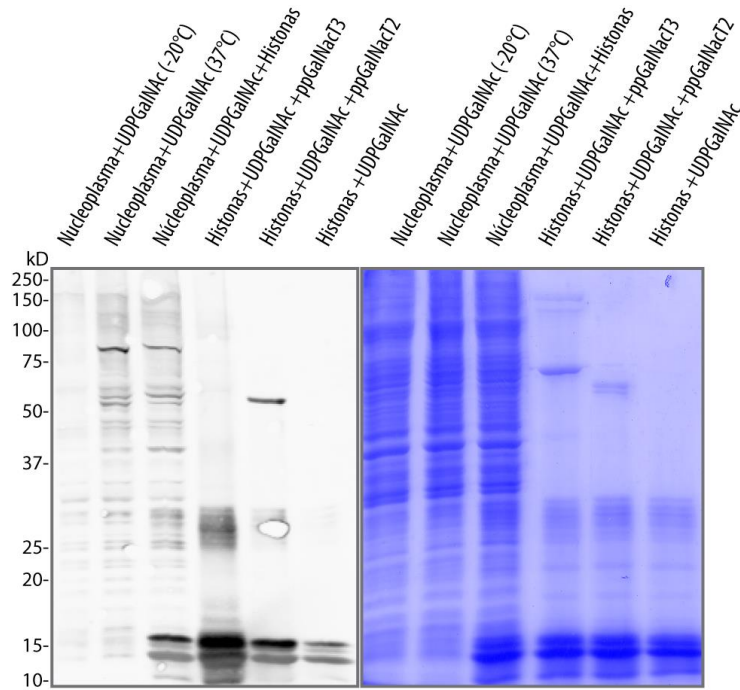


Figura 29. Actividad O-GalNAc glicosiltransferasa en la fracción nuclear soluble

Actividad O-GalNAc GT en la fracción nuclear soluble. Las muestras se analizaron mediante WB con la lectina VVL. El nucleoplasma se incubó con UDP-GalNAc a -20 °C, 37 °C y a 37 °C en presencia de Histonas purificadas. Además las Histonas purificadas se incubaron a 37 °C con UDP-GalNAc y con ppGalNAc-T3 purificada, con ppGalNAc-T2 purificada o sin enzimas (control). El SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie muestra el control de carga.

## 9. Identificación de las proteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas

En un paso siguiente se procedió a identificar a las proteínas glicosiladas endógenamente y también a aquellas proteínas capaces de ser sobreglicosiladas. Para la identificación de las proteínas glicosiladas endógenamente, el nucleoplasma obtenido mediante extracción salina a partir de núcleos purificados de células HeLa fue enfrentando a una columna de agarosa a la cual previamente se le inmovilizó la lectina VVL. Las glicoproteínas retenidas por esta columna fueron enviadas para su análisis mediante espectrometría de masas. Además se incluyó una columna control de la misma agarosa sin lectina, a la cual también se le ofreció el nucleoplasma y se analizaron las proteínas retenidas. El criterio utilizado para identificar las proteínas O-GalNAc glicosiladas fue que el valor de

la relación del parámetro PSM o *Peptide Spectrum Matches* (Espectro de coincidencia de los péptidos) de los péptidos correspondientes a las proteínas retenidas por la columna con VVL, fuera al menos 3 veces mayor que el detectado en la columna sin lectina. En la Tabla 6 se muestran las glicoproteínas identificadas en el nucleoplasma de células HeLa. Las glicoproteínas identificadas corresponden a las proteínas ribosomales 40S RPS6 y RPS3, ambas con localización nuclear y citoplasmática según las bases de datos de UNIPROT (UniProt 2015) y *The Nuclear Protein Database* (NPD) (Dellaire *et al.* 2003). Los valores de relación PSM fueron de 4 y 3 para las proteínas RPS6 y RPS3, respectivamente.

Tabla 6. Glicoproteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas

PSM (VVL+/VVL-)	Código UNIPROT	Nombre	Localización Subcelular (UNIPROT)	Localización Subcelular (NPD)
4	P62753	Proteína ribosomal 40S S6 (RPS6)	Nucleolo, Nucleoplasma, Citoplasma	Nucleolo, C. Cajal, Citoplasma
3	P23396	Proteína ribosomal 40S S3 (RPS3)	Nucleolo, Nucleoplasma, Citoplasma	Núcleo

Proteínas nucleares constitutivamente O-GalNAc glicosiladas identificadas por análisis de espectrometría de masa. Las proteínas identificadas se ordenaron en base a la relación de PSMs y se muestra su localización subcelular según las bases de datos UNIPROT y NPD.

Para identificar las proteínas sobreglicosiladas, se ofreció a la columna de agarosa-VVL el nucleoplasma obtenido mediante extracción salina proveniente de núcleos purificados sobreglicosilados. También se incluyó una columna control de agarosa sin VVL, a la que también se le ofreció el nucleoplasma sobreglicosilado. En la Tabla 7 se muestra el total de las 25 proteínas identificadas, de las cuales según las bases de datos, 16 corresponden a proteínas Núcleo-Citoplasmáticas, 7 son proteínas nucleares. Si bien 2 de ellas no están descritas en núcleo, guardan estrecha relación con proteínas de la LN.



**Tabla 7. Glicoproteínas nucleares sobre-O-GalNAc glicosiladas**

PSM (VVL+/VVL-)	Código UNIPROT	Nombre	Localización Subcelular (UNIPROT)	Localización Subcelular (NPD)
30	P02545	Pre Lamina A/C (LMNA)	Envoltura Nuclear, Nucleoplasma, Speckle	Lámina Nuclear
22	P20700	Lamina B1 (LMNB1)	Envoltura Nuclear, Nucleoplasma	Lámina Nuclear
17	P23246-2	SFPQ, Isoforma corta (SFPQ)	Paraspeckles, Matriz Nuclear	Paraspeckles, Nucleolo
8	Q15233	Proteína NONO (NONO)	Paraspeckles, Nucleolo, Nucleoplasma	Paraspeckles, Nucleolo, Nucleoplasma
8	P36957	Componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDC-E2)	Mitocondria, Núcleo	Sin datos
7	Q03252	Lamina B2 (LMNB2)	Envoltura Nuclear, Núcleo	Lámina Nuclear
6	P04843	Riboporina 1 (RPN-1)	RE	Sin datos
5	P23396	Proteína ribosomal 40S S3 (RPS3)	Nucleolo, Nucleoplasma, Citoplasma	Núcleo
4,7	P38159	Proteína de unión a motivos de ARN, cromosoma X (RBMX)	Núcleo, Spliceosoma	Nucleolo, Speckle, ICG
4	Q08211	ARN helicasa A, dependiente de ATP (DHX9)	Nucleolo, Nucleoplasma, Gr. de estrés, Citoplasma	Núcleo, Nucleolo, C. PML
4	P61979-3	Ribonucleoproteína K heterogénea nuclear, Isoforma 3 (hnRNP K)	Nucleoplasma, Spliceosoma, Citoplasma	Núcleo, Nucleolo, Citoplasma
4	P49458	Partícula de reconocimiento de señal de proteína 9 kDa (SRP9)	Citoplasma	Núcleo
3,5	P62269	Proteína ribosomal 40S S18 (RPS18)	Núcleo, Nucleoplasma, Citoplasma	Nucleolo
3,5	P61247	Proteína ribosomal 40S S3a (RPS3A)	Núcleo, Nucleolo, Citoplasma	Nucleolo
3	P62263	Proteína ribosomal 40S S14 (RPS14)	Nucleolo, Nucleoplasma, Citosol	Nucleolo
3	P08865	Proteína ribosomal 40S SA (RPSA)	Núcleo, Nucleoplasma, Citoplasma	Nucleolo
3	P05388	Proteína acidica ribosomal 60S P0 (RPLP0)	Núcleo, Citoplasma	Nucleolo
3	P05387	Proteína acidica ribosomal 60S P0 P2 (RPLP2)	Citoplasma	Nucleolo
3	P68104	Factor de elongación 1- $\alpha$ -1 (EF-1- $\alpha$ -1)	Nucleolo, Citoplasma	Nucleolo
3	P35232	Prohibitina (PHB)	Nucleolo, Citoplasma, Mitocondria	Núcleo, Nucleolo, Mitocondria
3	Q99623	Prohibitina 2 (PHB2)	Nucleolo, Citoplasma, Mitocondria	Núcleo
3	Q9Y262	Factor de inicio de traducción Eucariota 3 subunidad L (eIF31)	Núcleo, Nucleolo, Citoplasma	Núcleo
3	P21333-2	Filamina A, Isoforma 2 (FLNA)	Núcleo, Nucleolo, Citoplasma	Núcleo, Citoplasma
3	075533	Factor de empalme 3B subunidad 1 (SF3B1)	Nucleoplasma, Speckle	Nucleolo, Speckle
3	Q15149	Plectina (PLEC)	Citoplasma	Sin datos

Proteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas identificadas por análisis de espectrometría de masa de nucleoplasma sobreglicosilado. Las proteínas identificadas se ordenaron en base a la relación de su PSMs y se muestra su localización subcelular según las bases de datos UNIPROT y NPD.

En conjunto las proteínas identificadas que se localizan en núcleo suman un total de 23, representando el 92% del total de proteínas identificadas en el análisis de espectrometría de masas. Estos resultados indican claramente que el método empleado es eficiente, permitiendo el enriquecimiento de proteínas nucleares. La proteína identificada con el mayor valor de relación PSMs es la Pre-LMN A/C (30) seguida de LMN B1 (22) y la proteína SFPQ (17). Las proteínas NONO y OGDC-E2 tienen un PSMs de 8, mientras que LMN B2 y RPN1 tienen PSMs de 7 y 6 respectivamente. Le siguen las proteínas RPS3 (5) y RBMX (4,7). Las proteínas DHX9, hnRNP K y SRP9 presentan un PSMs de 4, mientras que RPS18 y RPS3A de 3,5. Finalmente, las proteínas con menores valor de PSMs (3) son RPS14, RPSA, RPLP0, RPLP2, EF 1 $\alpha$ 1, PHB1, PHB2, EIF31, FLNA, SF3B1 y PLEC. Las proteínas identificadas incluyen componentes de la Lámina nuclear como las proteínas Pre-LMN

A/C, LMN B1 y LMN B2. También se encuentran diversas proteínas que integran diferentes cuerpos nucleares como lo son los Paraspeckles (SFPQ y NONO), Nucleolo (Proteínas Ribosomales 40S y 60S, EF 1 $\alpha$ 1) y Speckles (RBMX y SF3B1), entre otros.

## 10. Predicción de sitios de O-glicosilación de LMN B1

Se realizó la predicción de sitios de O-glicosilación de LMNB1 (P20700) mediante análisis bioinformático (Tabla 8). Para el análisis de los potenciales sitios de O-GalNAc glicosilación se utilizó como herramienta el servidor NetOGlyc 4.0 (Steentoft et al. 2013) disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>. Por otra parte, mediante el servidor YinOYang 1.2 (Gupta y Brunak 2002) accesible a través de <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>, se analizaron los posibles sitios de O-GlcNAc glicosilación.

Tabla 8. Predicción de sitios de O-Glicosilación de LMNB1

Sitio	netOGlyc-4.0	YinOYang 1.2	Sitio	netOGlyc-4.0	YinOYang 1.2
3	0,935		395	0,913	0.533
5	0,968		396	0,830	0.582
13	0,942		399	0,907	0.639
19	0,941	0,5629	401	0,947	0.812
20	0,795		404	0,965	0.590
23	0,844		405	0,965	
25	0,843		406	0,966	
28	0,580		408	0,939	
58	0,614		411	0,959	
65	0,724		412	0,978	
96	0,511		424	0,648	0.573
176	0,537		427	0,847	0.577
219	0,513		428	0,812	
225	0,662		429	0,508	0.543
283	0,500		431	0,647	0.665
284	0,663		433	0,772	
285	0,727		435	0,863	
304	0,512		437	0,721	
314	0,630		439	0,708	
335	0,567		506	0,624	0.533
375	0,621		508	0,520	
391	0,848		548	0,536	
393	0,912		582		0.534

Se muestran la predicción de sitios de O-glicosilación de LMNB1 (P20700) y los correspondientes puntajes de confianza de la predicción asignado según los servidores NetOGlyc 4.0 y YinOYang 1.2 que predicen sitios de O-GalNAc glicosilación y O-GlcNAc glicosilación, respectivamente.

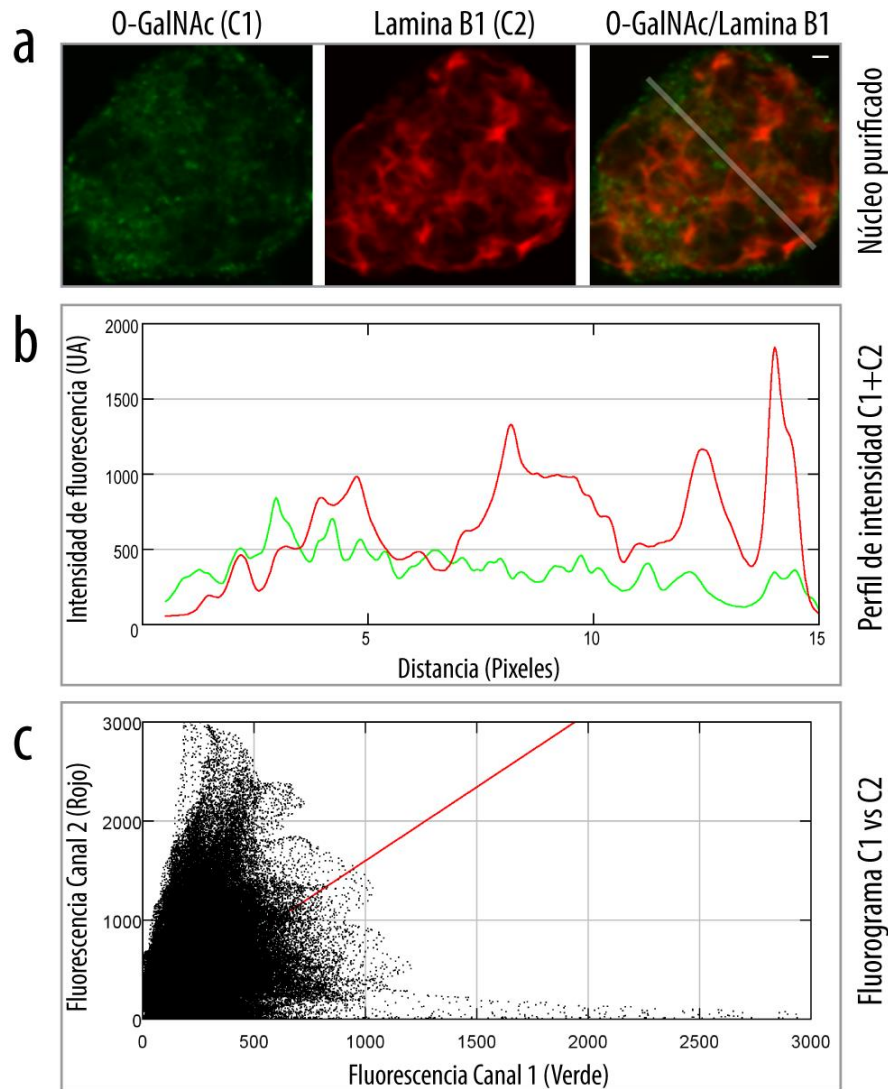
Según se muestra en la Tabla 8, se predice un total de 45 sitios de potencial O-GalNAc glicosilación de LMN B1, de los cuales 14 de ellos poseen un puntaje de confianza de la predicción de más de 0,900; en una escala de 0 a 1. El valor máximo de predicción de O-GalNAc glicosilación de LMN B1 corresponde al aminoácido número 412 de esta proteína con un puntaje de 0,978. En el caso de los potenciales sitios de O-GlcNAc glicosilación de LMN B1, se detectaron un total de 12 posibles sitios según el servidor YinOYang 1.2. Los valores de predicción de O-GlcNAc glicosilación para LMNB1 son más bajos, la mayoría de ellos rondan entre 0,5 y 0,6 alcanzando un valor máximo de 0,812 sólo para un sitio que corresponde al aminoácido 401 de LMNB1.

## **11. Análisis de correlación entre LMN B1 y O-GalNAc glicosilación**

Se estudió en mayor profundidad la O-GalNAc glicosilación de LMN B1, una de las proteínas identificadas mediante análisis de espectrometría de masas. Mediante estudio de co-localización mediante microscopía confocal de fluorescencia, se analizó el nivel de co-ocurrencia de la O-GalNAc glicosilación y la presencia de LMN B1 en núcleos purificados y en núcleos sobreglicosilados. Células HeLa fueron transfectadas con un vector que codifica para la proteína LMN B1-Cherry, la cual emite fluorescencia en color rojo. Luego se purificaron núcleos a partir de estas células transfectadas, los cuales fueron incubados sin/con el azúcar UDP-GalNAc. Una vez fijados, la O-GalNAc glicosilación en los núcleos purificados fue detectada con la Lectina VVL. Mediante análisis de co-localización mediante el uso de microscopía confocal, se estudió la correlación entre la marcación de la O-GalNAc glicosilación con la lectina VVL (color verde, Canal 1 ó C1) y la proteína LMN B1 (color rojo, Canal 2 ó C2) mediante análisis semi-cuantitativo y cuantitativo. En el caso del análisis cuantitativo, se realizó midiendo el coeficiente de correlación de Pearson el cual mide la propagación de la distribución con respecto a un ajuste lineal y su valor puede variar entre -1 a 1, donde un Pearson equivalente a 1 significa correlación positiva completa y cero que no existe correlación.

En la Figura 30 se muestra una imagen representativa de la inspección de la correlación entre LMN B1 y la O-GalNAc glicosilación endógena en núcleos purificados. Según se observa en la sección a (panel superior) de la Figura 30, la señal de O-GalNAc glicosilación (mostrada en color verde) presenta un patrón que parece coincidir en algunas regiones con la señal de LMN B1 (en color rojo). Cuando se muestran ambos canales juntos (composición), en la imagen no se denota del todo los puntos de coincidencia de las señales, principalmente porque la señal de fluorescencia del canal rojo es mayor a la del canal verde. Para poder apreciar mejor si existe un acompañamiento de las

señales, se trazó una selección linear la cual puede observarse en la imagen compuesta (O-GalNAc/LMN B1) y se realizó un gráfico con el perfil de intensidad de ambas señales a lo largo de este trazado. En la sección b de la Figura 30 se muestra el perfil de intensidad resultante, donde se aprecia que la intensidad de fluorescencia de LMN B1 (trazado rojo) es por lo general superior a la de O-GalNAc glicosilación (trazado verde). En este gráfico puede también notarse que existe un acompañamiento parcial de las señales en algunas regiones, es decir la intensidad de fluorescencia de ambos canales aumenta o decae en forma paralela tanto para LMN B1 y la O-GalNAc glicosilación. Adicionalmente, se realizó un fluorograma de la imagen el cual se muestra en la Figura 30 c. En este tipo de gráfica, se muestra la intensidad de fluorescencia de ambos canales para cada uno de los pixeles que componen la imagen. Según se aprecia para esta imagen de núcleo purificado, la relación entre la señal de O-GalNAc glicosilación (Fluorescencia de Canal 1) en función a la señal de LMN B1 (Fluorescencia de Canal 1) es baja, lo que puede notarse en la dispersión de los puntos que componen el fluorograma los cuales se distribuyen en forma de “nube” alrededor de la tendencia lineal marcada en la línea de color rojo en la gráfica.



