



Departamento de
QUÍMICA BIOLÓGICA
Ranwel Caputto



C I Q U I B I C

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, CELULAR Y FUNCIONAL DE LA SIALIDASA NEU3

Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencias Químicas
Licenciada en Química Macarena Rodríguez Walker

Director de Tesis:
Dr. José Luis Daniotti

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA
(CIQUIBIC)-CONICET
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA RANWEL CAPUTTO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Córdoba, 5 de diciembre de 2017

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dr. José Luis Daniotti (Director de Tesis)

Dra. Susana Genti-Raimondi

Dra. María Elena Álvarez

Dra. María Carolina Touz

COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS

Dra. Susana Genti-Raimondi

Dra. María Elena Álvarez

Dra. María Carolina Touz

Dra. María del Rosario González-Baró (Evaluadora externa)

AGRADECIMIENTOS

★ A la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas por la formación recibida durante todos estos años.

★ Al Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto y al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC) por brindarme un lugar físico para llevar a cabo esta tesis.

★ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo económico brindado a través de sus becas.

★ A mi querido director, el Dr. José Luis Daniotti, por la confianza depositada en mí desde el principio, por todas sus enseñanzas, su constante seguimiento y por haberme contagiado su pasión por la ciencia. ¡Infinitas gracias Pepe!

★ A los miembros de mi comisión de tesis, Dras. Susana Genti-Raimondi, María Elena Álvarez y María Carolina Touz, por las sugerencias y los aportes realizados en el desarrollo de este trabajo.

★ A la Dra. María del Rosario González-Baró, por el tiempo dedicado a la evaluación de esta tesis.

★ A mis compañeros de laboratorio, Alejandro, Pilar, Sabrina y Fernando, por la compañía diaria y por dejarme aprender junto a ustedes.

★ A Carlos, Cecilia, Gabriela, Susana y Daniela por la excelente asistencia técnica brindada y por la buena predisposición en todo momento.

★ A los integrantes del CIQUIBIC, en especial a los laboratorios vecinos, por haberme ayudado de alguna u otra forma, ya sea enseñándome a usar un equipo, prestándome un reactivo o dándome un consejo, siempre de manera desinteresada.

★ A los grandes amigos que me llevo de la Facultad, en especial a Ignacio, Yanela y Agustín. Simplemente nada hubiera sido igual sin ustedes.

★ A mis hermanas, Guadalupe y Trinidad, y a mis abuelas, Martha y Mariana, por estar presentes y cuidarme siempre. También a mis abuelos, Hugo y Daniel, que aunque ya no estén físicamente, sé que estarían muy orgullosos de su nieta mayor.

★ A Gerardo, mi compañero de vida, por su cariño, comprensión, paciencia y por la tranquilidad que me transmite cada día.

★ A mis padres, Silvia y Pablo, por haberme enseñado que con humildad, dedicación y esfuerzo, todo se logra.

ÍNDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS FRECUENTEMENTE	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
GANGLIÓSIDOS	9
Distribución subcelular.....	12
Funciones	12
Biosíntesis	14
Degradación	18
Remodelado a nivel de membrana plasmática	22
SIALIDASAS	25
Características generales	25
Neu1	28
Neu2.....	29
Neu3.....	31
Neu4.....	33
OBJETIVOS	35
CAPÍTULO I	36
ANTECEDENTES	37
RESULTADOS	40
Expresión de la sialidasa Neu3 humana en células epiteliales CHO-K1	40
Caracterización de la asociación de Neu3 a membranas.....	44
Análisis de la presencia de segmentos transmembrana en la secuencia de Neu3....	49
Análisis de posibles modificaciones lipídicas en Neu3	50
Capacidad de Neu3 para dimerizar y oligomerizar	53
Modelado molecular de Neu3 basado en la estructura cristalina de Neu2	55
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIÓN	65
MATERIALES Y MÉTODOS	66
<i>Plásmidos</i>	66
<i>Cultivos celulares</i>	66

<i>Transfecciones</i>	66
<i>Anticuerpos</i>	67
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot</i>	67
<i>Inmunofluorescencia y microscopía confocal</i>	68
<i>Análisis cuantitativo de imágenes confocales</i>	68
<i>Ensayos de actividad sialidasa</i>	69
<i>Fraccionamiento subcelular</i>	69
<i>Extracción de proteínas de membrana</i>	70
<i>Tratamiento con Proteinasa K</i>	70
<i>Biotinilación de superficie</i>	70
<i>Partición en Tritón X-114</i>	71
<i>Ensayos de intercambio de acilo por biotina (ABE, Acyl-Biotin Exchange)</i>	71
<i>Ensayos de entrecruzamiento</i>	71
<i>Predicciones con herramientas bioinformáticas y modelado de Neu3</i>	72
<i>Análisis estadístico</i>	72
CAPÍTULO II	73
ANTECEDENTES	74
RESULTADOS	78
Análisis del efecto de la expresión de Neu3 sobre la endocitosis de transferrina.....	78
Cinética de incorporación de transferrina.....	81
Análisis del efecto de la expresión de Neu3 sobre la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina	83
Análisis del efecto de la expresión de Neu3 sobre la endocitosis independiente de clatrina.....	85
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIÓN	90
MATERIALES Y MÉTODOS	91
<i>Plásmidos</i>	91
<i>Cultivos celulares</i>	91
<i>Transfecciones</i>	92
<i>Anticuerpos</i>	92
<i>Inmunofluorescencia y microscopía confocal</i>	92
<i>Estudios endocíticos con marcadores fluorescentes</i>	93
<i>Microscopía confocal in vivo (Live cell imaging)</i>	93

<i>Análisis cuantitativo de imágenes confocales</i>	93
<i>Depleción de glicosfingolípidos</i>	94
<i>Análisis estadístico</i>	94
PUBLICACIONES	96
REFERENCIAS	97

ABREVIATURAS UTILIZADAS FRECUENTEMENTE

- ABE:** Intercambio de acilo por biotina (*Acyl-Biotin Exchange*)
- AP-2:** Proteína adaptadora de clatrina-2 (*Adaptor Protein-2*)
- BSA:** Albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
- Cav-1:** Caveolina-1
- CCP:** Invaginación recubierta con clatrina (*Clathrin-Coated Pit*)
- Cer:** Ceramida
- CHO-K1:** Células de ovario de hámster chino-K1 (*Chinese Hamster Ovary-K1 Cells*)
- CIE:** Endocitosis independiente de clatrina (*Clathrin-Independent Endocytosis*)
- CLC:** Cadena liviana de clatrina
- CME:** Endocitosis mediada por clatrina (*Clathrin-Mediated Endocytosis*)
- CTx β :** Subunidad β de la toxina colérica
- EGF:** Factor de crecimiento epidermal (*Epidermal Growth Factor*)
- EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- ER:** Endosomas de reciclado
- ET:** Endosomas tempranos
- Gal:** Galactosa
- GalCer:** Galactosilceramida
- GalNAc:** *N*-acetilgalactosamina
- GFP:** Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)
- Glc:** Glucosa
- GlcCer:** Glucosilceramida
- GlcNAc:** *N*-acetilglucosamina
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol
- GSL:** Glicoesfingolípido
- Lac:** Lactosa
- LacCer:** Lactosilceramida
- MP:** Membrana plasmática
- Neu5Ac:** Ácido *N*-acetilneuramínico
- PBS:** Buffer fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
- PH-PLC δ 1:** Dominio PH de la fosfolipasa C δ 1
- PIP2:** Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ó PtdIns(4,5)P₂
- RE:** Retículo endoplásmico
- Tf:** Transferrina
- TfR:** Receptor de transferrina
- Tub:** α -tubulina
- YFP:** Proteína fluorescente amarilla (*Yellow Fluorescent Protein*)
- α ₂M:** α ₂-Macroglobulina

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

La sialidasa asociada a membranas Neu3 está involucrada en el catabolismo de glicoconjugados, especialmente de gangliósidos, e interviene en numerosos procesos biológicos tales como diferenciación, proliferación, migración y adhesión celular, regulando principalmente vías de transducción de señales. Dado que el mecanismo de asociación de Neu3 con membranas biológicas no se conoce, uno de los objetivos de este trabajo fue proveer más información sobre ese aspecto. Se encontró que Neu3 localiza principalmente en membrana plasmática, y también en endomembranas de compartimientos endosomales. Utilizando diferentes metodologías se demostró que el extremo C-terminal de la proteína está expuesto hacia el lado citosólico, y que otra porción de Neu3 está expuesta hacia el espacio extracelular, sugiriendo que la sialidasa posee las características de una proteína transmembrana. Sin embargo, análisis *in silico* y modelado molecular predijeron que la sialidasa no contiene segmentos α -hélices transmembrana en su secuencia, y que comparte la estructura de β -propeller, típica de las sialidasas virales y bacterianas. En la búsqueda de modificaciones post-traduccionales de Neu3, se encontró que la misma está S-acilada, y dado que la S-acilación está restringida al lado citosólico de las membranas, este descubrimiento apoya la idea de que la sialidasa contiene un dominio expuesto al citosol. Aunque aún queda por determinar exactamente cómo esta enzima atraviesa la bicapa lipídica, la primera parte de este estudio provee una nueva visión sobre la topología de Neu3 y se discuten algunas posibles configuraciones.

Por otro lado, se estudiaron aspectos funcionales de la enzima no descriptos con anterioridad, como ser su participación en eventos endocíticos. Se observó que células que sobreexpresan Neu3 endocitan menos transferrina (Tf), un típico ejemplo de molécula que ingresa a la célula por endocitosis mediada por clatrina (CME). Dicha disminución en la endocitosis de Tf se observó también en células con reducido nivel de expresión de glicoesfingolípidos, sugiriendo que el efecto observado es independiente de la acción de Neu3 sobre gangliósidos. La disminución en la internalización de Tf, como así también de otras moléculas que ingresan por CME, pudo ser explicada debido a una distribución subcelular alterada del adaptador de clatrina AP-2, el cual se observó formando agregados en células que sobreexpresan Neu3. Por el contrario, clatrina, el fosfoinosítido PIP2 y caveolina mostraron una distribución normal. En conjunto estos resultados sugieren un rol específico de Neu3 en CME.

ABSTRACT

Membrane-bound sialidase Neu3 is involved in the catabolism of glycoconjugates, especially gangliosides, and plays crucial roles in numerous biological processes, such as differentiation, proliferation, migration and cell adhesion, regulating transmembrane signaling. Since the mechanism of its association with membranes is still not completely understood, the aim of this work was to provide further information regarding this aspect. Human Neu3 was found to be associated with the plasma membrane and endomembranes from endosomal compartments, and it was not released from the lipid bilayer under conditions that typically release peripheral membrane proteins. By different experimental approaches, it was demonstrated that its C-terminus is exposed to the cytosol while another portion of the protein is exposed to the extracellular space, suggesting that Neu3 possesses the features of a transmembrane protein. However, *in silico* analysis and homology modeling predicted that the sialidase does not contain any α -helical transmembrane segment and shares the same β -propeller fold typical of viral and bacterial sialidases. Additionally, it was found that Neu3 is S-acylated, and since this post-translational modification is restricted to the cytosolic side of membranes, this finding strongly supports the idea that Neu3 may contain a cytosolic-exposed domain. Although it remains to be determined exactly how this sialidase crosses the lipid bilayer, the first part of this study provides new insights about membrane association and topology of Neu3.

On the other hand, some previously unknown functional aspects of the enzyme, such as its involvement in endocytic events, were studied in this work. The ectopic expression of Neu3 led to a drastic decrease in the internalization of transferrin (Tf), the archetypical cargo for clathrin-mediated endocytosis (CME). This reduction was still observed in cells with reduced expression of glycosphingolipids, suggesting that the observed effect is independent of Neu3 activity toward gangliosides. This decrease in the internalization of Tf and also of other molecules entering by CME could be explained by an altered subcellular distribution of the clathrin adaptor AP-2, which was observed to be aggregated in cells overexpressing Neu3. In contrast, clathrin, the phosphoinositide PIP2 and caveolin showed a normal distribution. Together these results suggest a specific and novel role of Neu3 in CME.

INTRODUCCIÓN

GANGLIÓSIDOS

Los gangliósidos son una amplia familia de glicoesfingolípidos (GSLs) ácidos, de naturaleza anfipática. Como en todos los GSLs, la parte lipídica de los gangliósidos está compuesta por la ceramida (Cer), una molécula formada por un ácido graso de largo variable unido por un enlace amida a un amino alcohol llamado esfingosina [1]. Dependiendo del largo de la cadena hidrocarbonada, de la cantidad de grupos hidroxilo y del grado de insaturación, tanto de la esfingosina como del ácido graso, se genera un amplio espectro de ceramidas (Fig. 1). Con fines prácticos y para simplificar la nomenclatura, a partir de ahora se referirá a las ceramidas como si fueran una sola. En los GSLs, la ceramida está unida mediante un enlace β -glicosídico a un monosacárido o a un oligosacárido de composición variable, lo que origina las diferentes series de GSLs que existen (Fig. 1). La mayor parte de los gangliósidos descritos pertenecen a la serie-ganglio, y serán los que se describirán en esta tesis. La característica principal que distingue a los gangliósidos de otras familias de GSLs es que poseen en su oligosacárido una o más moléculas de ácido siálico, un monosacárido de nueve átomos de carbono que presenta gran diversidad estructural y se encuentra principalmente en las porciones terminales de los oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos. Se han descrito cerca de 50 tipos diferentes de ácidos siálicos, siendo el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) el que más frecuentemente se encuentra formando parte de los oligosacáridos en humanos [2] (Fig. 1). Otros mamíferos poseen tanto Neu5Ac como así también ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc), el último de los cuales no puede ser sintetizado por los humanos. A pesar de que no es estrictamente correcto y a los fines de una mejor comprensión, en este trabajo de tesis se utilizarán como sinónimos los términos ácido siálico y Neu5Ac. El orden de los azúcares y el tipo de enlace glicosídico da lugar a un gran repertorio de gangliósidos, de tal manera que estos compuestos constituyen la familia de GSLs con mayor variabilidad estructural. No hay que perder de vista que la heterogeneidad que presentan los gangliósidos no se halla restringida sólo al oligosacárido, sino que también está presente en el residuo ceramida, como se mencionó anteriormente. El gangliósido más simple es el GM3, cuyo oligosacárido contiene un residuo de glucosa (Glc), seguido por un residuo de galactosa (Gal) y uno de Neu5Ac (Fig. 1).