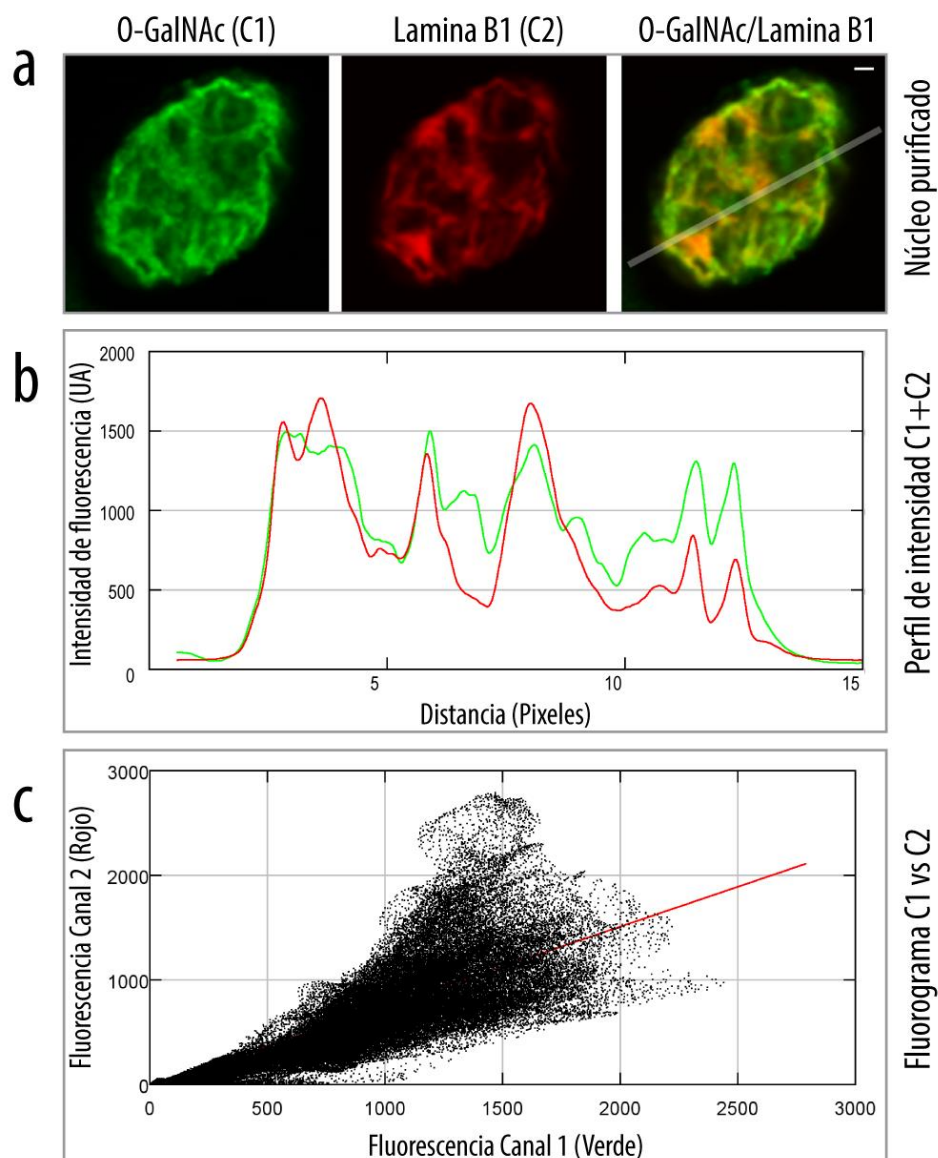
**Figura 30. Co-localización de LMN B1 y VVL en núcleos purificados**

La co-localización entre las proteínas LMN B1 y VVL (O-GalNAc glicosilación) se estudió en núcleos purificados. a. Canales individuales y composición de imágenes, mostrando el patrón de distribución nuclear de la O-GalNAc glicosilación (Verde) y LMN B1 (Rojo). La barra de escala equivale a 1 μm. b. Gráfica donde se muestra el perfil de intensidad del canal verde (O-GalNAc glicosilación) y rojo (LMN B1) a lo largo de la selección lineal. La línea trazada corresponde a la que se muestra en la imagen con la composición de los canales del panel superior (a.). c. Fluorograma correspondiente a las imágenes mostradas en a., donde se aprecia la fluorescencia del canal 1 (O-GalNAc glicosilación) en función al canal 2 (LMN B1).

También se realizó la inspección de la distribución de la correlación entre LMN B1 y O-GalNAc glicosilación cuando los núcleos purificados son previamente incubados con el azúcar UDP-GalNAc (Figura 31). En este caso, como puede verse en la figura Figura 31 a, la señal de O-GalNAc glicosilación (verde) coincide en mayor nivel con la señal de LMN B1 (rojo) e inclusive tienen un patrón de distribución similar como puede verse en las imágenes de los canales individuales. Luego en la imagen que corresponde a la composición de ambos canales se aprecian zonas que se tornan

al color amarillo, resultante de la superposición de la señal roja y verde con intensidades de fluorescencia similares. Esta coincidencia de las señales y color amarillo nos dan una idea visual de la co-localización que existe entre LMN B1 y la O-GalNAc glicosilación en los núcleos sobreglicosilados. En el gráfico de perfil de intensidades de la Figura 31 b, se aprecia el acompañamiento de las señales verde y roja las cuales se correlacionan en gran parte del trazado marcado con la línea de color blanco en la sección a de dicha figura. También se observa el aumento en la intensidad de fluorescencia de la señal de O-GalNAc glicosilación en estos núcleos sobreglicosilados respecto a los núcleos purificados sin sobreglicosilar, la cual presenta valores similares a la señal del canal rojo. En el fluorograma (Figura 31 c) se aprecia que la relación entre la señal de O-GalNAc glicosilación (Fluorescencia de Canal 1) en función a la señal de LMN B1 (Fluorescencia de Canal 2) aumenta dado que los puntos que componen el fluorograma muestran una distribución menos dispersa que en los núcleos purificados. Los puntos tienen tendencia a distribuirse alrededor de la línea de color rojo en la gráfica, la cual marca un ajuste de distribución lineal del fluorograma.

El aumento en el grado de superposición de las señales de LMN B1 y O-GalNAc glicosilación y la tendencia a una distribución menos dispersa en el fluorograma en los núcleos sobreglicosilados comparados con los núcleos purificados, indican el aumento en la correlación entre las señales en esta condición.



**Figura 31. Co-localización de LMN B1 y VVL en núcleos sobreglicosilados**

La co-localización entre las proteínas LMN B1 y VVL (O-GalNAc glicosilación) se estudió en núcleos purificados y sobreglicosilados. a. Canales individuales y composición de imágenes, mostrando el patrón de distribución nuclear de la O-GalNAc glicosilación (Verde) y LMN B1 (Rojo). La barra de escala equivale a 1  $\mu\text{m}$ . b. Gráfica donde se muestra el perfil de intensidad del canal verde (O-GalNAc glicosilación) y rojo (LMN B1) a lo largo de la selección lineal. La línea trazada corresponde a la que se muestra en la imagen con la composición de los canales del panel superior (a.). c. Fluorograma correspondiente a las imágenes mostradas en a., donde se aprecia la fluorescencia del canal 1 (O-GalNAc glicosilación) en función al canal 2 (LMN B1).

Adicionalmente, se realizó un análisis cuantitativo de la correlación de las señales en ambas condiciones. También se incluyó como control la detección del terminal O-GlcNAc con la lectina WGA en núcleos purificados y sobreglicosilados. El análisis cuantitativo de co-localización se realizó utilizando la extensión JACoP, y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el método de umbralización automática de Costes para cada una de las imágenes en cuestión. En la

Figura 32 a., se muestran los resultados de la correlación entre LMN B1 y O-GalNAc glicosilación. Como puede apreciarse el coeficiente de correlación de Pearson medio entre LMN B1 y O-GalNAc glicosilación aumenta de 0,151 a 0,630 cuando los núcleos son incubados con UDP-GalNAc. Este aumento significativo en el valor del coeficiente de Pearson en los núcleos sobreglicosilados muestra que existe una relación entre la presencia de LMN B1 y el terminal O-GalNAc, concordando con los resultados obtenidos en el análisis cualitativo-semicuantitativo de la Figura 30 y la Figura 31. Por el contrario, y según se muestra en la Figura 32 b, en la condición control donde se evalúa el terminal O-GlcNAc en núcleos purificados y sobreglicosilados no existe una diferencia significativa en el valor de correlación según Pearson entre LMN B1 y WGA.

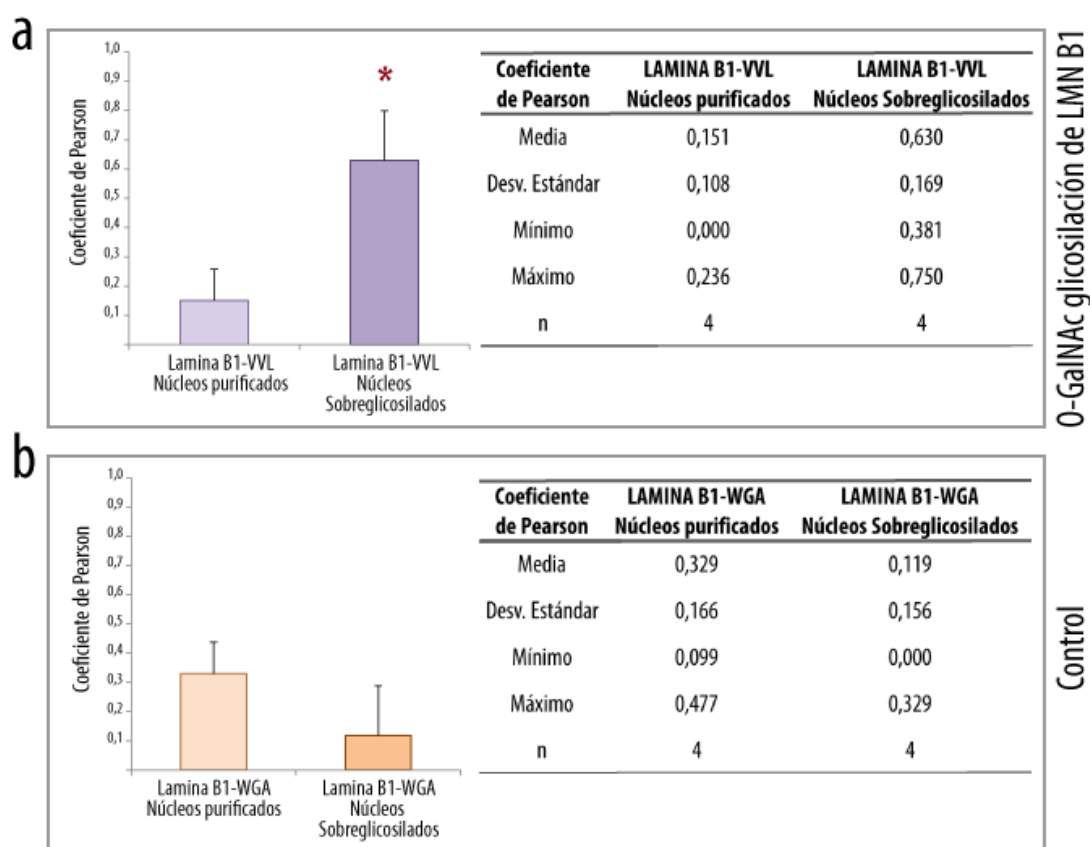


Figura 32. Análisis cuantitativo de co-localización entre LMN B1 y VVL

La co-localización se estudió en base al coeficiente de correlación de Pearson con umbralización automática de Costes. a. Se graficó el valor medio del coeficiente de Pearson obtenido para la correlación entre LMN B1 y O-GalNAc glicosilación detectada con la lectina VVL, en núcleos purificados y núcleos sobreglicosilados. La barra en la gráfica corresponde a la desviación estándar. En la tabla se resumen los valores estadísticos para cada una de las condiciones. b. Como control se incluyó la detección de la O-GlcNAc glicosilación con la lectina WGA en núcleos purificados y núcleos sobreglicosilados. En esta condición control se estudió la correlación entre la O-GlcNAc glicosilación y la proteína LMN B1. Al igual que en a., se muestra el gráfico del valor medio de Pearson y desvío estándar para cada condición y la tabla con el resumen de los valores estadísticos. (\*) Significancia estadística (p) medida por prueba t pareada de dos colas,  $P < 0,005$ .

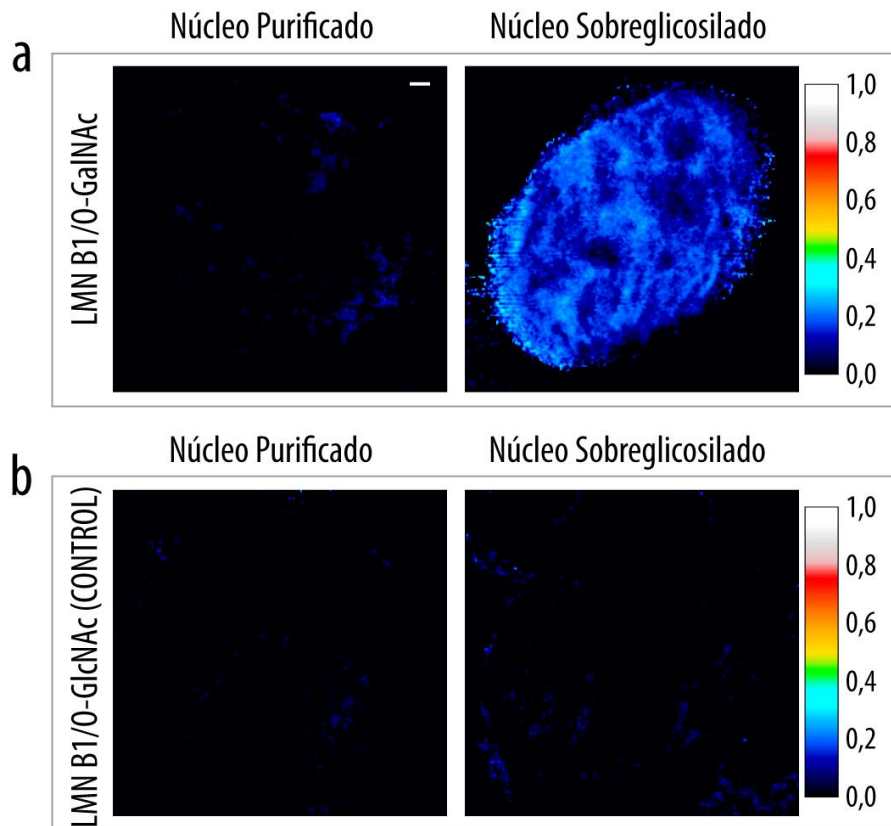


## 12. Ensayo de FRET: O-GalNAc Glicosilación de LMN B1

Para estudiar si fehacientemente la proteína LMN B1 se O-GalNAc glicosila en núcleos purificados sobreglicosilados, se realizó un ensayo de Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) mediante el método de fotoblanqueo del aceptor. En este ensayo Núcleos purificados o Núcleos purificados pre-incubados con UDP-GalNAc, ambos expresando LMN B1-Cherry, fueron marcados con las lectinas VVL o WGA (control). En este ensayo de FRET la proteína LMN B1 presenta el tag fluorescente codificado genéticamente M-Cherry y la glicosilación de tipo O-GalNAc se detectó mediante la lectina VVL la cual contiene un residuo de biotina, que es reconocido por la proteína Estreptavidina acoplada al fluoróforo Alexa 488. Por lo tanto, si la glicosilación de tipo O-GalNAc ocurre sobre la proteína LMN B1, VVL la reconocerá por lo que la interacción del par proteico Lectina/LMN B1 permite la transferencia de energía entre el fluoróforo Alexa 488 y M-Cherry presente en LMN B1. El índice de FRET fue calculado según se detalla en materiales y métodos, para cada imagen en cada una de las condiciones ensayadas.

En la Figura 33 se muestra valor del índice de FRET para cada pixel de la imagen en núcleos purificados y sobreglicosilados. En la sección a de la Figura 33 se aprecian imágenes representativas en las que se calculó el índice de FRET entre la lectina VVL (O-GalNAc glicosilación) y LMN B1 en núcleos purificados o núcleos sobreglicosilados. Puede notarse que ocurre un claro aumento en los valores del índice de FRET tornándose el patrón de marcación nuclear en la condición que muestra el núcleo sobreglicosilado. Esto indica que cuando se ofrece UDP-GalNAc a los núcleos aumenta la interacción entre la lectina VVL y la proteína nuclear LMN B1.

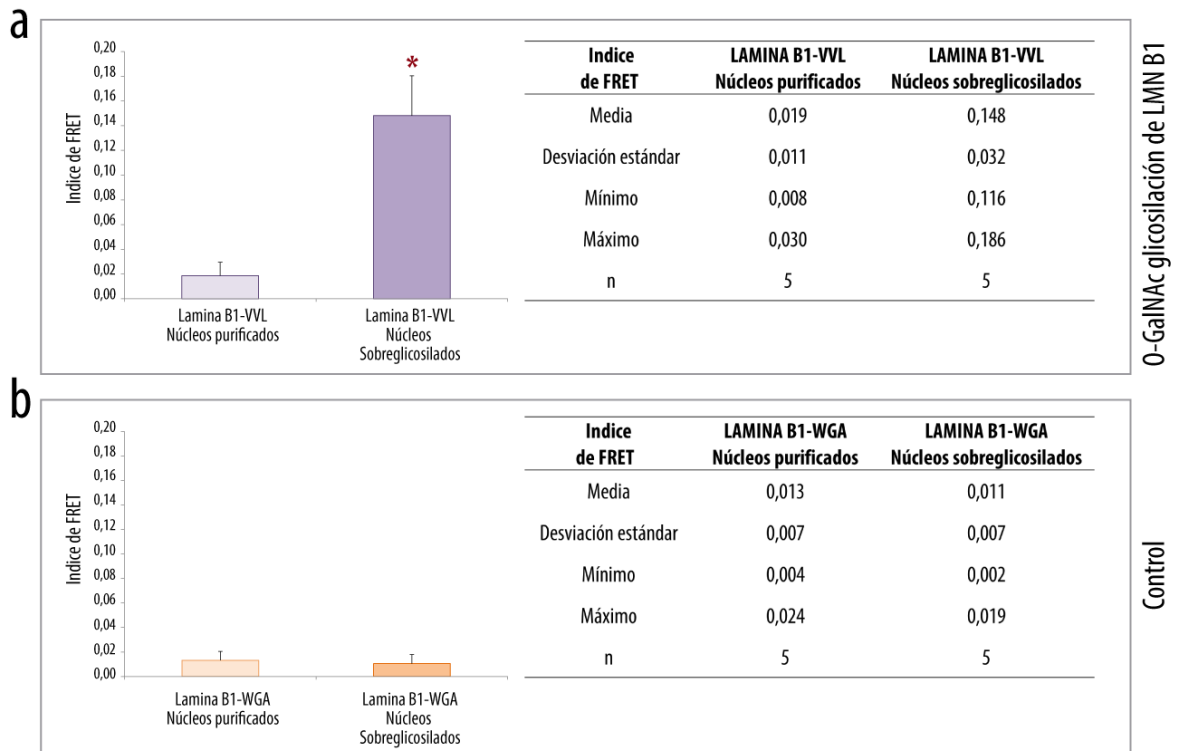
En la Figura 33 b., se aprecian las condiciones que fueron incluidas como control. En este caso el ensayo se realizó entre la lectina WGA, que detecta terminales de tipo O-GlcNAc, y LMN B1 tanto en núcleos purificados como en núcleos sobreglicosilados. En la condición control no se aprecia un aumento en los valores de índice de FRET en los pixeles que integran las imágenes representativas mostradas.



**Figura 33. Mapa de FRET en núcleos purificados y sobreglicosilados**

La O-GalNAc glicosilación de LMN B1 en núcleos purificados se estudió por FRET mediante fotoblanqueo del aceptor. a. Imágenes representativas en las cuales se muestra el índice de FRET para cada pixel según el código de color que las acompaña, entre la lectina VVL (O-GalNAc glicosilación) y LMN B1 en núcleos purificados o núcleos sobreglicosilados. b. Como control se incluyó el cálculo del índice de FRET entre la lectina WGA (O-GlcNAc glicosilación) y LMN B1 en núcleos purificados o núcleos sobreglicosilados. La barra de escala equivale a 1  $\mu\text{m}$ .