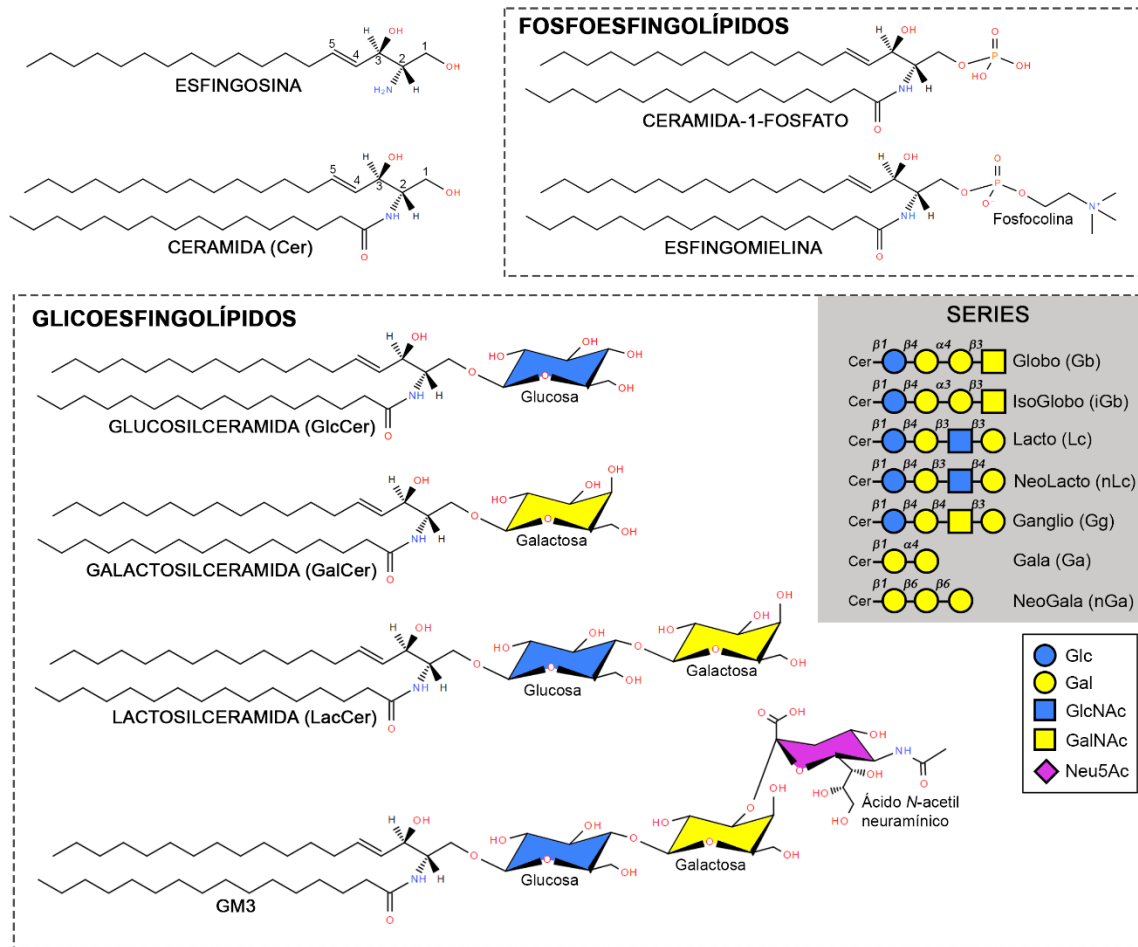


FIGURA 1. Estructuras representativas de los esfingolípidos. Esta familia de lípidos está compuesta por una base esfingoide como la esfingosina unida por un enlace amida a un ácido graso (ejemplificado como un ácido palmítico), dando origen a ceramida (Cer). La ceramida puede ser derivatizada por la adición de una o varias moléculas en el grupo hidroxilo del carbono 1 para dar origen a dos grupos principales de esfingolípidos: los fosfoesfingolípidos y los glicoesfingolípidos (GSLs). Los fosfoesfingolípidos contienen un grupo fosfato, siendo los más comunes en mamíferos, la ceramida-1-fosfato y la esfingomielina (cuadrante superior derecho). Por otro lado, los GSLs contienen monosacáridos u oligosacáridos unidos a la ceramida (cuadrante inferior). En mamíferos, existen dos clases principales de GSLs dependiendo si poseen galactosa (Gal) o glucosa (Glc) como el primer residuo azúcar. Sin embargo, la mayoría de GSLs derivan de GlcCer, la cual puede ser posteriormente convertida a lactosilceramida (LacCer). Los gangliósidos son GSLs que poseen en su oligosacárido una o más unidades de ácido siálico (ej: Neu5Ac). En la figura se incluyen las estructuras químicas completas de determinados esfingolípidos, como así también la representación esquemática de las distintas series de GSLs (recuadro gris). GlcNAc, *N*-acetilglucosamina; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; Neu5Ac, ácido *N*-acetilneuramínico.

Existen varios sistemas de nomenclatura para referirse a los gangliósidos, pero la más utilizada fue propuesta por Lars Svennerholm (Universidad de Götebor, Suecia),

basada en el orden en el que migraban los principales gangliósidos del cerebro humano en una cromatografía [3], la cual fue posteriormente expandida a otras estructuras [4]. En esta nomenclatura histórica, los gangliósidos se designan con la letra G, seguido de una letra que indica el número de residuos de ácido siálico presente en la molécula (“M” = 1, “D” = 2, “T” = 3, “Q” = 4, “P” = 5) y por último, un número que hace referencia a su orden de migración obtenido experimentalmente en ensayos de cromatografía en capa delgada. Además, los gangliósidos se clasifican en cuatro series (0-, a-, b- y c-) de acuerdo con el número de residuos de ácido siálico (0, 1, 2 y 3, respectivamente) unido a la galactosa interna (Fig. 2). Por lo general, en los gangliósidos el ácido siálico se une por enlace glicosídico $\alpha 2-3$ a un residuo de galactosa, o por enlace $\alpha 2-8$ a otro ácido siálico, mientras que el resto de los azúcares de la serie-ganglio se unen por enlace β -glicosídico.