Además de estas imágenes donde puede apreciarse la distribución y valores de FRET a modo de inspección visual, se incluyó el cálculo de los valores promedio del índice de FRET por imagen para cada una de las condiciones en las que se realizó el ensayo de FRET por fotoblanqueo del aceptor. Para el análisis cuantitativo se midió el valor medio del índice de FRET en la región de la imagen correspondiente a la zona donde se realizó el fotoblanqueo. Se aprecia en la Figura 34 a., que el índice de FRET medio entre LMNB1 y VVL es de 0,019 en núcleos purificados. Luego el valor de FRET medio aumenta significativamente a 0,148 cuando los núcleos son sobreglicosilados. Por el contrario en la Figura 34 b. se observa que no existe diferencia significativa en el valor de los índices de FRET medios entre LMNB1 y WGA en núcleos purificados y sobreglicosilados. En esta condición control el índice de FRET asume valores de 0,013 y 0,011 en aquellos núcleos purificados y en los que se encuentran sobreglicosilados, respectivamente.



**Figura 34. Cuantificación del Índice de FRET medio en núcleos purificados y sobreglicosilados**

Se calculó índice de FRET medio en núcleos purificados y núcleos sobreglicosilados. a. En el gráfico se muestra el valor promedio del índice de FRET y la correspondiente desviación estándar en núcleos purificados y núcleos sobreglicosilados expresando LMN B1 y detectando la O-GalNAc glicosilación con VVL. En la tabla se resumen los valores estadísticos del índice de FRET para cada condición. b. Se grafican los valores medios de FRET y desvío estándar, y se muestra la tabla de resumen de estadística para las condiciones control que incluyen la detección de la O-GlcNAc glicosilación con WGA. (\*) Significancia estadística (p) medida por prueba t pareada de dos colas,  $P < 0,005$ .

## VI. DISCUSIÓN

Las células regulan la síntesis de glicanos en respuesta a diversas señales. Si bien los O-glicanos muestran patrones de expresión altamente regulados, no son comprendidos en su totalidad los mecanismos que dirigen la expresión de la información codificada en el glicoma. La Glicosilación de tipo O-GalNAc es una MPT compleja por lo que el tipo de O-GalNAc glicano sintetizado a partir de una proteína determinada dependerá de varios factores incluyendo la naturaleza de dicha proteína, del conjunto de glicosiltransferasas expresadas por la célula, la disponibilidad del sustrato donante de carbohidrato, como así también de la localización subcelular de los actores involucrados. La regulación de la glicosilación de tipo O-GalNAc se produce en dos niveles diferentes. El primer nivel de regulación ocurre en el inicio de la glicosilación, dependiendo de qué proteínas se expresan y cuáles de sus sitios serán glicosilados. El segundo punto de control es a nivel de elongación del O-GalNAc glicano, regulando la manera en que el glicano inicial será posteriormente modificado para dar lugar a la O-GalNAc glicoproteína final. El presente trabajo doctoral está enfocado en el estudio del inicio de la O-GalNAc glicosilación, y más precisamente, en la capacidad de biosíntesis de este tipo de glicosilación en el núcleo celular y sobre proteínas nucleares.

Es ampliamente conocido que el inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc transcurre principalmente en el complejo de Golgi, encontrándose glicosiladas una gran cantidad de proteínas de la vía secretoria de las cuales algunas son secretadas al medio extracelular, mientras que otras forman parte de la membrana celular (Stanley 2011, Vakhrushev et al. 2013). El inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc está controlada por las ppGalNAc-Ts, familia de enzimas codificadas por 20 genes homólogos (*GALNT* 1-20) y con localización preferente en la porción *Cis* del complejo de Golgi (Bennett *et al.* 2012). Diversos estudios se enfocan en comprender los mecanismos que regulan la glicosilación basados en la expresión diferencial de *GALNTs*, en las capacidades que poseen isoformas particulares de ppGalNAc-Ts de glicosilar proteínas determinadas o en la modificación covalente de las enzimas de glicosilación (Schjoldager y Clausen 2012, Zlocowski *et al.* 2013, Schjoldager *et al.* 2015, Vojta *et al.* 2016). Sin embargo, y en forma relativamente reciente, han surgido estudios dirigidos a comprender el rol de la compartimentación de las ppGalNAc-Ts como un mecanismo de regulación de la O-glicosilación (Gill *et al.* 2010, Gill *et al.* 2013). En el último año se ha propuesto un mecanismo denominado “Vía GALA” (*GALA pathway*) que intenta explicar la regulación de la actividad de ppGalNAc-Ts a través de su re-localización subcelular (Chia *et al.* 2016). En condiciones normales casi todo el inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc de las

glicoproteínas secretadas y de membrana ocurre en Golgi. Aquí las ppGalNAc-Ts adicionan los residuos de GalNAc que son rápidamente modificados por C1GalT y elongados para dar los correspondientes glicanos extendidos. Cuando la vía GALA se activa, provoca la relocalización de las ppGalNAc-Ts desde Golgi al RE. La relocalización es inhibida por la quinasa ERK8 y estimulada por la tirosin quinasa Src mediante la activación del sistema de transporte mediado por COPI (*Coat Complex Protein I*). Como resultado, las ppGalNAc-Ts pueden glicosilar proteínas residentes de RE y aumenta la cantidad de terminales de tipo Tn en las glicoproteínas (Bard y Chia 2016).

Las ppGalNAc-Ts presentan expresión diferencial dependiendo del tipo celular y tejido, como así durante el desarrollo y diferenciación. En base a su expresión, se las clasifica en dos grandes grupos: de expresión ubicua y de expresión restringida. La isoforma ppGalNAc-T2 fue seleccionada como representante de los miembros con amplio patrón de expresión. En cambio ppGalNAc-T3 presenta un patrón de expresión más restringido, encontrándose más abundantemente en ciertos órganos como testículo y páncreas (Bennett *et al.* 1996, Chefetz *et al.* 2009). *GALNT3* fue identificado como uno de los genes relacionados a la glicosilación más altamente regulados, donde se propone que los microARNs cumplen roles en la regulación de glicogenes (Kasper *et al.* 2014). En el presente trabajo de tesis se analizó la distribución subcelular de las isoformas ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 encontrándose que la isoforma ppGalNAc-T2 presenta localización característica en Golgi, mientras que ppGalNAc-T3 se distribuye principalmente en núcleo. Respecto a la localización nuclear de otras isoformas de ppGalNAc-Ts, el único reporte existente se encuentra en la base de datos del atlas de proteínas humanas <http://www.proteinatlas.org> (Uhlen *et al.* 2010). Aquí puede apreciarse que las isoformas ppGalNAc-T 5, 6, 7, 10, 14 y 16 (*GALNT5*, *GALNT6*, *GALNT7*, *GALNT10*, *GALNT14* y *GALNT16* para su búsqueda en la base de datos, respectivamente) presentan distribución en el núcleo analizado por microscopía de fluorescencia, en diversas líneas celulares incluyendo A-431, MCF7, HeLa, A-549, RT4, HEK 293, RH-30 y U-2 OS. En forma adicional, es posible constatar en esta base de datos la expresión de *GALNT3* ARNm en las líneas celulares HeLa, MCF7 y T-47D las cuales fueron ensayadas en el presente trabajo. La corroboración de la especificidad de reconocimiento del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 realizada en este trabajo de tesis, sumado al hecho de que es un anticuerpo disponible comercialmente y validado, son hechos que avalan la confiabilidad del anticuerpo anti-ppGalNAc-T3 utilizado para estudiar la localización de la enzima en este trabajo de tesis.

En una siguiente etapa, se procedió a estudiar en forma más detallada la distribución nuclear de ppGalNAc-T3 en células HeLa. Para ello se utilizó como herramienta la tecnología de microscopía confocal, la cual permite obtener imágenes a diferentes profundidades a lo largo del espesor o el eje Z de la muestra analizada. Se aprecia claramente que ppGalNAc-T3 se localiza en el interior del núcleo presentando un patrón de tipo moteado, y estas motas o partículas nucleares, presentan un tamaño variable pudiendo alcanzar diámetros de entre 0,10 y 1,21  $\mu\text{m}$ . Cabe destacar que el patrón detectado para ppGalNAc T3 coincide con la morfología descrita para diferentes CNs, entre ellos Paraspeckles, Speckles y cuerpos PML según el tamaño y número de motas detectadas. Más aún, varias de las proteínas nucleares que se identificaron como O-GalNAc glicosiladas en el nucleoplasma de células HeLa, están asociadas a ciertos grupos funcionales y/o dominios subnucleares que incluyen Speckles, Paraspeckles, Gránulos de estrés, cuerpos PML y nucleolo. Esto indica que existe una relación entre el patrón de distribución de esta isoforma y las proteínas nucleares que podría ser capaz de O-GalNAc glicosilar. Más aún, adicionalmente a la isoforma ppGalNAc T3, varias ppGalNAc-Ts muestran distribuirse en la región nuclear según el Atlas de Proteínas Humanas (<http://www.proteinatlas.org/>) y presentan un patrón de distribución que coincide con diferentes CNs (ppGalNAc-T 5, 6, 7, 10, 14 y 16). Esto por una parte demuestra que los resultados de identificación de proteínas nucleares glicosiladas tienen contundencia con la distribución descrita para ppGalNAc-T3, y además sugieren que esta isoforma podría estar relacionada con el control transcripcional en base a su relación con estos CNs. Adicionalmente la localización nuclear de ppGalNAc-T3 fue analizada posterior al fraccionamiento subcelular, siendo posible apreciar que ppGalNAc-T3 sigue manteniendo el patrón de distribución de tipo moteado en los núcleos purificados observados mediante análisis mediante microscopía confocal, así como en la fracción nuclear analizada mediante ensayo de WB. En la fracción nucleoplasmática, la cantidad de ppGalNAc-T3 detectada es mucho menor que en núcleos completos purificados. La metodología utilizada de fraccionamiento subcelular adaptada de (Shechter *et al.* 2007), involucra el uso de una alta concentración de sal para la obtención del nucleoplasma a partir de núcleos purificados. Esto permite la solubilización en la fracción nucleoplasmática de las histonas y proteínas asociadas, así como otras proteínas nucleoplasmáticas no solubles en otras condiciones. Sin embargo ciertas proteínas pueden ser poco solubles aún en esta condición de alta concentración de sal y uso de detergente. Mediante análisis de proteómica, se han identificado más de 500 proteínas en fracciones insolubles nucleares de células HeLa-S3. Estas fracciones incluyeron aquellas resistentes

a alta concentración de sal/detergente/nucleasa y una fracción resistente a 3,5-diyodosalicilato de litio/nucleasa (Takata *et al.* 2009).

En base a la evidencia de que al menos una isoforma de ppGalNAc-T se encuentra presente en el núcleo celular, la siguiente cuestión que surge es la posibilidad de que la/s ppGalNAc-Ts sean capaces de iniciar la glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo. Para que la glicosilación se lleve a cabo es necesaria la presencia del azúcar nucleótido UDP-GalNAc y un sustrato proteico con sitios factibles de glicosilación por la enzima. Es por ello que se exploró la disponibilidad de UDP-GalNAc en el núcleo celular, encontrándose que dicho azúcar nucleótido se encuentra presente en el nucleoplasma de células HeLa en una concentración de 0,33  $\mu\text{M}$ . Más aún, la disponibilidad de UDP-GalNAc aumenta de 0,33  $\mu\text{M}$  a 0,51  $\mu\text{M}$  cuando los núcleos purificados son preincubados con una cantidad adicional de dicho azúcar dador, evidenciando la capacidad de ingreso de UDP-GalNAc al núcleo celular. Las concentraciones de UDP-GlcNAc y su epímero UDP-GalNAc están directamente influenciadas por la disponibilidad de nutrientes, dado que ambos azúcares nucleótidos son derivados de la vía de biosíntesis de hexosamina dependiente de nutrientes y luego utilizados por enzimas sensibles a su concentración para glicosilar sus sustratos (Varki *et al.* 2009). Los transportadores de azúcar de nucleótidos transportan activamente UDP-GlcNAc en RE y Golgi, mientras que el núcleo y la mitocondria son organelas altamente permeables al azúcar nucleótido pero no lo concentran (Bond y Hanover 2015). Debido a la analogía entre UDP-GlcNAc y UDP-GalNAc, es probable que éste último ingrese a núcleo de la misma forma a partir del *pool* citoplasmático. Más aún, en la revisión realizada por Bond y Hanover (2015) se estima que la concentración de UDP-GlcNAc en citoplasma, núcleo y mitocondria está en el rango de 2 a 30  $\mu\text{M}$  siendo concentrado de 10 a 30 veces en RE y Golgi, valores que se aproximan a los encontrados para UDP-GalNAc en el presente trabajo. Por lo tanto el ingreso de UDP-GalNAc a núcleo estaría influenciada por la permeabilidad de dicha membrana, siendo la disponibilidad celular de azúcar nucleótido un punto de regulación de este tipo de glicosilación.

Luego de comprobada la disponibilidad de UDP-GalNAc en núcleo y evidenciada su capacidad de incorporación, se utilizaron las lectinas HPA y VVL para detectar la glicosilación de tipo O-GalNAc sobre proteínas nucleares en núcleos purificados, resultante de la actividad ppGalNAc-T. Ambas lectinas son herramientas ampliamente utilizadas para la detección de terminales O-GalNAc-Ser/Thr, y empleadas en diversos trabajos de investigación científica (Kakeji *et al.* 1991, Berger 1999, Steentoft *et al.* 2013, Lorenz *et al.* 2016). En los ensayos realizados en el presente trabajo fue posible



detectar glicosilación de tipo O-GalNAc endógena de proteínas en núcleo, así como un marcado aumento en su nivel o sobreglicosilación de las proteínas nucleares luego de la incubación de los núcleos con el azúcar dador. En cuanto a la glicosilación de tipo O-GalNAc nuclear endógena, los niveles detectados son bajos. Cuando los núcleos purificados son expuestos a un exceso de azúcar dador UDP-GalNAc, se observa un aumento significativo de alrededor del 4,7 veces en los niveles de O-glicosilación (135,4 UA en núcleos sin agregado de UDP-GalNAc y 638,9 UA en núcleos incubados con exceso de UDP-GalNAc) lo que pone en evidencia la actividad O-GalNAc transferasa presente en el núcleo celular, la cual se incrementa en respuesta al aumento de UDP-GalNAc disponible. De manera complementaria, los ensayos de microscopía confocal revelan que los terminales  $\alpha$ GalNAc incorporados como consecuencia de la actividad GT en las proteínas, efectivamente se distribuye en el interior del núcleo.

Los ensayos realizados con el fin de diferenciar la glicosilación de tipo O-GalNAc nuclear de la ya conocida glicosilación de tipo O-GlcNAc, constatan que el terminal detectado en las glicoproteínas presentes en los núcleos purificados corresponde a  $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr. La glicosilación de tipo O-GlcNAc es ampliamente conocida por su rol como regulador y modificador de diversas proteínas nucleocitoplasmáticas, y hasta el momento, considerada como el único tipo de O-glicosilación nuclear (Zhang *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2016). Este hecho, sumado a la alta analogía que existe entre los terminales O-GlcNAc-Ser/Thr y O-GalNAc-Ser/Thr hacen que sea necesario diferenciar la O-GlcNAc glicosilación de la O-GalNAc glicosilación nuclear de proteínas, evidenciada en el presente trabajo. En los ensayos realizados se constata que se detectan terminales  $\alpha$ GalNAc-Ser/Thr en las proteínas nucleares con la lectina VVL, aumentando la señal de detección cuando los núcleos purificados preincubados con exceso de UDP-GalNAc pero sin detectarse cambio cuando se les suministra UDP-GlcNAc. En cambio la lectina WGA, que es empleada para detectar terminales de tipo O-GlcNAc-Ser/Thr (Kelly y Hart 1989, Vosseller *et al.* 2006, Zachara *et al.* 2011), no reconoce el aumento glicosilación en núcleo cuando son sobreglicosilados con UDP-GalNAc, demostrando la especificidad de reconocimiento de la lectina VVL por los terminales de tipo  $\alpha$ GlcNAc-Ser/Thr y la actividad catalítica de tipo GalNAc-Transferasa en núcleo. Resulta llamativo que no se observe un aumento en el nivel de O-GlcNAc glicosilación cuando los núcleos purificados son suplementados con UDP-GlcNAc. El terminal O-GlcNAc se añade dinámicamente y se elimina de las proteínas por la OGT y la OGA, respectivamente. La homeostasis de O-GlcNAc parece ser crítica para la regulación de muchas funciones celulares y la desregulación del ciclo O-GlcNAc está implicada en la etiología

de numerosas enfermedades incluyendo tumorigénesis, disfunción metabólica y neurodegeneración (Ferrer *et al.* 2016, Wani *et al.* 2016). Quizás la glicosilación nuclear de tipo O-GlcNAc sea más sensible que la de tipo O-GalNAc a los aumentos en los niveles de azúcar nucleótido, desencadenando respuestas regulatorias tendientes a mantener los niveles de O-glicosilación sobre las proteínas nucleares (Zhang *et al.* 2014). De esta manera la enzima OGA podría aumentar su expresión y/o actividad bajo esta condición removiendo el terminal de las glicoroteínas, explicando de esta manera el efecto observado en el presente trabajo de tesis.

Adicionalmente, se verificó la naturaleza del terminal detectado por la lectina HPA en núcleos sobreglicosilados mediante el uso de la enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa. Esta enzima está involucrada en la hidrólisis de glicoconjugados que contienen residuos terminales de  $\alpha$ -N-acetilgalactosamina (Dean y Sweeley 1979). El tratamiento con la enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa en núcleos sobreglicosilados provoca la disminución en la señal de glicosilación detectada con HPA, demostrando que los GalNAc unidos a proteínas corresponden a anómeros alfa de GalNAc.

Otra diferencia entre la glicosilación de tipo O-GalNAc y la glicosilación de tipo O-GlcNAc es que, en ésta última, el terminal O-GlcNAc no es elongado en núcleo. La enzima OGT es la encargada de transferir  $\beta$ -O-GlcNAc a los residuos de Ser y Thr de proteínas nucleares, citoplasmáticas y mitocondriales. Esta modificación con O-GlcNAc cumple roles regulando la actividad de diversas proteínas nucleares. Adicionalmente, la enzima OGA es capaz de catalizar la remoción del terminal  $\beta$ -GlcNAc por lo que la glicosilación de tipo O-GlcNAc es reversible y se caracteriza por ser dinámica y cíclica (Nagel y Ball 2014, Levine y Walker 2016). En cambio, el terminal  $\alpha$ -GalNAc o antígeno Tn es usualmente elongado en Golgi mediante el agregado de Galactosa por la enzima C1GalT dando como producto el antígeno T, que luego sigue la ruta de O-Glicosilación para dar glicanos más complejos. Alteraciones en la elongación de glicanos de tipo O-GalNAc está asociado con estados patológicos, y la expresión de glicanos cortos como los antígenos Tn, T y sus formas sililadas son antígenos característicos asociados a tumores (Ju *et al.* 2014, Fu *et al.* 2016). El terminal detectado por las lectinas VVL y HPA en proteínas de núcleos purificados, además de ser removido específicamente por la enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa también es capaz de ser elongado en presencia del azúcar dador UDP-Gal. Este efecto es apreciado tanto con HPA (que reconoce el antígeno Tn) donde se evidencia una disminución en el reconocimiento de la lectina cuando se ofrece UDP-GalNAc y UDP-Gal respecto de cuando sólo se ofrece UDP-GalNAc; así como con ABL

(que reconoce el antígeno T), lectina que aumenta su reconocimiento cuando los núcleos son incubados con UDP-GalNAc y UDP-Gal respecto de cuando sólo se ofrece UDP-GalNAc. En ambas situaciones las lectinas indican que cuando se suministra UDP-GalNAc en los núcleos hay enzimas allí presentes capaces de transferirlo a las proteínas aumentando el nivel de antígeno Tn y, si además de UDP-GalNAc posteriormente se incuban los núcleos purificados con UDP-Gal, el antígeno Tn presente en los núcleos sobreglicosilados es extendido dando lugar a la biosíntesis de antígeno T.

Como puede apreciarse, el uso de los núcleos purificados resultó clave en el presente trabajo resultando en una novedosa metodología para estudiar la O-glicosilación nuclear. Sistemas similares que incluyen el uso de núcleos purificados para evaluar la expresión génica, son ampliamente utilizados. Los ensayos de transcripción nuclear de tipo *run-on* implican la extracción en frío de núcleos intactos y su posterior incubación a 37°C, por un tiempo corto, con ribonucleótidos radioactivos para luego medir la tasa de transcripción (Murphy 1993, Smale 2009). Brasse-Lagnel y colaboradores (Brasse-Lagnel, Fairand et al. 2003) demostraron mediante el uso de ensayos *run-on* que el metabolismo de la glutamina a través de la vía de hexosamina conduce a la O-GlcNAc glicosilación citosólica de Sp1, el cual se trasloca al núcleo y estimula la transcripción del gen Argininsuccinato sintetasa. Sin embargo, a la fecha no ha sido documentado el uso de núcleos purificados para el estudio de glicosilación y en particular permitiendo el ingreso al núcleo del azúcar dador y luego evaluando el producto de las enzimas nucleares, como se realiza en esta tesis doctoral. En las estrategias usualmente utilizadas para analizar la O-glicosilación en núcleo, se les suplementa a las células en cultivo monosacáridos ligeramente modificados como sustrato alternativo al sustrato de azúcar natural. Luego este monosacárido es incorporado a los glicoconjugados por la maquinaria biosintética celular y puede ser analizado por diferentes metodologías (Vocadlo, Hang et al. 2003, Laughlin, Agard et al. 2006). La purificación de núcleos intactos y su posterior exposición a un exceso de UDP-GalNAc, es un modelo de estudio que ofrece diversas ventajas. En primer lugar el núcleo se encuentra aislado: esto significa que, además de encontrarse libre de otras organelas que podrían intervenir con los procesos nucleares que se desean estudiar, no presenta los mecanismos de transporte de proteínas comúnmente encontrados en una célula completa. Al encontrarse libre del citoplasma y las enzimas allí presentes, también se evita la interconversión del azúcar UDP-GalNAc a UDP-GlcNAc mediante la vía biosintética de hexosaminas (Daenzer *et al.* 2012). Dado que en este sistema se ofrece un exceso UDP-GalNAc a los núcleos, también se garantiza que es éste el azúcar incorporado al aumentar su disponibilidad y por lo tanto,  $\alpha$ GalNAc-

Ser/Thr el terminal que luego va a detectarse en mayor cantidad en las glicoproteínas. Además, esta suplementación con UDP-GalNAc permite una especie de “sobrexpresión” de glicoproteínas O-GalNAc glicosiladas.

La actividad O-GalNAc transferasa, además de ser estudiada en núcleos purificados, se analizó en el extracto nuclear soluble o nucleoplasma. Cuando el nucleoplasma de células HeLa es ofrecido a MUC1, un aceptor peptídico clásico de las ppGalNAc-Ts; y en presencia UDP-GalNAc, azúcar activado dador en el inicio de la síntesis de glicanos de tipo O-GalNAc, es posible apreciar actividad transferasa en esta fracción. De esta forma fue posible confirmar la presencia de actividad específica de tipo ppGalNAc-T en nucleoplasma, la cual alcanza valores de 6,65  $\mu\text{U}/\text{mg}$ . Adicionalmente, si se brindan las condiciones adecuadas de temperatura para permitir la acción enzimática y en presencia de un exceso de UDP-GalNAc, también es posible apreciar dicha actividad ppGalNAc-Transferasa sobre las proteínas nucleares. Estos resultados claramente indican la presencia, de al menos, un tipo de ppGalNAc-T en esta fracción. Si bien se evidencia una pequeña cantidad de ppGalNAc-T3 en nucleoplasma utilizando el anticuerpo anti-ppGalNAc-T3, podría ser suficiente para provocar la O-glicosilación de las proteínas nucleares. Sin embargo debe considerarse que, según fue discutido y en base a los datos presentes en el proyecto del Atlas de Proteínas Humanas (<http://www.proteinatlas.org/>), en núcleo podrían encontrarse más de un tipo de ppGalNAc-T capaces de llevar a cabo esta reacción.

En una etapa siguiente, se identificó mediante análisis de espectrometría de masas las proteínas nucleares con terminales de tipo  $\alpha$ -GalNAc presentes en el nucleoplasma de núcleos purificados (glicosilación endógena) y en núcleos sobreglicosilados. En la condición donde se evaluó a las proteínas nucleares glicosiladas endógenamente, se identificaron 2 proteínas ribosomales 40S nucleocitoplasmáticas: RPS3 y RPS6. RPS3 también fue detectada en núcleos sobreglicosilados. La proteína nucleocitoplasmática RPS3, además de ser uno de los constituyentes de la subunidad ribosómica 40S, cumple diversos roles extraribosómicos en el núcleo celular que incluyen la reparación del ADN y la regulación de la expresión génica (Graifer *et al.* 2014). MPTs como la fosforilación, metilación, sumoilación y N-glicosilación regulan las funciones extra-ribosómicas de esta proteína en diferentes condiciones (Graifer *et al.* 2014, Kim *et al.* 2016), por lo que es de suponer que la O-GalNAc glicosilación podría tener un rol similar a las otras MPTs. RPS6 también participa en funciones extraribosomales, y su fosforilación le permite interactuar con diversas proteínas, cumpliendo roles fisiológicos en la proliferación celular y la homeostasis de glucosa

(Meyuhas 2015). En los núcleos sobreglicosilados se identificaron 23 proteínas nucleares de las cuales 16 corresponden a proteínas Núcleo-Citoplasmáticas y 7 de ellas proteínas de residencia nuclear. Este número guarda relación con el evidente aumento en el nivel de O-glicosilación en los núcleos purificados incubados con UDP-GalNAc, detectándose un total de 2 proteínas glicosiladas endógenamente en el nucleoplasma de núcleos de HeLa mientras que el número de proteínas identificadas asciende a un total de 25 cuando los núcleos son sobreglicosilados. Respecto a las proteínas identificadas en núcleos sobreglicosilados, se ha reportado localización nuclear para el 92% de ellas según la información presente en las bases de datos de UNIPROT y NPD. El valor del parámetro de relación de PSM resultante del análisis de proteómica es útil para describir la abundancia relativa de una proteína ya que, cuanto mayor es el valor de PSM, mayor es la abundancia de la proteína en dicha muestra (Gao *et al.* 2005). Según los valores de la relación de PSMs de las glicoproteínas presentes en el nucleoplasma de núcleos sobreglicosilados, Pre-LMN A/C (30) y LMN B1 (22) son las más abundantes en esta muestra. Estas proteínas identificadas, junto con LMN B2 (7), son componentes esenciales de la Lámina nuclear requeridas para diversas y fundamentales funciones nucleares (Xie y Burke 2016). Otra de las proteínas con valor de PSM relativamente alto es SFPQ (17), componente característico de Paraspeckles al igual que NONO (8) (Fox y Lamond 2010). Ambas proteínas presentan motivos de reconocimiento a ARN y son capaces de formar heterodímeros (Passon *et al.* 2012). También se identificaron diversas proteínas ribosomales como la ya mencionada RPS3 (5) y las RPs RPS18 (3,5), RPS14 (3), RPS3A (3,5), RPSA (3), RPLP0 (3), RPLP2 (3). La biosíntesis de la maquinaria ribosomal comienza en el nucléolo, donde más de 70 tipos de RPs son ensambladas junto con diferentes especies de ARNrs y factores no ribosómicos formando la partícula pre-ribosómica 90S. En el nucléolo, este precursor sufre múltiples modificaciones y posterior separación en partículas pre-60S y pre-40S que luego se transportan al citoplasma (Tschochner y Hurt 2003). Por este motivo, no es sorprendente haber identificado estas RPs en la fracción nuclear soluble, siendo proteínas típicamente nucleocitoplasmáticas. Las RPs además de cumplir funciones como componentes de los ribosomas en el citoplasma, participan en diversas funciones extraribosomales (Zhou *et al.* 2015). Como ejemplos podemos citar las RPs RPS14, RPS3A y RPSA las cuales tienen roles tumorgénicos al ser capaces de interactuar con factores de transcripción nucleares como c-Myc, NF- $\kappa$ B y factores de reparación de ADN como RNF8 y BRCA1 (Lim *et al.* 2011, Guerra-Rebollo *et al.* 2012, Zhou *et al.* 2013). Otra proteína nucleocitoplasmática identificada, también asociada con la traducción de proteínas, es el Factor de elongación 1- $\alpha$ -1 (3). El EF-1- $\alpha$ -1 tiene funciones extracitoplasmáticas, siendo capaz de interactuar

con los factores de transcripción p53 y p73 que regulan genes involucrados en el ciclo celular, senescencia y apoptosis (Blanch *et al.* 2013). Diversas proteínas identificadas forman parte del Espliceosoma incluyendo a las ya mencionados RPS3, RPS3A, RPS18, EF-1- $\alpha$ -1, como así también las proteínas RBMX (4,7), hnRNP K (4), SRP9 (4), DHX9 (4) y SF3B1 (3) (Rappsilber *et al.* 2002, Cvitkovic y Jurica 2013). El Espliceosoma es un complejo de ARN-(multi)proteico, donde se lleva a cabo el empalme alternativo de ARNs. La mayoría del empalme alternativo ocurre co-transcripcionalmente, y los Espliceosomas activos se localizan dentro y en la periferia de los Speckles. Varias de las proteínas identificadas presentan más de una localización subcelular, inclusive pudiéndose encontrar en más de un tipo de dominio subnuclear y muchas veces coincidiendo en su ocurrencia. Los CNs se caracterizan por su dinamismo y sus componentes se intercambian tanto con el nucleoplasma circundante como entre los diferentes tipos de CNs (Carmo-Fonseca *et al.* 2000, Andersen *et al.* 2002, Fox *et al.* 2002).

Posterior a la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas, y en función los valores de la relación de PSM, se decidió centrar el estudio de la glicosilación de la proteína LMN B1. En una primera instancia se estudió la posibilidad de O-GalNAc glicosilación de LMNB1 mediante análisis bioinformático, detectándose un alto número (45) de sitios potenciales de O-GalNAc glicosilación, los que además presentan un alto grado de confianza de la predicción. En cuanto a la predicción de sitios de O-GlcNAc glicosilación de LMN B1, se detectó una factibilidad mucho menor. Si bien no existen evidencias a nivel experimental de O-GlcNAc glicosilación de LMN B1, se ha reportado que los residuos Ser-612 y Thr-643 de LMN A se O-GlcNAc glicosilan en células HeLa, aunque no se conoce el rol que cumple dicha MPT en esta proteína (Wang, Udeshi *et al.* 2010). A pesar de no existir una secuencia consenso específica para la glicosilación de tipo O-GalNAc, diversas herramientas de bioinformática son capaces de predecir sitios de O-GalNAc glicosilación en las proteínas. Junto con la evolución de los campos de la proteómica y la espectrometría de masas, se están desarrollando cada vez más métodos de alto rendimiento para la identificación de diversas MPTs (Blom, Sicheritz-Ponten *et al.* 2004, Calvete and Sanz 2008, Hassan, Badr *et al.* 2015, Li, Li *et al.* 2015). Si bien estos métodos son predictivos, resultan de gran ventaja al reducir el número de pasos experimentales necesarios para estudiar la O-glicosilación al integrar enfoques computacionales en procedimientos de validación. Además, estas bases de datos aumentan su precisión con el paso del tiempo debido al constante y dinámico agregado de nuevos datos experimentales. Adicionalmente a la predicción de glicosilación de LMNB1, se realizó un ensayo de

co-localización mediante microscopía confocal. El análisis de correlación entre la señal de glicosilación nuclear de tipo O-GalNAc y LMN B1, revela que la actividad GalNAc-transferasa nuclear es capaz de glicosilar la proteína nuclear LMN B1 ya que en núcleos sobreglicosilados ocurre un claro aumento en la señal de O-GalNAc glicosilación de LMN B1. Dicho análisis cuantitativo se realizó analizando la correlación mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, el cual refleja la fuerza de la relación lineal entre las dos variables (Manders *et al.* 1992). Cuando los núcleos son sobreglicosilados, la co-localización entre la señal de glicosilación de tipo O-GalNAc y la proteína LMN B1 aumenta significativamente (Pearson 0,15 en núcleos purificados aumentando a 0,63 en núcleos sobreglicosilados), sin variar en la condición control.

Si bien el análisis bioinformático y los resultados del análisis de co-localización indican que existe una relación entre la O-GalNAc glicosilación nuclear y LMN B1, no terminan de probar que LMN B1 sea portadora de esta MPT. Debido a su naturaleza no codificada genéticamente de la mayoría de las MPTs, estrategias comúnmente utilizadas para detectar proteínas específicas como por ejemplo quimeras de proteína fluorescente verde (GFP), no pueden ser utilizadas para marcar terminales con MPTs. Se han desarrollado diferentes tipos de estrategias donde la MPT y la proteína que se quiere investigar si está modificada, son marcados con diferentes etiquetas o *tags*. Estas estrategias permiten evidenciar la MPT mediante la generación de señales fluorescentes dependientes de la proximidad nanométrica del par en cuestión (Laughlin y Bertozzi 2009, Chang y Bertozzi 2012, Lin *et al.* 2015). Mediante ensayo de FRET pudo determinarse que, cuando los núcleos son incubados con un exceso de UDP-GalNAc, existe actividad glicosiltransferasa nuclear capaz de incorporar residuo/s de tipo  $\alpha$ -GalNAc en la proteína LMN B1. Esto se vio reflejado en los valores medio del índice de FRET, el cual aumenta casi 8 veces (0,019 a 0,148) cuando los núcleos son sobreglicosilados. Más aún, los resultados obtenidos en el ensayo de FRET guardan relación con los obtenidos en el análisis de co-localización: en ambos casos existen diferencias significativas en el nivel de glicosilación de tipo O-GalNAc de LMNB1 cuando los núcleos son sobreglicosilados, sin apreciarse diferencias en las respectivas condiciones control. Estos resultados, sumado a la detección en un alto nivel relativo de LMNB1 glicosilada en el nucleoplasma de núcleos sobreglicosilados mediante el análisis mediante espectrometría de masas, indican que efectivamente LMNB1 es una proteína capaz de ser O-GalNAc glicosilada en el núcleo de células HeLa.

Estructuralmente, al igual que las demás LMNs, LMNB1 presenta un dominio central largo en alfa hélice, flanqueado por un dominio globular corto en el extremo amino terminal (cabeza) y un dominio carboxi terminal (C-terminal) largo (cola) (Figura 3). El dominio central posee cuatro segmentos que están separados por regiones separadoras o *linkers*. El dominio de la cola contiene una señal de localización nuclear, un dominio de inmunoglobulina y una caja CAAX conservada (Dittmer y Misteli 2011). En cuanto a las MPTs que puede sufrir LMNB1 en su estado maduro se incluyen la fosforilación, ubiquitinación, acetilación y clivaje por proteasas apoptóticas (Simon y Wilson 2013). Se conocen 32 sitios de fosforilación de LMNB1, de los cuales la mayoría de ellos se distribuyen en las regiones de la cabeza y cola, con la mayor densidad entre el dominio central y la señal de localización nuclear. La fosforilación, entre otros roles, es importante al regular la dinámica de las LMNs durante la mitosis y el ciclo celular (Kuga et al. 2010, Mall *et al.* 2012). De manera similar, los sitios predictivos de O-GalNAc glicosilación de LMNB1 presentan una alta densidad en los dominios de la cabeza (aminoácidos 2 al 34) y la cola (aminoácidos 387 al 586): se detectan 8 sitios en la cabeza y 24 en la cola, aunque también hay diversos potenciales sitios en el dominio central en las 4 regiones y en los *linkers* 1 y 2. No es sorprendente la coincidencia entre las regiones potenciales de O-GalNAc glicosilación y los sitios en que ocurre la fosforilación, ya que ambas MPTs ocurren en las Ser y Thr. Estas evidencias sugieren que podría existir una competencia entre la O-GalNAc glicosilación y la fosforilación, de manera similar de como ocurre con la O-GlcNAc glicosilación (Hu *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Chaiyawat *et al.* 2015).

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo que demuestran la actividad de tipo O-GalNAc glicosil transferasa en el núcleo celular, la cual es capaz de O-GalNAc glicosilar *in situ* a diversas proteínas nucleares incluyendo a LMNB1, es evidente que esta MPT podría cumplir diversos roles regulatorios. Esta modulación podría darse al afectar directamente la función de las proteínas O-GalNAc glicosiladas o de manera indirecta, al afectar la interacción de estas proteínas nucleares con otras moléculas regulatorias. Como ejemplo podemos citar a las LMNs identificadas en esta tesis, las cuales cumplen diversos roles regulando la estructura y función nuclear y cuya alteración se asocia con diversas patologías conocidas conjuntamente como laminopatías. Dado que las LMNs son capaces de interactuar con diversas moléculas nucleares incluyendo factores de transcripción, histonas y ADN, e inclusive entre ellas mismas, la O-GalNAc glicosilación de estas proteínas podría ser un requisito necesario para su normal función o regulación de sus diversos roles, e inclusive estar asociada a estados patológicos. Si bien la expresión de O-GalNAc glicanos truncados en las



glicoproteínas que atraviesan la vía secretoria está asociado a estados patológicos como el desarrollo de tumores y cáncer; aún queda pendiente develar el rol de la O-GalNAc glicosilación nuclear y si la presencia de ppGalNAc-Ts en núcleo sería necesaria para llevar a cabo una normal función celular.

## VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis Doctoral se muestran sólidas evidencias de que la glicosilación de tipo O-GalNAc transcurre en el núcleo de células humanas, identificándose todos los actores necesarios para la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc en esta organela. Entre dichos actores se detecta la presencia de la isoforma ppGalNAc-T3 en el núcleo celular la cual muestra, además de la clásica expresión en Golgi, una clara distribución dentro del núcleo. La actividad ppGalNAc-T encontrada en nucleoplasma, sugiere que más de una isoforma de ppGalNAc-T podría ser capaz de iniciar la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc en núcleo. En referencia a esto, surgen diversas cuestiones como por ejemplo cuáles serían las ppGalNAc-Ts capaces de localizarse en núcleo, considerando que el inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc puede ser iniciado por 20 isoenzimas que presentan expresión diferencial según el tipo celular, estadio de desarrollo, e inclusive su localización y nivel de expresión puede verse alterado en estados patológicos como por ejemplo cáncer.

El segundo componente identificado necesario para la glicosilación de tipo O-GalNAc, es el azúcar nucleótido activado. El azúcar UDP-GalNAc, dador de GalNAc para la síntesis de glicanos, se encuentra presente en núcleo aumentando su disponibilidad intranuclear cuando se suplementa en exceso a los núcleos purificados. Esto por una parte permitió demostrar que el UDP-GalNAc puede atravesar la membrana nuclear hacia el interior del núcleo, y por otra parte, fue utilizado como una original estrategia para estudiar la actividad GalNAc-Transferasa en núcleo la cual aumenta en respuesta a esta mayor disponibilidad de sustrato.

Entre las proteínas identificadas, blanco de la actividad GalNAc-Transferasa nuclear, encontramos a las LMNs que, además de cumplir roles fundamentales en la arquitectura nuclear, regulan la expresión génica mediante dominios de interacción con el genoma. Otras de las proteínas identificadas integran diferentes CNs, los cuales regulan la expresión génica principalmente por mecanismos que incluyen el procesamiento de ARN así como la retención de ARNms. Además se identificaron diversas RPs que, junto con factores de inicio de la transcripción y elongación también identificados en este trabajo, sugieren que esta MPT podría ser importante modulando la traducción de proteínas. Dado que estas proteínas nucleares con potencialidad de ser O-GalNAc glicosiladas participan en roles fundamentales para la función nuclear, la glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo podría cumplir funciones regulando distintos procesos nucleares. Por lo tanto, el rol de esta modificación postraduccional en el núcleo de células humanas es una cuestión próxima a descifrar.

## VIII. PERSPECTIVAS

El hallazgo de que la glicosilación de tipo O-GalNAc ocurre en el núcleo de células humanas, es sumamente novedoso. Por este motivo podemos considerar que éste es sólo el inicio de la comprensión de dicha MPT a nivel nuclear, y junto con ello, se abre lugar a diversas preguntas respecto a los roles y mecanismos que cumple la glicosilación de tipo O-GalNAc sobre proteínas presentes en el núcleo celular.