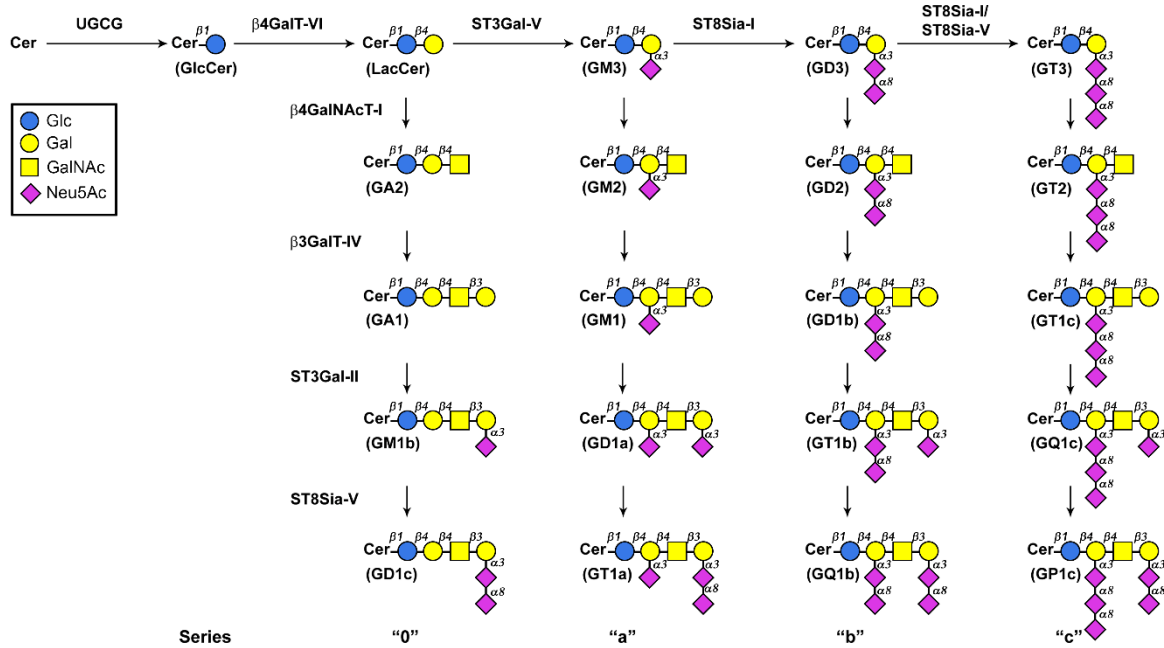


FIGURA 2. Esquema de biosíntesis de gangliósidos. Los gangliósidos se sintetizan por la adición secuencial de distintos monosacáridos a la ceramida. Cada reacción es catalizada por una glicosiltransferasa específica (ver Tabla I). Se indica el tipo de enlace glicosídico entre cada residuo. Las series 0-, a-, b- y c- indican el número de residuos de ácido siálico (0, 1, 2 y 3, respectivamente) unido a la galactosa interna de los gangliósidos.

Distribución subcelular

Los gangliósidos se encuentran distribuidos de manera ubicua en distintos tejidos de vertebrados, pero están principalmente enriquecidos en el sistema nervioso, donde constituyen alrededor de un 10% del contenido lipídico total [5]. A nivel subcelular, la mayor parte de los mismos reside en la membrana plasmática (MP) de las células, donde contribuyen entre un 20-25% de los lípidos en esta localización. Por su naturaleza anfipática están localizados asimétricamente, unidos por medio de la ceramida que se inserta en la hemicapa externa de la MP, dejando el oligosacárido expuesto al espacio extracelular [6]. Los tejidos extraneurales expresan cantidades inferiores de gangliósidos, y principalmente gangliósidos simples, mientras que los gangliósidos más complejos están restringidos al sistema nervioso diferenciado en el organismo adulto. En este sentido, GM1, GD1a, GD1b y GT1b representan más del 90% de los gangliósidos totales en el cerebro de mamíferos, mientras que GM3 es el gangliósido más abundante en la mayoría del resto de los tejidos.

El patrón de expresión de gangliósidos se encuentra finamente regulado a lo largo del desarrollo [5]. Un ejemplo lo constituye el cambio en el patrón de expresión de gangliósidos simples a gangliósidos más complejos durante el desarrollo del sistema nervioso central. La expresión de estas moléculas varía no solo en diferentes estadios fisiológicos, sino que también lo hace durante la transformación oncogénica. En varios tipos de cáncer se observa una marcada sobreexpresión de estos glicolípidos principalmente en aquellos tumores que tienen origen neuroectodérmico (melanoma, neuroblastoma, glioblastoma, etc.). Por ejemplo, en el 80% de los melanomas se encuentra sobreexpresado el gangliósido GD3, mientras que dicho gangliósido es un componente minoritario de los melanocitos. Además, algunos tumores comienzan a expresar gangliósidos que no se sintetizan en tejidos normales, como Neu5Gc-GM3 y fucosil-GM1. Es por ello, que estas especies se consideran antígenos asociados a tumores y son blanco de diversas inmunoterapias contra el cáncer [7].

Funciones

Además de ser componentes estructurales de la MP, los gangliósidos están involucrados en una gran variedad de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Estas moléculas participan en el desarrollo de enfermedades infecciosas, ya que actúan como

receptores celulares o co-receptores de diversos virus, bacterias y toxinas. El ejemplo más conocido es el caso del gangliósido GM1 como receptor de la toxina colérica. Esta toxina es producida por la bacteria *Vibrio cholerae* y está compuesta por cinco subunidades β y una subunidad α . Las subunidades β se unen específicamente a GM1 en la MP de las células y permiten la entrada de la subunidad α al citosol. Este hecho conlleva a la activación de la enzima adenilato ciclasa, con el consiguiente aumento en la producción de adenosín monofosfato (AMP) cíclico principalmente en células gastrointestinales, causando desbalance de electrolitos, diarrea severa y deshidratación [6]. Otros ejemplos de toxinas que utilizan a gangliósidos, en este caso no como receptores directos sino como co-receptores, son las toxinas tetánica y botulínica producidas por *Clostridium tetani* y *Clostridium botulinum*, respectivamente.

Los gangliósidos también están involucrados en la patogénesis de diversas neuropatías periféricas, como el síndrome de Guillain-Barré, una enfermedad causada por una respuesta autoinmune a los gangliósidos, que genera debilidad muscular en las extremidades, pérdida de reflejos y parálisis progresiva [8].

Por otro lado, la desregulación del catabolismo de gangliósidos, y de GSLs en general, origina un grupo de severas enfermedades hereditarias de acúmulo lisosomal, las cuales se caracterizan por un deterioro neurológico muchas veces fatal durante la infancia temprana. Estas enfermedades se describirán con mayor detalle en la sección de degradación de gangliósidos.

A nivel molecular, los gangliósidos actúan como receptores de superficie regulando diversas funciones celulares al menos a través de dos mecanismos: interaccionando lateralmente con moléculas presentes en la misma membrana (cis) para desencadenar cascadas de transducción de señales, o bien interaccionando con moléculas que unen glicanos presentes en una célula vecina o en el espacio extracelular (trans), modulando de esta manera procesos de reconocimiento célula-célula y célula-matriz extracelular [9].

Una de las funciones de los gangliósidos más descritas en la literatura es su capacidad de modular la actividad de receptores de factores de crecimiento en la superficie celular. Estos receptores por lo general son proteínas con un único dominio transmembrana, un gran dominio extracelular mediante el cual se unen a sus ligandos (factores de crecimiento), y un dominio citosólico con actividad tirosina quinasa. Cuando se unen al factor de crecimiento apropiado, estos receptores dimerizan, sufren autofosforilación cruzada y desencadenan una cascada de transducción de señales que

regula la proliferación, diferenciación, migración e invasión celular. La mayoría de los receptores, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, *Platelet-Derived Growth factor Receptor*) y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR, *Fibroblast Growth Factor Receptor*), están regulados por gangliósidos [10]. Por lo general, aunque hay excepciones, los monosialogangliósidos como GM3 inhiben la activación de estos receptores, mientras que los disialogangliósidos como GD2 y GD1a, los activan [11, 12]. Por ejemplo, GM3 inhibe la proliferación celular ya que está involucrado en la regulación del EGFR, previniendo su dimerización e inhibiendo la actividad tirosina quinasa endógena del receptor [13]. Recientemente, se ha demostrado que GM3 interacciona directamente con EGFR a través de interacciones carbohidrato-carbohidrato entre el glicolípido y los terminales GlcNAc de los *N*-glicanos de EGFR [14]. De manera similar, la activación de PDGFR es inhibida por GM1 [15].

Biosíntesis

La síntesis *de novo* de gangliósidos comienza con la producción de ceramida en la hemicapa citosólica de la membrana del retículo endoplásmico (RE), por acción de una serie de enzimas que generan como resultado final la formación de un enlace amida entre una base esfingoide y un ácido graso [1]. Posteriormente, la ceramida es transportada desde RE hacia el complejo de Golgi en vesículas o mediante un transporte no vesicular mediado por la proteína transferidora de ceramida CERT. En la membrana del complejo de Golgi se encuentran todas las enzimas glicosiltransferasas que van a catalizar la incorporación de los distintos monosacáridos [6, 16]. Cada reacción de glicosilación involucra la transferencia de un monosacárido desde un nucleótido azúcar donador (UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GalNAc o CMP-Neu5Ac) a un sustrato aceptor (Fig. 2). En la literatura, una misma glicosiltransferasa se puede encontrar con varios nombres alternativos, por lo que en este trabajo de tesis se utilizará una de las nomenclaturas más aceptada en la actualidad (Tabla I).

En membranas del cis-Golgi se localiza la enzima UGCG, la cual cataliza la transferencia de glucosa desde UDP-Glc hacia Cer para producir GlcCer, el primer intermediario glicosilado en la vía de síntesis de gangliósidos (Fig. 2). Esta enzima presenta una topología diferente al resto de las glicosiltransferasas de gangliósidos ya que en

principio sería una proteína con varios pasos transmembrana y con su dominio catalítico orientado hacia el citosol [17, 18]. De esta manera la síntesis de GlcCer es llevada a cabo en la hemicapa citosólica de las membranas del complejo de Golgi.

Tabla I. Nomenclatura de las glicosiltransferasas de gangliósidos.

Enzima	Nombres alternativos	Gen
UGCG	Ceramida glucosiltransferasa UDP-Glc:ceramida glucosiltransferasa GCS Glc-T1	<i>UGCG</i>
β 4GalT-VI	β -1,4-galactosiltransferasa 6 UDP-Gal:glucosilceramida galactosiltransferasa LacCer sintasa Gal-T1	<i>B4GALT6</i>
ST3Gal-V	Lactosilceramida α -2,3-sialiltransferasa CMP-Neu5Ac:lactosilceramida α -2,3-sialiltransferasa GM3 sintasa Sial-T1	<i>ST3GAL5</i>
ST8Sia-I	α -2,8-sialiltransferasa 1 CMP-Neu5Ac:GM3 α -2,8-sialiltransferasa GD3 sintasa Sial-T2	<i>ST8SIA1</i>
β 4GalNAcT-I	β -1,4- <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferasa 1 UDP-GalNAc: LacCer/GM3/GD3/GT3 β -1,4- <i>N</i> - acetilgalactosaminiltransferasa GA2/GM2/GD2/GT2 sintasa GalNAc-T	<i>B4GALNT1</i>
β 3GalT-IV	β -1,3-galactosiltransferasa 4 UDP-Gal:GA2/GM2/GD2/GT2 β -1,3-galactosiltransferasa GA1/GM1/GD1b/GT1c sintasa Gal-T2	<i>B3GALT4</i>
ST3Gal-II	α -2,3-sialiltransferasa 2 CMP-Neu5Ac: GA1/GM1/GD1b/GT1c α -2,3-sialiltransferasa GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c sintasa Sial-T4	<i>ST3GAL2</i>
ST8Sia-V	α -2,8-sialiltransferasa 5 CMP-Neu5Ac: GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c α -2,8- sialiltransferasa GD1c/GT1a/GQ1b/GP1c sintasa Sial-T5	<i>ST8SIA5</i>

Las demás glicosiltransferasas de gangliósidos son proteínas de membrana tipo II, que se caracterizan por poseer una región N-terminal citosólica corta, un único dominio transmembrana y un gran dominio C-terminal orientado hacia el lumen del complejo de Golgi, que alberga el sitio catalítico y los sitios de unión a los sustratos donador y aceptor (Fig. 3) [16, 19]. Por lo tanto, luego de su síntesis, GlcCer debe ser translocada hacia la hemicapa lumenal del complejo de Golgi para ser utilizada como sustrato en la síntesis de glicolípidos más complejos, incluidos los gangliósidos [20].

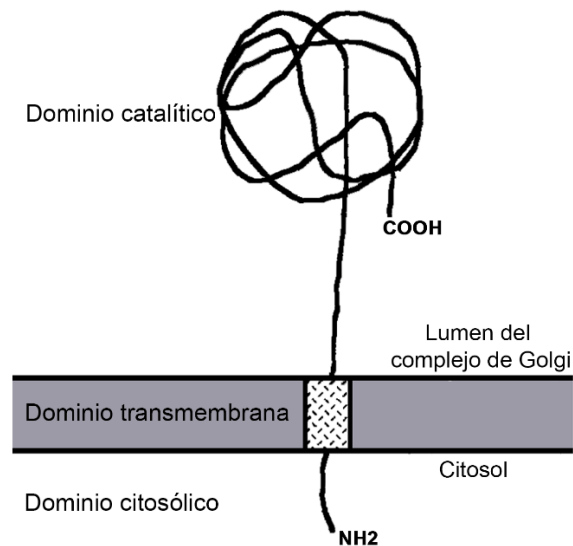


FIGURA 3. Topología característica de las glicosiltransferasas de gangliósidos. Las glicosiltransferasas de gangliósidos son proteínas transmembrana tipo II, con su corto extremo N-terminal orientado hacia el citosol, un único segmento transmembrana, y el extremo C-terminal que alberga el sitio catalítico, orientado hacia el lumen del complejo de Golgi. Modificado de Paulson y Colley [19].

Una vez translocada, GlcCer es sustrato de la enzima β 4GalT-VI, la cual transfiere un residuo galactosa desde UDP-Gal a GlcCer para sintetizar LacCer. La subsiguiente transferencia de ácido siálico por ST3Gal-V desde CMP-Neu5Ac a LacCer, produce GM3, el primer gangliósido de la vía α - y un punto de ramificación clave en la síntesis de estos GSLs. Residuos adicionales de ácido siálico pueden ser agregados por ST8Sia-I y por ST8Sia-V, que sintetizan GD3 y GT3, respectivamente. ST8Sia-I utiliza preferentemente a GM3 como sustrato, pero también puede incorporar una molécula de ácido siálico a GD3 para formar GT3, mientras que ST8Sia-V tiene menor especificidad, utilizando como sustratos tanto a GD3 como a otros gangliósidos más complejos.