Una de las interesantes cuestiones que surgen a partir de este trabajo es la comprensión de cuáles son los mecanismos y/o condiciones en que las ppGalNAc-Ts son transportadas al núcleo. Estas particulares enzimas responsables del inicio de la glicosilación de tipo O-GalNAc tradicionalmente se localizan en Golgi presentando un dominio transmembrana es corto de 15 a 25 aminoácidos. Sin embargo, ppGalNAc-T3 se distribuye en núcleo en diferentes líneas celulares y se evidencia actividad O-GalNAc glicosil transferasa en la fracción soluble nucleoplasmática. Ciertos reportes indican la existencia de regiones 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). Se piensa que la liberación/eliminación de las enzimas de Golgi involucra el clivaje endoproteolítico en la región tallo o *stem*, con la consecuente secreción de las enzimas solubles catalíticamente activas. Quizás un mecanismo similar que implique la modificación de ppGalNAc-Ts mediante este tipo de modificación, pueda ser un factor que determine su localización en nucleoplasma. Adicionalmente, otro mecanismo que podría determinar la localización nuclear de ppGalNAc-Ts podría ser mediante MPTs en estas enzimas, como por ejemplo la acetilación. La acetilación 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 (Xiong y Guan 2012, Choudhary *et al.* 2014). En nuestro laboratorio se ha comenzado a estudiar la acetilación de ppGalNAc-Ts de origen humano caracterizando cómo afecta a las propiedades de estas enzimas (Zlocowski *et al.* 2011, Zlocowski *et al.* 2013). Además, en un trabajo reciente de nuestro grupo se encontró que el residuo K626 de ppGalNAc-T3 presenta alta probabilidad de acetilación por la acetiltransferasa nuclear p300 (Lorenz *et al.* 2017). Este hallazgo reciente indica la posibilidad de que la acetilación además pueda regular la actividad de ppGalNAc-T3 en núcleo.

Otra cuestión relevante que surge a partir del presente trabajo, es la determinación del rol de la glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo. Dado que muchas de las proteínas nucleares

capaces de ser O-GalNAc glicosiladas que fueron identificadas en el presente trabajo cumplen roles en la regulación génica, la glicosilación de tipo O-GalNAc nuclear podría modular de forma directa o indirecta las funciones de estas proteínas. La presencia de formas truncadas de O-GalNAc glicanos en la membrana celular son marcadores típicos de procesos tumorigénicos, y la relocalización de ppGalNAc-Ts mediante la vía GALA también se ve incrementada y se encuentra asociada al desarrollo de tumores malignos (Bard y Chia 2016). Sin embargo, aún queda pendiente develar los posibles roles de la glicosilación de tipo O-GalNAc nuclear y los efectos de la presencia de ppGalNAc-Ts en núcleo.

En una siguiente etapa pretendemos estudiar el efecto de la expresión de antígeno Tn en las proteínas nucleares. Dado que varias de las proteínas que se O-GalNAc glicosilan regulan la expresión de genes, se pretende analizar la influencia de la glicosilación de tipo O-GalNAc nuclear sobre la actividad transcripcional. Para estudiar el efecto transcripcional de la glicosilación, se diseñarán *primers* específicos para genes regulados por LMNs. Luego mediante RT-PCR cuantitativa, se determinará el nivel de expresión de dichos genes blanco en núcleos de células HeLa y núcleos sobreglicosilados. Además, también esperamos poder identificar los sitios de O-GalNAc glicosilación de LMN B1 para poder comprender como influye esta MPT en la función de dicha proteína. De esta forma, analizando el cambio en los perfiles de expresión e identificando los sitios de O-GalNAc glicosilación de las proteínas nucleares, esperamos descifrar el rol de esta modificación sobre la expresión de genes y en particular, sobre la regulación de los genes asociados a diferentes laminopatías.

## IX. MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Líneas celulares

Las líneas celulares tumorales humanas de cuello de útero (HeLa), adenocarcinoma de mama (MCF-7), tumor de mama (T47D) y neuroblastoma (SK-N-AS) fueron cultivadas y mantenidas en estufa a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”) (GIBCO-Invitrogen) suplementado con 10 % de Suero fetal bovino (SFB), estreptomycin (100 µg/mL) y penicilina (200 U/mL). En el caso de las células de insecto Sf9, utilizadas para la expresión de proteínas en forma recombinante, fueron cultivadas a 27 °C en medio Grace (Gibco-Invitrogen) suplementado con antibiótico y 10 % de SFB. Las mencionadas líneas celulares pertenecen al CIQUIBIC, Departamento de Biología Química, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

## 2. SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras fueron suplementadas con *buffer* de muestra 4X (Tris HCl 0,3 M pH 6,8; Glicerol 40%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,4%, 2-mercaptoetanol 5%), se sonicaron para asegurar la ruptura de las membranas celulares y se hirvieron a 100°C durante 5 min. Luego fueron sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel se sometió a detección de proteínas totales mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie, o bien fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa (GE-Healthcare) a 350 mA durante 50 min. Según si el objetivo fue la detección de proteínas o glicoproteínas, se procedió de formas diferentes.

Para la detección de proteínas mediante WB, la membrana se bloqueó durante 30 min a temperatura ambiente (TA) con leche descremada (LD) al 3% en solución tampón fosfato salina o PBS (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM). Posteriormente, la membrana fue incubada con los diferentes anticuerpos primarios a ensayar los cuales incluyeron conejo anti-ppGalNAc-T3 humana (1:500) (HPA007613, Sigma-Aldrich), conejo anti-ppGalNAc-T2 humana (1:500) (HPA011222, Sigma-Aldrich), ratón anti-  $\alpha$ -tubulina (clon DM1A, T9026, Sigma-Aldrich) (1:2500), ratón anti-Golgin 97 (1:100) (A-21270, Thermo Fisher Scientific), ratón anti-Calreticulina (1:1000) (612137, BD biosciences), conejo anti-histona H3 (1:5000) (AS10 710, Agrisera). Para la visualización y detección de las bandas se utilizaron anticuerpos secundarios de origen caprino conjugados a fluoróforos: anti-IgG de conejo IRDye® 800 (verde) y anti-IgG de ratón IRDye® 680 (rojo), a una dilución 1:20000 para ambos anticuerpos (LI-COR Biosciences). En todos los casos los anticuerpos fueron diluidos en LD 1% en PBS. En la Figura 35 se muestra la especificidad de reconocimiento en un homogenato de células HeLa de los anticuerpos anti-

ppGalNAc-T2 (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000143641-GALNT2/antibody>) y anti-ppGalNAc-T3 (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000115339-GALNT3/antibody>), utilizados en diversos ensayos para estudiar la localización nuclear de ppGalNAc-T en núcleo.

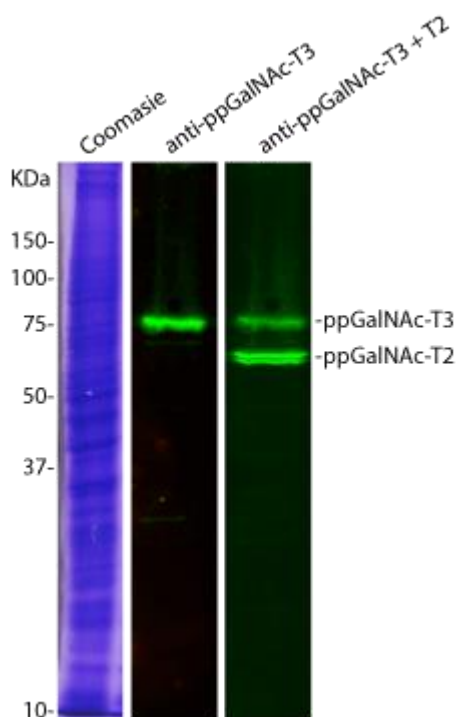


Figura 35. Anticuerpos comerciales anti-ppGalNAc-T2 y T3

Los anticuerpos comerciales anti-ppGalNAc-T3 (HPA007613, Sigma-Aldrich) y anti-ppGalNAc-T2 (HPA011222, Sigma-Aldrich) fueron ensayados mediante WB en un homogenato total de células HeLa. La membrana fue primero incubada con anti-ppGalNAc-T3 revelando una única banda en la movilidad esperada para ppGalNAc-T3 (72 KDa), que se muestra en la imagen central. Luego la misma membrana fue incubada con anti-ppGalNAc-T2, y en la imagen de la derecha se observa una banda adicional con la movilidad prevista para ppGalNAc-T2 (65 KDa). El SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie muestra las proteínas totales.

Para la detección de terminales glicoproteicos mediante WB, la membrana se bloqueó durante 1 hora a TA con polivinilpirrolidona (PVP) al 3% en PBS. Posteriormente, la membrana fue incubada con las diferentes lectinas biotiniladas diluidas en PVP al 1% en PBS. Las lectinas biotiniladas empleadas incluyeron aglutinina de *Helix pomatia* (HPA) (1:500) (L6512, Sigma-Aldrich), Lectina de *Vicia villosa* (VVL) (1:2500) (B-1235, Vector Laboratories), aglutinina de germen de trigo (*Wheat Germ Agglutinin*) (WGA) (1:500) (B-1025, Vector Laboratories) y lectina de *Agaricus bisporus* (ABL) (1:400). Para la visualización y detección de las bandas se utilizó Estreptavidina conjugada a IRDye® 800 (1:20000) (LI-COR).

El revelado de las membranas para ambos casos, se llevó a cabo mediante el sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR).



### 3. Microscopía de fluorescencia

Las células fueron crecidas hasta un 80% de confluencia, en cápsulas de cultivo con cubreobjetos de vidrio. En el caso de los núcleos purificados, una vez obtenidos se sembraron en cubreobjetos de vidrio previamente poli-lisinados, para permitir su adhesión a esta superficie. Tanto los núcleos purificados y las células adheridas al cubreobjetos, se fijaron durante 20 minutos en paraformaldehído al 2% en PBS, se lavaron, y luego se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% conteniendo 200 mM de Glicina en PBS durante 2 min. Posterior a su lavado, las muestras se bloquearon en BSA al 3% durante 1 h a TA.

Luego los preparados fueron inmunomarcados con los anticuerpos de interés o lectinas en BSA al 1% durante 2 h a TA. Los anticuerpos empleados incluyeron anti ppGalNAc-T3 (1:500) (HPA007613, Sigma-Aldrich), anti ppGalNAc-T2 (1:500) (HPA011222, Sigma-Aldrich), anti-Golgin 97 (1:500) (A-21270, Thermo Fisher Scientific), anti-calreticulina (1:1000) (612137, BD biosciences). Una vez lavados, los anticuerpos específicos fueron revelados por incubación durante 1 h a TA con anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos Alexa Fluor 488 o 546 (1:1000) (Invitrogen). Las lectinas biotinizadas empleadas incluyeron HPA (1:1000) (L6512, Sigma-Aldrich), VVL (1:2500) (B-1235, Vector Laboratories) o WGA (1:2500) (B-1025, Vector Laboratories). Dichas lectinas biotinizadas fueron reveladas con Estreptavidina Alexa 488 (1:2000) (Life Technologies). Los núcleos se tiñeron con IP y DAPI durante 10 min a TA. Una vez listos y lavados, los preparados se montaron en portaobjetos con FluorSave (Calbiochem). Se incluyeron controles de especificidad de la tinción utilizando sólo anticuerpos secundarios o estreptavidina marcadas como se describió previamente, en los que se omitió la incubación con los anticuerpos primarios/lectinas durante el proceso de marcación.

Las imágenes del ensayo Localización subcelular de ppGalNAc-T3 y ppGalNAc-T2 en diferentes líneas celulares humanas fueron adquiridas en el microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss, Axioplan. Las demás imágenes fueron adquiridas con microscopios confocales (Olympus FV-300, FV-1000 o FV-1200) con un objetivo de inmersión en aceite de tipo PlanApon 60 x 1,42 NA. Las imágenes fueron adquiridas en modo secuencial para evitar el sangrado entre canales, y en condiciones óptimas/constantes de configuración del microscopio. Las imágenes además fueron obtenidas en modo de escaneo X, Y o X, Y, Z para el estudio del volumen celular. Para imágenes con aumento, se realizó modo de recorte de región y se obtuvieron imágenes en planos equidistantes de 0,10-0,17  $\mu\text{m}$ . El aumento o *Zoom* fue ajustado para obtener una resolución de 0,045  $\mu\text{m}$  por pixel. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software ImageJ-FIJI (Schindelin *et al.* 2012).

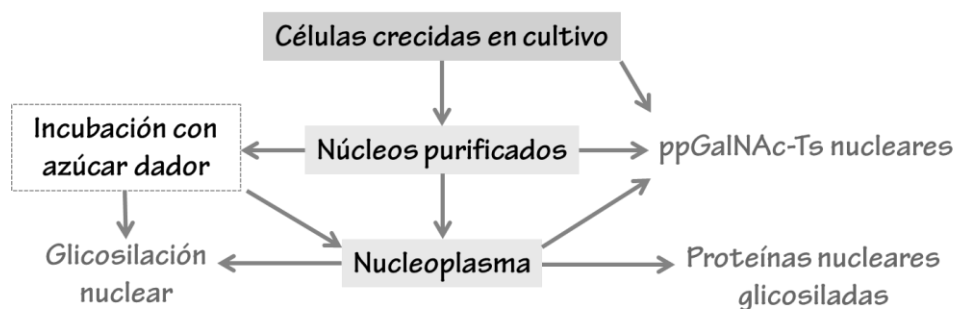
#### 4. Obtención de núcleos y fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular fue adaptado del protocolo para extracción salina de histonas desarrollado por Shechter y colaboradores (Shechter, Dormann et al., 2007). Para ello, las células fueron crecidas en cultivo y posteriormente cosechadas mediante el uso de tripsina. Se realizó el recuento del número de células, las cuales fueron lavadas en PBS.  $1.10^7$  células fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos y, una vez retirado el exceso de PBS, resuspendidas en 1 mL de tampón o *buffer* de extracción (HEPES pH 7,9 10 mM, ClK 10 mM,  $Cl_2Mg$  1,5 mM, sucrosa 0,34 M, glicerol 10%) conteniendo 0,2% de NP40 e inhibidores de proteasas e incubadas en hielo durante 15 minutos. Luego de centrifugar a 6500 g, el citoplasma resultante (sobrenadante) se recuperó cuidadosa y completamente. El sedimento (núcleos) fue lavado tres veces en *buffer* de extracción (sin NP40). De esta manera se obtuvieron los núcleos purificados. Para obtener la fracción nuclear soluble, los núcleos fueron incubados en 1 mL de *buffer* de solubilización con alto contenido de sal (Tris-HCl 50 mM pH 8, ClNa 2,5 M, NP40 0,05%) suplementado con inhibidores de proteasas e incubados durante 30 minutos a 4 °C en rotación constante. Posteriormente fueron sonicados y centrifugados a 6500 g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante (nucleoplasma) fue cuidadosamente recuperado y clarificado mediante centrifugado a 6500 g. De esta manera se obtuvieron las fracciones citoplasmática, nuclear y nucleoplasmática. En la Figura 36 se muestra la dinámica de trabajo con los núcleos purificados a partir de células crecidas en cultivo. El fraccionamiento subcelular fue clave para estudiar la presencia de ppGalNAc-T3 en núcleo, la O-GalNAc glicosilación nuclear y para identificar aquellas proteínas nucleares capaces de ser O-GalNAc glicosiladas.

De manera alternativa, para algunos ensayos fue utilizado el nucleoplasma obtenido mediante extracción no salina. Para ello los núcleos purificados ( $1.10^7$ ) fueron resuspendidos en 100  $\mu$ L de *buffer* TBS y sonicados en hielo durante 5 ciclos de 10 segundos cada uno. Luego, los núcleos lisados mediante sonicado fueron centrifugados a 6500 g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante (nucleoplasma) fue cuidadosamente recuperado y clarificado mediante centrifugado a 6500 g.

Para el análisis por WB de las fracciones,  $1.10^7$  células y su equivalente en núcleos purificados fueron resuspendidos en 1 mL de PBS y sonicados, obteniendo las fracciones de células completas y nuclear, respectivamente. Luego 15  $\mu$ L de cada fracción obtenidas a partir de células HeLa (células enteras, citoplasmática, nuclear y nucleoplasmática) se sembraron por duplicado en geles de poliacrilamida 4-20% en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana transferida se incubó con los anticuerpos anti-

Golgin 97 (1:500) (A-21270, Thermo Fisher Scientific) como marcador Golgi, anti-calreticulina (1:1000) (612137, BD biosciences) como marcador RE, anti- $\alpha$ -tubulina (1:2500) (Sigma-Aldrich) como marcador citosólico, anti-histona H3 (1:5000) (AS10 710, Agrisera) como marcador nuclear y anti ppGalNac-T3 (1:500) (HPA007613, Sigma-Aldrich).



**Figura 36.** Esquema de obtención de fracciones subcelulares y su aplicación en el presente estudio

A partir de células crecidas en cultivo se obtuvieron núcleos purificados. A partir de ellos se analizó la presencia de ppGalNac-T3 en núcleo y se obtuvo nucleoplasma para estudiar las proteínas glicosiladas. Además estos núcleos purificados fueron incubados sin o con UDP-GalNac lo que permitió la obtención de núcleos sobreglicosilados. A partir de los núcleos sobreglicosilados se estudió la O-GalNac glicosilación nuclear y se identificaron proteínas nucleares capaces de ser O-GalNac glicosiladas.

## 5. Expresión y purificación de ppGalNac-T3 humana

La secuencia de ADN codificante de la enzima ppGalNac-T3 (de origen humano) fue clonada en el vector de expresión pAcGP67 (BD-Biosciences) como fuera descrito previamente por Bennett y col., 1996 y Wandall y col., 2007 (Bennett *et al.* 1996, Wandall *et al.* 2007). En el extremo amino terminal del constructo se incorporó una etiqueta de seis histidinas que se utiliza en este trabajo como estrategia de purificación mediante una columna con metal inmovilizado. Además la secuencia es clonada inmediatamente posterior a la señal de secreción de la proteína gp67 que posee el plásmido pAcGP67; lo que permite que la proteína heteróloga siga la vía secretoria, siendo removido el péptido señal a lo largo de la misma.

La expresión de la proteína recombinante se realizó mediante la generación de Baculovirus recombinantes utilizando el kit BaculoGold™ (BD – Biosciences utilizando células de insecto Sf9. El plásmido pAcGP67-His-proteína fue co-transfectados con ADN viral lineal, protocolo adaptado a partir del Kit BaculoGold (BD Biosciences). 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.

Para la purificación de la proteína recombinante, el medio de cultivo de Sf9 fue sometido a centrifugación a 1500 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue dializado contra PBS 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 equilibrada con una solución de imidazol 5 mM y a continuación, se agregó la muestra del sobrenadante de cultivo conteniendo ppGalNac-T3. Se hicieron lavados escalonados con 5 mM y 40 mM de imidazol. Finalmente, la proteína de interés fue eluída con 150 mM de imidazol. La pureza fue evaluada mediante SDS-PAGE al 10% y posterior tinción de proteínas totales con Azul Brillante de Coomassie.

## 6. Ensayo de especificidad del anticuerpo

El grado de pureza de la proteína recombinante ppGalNac-T3 fue evaluada mediante un SDS-PAGE con una tinción con Azul Brillante de Coomassie. Para la verificación del reconocimiento del anticuerpo anti-ppGalNac-T3 (1:500) se realizó un WB utilizando a la muestra de ppGalNac-T3 previamente purificada por cromatografía de afinidad.