LacCer, GM3, GD3, y GT3 son los precursores de gangliósidos más complejos de las vías 0-, a-, b- y c-, respectivamente. Dichos precursores pueden ser modificados en subsiguientes pasos de glicosilación por las enzimas β 4GalNAcT-I, β 3GalT-IV, ST3Gal-II y ST8Sia-V [1, 6, 21]. Todos los pasos biosintéticos con sus respectivas enzimas se encuentran esquematizados en la Figura 2.

Una vez sintetizados, los gangliósidos son incorporados en vesículas y transportados hacia la MP, donde residen y cumplen su función. En la Figura 4 se encuentra esquematizada con flechas verdes y de manera simplificada la biosíntesis de gangliósidos.

Es importante mencionar que hace más de 45 años se predijo que las glicosiltransferasas pueden formar complejos multienzimáticos entre ellas [22]. Esto fue posteriormente demostrado experimentalmente y permitió concluir que algunos pares de glicosiltransferasas que catalizan reacciones secuenciales en la misma vía están organizadas formando oligómeros. Tal es el caso de las enzimas β 4GalNAcT-I/ β 3GalT-IV y de β 4GalT-VI/ST3Gal-V/ST8Sia-I [23, 24]. Este sistema mejora la eficiencia de las reacciones de glicosilación secuenciales y es un mecanismo de regulación de la síntesis de gangliósidos.

Hasta la fecha, ninguna glicosiltransferasa de gangliósidos ha sido cristalizada, mientras que sí existen algunos reportes de estructuras cristalinas de glicosiltransferasas que preferentemente tienen como sustratos a glicoproteínas y polisacáridos, como por ejemplo ST3Gal-I, ST6Gal-I y ST8Sia-III [25-27].

Como se mencionará más adelante, está bien documentado que defectos en el catabolismo de gangliósidos están implicados en una gran variedad de enfermedades metabólicas. Sin embargo, existen muy pocos reportes de enfermedades humanas asociadas a una alteración de la biosíntesis de gangliósidos. En este sentido, mutaciones en el gen que codifica ST3Gal-V han sido descritas en pacientes con una forma de epilepsia [28], y en pacientes con el síndrome de “sal y pimienta”, un severo desorden caracterizado por déficits neurológicos y cambios en la pigmentación cutánea [29]. Recientemente, un segundo tipo de trastorno que involucra mutaciones en la glicosiltransferasa β 4GalNAcT-I ha sido descrito [30, 31]. Las principales manifestaciones clínicas incluyen una pérdida parcial y progresiva de los movimientos de las extremidades inferiores y dificultad variable en el aprendizaje, con un progreso lento de la enfermedad.

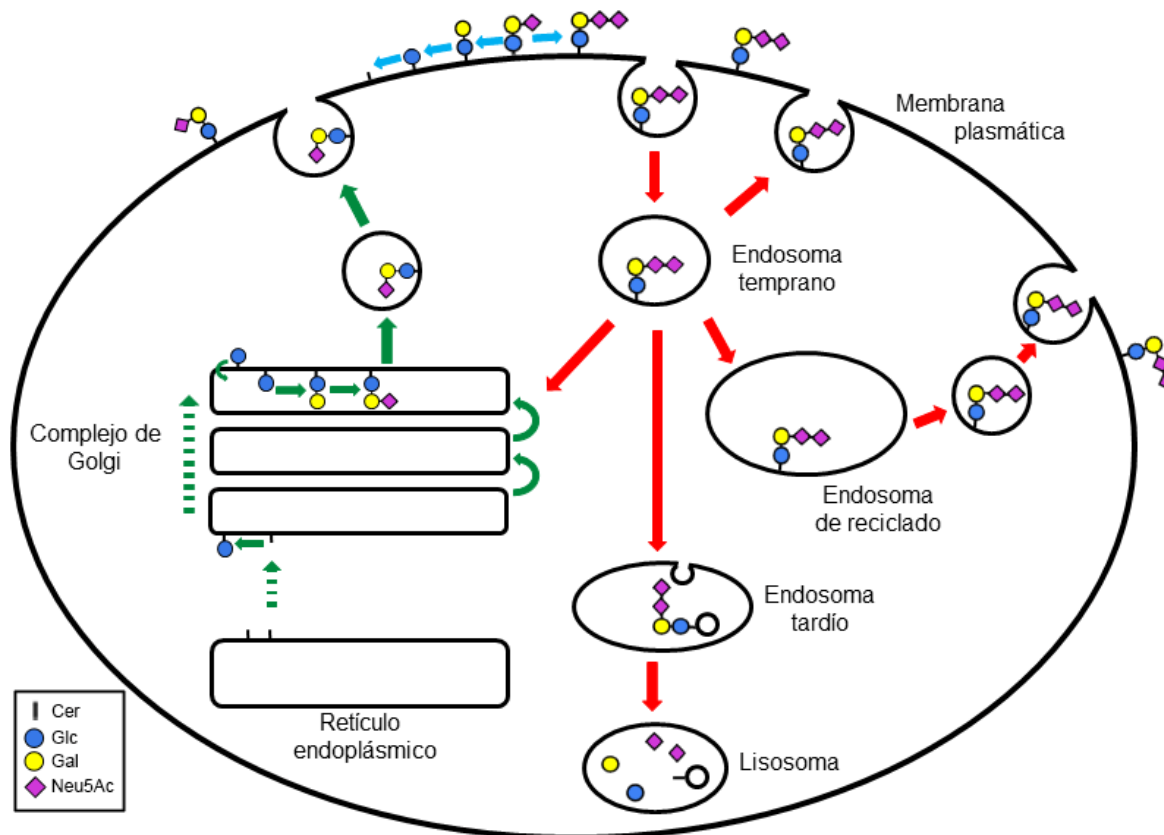


FIGURA 4. Metabolismo y transporte intracelular de gangliósidos. Las flechas verdes indican el transporte biosintético/exocítico. Las flechas rojas indican el transporte endocítico/de reciclado y catabólico. Las flechas azules indican el remodelado de GSLs mediado por glicohidrolasas y glicosiltransferasas asociadas a la membrana plasmática. Se esquematiza una situación hipotética, donde GM3 es sintetizado *de novo* en el complejo de Golgi y luego es transportado en vesículas hacia la membrana plasmática. En la superficie celular, GM3 puede ser catabolizado por distintas glicohidrolasas o puede ser usado para la síntesis de GD3. GD3 puede ser a su vez ser endocitado y reciclado a la membrana plasmática, puede también ser transportado al complejo de Golgi para ser reglicosilado, o ser transportado a los lisosomas para su degradación total o parcial. Las flechas entrecortadas indican transporte vesicular y/o transporte mediado por proteínas. Modificado de Daniotti e Iglesias-Bartolomé [6].