Una vez verificada la pureza de la enzima recombinante y la especificidad de reconocimiento del anticuerpo anti-ppGalNac-T3 hacia esta proteína, se realizó un ensayo para evaluar la especificidad de reconocimiento del anticuerpo hacia la proteína ppGalNac-T3 expresada endógenamente *in vivo*. Células HeLa crecidas en cubreobjetos y fijadas, fueron incubadas durante 2 horas a TA con el anticuerpo anti-ppGalNac-T3 (1:500) y con 0,9 µg/mL de la proteína ppGalNac-T3 recombinante purificada, o sin proteína recombinante y con el anticuerpo anti-ppGalNac-T3 (condición control). Después de lavados, los cubreobjetos fueron revelados para su análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia, mediante el uso del anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 546. Los núcleos fueron marcados mediante tinción con DAPI. Finalmente los preparados se visualizaron en el microscopio confocal Olympus FV-300, y las imágenes fueron obtenidas en configuraciones idénticas de potencia del láser, ganancia del detector y *offset*.

## 7. Estudio de distribución subcelular de ppGalNAc-T3

Para este estudio de localización subcelular de ppGalNAc-T3 en células HeLa se obtuvieron pilas de imágenes a diferentes profundidades (modo de escaneo en Z) a alta resolución mediante microscopía confocal, a partir de muestras de células fijadas e inmnomarcadas con anti-ppGalNAc-T3 (rojo) y DAPI (azul). La cuantificación del tamaño y número de las motas de ppGalNAc-T3 presentes en el núcleo celular se realizó empleando el programa FIJI. Para ello se procesó la pila de imágenes restándole el fondo o *background*, se aplicó un filtro gaussiano con sigma de 2 y se seleccionó un umbral de 200 a intensidad máxima.

Para el análisis de la presencia de ppGalNAc-T3 en núcleos posterior al fraccionamiento subcelular, se colocaron 3  $\mu\text{L}$  de suspensiones de núcleos purificados de células HeLa ( $10^7$  núcleos/mL) en cada cubreobjetos, los cuales fueron previamente tratados con poli-lisina. Una vez fijadas, las células crecidas en cubreobjetos y los núcleos purificados fueron inmnomarcados con Anti-ppGalNAc-T3 (verde) y como marcador nuclear de utilizó IP (rojo). La obtención de imágenes se realizó con el microscopio confocal Olympus, FV-1000. Se obtuvieron pilas de imágenes a alta resolución (0,045  $\mu\text{m}$  por pixel) realizándose modo de recorte de región con un espaciado equidistante en el plano Z cada 170 nm para las células y núcleos individuales. Las imágenes fueron adquiridas en modo secuencial para evitar el sangrado entre canales, y en condiciones óptimas/constantes de configuración del microscopio.

Adicionalmente se analizó la presencia de ppGalNAc-T3 en las diferentes fracciones subcelulares de células HeLa mediante ensayo de WB. El equivalente a  $1,5 \cdot 10^5$  células de cada fracción obtenida (células enteras, citoplasmática, nuclear y nucleoplasmática) se sembraron por duplicado en geles de poliacrilamida 4-20% en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana transferida se incubó con anti ppGalNAc-T3 para evaluar la marcación en las diferentes fracciones, y con marcadores de organelas de Golgi, RE, Citosol y Núcleo. Se ensayó un SDS-PAGE teñido con azul brillante de coomasie como control de carga, de forma complementaria a los marcadores de organelas.

## 8. Cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo

La detección y cuantificación del azúcar UDP-GalNAc en el núcleo celular se realizó mediante ensayo enzimático con detección colorimétrica, donde se analizó el azúcar nucleótido contenido en diferentes fracciones subcelulares de células HeLa. Las fracciones ensayadas incluyeron el citoplasma de células HeLa, el último lavado de los núcleos purificados y la fracción

nucleoplasmática obtenida por extracción no salina de núcleos no sobreglicosilados y sobreglicosilados.

Placas multiorificio de poliestireno (Corning Costar) se sensibilizaron con el sustrato aceptor MUC2 en *buffer* carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, NaCl 0,5 M pH 8,3) durante toda la noche a 4°C. 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 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), MnCl<sub>2</sub> 10 mM, Tween-20 0,1% y la enzima recombinante purificada ppGalNAcT-2. En los pocillos que contenían la mezcla de reacción se adicionó las fracciones a ser evaluadas (citoplasma, lavados y nucleoplasmas) 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 VVL conjugada a peroxidasa (HRP: Horse Radish Peroxidase) (Sigma-Aldrich) (1:2000) diluida en PBS con Tween-20 0,05% y lavados nuevamente con PBS. El revelado colorimétrico fue llevado a cabo con una solución de o-fenilendiamina 0,5 mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,02% en *buffer* citrato de sodio (pH 5,0) a TA y la reacción se detuvo por adición de 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 N. Las medidas de absorbancia fueron obtenidas mediante un lector de microplacas (Epoch, BiotekR Instruments) a 490 nm.

En paralelo se realizó una curva de trabajo con diferentes concentraciones conocidas de UDP-GalNAc. La concentración de UDP-GalNAc presente en cada fracción ensayada fue calculada por extrapolación a dicha curva de trabajo. Los datos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00.

## 9. Glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleos purificados

### 9.1. Obtención de núcleos sobreglicosilados

Los núcleos purificados a partir de células HeLa según se describe en *Obtención de núcleos y fraccionamiento subcelular*, se incubaron en *buffer* TBS (Tris HCl 25 mM pH 7,4; ClNa 0,15 M) (glicosilación endógena); TBS, 20 mM de Cl<sub>2</sub>Mn y 500 µM de UDP-GalNAc (Sigma) (núcleos O-GalNAc Glicosilados o sobreglicosilados) o TBS, 20 mM de Cl<sub>2</sub>Mn y 500 µM de UDP-GlcNAc (Sigma) (núcleos O-GlcNAc Glicosilados, control) durante 1 h a 37 °C. Luego de la incubación, los núcleos purificados fueron lavados tres veces en *buffer* TBS. Los núcleos resultantes así como el nucleoplasma de los mismos fueron utilizados en diversos ensayos y analizados por microscopía de inmunofluorescencia así como por WB.

## 9.2. Análisis de glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleos purificados

Para el análisis mediante WB de la glicosilación nuclear, se sembraron  $1,5 \cdot 10^5$  núcleos purificados o núcleos sobreglicosilados por duplicado. El gel se sometió a detección de proteínas totales mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie (control de siembra), o bien fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa y los terminales O-GalNAc de las proteínas nucleares detectados con la lectina HPA.

En cuanto al análisis de la O-GalNAc glicosilación nuclear mediante microscopía confocal de fluorescencia, se colocaron 3  $\mu\text{L}$  ( $10^7$  núcleos/mL) de suspensiones de núcleos purificados o sobreglicosilados en cubreobjetos de vidrio poli-lisinados los cuales fueron posteriormente fijados, bloqueados y permeabilizados. La detección de los terminales O-GalNAc en las proteínas se realizó con las lectinas biotiniladas HPA o VVL y detectados con Estreptavidina Alexa 488 (verde). Adicionalmente, los núcleos fueron marcados con IP. La obtención de imágenes se realizó con el microscopio confocal Olympus, FV-1000. Se obtuvieron pilas de imágenes a alta resolución (0,045  $\mu$  por pixel) realizándose modo de recorte de región con un espaciado equidistante en el plano Z cada 170 nm para las células y núcleos individuales. Las imágenes fueron adquiridas en modo secuencial para evitar el sangrado entre canales, y en condiciones óptimas/constantes de configuración del microscopio.

## 9.3. Cuantificación del nivel de glicosilación de tipo O-GalNAc en núcleo

Los núcleos purificados y los núcleos sobreglicosilados se procesaron para microscopía de inmunofluorescencia y se tiñeron con Estreptavidina Alexa 488 (sin lectina) (control) o con VVL biotinilada y Estreptavidina Alexa 488. En todas las condiciones, el núcleo se tiñó con IP. A partir de estos preparados y utilizando el microscopio Olympus FV-1000 se tomaron imágenes de 5 campos por cada condición, con obtención de pilas de imágenes de 3-4 planos equidistantes (0,7  $\mu$ ). Las imágenes se adquirieron en configuraciones idénticas de potencia láser, ganancia de detector y offset. Las imágenes se procesaron con el programa Fiji y se midió la intensidad de la señal del canal 488 (correspondiente a la O-GalNAc Glicosilación cuando es detectado con la lectina VVL, y a la señal no específica en el caso los controles sin lectina) en el núcleo. Para ello, en primer lugar se realizó un perfil de intensidad en Z de cada pila de imágenes en el canal 546 nm (correspondiente a la marcación nuclear con IP), y de esta forma se seleccionó el plano nuclear. La máscara nuclear creada mediante umbralización de la señal del canal 546 nm (método de Huang), fue utilizada para cuantificar la intensidad media en el canal 488 nm por núcleo, para condición. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de intensidad de

fluorescencia. Previamente se realizó la sustracción de la señal de fondo para ambos canales. Finalmente los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.

#### **9.4. Análisis de glicosilación de tipo O-GalNAc y O-GlcNAc en núcleos purificados**

Núcleos purificados a partir de células HeLa e incubados en TBS (glicosilación endógena); TBS, 20 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  y 500  $\mu\text{M}$  de UDP-GalNAc (núcleos sobreglicosilados) o TBS, 20 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  y 500  $\mu\text{M}$  de UDP-GlcNAc (núcleos O-GlcNAc Glicosilados, control) durante 1 h a 37 °C fueron analizados mediante WB. Para ello  $1,5 \cdot 10^5$  núcleos de cada condición fueron sembrados y la glicosilación de las proteínas nucleares analizada con las lectinas VVL (terminales O-GalNAc) o WGA (terminales O-GlcNAc). Adicionalmente se realizó la detección de proteínas totales en cada una de las fracciones analizadas mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie, ensayado como control de siembra).

#### **9.5. Reactividad de las lectinas VVL y WGA**

La reactividad de las lectinas VVL y WGA fue analizada mediante ensayo colorimétrico en placa. Para ello placas multiorificio se sensibilizaron por duplicado con las proteínas no glicosiladas Albúmina Sérica Bovina (BSA) y MUC1, y las glicoproteínas Ovoalbúmina (OVA) y MUC1Tn en *buffer* carbonato durante toda la noche a 4°C. 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 TA. Luego los pocillos fueron incubados durante 2 horas a TA con la lectina VVL (1:1000) o con WGA (1:600), ambas conjugadas a biotina, en PBS con Tween-20 0,05%. Una vez lavados con PBS, los pocillos fueron incubados con Estreptavidina-HRP (1:2500) en PBS con Tween-20 0,05% durante 30 minutos a TA y lavados nuevamente. El revelado colorimétrico fue llevado a cabo con una solución de o-fenilendiamina 0,5 mg/ml y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,02% en *buffer* citrato de sodio (pH 5,0) a TA y la reacción se detuvo por adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 N. Las medidas de absorbancia fueron obtenidas mediante un lector de microplacas (Epoch, BiotekR Instruments) a 490 nm. Las figuras fueron confeccionadas con el programa GraphPad Prism versión 5.00

#### **9.6. Remoción del terminal $\alpha$ -GalNAc de proteínas nucleares con la enzima $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa**

Núcleos purificados y núcleos sobreglicosilados fueron lisados mediante sonicado (5 ciclos de 10 segundos). Luego los núcleos sobreglicosilados fueron incubados sin o con la enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa glicosidasa (GalNAc-glicosidasa) (G1163, Sigma-Aldrich) durante 2 hs a



37 °C. Luego las muestras correspondientes a los núcleos purificados, núcleos purificados incubados con UDP-GalNAc o núcleos sobreglicosilados y posteriormente tratados con  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa, fueron analizados mediante WB con la lectina HPA. Adicionalmente se realizó un control de siembra de las fracciones ensayadas mediante tinción del gel con Azul Brillante de Coomassie.

### **9.7. Elongación del terminal Tn en la fracción nuclear**

Núcleos purificados a partir de células HeLa, núcleos sobreglicosilados y núcleos purificados e incubados durante 1 h a 37 °C en TBS, 20 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  y 500  $\mu\text{M}$  de UDP-GalNAc y luego de lavados, incubados durante otra hora a 37 °C en TBS, 20 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  y 500  $\mu\text{M}$  de UDP-Gal fueron analizados mediante WB. Para ello  $1,5 \cdot 10^5$  núcleos de cada condición fueron sembrados y la glicosilación de las proteínas nucleares analizada con las lectinas HPA (terminales O-GalNAc o antígeno Tn) o ABL (terminales  $\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\alpha\text{Ser/Thr}$  o antígeno T). Adicionalmente se realizó la detección de proteínas totales en cada una de las fracciones analizadas mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie, ensayado como control de siembra.

## **10. Actividad O-GalNAc glicosil transferasa en nucleoplasma**

### **10.1. Cuantificación de la actividad ppGalNAc-T en nucleoplasma**

La detección y cuantificación de la actividad ppGalNAc-T en el núcleo celular se realizó mediante ensayo colorimétrico en placa. En este caso las placas multiorificio de poliestireno se sensibilizaron con MUC1 y el nucleoplasma obtenido a partir de células HeLa, fue utilizado como fuente enzimática en presencia de un exceso de UDP-GalNAc. Luego de una incubación a 37°C, se midió el glicopéptido  $\text{GalNAc}\alpha\text{MUC1}$  generado. Para ello se utilizó la lectina VVL biotinilada (1:1000) para detectar el terminal  $\alpha\text{GalNAc}$  que luego fue incubada con Estreptavidina HRP (1:2500) y revelada colorimétricamente, de manera similar a como fue realizado en el ensayo de Cuantificación de UDP-GalNAc en núcleo.

Para el cálculo de la actividad ppGalNAc-Transferasa se realizó una curva de trabajo adsorbiendo distintas concentraciones conocidas del glicopéptido  $\text{GalNAc}\alpha\text{MUC1}$  en placas multiorificios, el cual fue detectado con la lectina VVL biotinilada (1:1000) y estreptavidina HRP (1:2500). Luego por extrapolación a partir de la curva de trabajo del estándar  $\text{GalNAc}\alpha\text{MUC1}$ , se calculó midiendo la absorbancia a 490 nm los  $\mu\text{moles}$  de  $\alpha\text{GalNAc}$  unidos/min (1U=1 unidad internacional) por mg de proteínas totales en las fracciones citoplasmática y nucleoplasmática, así como en el último lavado previo a la lisis de los núcleos. La cuantificación de proteínas totales

se llevó a cabo empleando el método de ácido bicinonínico (kit Pierce, Thermo Scientific), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

## 10.2. Actividad GT en la fracción nuclear soluble y glicosilación de histonas

El nucleoplasma de núcleos purificados a partir de células HeLa fue obtenido mediante extracción no salina e incubado en *buffer* de glicosilación conteniendo 25 mM de cacodilato sódico pH 6, Tween-20 al 0,25%, 40 mM Cl<sub>2</sub>Mn y 500 μM UDP-GalNAc durante 1 h a -20 °C (control) o a 37°C.

Además, las histonas purificadas de timo de ternera (H9250, Sigma-Aldrich) (Figura 37) fueron suplementadas con *buffer* de glicosilación e incubadas 1 h a 37°C sin enzimas (control) o con las enzimas purificadas recombinantes ppGalNAc-T2, ppGalNAc-T3 o con la fracción nuclear soluble de HeLa.

Las fracciones resultantes fueron sembradas en geles de poliacrilamida (nucleoplasma equivalente a 1.10<sup>6</sup> núcleos y 5 μg de histonas purificadas de timo de ternera) y la glicosilación de dichas fracciones analizadas mediante WB con la lectina VVL. Adicionalmente se realizó la detección de proteínas totales en cada una de las fracciones analizadas mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie, ensayado como control de siembra.

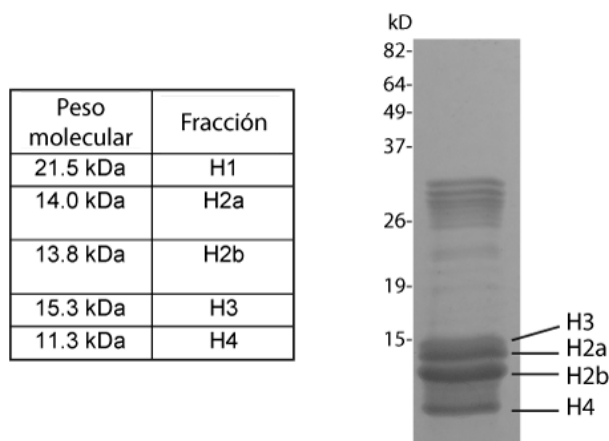


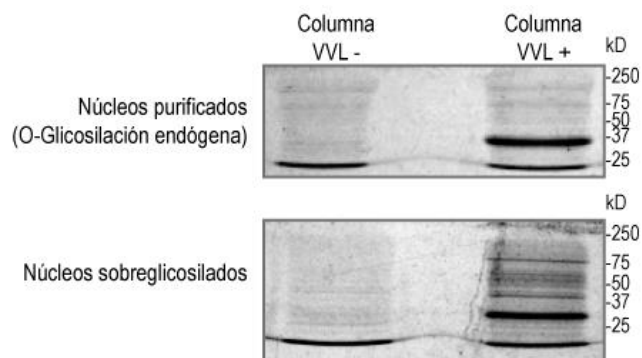
Figura 37. Histonas de Timo de Vaca

Las histonas son un grupo de proteínas básicas que forman complejos reversibles con el ADN. El peso molecular de las histonas es de aproximadamente 11 a 21 kDa dependiendo de la fracción. Se han aislado y caracterizado cinco fracciones diferentes denominadas H1, H2a, H2b, H3 y H4. En el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie se muestran las diferentes fracciones presentes en las histonas de timo de ternera (H9250, Sigma-Aldrich).

## 11. Identificación de proteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas mediante espectrometría de masa

Para el enriquecimiento de las proteínas nucleares O-GalNAc glicosiladas, se obtuvo el nucleoplasma proveniente de núcleos purificados a partir de células HeLa o de núcleos purificados preincubados con UDP-GalNAc durante 1 hora a 37°C. Estos nucleoplasmas fueron utilizados como fuente de proteínas nucleares glicosiladas, las que posteriormente se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Para la preparación de las columnas cromatograficas, se incubó al soporte de Estreptavidina inmovilizada en Agarosa CL-4B (85881, Sigma-Aldrich) con la lectina VVL biotinilada durante 1 h a 4°C y finalmente se lavó con TBS. La columna control constó de la columna de Estreptavidina inmovilizada en Agarosa CL-4B sola, sin la lectina. Todas las columnas fueron lavadas y pre-equilibradas con TBS antes de que sean cargadas con las respectivas muestras.

El nucleoplasma de núcleos purificados o de núcleos sobreglicosilados, se clarificó por centrifugación y se preincubó durante 1 h en una columna de Estreptavidina-Agarosa. La muestra resultante (*flow through*) se dividió en dos partes iguales y se incubó 1 h a TA con la columna VVL-Estreptavidina-Agarosa (columna VVL+) o con la columna Estreptavidina-Agarosa (columna control VVL-). Luego de la incubación con las muestras, las columnas fueron lavadas, resuspendidas en *buffer* de muestra Laemmli y calentadas a 90°C en baño de agua durante 10 min. Luego de una centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min, se recuperó las fracciones solubles resultantes las cuales fueron sembradas y corridas en un SDS-PAGE al 12% hasta una separación de aproximadamente 1 cm. Los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomassie G (B1131, Sigma-Aldrich), y se escindió una porción del gel de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para la posterior identificación de la proteínas presentes mediante análisis de espectrometría de masas (Figura 38).



**Figura 38. Glicoproteínas nucleares retenidas por las columnas de afinidad**

SDS-PAGE revelados mediante tinción con azul de Coomassie coloidal que muestran las proteínas enriquecidas mediante cromatografía de afinidad, las cuales fueron posteriormente identificadas mediante espectrometría de masas. Las muestras analizadas incluyeron glicoproteínas presentes en el nucleoplasma de núcleos purificados como así también de núcleos sobreglicosilados, las cuales fueron ofrecidas a una columna conteniendo la lectina VVL que reconoce los terminales O-GalNAc en las proteínas (Columna VVL+) o a una columna control sin lectina (Columna control VVL-).

Las regiones de interés de los geles, correspondientes a los carriles de la columna con VVL o de columnas control sin lectina, se enviaron al centro CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina) para su posterior análisis. Allí, las muestras se sometieron a digestión en gel y los datos de espectrometría de masa se obtuvieron utilizando un espectrómetro MALDI-TOF-TOF, Ultraflex II (Bruker). El análisis de los datos se realizó utilizando el programa Proteome Discoverer 1.4. Los datos resultantes obtenidos fueron procesados y se estableció un criterio para la identificación final de las proteínas retenidas en cada columna y finalmente enumeradas en la Tabla 6 y Tabla 7. El primer criterio para considerar un *hit* como positivo, es que las proteínas fueran identificadas con al menos dos péptidos de alta calidad. Luego se calculó la relación de los PSMs para los *hits* identificados en la columna con la lectina VVL respecto de la columna control, sin VVL (PSMs VVL+/PSMs VVL-). El segundo criterio de identificación, fue que la relación de los PSMs (PSMs VVL+/PSMs VVL-) sea de al menos 3 para considerar la proteína en el análisis. Por lo tanto:

**Proteína identificada O-GalNAc glicosilada = Péptidos High  $\geq 2$ , y (PSMs VVL+ / PSMs VVL-)  $\geq 3$**

## 12. Predicción de sitios de O-GalNAc glicosilación de LMNB1

La secuencia de amino ácidos de LMNB1 a ser analizada se obtuvo partir del código de acceso de UNIPROT P20700 (*LMNB1-HUMAN*), correspondiente a la proteína LMN B1 identificada como O-GalNAc glicosilada mediante el análisis de espectrometría de masas. La predicción de sitios de O-glicosilación de tipo GalNAc de LMNB1 (P20700) se realizó mediante un análisis bioinformático. Para el análisis de los potenciales sitios de O- GalNAc glicosilación se

utilizó como herramienta el servidor NetOGlyc 4.0 (Steentoft, Vakhrushev et al. 2013) disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>. Por otra parte, mediante el servidor YinOYang 1.2 (Gupta and Brunak 2002) accesible a través de <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>, se analizaron los posibles sitios de O-GlcNAc glicosilación.

### **13. Análisis de correlación LMNB1-VVL**

Células Hela al 80% de confluencia se transfectaron durante 2 h usando el reactivo de transfección Lipofectamina (Thermo Fisher Scientific) con el plásmido mCherryLaminB1-10 (Plásmido #55069, Addgene). Se recolectaron las células transfectadas, se realizó fraccionamiento subcelular y se obtuvieron los núcleos purificados. Estos núcleos purificados se incubaron sin o con UDP-GalNAc durante 1 h a 37 °C para obtener núcleos sobreglicosilados, y se sembraron en cubreobjetos polilisinados. Una vez fijados, se procesaron para inmunofluorescencia con las lectinas biotiniladas VVL (1: 1000) o WGA (1: 1000) (Control) y luego con Estreptavidina Alexa 488. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal Olympus FV-1200 usando un objetivo de inmersión de aceite PlanApon 60 x 1,42 NA en configuraciones de adquisición constante y modo secuencial para evitar el sangrado entre canales. Las imágenes fueron procesadas, realizándose una sustracción de fondo constante y se aplicó un filtro gaussiano con sigma de 2. Luego para el análisis de correlación de los canales verde (Alexa 488) y rojo (mCherry) de las imágenes obtenidas se utilizó el Programa Fiji. Los perfiles de intensidad de ambos canales se obtuvieron utilizando la extensión BAR 1.1.6. Los fluorogramas y los coeficientes de Pearson se obtuvieron mediante el uso de la extensión JACoP, mediante umbralización automatizada según Costes.

### **14. Ensayo de FRET: LMNB1-VVL**

Núcleos purificados a partir de células Hela transfectadas con el plásmido mCherryLaminB1-10 fueron incubados sin o con UDP-GalNAc para obtener núcleos sobreglicosilados, y posteriormente sembrados en cubreobjetos polilisinados. Una vez fijados, permeabilizados y bloqueados con BSA, se incubaron con las lectinas biotiniladas VVL (1: 1000) o WGA (1: 1000) (Control) reveladas con Estreptavidina Alexa 488. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal Olympus FV-1200 usando un objetivo de inmersión de aceite PlanApon 60 x 1,42 NA bajo configuración de adquisición constante y modo secuencial para evitar el sangrado entre canales. El ensayo de FRET se realizó sometiendo a las muestras a fotoblanqueo durante 2 mSeg en el canal aceptor (mCherry), obteniendo como resultado un fotoblanqueo completo. La magnitud del área de la región de fotoblanqueo se mantuvo

constante para todos los núcleos analizados. El cambio de fluorescencia en el canal del fluoróforo donante (Alexa 488) se evaluó luego fotoblanqueo aceptor y el índice de FRET para cada píxel fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Índice de Fret} = 1 - \frac{\text{Fluorescencia del donante en presencia de aceptor}}{\text{Fluorescencia del donante en ausencia de aceptor}}$$

Además, se cuantificó el índice de FRET medio (n=5) en el área del fotoblanqueo, para cada condición. Las imágenes fueron procesadas utilizando los programas de análisis de imágenes Fiji y FV10-ASW 3.1

# BIBLIO GRAFÍA

- Aaronson, R. P. and G. Blobel (1975). "Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1007-1011.
- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle and L. Gerace (1986). "The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments." Nature **323**(6088): 560-564.
- Ahmad, Y., F. M. Boisvert, P. Gregor, A. Cogley and A. I. Lamond (2009). "NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D181-184.
- Amendola, M. and B. van Steensel (2014). "Mechanisms and dynamics of nuclear lamina-genome interactions." Curr Opin Cell Biol **28**: 61-68.
- Andersen, J. S., C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, M. Mann and A. I. Lamond (2002). "Directed proteomic analysis of the human nucleolus." Curr Biol **12**(1): 1-11.
- Bard, F. and J. Chia (2016). "Cracking the Glycome Encoder: Signaling, Trafficking, and Glycosylation." Trends Cell Biol **26**(5): 379-388.
- 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**(29): 17006.
- Bennett, E. P., 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." J Biol Chem **271**(29): 17006-17012.
- 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**(6): 736-756.
- 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**(6): 736-756.
- Berger, E. G. (1999). "Tn-syndrome." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1455**(2-3): 255-268.
- Berger, S. L. (2002). "Histone modifications in transcriptional regulation." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 142-148.
- Bernardi, R. and P. P. Pandolfi (2007). "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 1006-1016.
- Berois, N., D. Mazal, L. Ubillos, F. Trajtenberg, A. Nicolas, X. Sastre-Garau, H. Magdelenat and E. Osinaga (2006). "UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker." J Histochem Cytochem **54**(3): 317-328.
- Birbach, A., S. T. Bailey, S. Ghosh and J. A. Schmid (2004). "Cytosolic, nuclear and nucleolar localization signals determine subcellular distribution and activity of the NF-kappaB inducing kinase NIK." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3615-3624.
- Blanch, A., F. Robinson, I. R. Watson, L. S. Cheng and M. S. Irwin (2013). "Eukaryotic translation elongation factor 1-alpha 1 inhibits p53 and p73 dependent apoptosis and chemotherapy sensitivity." PLoS One **8**(6): e66436.

- Bond, M. R. and J. A. Hanover (2015). "A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc." J Cell Biol **208**(7): 869-880.
- Bonne, G., M. R. Di Barletta, S. Varnous, H. M. Becane, E. H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C. R. Greenberg, F. Gary, J. A. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo and K. Schwartz (1999). "Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy." Nat Genet **21**(3): 285-288.
- Boulon, S., B. J. Westman, S. Hutten, F. M. Boisvert and A. I. Lamond (2010). "The nucleolus under stress." Mol Cell **40**(2): 216-227.
- 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**(15): 10592-10606.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares and I. Campos (2000). "To be or not to be in the nucleolus." Nat Cell Biol **2**(6): E107-112.
- 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**(6): 635.
- Clemson, C. M., J. N. Hutchinson, S. A. Sara, A. W. Ensminger, A. H. Fox, A. Chess and J. B. Lawrence (2009). "An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles." Mol Cell **33**(6): 717-726.
- Cook, A., F. Bono, M. Jinek and E. Conti (2007). "Structural biology of nucleocytoplasmic transport." Annu Rev Biochem **76**: 647-671.
- Coute, Y., J. A. Burgess, J. J. Diaz, C. Chichester, F. Lisacek, A. Greco and J. C. Sanchez (2006). "Deciphering the human nucleolar proteome." Mass Spectrom Rev **25**(2): 215-234.
- Cremer, T., M. Cremer, S. Dietzel, S. Muller, I. Solovei and S. Fakan (2006). "Chromosome territories--a functional nuclear landscape." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 307-316.
- Cremer, T., K. Kupper, S. Dietzel and S. Fakan (2004). "Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function." Biol Cell **96**(8): 555-567.
- Cvitkovic, I. and M. S. Jurica (2013). "Spliceosome database: a tool for tracking components of the spliceosome." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D132-141.
- Chaiyawat, P., D. Chokchaichamnankit, K. Lirdprapamongkol, C. Srisomsap, J. Svasti and V. Champattanachai (2015). "Alteration of O-GlcNAcylation affects serine phosphorylation and regulates gene expression and activity of pyruvate kinase M2 in colorectal cancer cells." Oncol Rep **34**(4): 1933-1942.
- Chang, P. V. and C. R. Bertozzi (2012). "Imaging beyond the proteome." Chem Commun (Camb) **48**(71): 8864-8879.
- Chefetz, I., K. Kohno, H. Izumi, J. Uitto, G. Richard and E. Sprecher (2009). "GALNT3, a gene associated with hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis, is transcriptionally regulated by extracellular phosphate and modulates matrix metalloproteinase activity." Biochim Biophys Acta **1792**(1): 61-67.
- Chen, L. L. and G. G. Carmichael (2009). "Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA." Mol Cell **35**(4): 467-478.
- Chen, Y. Z., Y. R. Tang, Z. Y. Sheng and Z. Zhang (2008). "Prediction of mucin-type O-glycosylation sites in mammalian proteins using the composition of k-spaced amino acid pairs." BMC Bioinformatics **9**: 101.
- Chia, J., G. Goh and F. Bard (2016). "Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives." Biochim Biophys Acta **1860**(8): 1623-1639.
- 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**(8): 536-550.
- D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." Trends Cell Biol **18**(10): 456-466.



Daenzer, J. M., R. D. Sanders, D. Hang and J. L. Fridovich-Keil (2012). "UDP-galactose 4'-epimerase activities toward UDP-Gal and UDP-GalNAc play different roles in the development of *Drosophila melanogaster*." *PLoS Genet* **8**(5): e1002721.

Dean, K. J. and C. C. Sweeley (1979). "Studies on human liver alpha-galactosidases. II. Purification and enzymatic properties of alpha-galactosidase B (alpha-N-acetylgalactosaminidase)." *J Biol Chem* **254**(20): 10001-10005.

Dechat, T., K. Pflieger, K. Sengupta, T. Shimi, D. K. Shumaker, L. Solimando and R. D. Goldman (2008). "Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin." *Genes Dev* **22**(7): 832-853.

Dellaire, G., R. Farrall and W. A. Bickmore (2003). "The Nuclear Protein Database (NPD): sub-nuclear localisation and functional annotation of the nuclear proteome." *Nucleic Acids Res* **31**(1): 328-330.

Dhe-Paganon, S., E. D. Werner, Y. I. Chi and S. E. Shoelson (2002). "Structure of the globular tail of nuclear lamin." *J Biol Chem* **277**(20): 17381-17384.

Dias, W. B., W. D. Cheung and G. W. Hart (2012). "O-GlcNAcylation of kinases." *Biochemical and biophysical research communications* **422**(2): 224-228.

Dittmer, T. A. and T. Misteli (2011). "The lamin protein family." *Genome Biol* **12**(5): 222.

Dodd, R. B. and K. Drickamer (2001). "Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity." *Glycobiology* **11**(5): 71R-79R.

Dorner, D., J. Gotzmann and R. Foisner (2007). "Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation." *FEBS J* **274**(6): 1362-1373.

Elgin, S. C. and H. Weintraub (1975). "Chromosomal proteins and chromatin structure." *Annu Rev Biochem* **44**: 725-774.

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**(6): 881-890.

Ferraro, A., M. Eufemi, L. Cervoni, R. Marinetti and C. Turano (1989). "Glycosylated forms of nuclear lamins." *FEBS Lett* **257**(2): 241-246.

Ferrer, C. M., V. L. Sodi and M. J. Reginato (2016). "O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling." *J Mol Biol* **428**(16): 3282-3294.

Fox, A. H., Y. W. Lam, A. K. Leung, C. E. Lyon, J. Andersen, M. Mann and A. I. Lamond (2002). "Paraspeckles: a novel nuclear domain." *Curr Biol* **12**(1): 13-25.

Fox, A. H. and A. I. Lamond (2010). "Paraspeckles." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(7): a000687.

Fraser, P. and W. Bickmore (2007). "Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation." *Nature* **447**(7143): 413-417.

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  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferase-T1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(43): 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  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferase-2." *Journal of Biological Chemistry* **281**(13): 8613-8619.

Fu, C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng and H. Chen (2016). "Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen." *HLA* **88**(6): 275-286.

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**(7245): 455-459.

Furukawa, K. and Y. Hotta (1993). "cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells." *EMBO J* **12**(1): 97-106.

- Furukawa, K., H. Inagaki and Y. Hotta (1994). "Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice." Exp Cell Res **212**(2): 426-430.
- Gall, J. G. (2003). "The centennial of the Cajal body." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 975-980.
- Gao, J., M. S. Friedrichs, A. R. Dongre and G. J. Opitck (2005). "Guidelines for the routine application of the peptide hits technique." J Am Soc Mass Spectrom **16**(8): 1231-1238.
- 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**(25): 22200-22208.
- Gay, S. and M. Foiani (2015). "Nuclear envelope and chromatin, lock and key of genome integrity." Int Rev Cell Mol Biol **317**: 267-330.
- Gill, D. J., H. Clausen and F. Bard (2011). "Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation." Trends in cell biology **21**(3): 149-158.
- Gill, D. J., H. Clausen and F. Bard (2011). "Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation." Trends Cell Biol **21**(3): 149-158.
- Gill, D. J., J. Chia, J. Senewiratne and F. Bard (2010). "Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes." J Cell Biol **189**(5): 843-858.
- 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." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(34): E3152-3161.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" Genes Dev **18**(17): 2046-2059.
- Goetz, R., Y. Nakada, M. C. Hu, H. Kurosu, L. Wang, T. Nakatani, M. Shi, A. V. Eliseenkova, M. S. Razzaque, O. W. Moe, M. Kuro-o and M. Mohammadi (2010). "Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 407-412.
- Goldberg, M., A. Harel, M. Brandeis, T. Rechsteiner, T. J. Richmond, A. M. Weiss and Y. Gruenbaum (1999). "The tail domain of lamin Dm0 binds histones H2A and H2B." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2852-2857.
- Goldman, R. D., Y. Gruenbaum, R. D. Moir, D. K. Shumaker and T. P. Spann (2002). "Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture." Genes Dev **16**(5): 533-547.
- Gomes, J., N. T. Marcos, N. Berois, E. Osinaga, A. Magalhaes, J. Pinto-de-Sousa, R. Almeida, F. Gartner and C. A. Reis (2009). "Expression of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 in gastric mucosa, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma." J Histochem Cytochem **57**(1): 79-86.
- Graifer, D., A. Malygin, D. O. Zharkov and G. Karpova (2014). "Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes." Biochimie **99**: 8-18.
- Guerra-Rebollo, M., F. Mateo, K. Franke, M. S. Huen, F. Lopitz-Otsoa, M. S. Rodriguez, V. Plans and T. M. Thomson (2012). "Nucleolar exit of RNF8 and BRCA1 in response to DNA damage." Exp Cell Res **318**(18): 2365-2376.
- Gupta, R. and S. Brunak (2002). "Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function." Pac Symp Biocomput: 310-322.
- Hadjilov, A. A. (2012). The Nucleolus and Ribosome Biogenesis, Springer Vienna.
- 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**(25): 18960-18965.
- Hang, H. C. and C. R. Bertozzi (2005). "The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation." Bioorganic & medicinal chemistry **13**(17): 5021-5034.

- Hanisch, F.-G. (2001). "O-glycosylation of the mucin type." Biological chemistry **382**(2): 143-149.
- Hansen, J. E., O. Lund, N. Tolstrup, A. A. Gooley, K. L. Williams and S. Brunak (1998). "NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility." Glycoconj J **15**(2): 115-130.
- 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." Carbohydr Res **344**(7): 881-887.
- Hazes, B. (1996). "The (QxW) 3 domain: a flexible lectin scaffold." Protein Science **5**(8): 1490-1501.
- Herrmann, H. and R. Foisner (2003). "Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **60**(8): 1607-1612.
- Hooper, N., E. Karran and A. Turner (1997). "Membrane protein secretases." Biochem. J **321**: 265-279.
- Hu, P., S. Shimoji and G. W. Hart (2010). "Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation." FEBS Lett **584**(12): 2526-2538.
- Huanna, T., Z. Tao, W. Xiangfei, A. Longfei, X. Yuanyuan, W. Jianhua, Z. Cuifang, J. Manjing, C. Wenjing, Q. Shaochuan, X. Feifei, L. Naikang, Z. Jinchao and W. Chen (2015). "GALNT14 mediates tumor invasion and migration in breast cancer cell MCF-7." Mol Carcinog **54**(10): 1159-1171.
- 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**(12): 1353-1356.
- Janetzko, J. and S. Walker (2014). "The making of a sweet modification: structure and function of O-GlcNAc transferase." J Biol Chem **289**(50): 34424-34432.
- Johns, E. W. (1964). "Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus." Biochem J **92**(1): 55-59.
- Ju, T., R. P. Aryal, M. R. Kudelka, Y. Wang and R. D. Cummings (2014). "The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer." Cancer Biomark **14**(1): 63-81.
- Kakeji, Y., S. Tsujitani, M. Mori, Y. Maehara and K. Sugimachi (1991). "Helix pomatia agglutinin binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma." Cancer **68**(11): 2438-2442.
- Kasper, B. T., S. Koppolu and L. K. Mahal (2014). "Insights into miRNA regulation of the human glycome." Biochem Biophys Res Commun **445**(4): 774-779.
- Kathiresan, S., O. Melander, C. Guiducci, A. Surti, N. P. Burt, M. J. Rieder, G. M. Cooper, C. Roos, B. F. Voight, A. S. Havulinna, B. Wahlstrand, T. Hedner, D. Corella, E. S. Tai, J. M. Ordovas, G. Berglund, E. Vartiainen, P. Jousilahti, B. Hedblad, M. R. Taskinen, C. Newton-Cheh, V. Salomaa, L. Peltonen, L. Groop, D. M. Altshuler and M. Orho-Melander (2008). "Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans." Nat Genet **40**(2): 189-197.
- Kato, K., C. Jeanneau, M. A. Tarp, A. Benet-Pages, 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." J Biol Chem **281**(27): 18370-18377.
- 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**(27): 18370-18377.