Degradación

En la MP, los gangliósidos pueden ser endocitados y ser transportados a distintas regiones celulares. Por un lado, pueden ser dirigidos al complejo de Golgi, donde pueden ser reglicosilados, o también pueden ser reciclados nuevamente a la MP vía endosomas tempranos (ET) o endosomas de reciclado (ER) [6]. Estas vías de reciclado se encuentran esquematizadas en la Figura 4 con flechas rojas.

La degradación de gangliósidos también ocurre luego de su endocitosis y tiene lugar principalmente en los lisosomas, más específicamente en la superficie de membranas intralisosomales [32] (Fig. 4). En los lisosomas se encuentran las glicohidrolasas ácidas que remueven secuencialmente cada uno de los azúcares desde el extremo no reductor de la cadena del oligosacárido. Todas las enzimas de este grupo son exo-glicohidrolasas, es decir, cortan únicamente la unión glicosídica de los azúcares terminales, por lo que deben actuar de forma secuencial. Los productos catabólicos resultantes pueden escapar de los lisosomas y ser usados como precursores de la síntesis de nuevas moléculas.

En contraste con las enzimas de biosíntesis de gangliósidos que son todas proteínas de membrana, la mayoría de las hidrolasas lisosomales son glicoproteínas solubles que se encuentran en el lumen de los lisosomas. Este es el caso de las enzimas β -glucosilceramidasa, β -galactocerebrosidasa, β -galactosidasa y las dos isoformas de β -hexosaminidasas, HexA y HexB (Fig. 5). La enzima β -glucosilceramidasa, codificada por el gen *GBA* en humanos, remueve el residuo de glucosa de GlcCer para generar Cer, razón por la cual también se la conoce como β -glucocerebrosidasa. Existen dos enzimas que remueven residuos de β -galactosa de GSLs, una es la β -galactocerebrosidasa, codificada por el gen *GALC* y la otra es la β -galactosidasa, codificada por el gen *GLB1*. La primera hidroliza los residuos de galactosa de LacCer y de otros GSLs que no pertenecen a la familia de gangliósidos como GalCer, mientras que la segunda remueve galactosas terminales presentes en glicoproteínas, glicosaminoglicanos y GSLs como GM1, GA1 y LacCer. Por su parte, las β -hexosaminidasas escinden residuos de GlcNAc o GalNAc de oligosacáridos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y glicolípidos. Estas enzimas son dímeros compuestos por subunidades α o β , codificadas por los genes *HEXA* y *HEXB*, respectivamente. Las dos isoformas principales de β -hexosaminidasas son HexA (dímero $\alpha\beta$) y HexB (dímero $\beta\beta$). Dado que la subunidad β sólo puede hidrolizar sustratos neutros y la subunidad α , sustratos cargados negativamente, el residuo GalNAc de GM2 sólo puede ser removido por la isoforma HexA, mientras que ambas isoformas pueden actuar sobre GA2.

Todas estas enzimas lisosomales poseen un péptido señal para su ingreso a la vía secretora y cada una deriva de un precursor que es clivado proteolíticamente para dar lugar a la proteína madura. Por el contrario, recientemente se demostró que Neu1, la sialidasa lisosomal que remueve residuos de ácido siálico, es una proteína transmembrana, cuya topología se describirá más adelante, ya que es relevante para esta tesis [33].

Al igual que en el complejo de Golgi, en los lisosomas también existen complejos multienzimáticos, siendo el caso más conocido el que forman β -galactosidasa con Neu1 y catepsina A, también llamada proteína protectora. La disociación de este complejo conlleva a la pérdida de la actividad enzimática de cada componente [32].

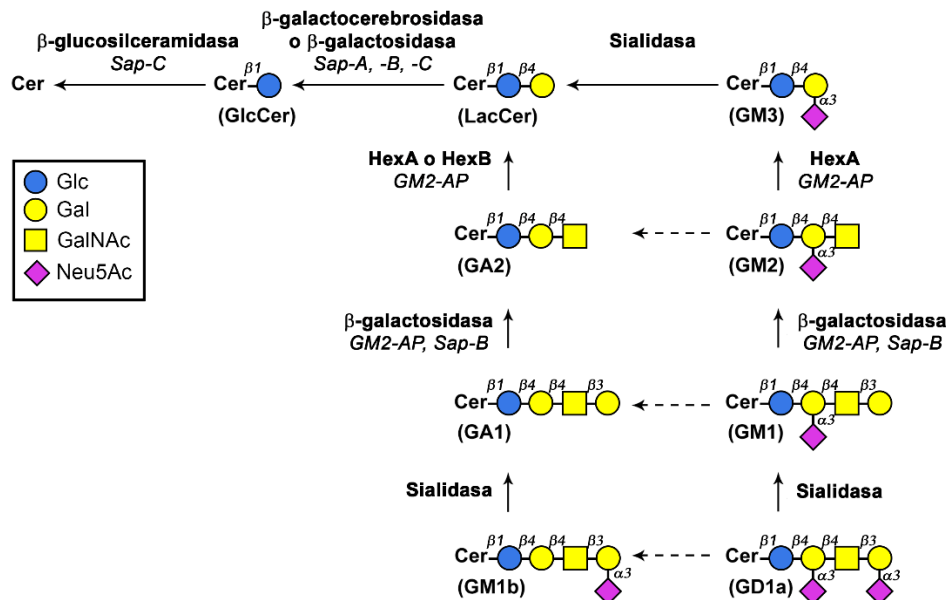


Figura 5. Reacciones representativas del catabolismo de gangliósidos a nivel lisosomal. Los monosacáridos son clivados secuencialmente desde el extremo no reductor por la acción de distintas enzimas glicohidrolasas con la ayuda de proteínas activadoras o de saposinas. Las flechas entrecortadas indican que las sialidasas no pueden remover el ácido siálico unido a la galactosa interna cuando hay un residuo de GalNAc. Sap-A, saposina A; Sap-B, saposina B; Sap-C, saposina C; HexA, β -hexosaminidasa A; HexB, β -hexosaminidasa B; GM2-AP, proteína activadora de GM2.

Para la degradación de glicolípidos con oligosacáridos cortos de menos de cuatro azúcares, las glicohidrolasas necesitan la asistencia de pequeñas proteínas activadoras (Fig. 5). En humanos, las mismas están codificadas por dos genes distintos: uno de ellos codifica para la proteína activadora de GM2 (GM2-AP) y el otro codifica para la prosaposina, la cual es procesada post-traduccionalmente para luego dar origen a cuatro proteínas maduras: las saposinas (Sap)-A, -B, -C y -D. Se han descrito dos mecanismos de acción posibles para las proteínas activadoras. El primero propone que dichas proteínas extraen los glicolípidos de las membranas, los solubilizan y se los presentan a las hidrolasas en el lumen del lisosoma; este sería el caso de GM2-AP y de Sap-B. El otro mecanismo involucra la unión de la proteína activadora a la membrana intralisosomal, produciendo una distorsión

en la bicapa que facilita el acceso al sustrato por parte de la glicohidrolasa; esto se ha propuesto para Sap-C [34]. Hasta la fecha, no se ha descrito ninguna proteína activadora necesaria para que Neu1 hidrolice sus sustratos, probablemente porque debido a su naturaleza transmembrana tiene fácil acceso a los mismos.