- Kelly, W. G. and G. W. Hart (1989). "Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin." *Cell* **57**(2): 243-251.
- Kim, E. J. (2011). "Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc." *Molecules* **16**(3): 1987-2022.
- Kim, Y., M. S. Lee, H. D. Kim and J. Kim (2016). "Ribosomal protein S3 (rpS3) secreted from various cancer cells is N-linked glycosylated." *Oncotarget* **7**(49): 80350-80362.
- Kim, Y. J. and A. Varki (1997). "Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer." *Glycoconjugate journal* **14**(5): 569-576.
- Kim, Y. S., J. Gum Jr and I. Brockhausen (1996). "Mucin glycoproteins in neoplasia." *Glycoconjugate journal* **13**(5): 693-707.
- Kingsley, P. D., K. G. T. Hagen, K. M. Maltby, J. Zara and L. A. Tabak (2000). "Diverse spatial expression patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase family member mRNAs during mouse development." *Glycobiology* **10**(12): 1317-1323.
- Krimm, I., C. Ostlund, B. Gilquin, J. Couprie, P. Hossenlopp, J. P. Mornon, G. Bonne, J. C. Courvalin, H. J. Worman and S. Zinn-Justin (2002). "The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy." *Structure* **10**(6): 811-823.
- 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  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10)." *Journal of molecular biology* **359**(3): 708-727.
- Kudelka, M. R., T. Ju, J. Heimburg-Molinario and R. D. Cummings (2015). "Simple sugars to complex disease-mucin-type O-glycans in cancer." *Adv Cancer Res* **126**: 53-135.
- Kuga, T., N. Nozaki, K. Matsushita, F. Nomura and T. Tomonaga (2010). "Phosphorylation statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle." *Exp Cell Res* **316**(14): 2301-2312.
- Lallemant-Breitenbach, V. and H. de The (2010). "PML nuclear bodies." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(5): a000661.
- Lanctot, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli and T. Cremer (2007). "Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions." *Nat Rev Genet* **8**(2): 104-115.
- Laughlin, S. T. and C. R. Bertozzi (2009). "Imaging the glycome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1): 12-17.
- Lenser, T., K. Weisshart, T. Ulbricht, K. Klement and P. Hemmerich (2010). "Fluorescence fluctuation microscopy to reveal 3D architecture and function in the cell nucleus." *Methods Cell Biol* **98**: 2-33.
- Levine, Z. G. and S. Walker (2016). "The Biochemistry of O-GlcNAc Transferase: Which Functions Make It Essential in Mammalian Cells?" *Annu Rev Biochem* **85**: 631-657.
- Li, B. and J. J. Kohler (2014). "Glycosylation of the nuclear pore." *Traffic* **15**(4): 347-361.
- Lim, K. H., K. H. Kim, S. I. Choi, E. S. Park, S. H. Park, K. Ryu, Y. K. Park, S. Y. Kwon, S. I. Yang, H. C. Lee, I. K. Sung and B. L. Seong (2011). "RPS3a over-expressed in HBV-associated hepatocellular carcinoma enhances the HBx-induced NF-kappaB signaling via its novel chaperoning function." *PLoS One* **6**(8): e22258.
- Lin, W., L. Gao and X. Chen (2015). "Protein-specific imaging of posttranslational modifications." *Curr Opin Chem Biol* **28**: 156-163.
- 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**(4): 1044-1055.
- Lorenz, V., R. B. Cejas, E. P. Bennett, G. A. Nores and F. J. Irazoqui (2017). "Functional control of polypeptide GalNAc-transferase 3 through an acetylation site in the C-terminal lectin domain." *Biol Chem*.

- Lorenz, V., Y. Ditamo, R. B. Cejas, M. E. Carrizo, E. P. Bennett, H. Clausen, G. A. Nores and F. J. Irazoqui (2016). "Extrinsic Functions of Lectin Domains in O-N-Acetylgalactosamine Glycan Biosynthesis." J Biol Chem **291**(49): 25339-25350.
- Luo, Y. B., F. L. Mastaglia and S. D. Wilton (2014). "Normal and aberrant splicing of LMNA." J Med Genet **51**(4): 215-223.
- Luxton, G. W. and D. A. Starr (2014). "KASHing up with the nucleus: novel functional roles of KASH proteins at the cytoplasmic surface of the nucleus." Curr Opin Cell Biol **28**: 69-75.
- Ma, J. and G. W. Hart (2014). "O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes." Clin Proteomics **11**(1): 8.
- Machiels, B. M., A. H. G. Zorenc, J. M. Endert, H. J. H. Kuijpers, G. J. J. M. van Eys, F. C. S. Ramaekers and J. L. V. Broers (1996). "An Alternative Splicing Product of the Lamin A/C Gene Lacks Exon 10." Journal of Biological Chemistry **271**(16): 9249-9253.
- Machyna, M., P. Heyn and K. M. Neugebauer (2013). "Cajal bodies: where form meets function." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(1): 17-34.
- Mall, M., T. Walter, M. Gorjanacz, I. F. Davidson, T. B. Nga Ly-Hartig, J. Ellenberg and I. W. Mattaj (2012). "Mitotic lamin disassembly is triggered by lipid-mediated signaling." J Cell Biol **198**(6): 981-990.
- Manders, E. M., J. Stap, G. J. Brakenhoff, R. van Driel and J. A. Aten (1992). "Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy." J Cell Sci **103 ( Pt 3)**: 857-862.
- Mao, Y. S., B. Zhang and D. L. Spector (2011). "Biogenesis and function of nuclear bodies." Trends Genet **27**(8): 295-306.
- Maraldi, N. M., C. Capanni, V. Cenni, M. Fini and G. Lattanzi (2011). "Laminopathies and lamin-associated signaling pathways." Journal of Cellular Biochemistry **112**(4): 979-992.
- 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**(51): 35486-35495.
- Mattout-Drubezki, A. and Y. Gruenbaum (2003). "Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery." Cell Mol Life Sci **60**(10): 2053-2063.
- Mattout, A., M. Goldberg, Y. Tzur, A. Margalit and Y. Gruenbaum (2007). "Specific and conserved sequences in D. melanogaster and C. elegans lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes." J Cell Sci **120**(Pt 1): 77-85.
- Meier, I. (2001). "The plant nuclear envelope." Cell Mol Life Sci **58**(12-13): 1774-1780.
- Melcak, I., S. Cermanova, K. Jirsova, K. Koberna, J. Malinsky and I. Raska (2000). "Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs." Mol Biol Cell **11**(2): 497-510.
- Melcer, S., Y. Gruenbaum and G. Krohne (2007). "Invertebrate lamins." Exp Cell Res **313**(10): 2157-2166.
- Meyuhas, O. (2015). "Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research." Int Rev Cell Mol Biol **320**: 41-73.
- Morimoto, M. and C. F. Boerkoel (2013). "The role of nuclear bodies in gene expression and disease." Biology (Basel) **2**(3): 976-1033.
- Nagel, A. K. and L. E. Ball (2014). "O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity." Amino Acids **46**(10): 2305-2316.
- Nakayama, Y., N. Nakamura, T. Kawai, E. Kaneda, Y. Takahashi, A. Miyake, N. Itoh and A. Kurosaka (2014). "Identification and expression analysis of zebrafish polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase Y-subfamily genes during embryonic development." Gene Expr Patterns **16**(1): 1-7.
- Ono, M. and S. Hakomori (2003). "Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness." Glycoconjugate journal **20**(1): 71-78.

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**(5): 353-364.

Passon, D. M., M. Lee, O. Rackham, W. A. Stanley, A. Sadowska, A. Filipovska, A. H. Fox and C. S. Bond (2012). "Structure of the heterodimer of human NONO and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(13): 4846-4850.

Pedersen, J. W., E. P. Bennett, K. T. Schjoldager, M. Meldal, A. P. Holmer, O. Blixt, E. Clo, S. B. Lavery, H. Clausen and H. H. Wandall (2011). "Lectin domains of polypeptide GalNAc transferases exhibit glycopeptide binding specificity." J Biol Chem **286**(37): 32684-32696.

Pestov, D. G., Z. Strezoska and L. F. Lau (2001). "Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition." Mol Cell Biol **21**(13): 4246-4255.

Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf (2006). "Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD." Genes Dev **20**(21): 2922-2936.

Pinho, S. S. and C. A. Reis (2015). "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications." Nat Rev Cancer **15**(9): 540-555.

Prasanth, K. V. and D. L. Spector (2007). "Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum." Genes Dev **21**(1): 11-42.

Prokocimer, M., M. Davidovich, M. Nissim-Rafinia, N. Wiesel-Motiuk, D. Z. Bar, R. Barkan, E. Meshorer and Y. Gruenbaum (2009). "Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities." J Cell Mol Med **13**(6): 1059-1085.

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**(28): 23549-23561.

Rappsilber, J., U. Ryder, A. I. Lamond and M. Mann (2002). "Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome." Genome Res **12**(8): 1231-1245.

Robson, M. I., P. Le Thanh and E. C. Schirmer (2014). "NETs and cell cycle regulation." Adv Exp Med Biol **773**: 165-185.

Rossetto, D., N. Avvakumov and J. Cote (2012). "Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events." Epigenetics **7**(10): 1098-1108.

Ruan, H.-B., Y. Nie and X. Yang (2013). "Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination." Molecular & Cellular Proteomics **12**(12): 3489-3497.

Rzepecki, R., S. S. Bogachev, E. Kokoza, N. Stuurman and P. A. Fisher (1998). "In vivo association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*." J Cell Sci **111 ( Pt 1)**: 121-129.

Saitoh, N., C. S. Spahr, S. D. Patterson, P. Bubulya, A. F. Neuwald and D. L. Spector (2004). "Proteomic analysis of interchromatin granule clusters." Mol Biol Cell **15**(8): 3876-3890.

Sakabe, K., Z. Wang and G. W. Hart (2010). "Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 19915-19920.

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.

Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Methods **9**(7): 676-682.

Schjoldager, K. T.-B. G., M. B. Vester-Christensen, E. P. Bennett, S. B. Lavery, T. Schwientek, W. Yin, O. Blixt and H. Clausen (2010). "O-glycosylation modulates proprotein convertase activation of angiotensin-like protein 3-possible role of polypeptide GalNAc-transferase-2 in regulation of concentrations of plasma lipids." Journal of Biological Chemistry: jbc. M110. 156950.

- Schjoldager, K. T. and H. Clausen (2012). "Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family." *Biochim Biophys Acta* **1820**(12): 2079-2094.
- Schjoldager, K. T., H. J. Joshi, Y. Kong, C. K. Goth, S. L. King, H. H. Wandall, E. P. Bennett, S. Y. Vakhrushev and H. Clausen (2015). "Deconstruction of O-glycosylation--GalNAc-T isoforms direct distinct subsets of the O-glycoproteome." *EMBO Rep* **16**(12): 1713-1722.
- Schjoldager, K. T., M. B. Vester-Christensen, E. P. Bennett, S. B. Lavery, 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." *J Biol Chem* **285**(47): 36293-36303.
- Sewell, R., M. Backstrom, M. Dalziel, S. Gschmeissner, H. Karlsson, T. Noll, J. Gatgens, H. Clausen, G. C. Hansson, J. Burchell and J. Taylor-Papadimitriou (2006). "The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer." *J Biol Chem* **281**(6): 3586-3594.
- Shechter, D., H. L. Dormann, C. D. Allis and S. B. Hake (2007). "Extraction, purification and analysis of histones." *Nat Protoc* **2**(6): 1445-1457.
- Shefer, K., J. Sperling and R. Sperling (2014). "The Supraspliceosome - A Multi-Task Machine for Regulated Pre-mRNA Processing in the Cell Nucleus." *Comput Struct Biotechnol J* **11**(19): 113-122.
- Simon, D. N. and K. L. Wilson (2013). "Partners and post-translational modifications of nuclear lamins." *Chromosoma* **122**(1-2): 13-31.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka and D. Reinberg (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." *Trends Genet* **19**(11): 629-639.
- Skrincosky, D., R. Kain, A. El-Battari, M. Exner, D. Kerjaschki and M. Fukuda (1997). "Altered Golgi localization of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase leads to decreased synthesis of branched O-glycans." *J Biol Chem* **272**(36): 22695-22702.
- Snider, N. T. and M. B. Omary (2014). "Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(3): 163-177.
- Spector, D. L. and A. I. Lamond (2011). "Nuclear speckles." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(2).
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." *Glycobiology* **12**(4): 43R-56R.
- Springer, G. F. (1984). "T and Tn, general carcinoma autoantigens." *Science* **224**(4654): 1198-1206.
- Stanley, P. (2011). "Golgi glycosylation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(4).
- Stanley, P., Schachter, H, Taniguchi N. (2009). N-Glycans. *Essentials of glycobiology*. e. a. Varki A. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press 101-114.
- Starr, D. A. (2009). "A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes." *J Cell Sci* **122**(Pt 5): 577-586.
- Steentoft, C., S. Y. Vakhrushev, H. J. Joshi, Y. Kong, M. B. Vester-Christensen, K. T. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N. B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E. P. Bennett, U. Mandel, S. Brunak, H. H. Wandall, S. B. Lavery and H. Clausen (2013). "Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology." *EMBO J* **32**(10): 1478-1488.
- Steentoft, 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**(10): 1478-1488.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* **403**(6765): 41-45.

Swift, J., I. L. Ivanovska, A. Buxboim, T. Harada, P. C. Dingal, J. Pinter, J. D. Pajerowski, K. R. Spinler, J. W. Shin, M. Tewari, F. Rehfeldt, D. W. Speicher and D. E. Discher (2013). "Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation." *Science* **341**(6149): 1240104.

Takata, H., H. Nishijima, S. Ogura, T. Sakaguchi, P. A. Bubulya, T. Mochizuki and K. Shibahara (2009). "Proteome analysis of human nuclear insoluble fractions." *Genes Cells* **14**(8): 975-990.

Tapley, E. C. and D. A. Starr (2013). "Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope." *Curr Opin Cell Biol* **25**(1): 57-62.

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**(7307): 707-713.

Tian, E. and K. G. Ten Hagen (2009). "Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation." *Glycoconj J* **26**(3): 325-334.

Topaz, O., D. L. Shurman, R. Bergman, M. Indelman, P. Ratajczak, M. Mizrahi, 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**(6): 579-581.

Torvaldson, E., V. Kochin and J. E. Eriksson (2015). "Phosphorylation of lamins determine their structural properties and signaling functions." *Nucleus* **6**(3): 166-171.

Tran, E. J. and S. R. Wentz (2006). "Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge." *Cell* **125**(6): 1041-1053.

Tripathi, V. and K. V. Prasanth (2001). *Cell Nucleus. eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.

Tschochner, H. and E. Hurt (2003). "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." *Trends Cell Biol* **13**(5): 255-263.

Uhlen, M., P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Bjorling and F. Ponten (2010). "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas." *Nat Biotechnol* **28**(12): 1248-1250.

UniProt, C. (2015). "UniProt: a hub for protein information." *Nucleic Acids Res* **43**(Database issue): D204-212.

Vakhrushev, S. Y., C. Steentoft, M. B. Vester-Christensen, E. P. Bennett, H. Clausen and S. B. Levery (2013). "Enhanced mass spectrometric mapping of the human GalNAc-type O-glycoproteome with SimpleCells." *Mol Cell Proteomics* **12**(4): 932-944.

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.

Varki, A., R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler (2009). *Essentials of Glycobiology*. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).

Varki, A. and M. J. Chrispeels (1999). *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Verheggen, C., D. L. Lafontaine, D. Samarsky, J. Mouaikel, J. M. Blanchard, R. Bordonne and E. Bertrand (2002). "Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments." *EMBO J* **21**(11): 2736-2745.

Vojta, A., I. Samarzija, L. Bockor and V. Zoldos (2016). "Glyco-genes change expression in cancer through aberrant methylation." *Biochim Biophys Acta* **1860**(8): 1776-1785.

Vosseller, K., J. C. Trinidad, R. J. Chalkley, C. G. Specht, A. Thalhammer, A. J. Lynn, J. O. Snedecor, S. Guan, K. F. Medzihradsky, D. A. Maltby, R. Schoepfer and A. L. Burlingame (2006). "O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* **5**(5): 923-934.

Wacker, M., D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, B. W. Wren and M. Aebi (2002). "N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*." *Science* **298**(5599): 1790-1793.



- Wagner, N. and G. Krohne (2007). "LEM-Domain proteins: new insights into lamin-interacting proteins." Int Rev Cytol **261**: 1-46.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova and G. J. Gatto, Jr. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." Angew Chem Int Ed Engl **44**(45): 7342-7372.
- 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**(4): 374-387.
- Wandall, H. H., F. Irazoqui, M. A. Tarp, E. P. Bennett, U. Mandel, H. Takeuchi, K. Kato, T. Irimura, G. Suryanarayanan, M. A. Hollingsworth and H. Clausen (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**(4): 374-387.
- Wang, C., L. Tian, V. M. Popov and R. G. Pestell (2011). "Acetylation and nuclear receptor action." J Steroid Biochem Mol Biol **123**(3-5): 91-100.
- Wang, Z., N. D. Udeshi, C. Slawson, P. D. Compton, K. Sakabe, W. D. Cheung, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and G. W. Hart (2010). "Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis." Sci Signal **3**(104): ra2.
- Wang, Z. Q., M. Bachvarova, C. Morin, M. Plante, J. Gregoire, M. C. Renaud, A. Sebastianelli and D. Bachvarov (2014). "Role of the polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in ovarian cancer progression: possible implications in abnormal mucin O-glycosylation." Oncotarget **5**(2): 544-560.
- Wani, W. Y., J. C. Chatham, V. Darley-Usmar, L. L. McMahon and J. Zhang (2016). "O-GlcNAcylation and neurodegeneration." Brain Res Bull.
- Wells, L., Y. Gao, J. A. Mahoney, K. Vosseller, C. Chen, A. Rosen and G. W. Hart (2002). "Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: FURTHER CHARACTERIZATION OF THE NUCLEOCYTOPLASMIC  $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE, O-GlcNAcase." Journal of Biological Chemistry **277**(3): 1755-1761.
- Wells, L., K. Vosseller and G. W. Hart (2001). "Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc." Science **291**(5512): 2376-2378.
- Wong, X., T. R. Luperchio and K. L. Reddy (2014). "NET gains and losses: the role of changing nuclear envelope proteomes in genome regulation." Curr Opin Cell Biol **28**: 105-120.
- Woodcock, C. L. and R. P. Ghosh (2010). "Chromatin higher-order structure and dynamics." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a000596.
- Worman, H. J. and G. Bonne (2007). "'Laminopathies': a wide spectrum of human diseases." Exp Cell Res **313**(10): 2121-2133.
- Xie, W. and B. Burke (2016). "Lamins." Curr Biol **26**(9): R348-350.
- Xiong, Y. and K.-L. Guan (2012). "Mechanistic insights into the regulation of metabolic enzymes by acetylation." The Journal of cell biology **198**(2): 155-164.
- Young, N. M., J. R. Brisson, J. Kelly, D. C. Watson, L. Tessier, P. H. Lanthier, H. C. Jarrell, N. Cadotte, F. St Michael, E. Aberg and C. M. Szymanski (2002). "Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*." J Biol Chem **277**(45): 42530-42539.
- Zachara, N. E., K. Vosseller and G. W. Hart (2011). "Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine." Curr Protoc Protein Sci Chapter 12: Unit12 18.
- Zastrow, M. S., S. Vlcek and K. L. Wilson (2004). "Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues." Journal of Cell Science **117**(7): 979-987.
- Zeidan, Q. and G. W. Hart (2010). "The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways." J Cell Sci **123**(Pt 1): 13-22.

- 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**(6): 715-725.
- 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  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase (OGT)." Journal of Biological Chemistry **289**(9): 5986-5996.
- Zhang, S., K. Roche, H. P. Nasheuer and N. F. Lowndes (2011). "Modification of histones by sugar beta-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated." J Biol Chem **286**(43): 37483-37495.
- Zhang, X., Y. Huang and X. Shi (2015). "Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins." Cell Mol Life Sci **72**(22): 4257-4272.
- Zhang, Z., E. P. Tan, N. J. VandenHull, K. R. Peterson and C. Slawson (2014). "O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis." Front Endocrinol (Lausanne) **5**: 206.
- Zhou, X., Q. Hao, J. M. Liao, P. Liao and H. Lu (2013). "Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity." J Biol Chem **288**(30): 21793-21801.
- Zhou, X., W. J. Liao, J. M. Liao, P. Liao and H. Lu (2015). "Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome." J Mol Cell Biol **7**(2): 92-104.
- Zhu, Y., T. W. Liu, Z. Madden, S. A. Yuzwa, K. Murray, S. Cecioni, N. Zachara and D. J. Vocadlo (2016). "Post-translational O-GlcNAcylation is essential for nuclear pore integrity and maintenance of the pore selectivity filter." J Mol Cell Biol **8**(1): 2-16.
- 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." Biol Chem **394**(1): 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**(1): 140-145.
- Zuleger, N., S. Boyle, D. A. Kelly, J. I. de las Heras, V. Lazou, N. Korfali, D. G. Batrakou, K. N. Randles, G. E. Morris, D. J. Harrison, W. A. Bickmore and E. C. Schirmer (2013). "Specific nuclear envelope transmembrane proteins can promote the location of chromosomes to and from the nuclear periphery." Genome Biol **14**(2): R14.