Además de glicohidrolasas ácidas y proteínas activadoras, la membrana intralisosomal debe tener la composición adecuada de lípidos para poder ser degradada. Esto implica un bajo contenido de colesterol y la presencia de lípidos con carga negativa como el bis(monoacilglicero)fosfato (BMP). Esta molécula es clave en la degradación de gangliósidos, ya que media la interacción electrostática entre las glicohidrolasas y las proteínas activadoras, con las membranas que contienen a los gangliósidos [32, 34].

Si hay una deficiencia en alguna de las glicohidrolasas lisosomales (o en las proteínas activadoras), el resto de las enzimas, aun cuando estén presentes, no podrán seguir degradando un determinado oligosacárido. Es por ello que defectos en los genes que codifican para estas proteínas dan lugar a enfermedades de acúmulo lisosomal, donde se acumula excesivamente el sustrato cuya enzima es deficiente. Estas enfermedades, resumidas en la Tabla II, por lo general son autosómicas recesivas y afectan diferentes sistemas y órganos, pero principalmente al sistema nervioso [35].

Tabla II. Enfermedades de acúmulo lisosomal causadas por defectos en la degradación de GSLs.

Proteína deficiente	Gen mutado	Enfermedad
β -glucosilceramidasa	<i>GBA</i>	Gaucher
β -galactocerebrosidasa	<i>GALC</i>	Krabbe
β -galactosidasa	<i>GLB1</i>	GM1-gangliosidosis
β -hexosaminidasas		
Subunidad α	<i>HEXA</i>	GM2-gangliosidosis (Tay-Sachs)
Subunidad β	<i>HEXB</i>	GM2-gangliosidosis (Sandhoff)
GM2-AP	<i>GM2A</i>	GM2-gangliosidosis (Variante AB)
Sialidasa Neu1	<i>NEU1</i>	Sialidosis
Catepsina A	<i>CTSA</i>	Galactosialidosis
Prosaposina	<i>PSAP</i>	Deficiencia combinada de saposinas (deficiencia en todas las saposinas); Krabbe atípico (deficiencia en Sap-A); Leucodistrofia metacromática (deficiencia en Sap-B); Gaucher atípico (deficiencia en Sap-C)

Remodelado a nivel de membrana plasmática

Actualmente, numerosas pruebas dan cuenta de la existencia y actividad en MP de enzimas involucradas en el metabolismo de gangliósidos (síntesis y/o degradación). La atención sobre este aspecto ha sido escasa en el pasado porque se consideraba que la principal localización de las glicosiltransferasas y de las glicohidrolasas era el complejo de Golgi y los lisosomas, respectivamente.

Diversos experimentos pioneros en los años 70-80 sugerían la presencia de glicosiltransferasas tanto de glicolípidos como de glicoproteínas asociadas a la MP, ya que observaban que ocurría glicosilación cuando células en cultivo eran incubadas con nucleótidos azúcares radiactivos, y los mismos no eran internalizados por las células [36-39]. Por otra parte, en experimentos de fraccionamiento subcelular se podía medir actividad glicosiltransferasa en la fracción correspondiente a MP [40, 41]. Sin embargo, la posible contaminación cruzada con membranas del complejo de Golgi, sumada a la imposibilidad de caracterizar a nivel molecular cuál o cuáles enzimas eran las responsables de la actividad observada, limitaron el progreso en esta temática. Más recientemente, se sugirió que ST3Gal-V estaría involucrada en la síntesis de GM3 a nivel de MP en el timo de ratones, pero nuevamente, esta evidencia fue obtenida mediante experimentos indirectos de fraccionamiento subcelular [42]. En el año 2010, nuestro laboratorio proporcionó la primera evidencia directa de que una glicosiltransferasa de gangliósidos, en particular la sialiltransferasa ST8Sia-I, está presente y es activa en la MP de células epiteliales y de melanoma [43, 44]. Mediante ensayos bioquímicos combinados con microscopía confocal y citometría de flujo, se demostró que ST8Sia-I es capaz de transferir un residuo de ácido siálico a GM3 presente en la superficie celular de la misma célula (actividad cis) o de una célula vecina (actividad trans) para sintetizar GD3 (Fig. 6). Analizando el peso molecular y el procesamiento de los *N*-glicanos presentes en ST8Sia-I de MP, se pudo concluir que, en principio, tendría la misma identidad que la sialiltransferasa presente en el complejo Golgi y que representaría un 5-10% del total. También se pudo detectar la presencia de la enzima β 4GalNAcT-I en la superficie celular, pero su actividad se puso de manifiesto sólo al incubar con sustratos exógenos.

Por otro lado, se ha descrito que el catabolismo de GSLs, y en particular de gangliósidos, no sólo ocurre a nivel lisosomal, sino que también puede ocurrir en otras localizaciones subcelulares, en especial en la MP. Las glicohidrolasas que han sido

asociadas a la superficie celular en su forma activa son β -glucosidasas, β -galactosidasas, β -hexosaminidasas y sialidasas (Fig. 6). Los estudios indican que algunas de estas enzimas asociadas a la MP tienen la misma identidad que su equivalente lisosomal, lo que sugiere que pueden producirse procesos de fusión entre los lisosomas y la superficie celular, mientras que otras enzimas son totalmente diferentes a las lisosomales, siendo codificadas por genes distintos. Al igual que con las glicosiltransferasas, las primeras evidencias de la presencia de glicohidrolasas en la MP se limitaban a la demostración de su actividad en la fracción subcelular enriquecida en MP de distintos tipos celulares.

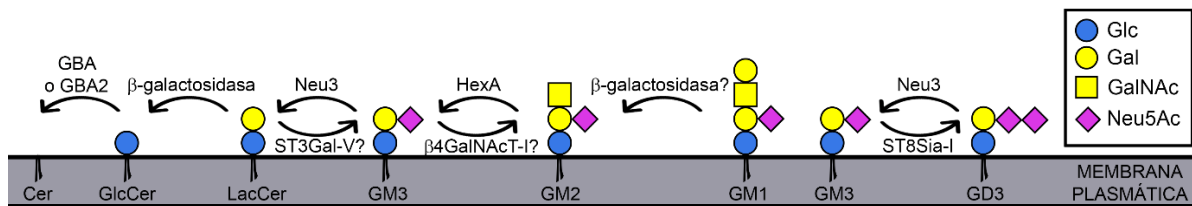


Figura 6. Representación esquemática del remodelado de glicolípidos en la superficie celular. Se indican las glicosiltransferasas y glicohidrolasas que han sido encontradas asociadas a la membrana plasmática y las reacciones que catalizan. Se ha sugerido la presencia de las enzimas con signo de pregunta, pero aún falta confirmarlo. Neu3 es una sialidasa que se describirá en la siguiente sección.

Además de la β -glucosilceramidasa lisosomal (GBA), una enzima distinta que también tiene actividad sobre GlcCer fue detectada en varios tejidos humanos y fue identificada como la β -glucosidasa no-lisosomal GBA2 [45, 46]. Experimentos de fraccionamiento subcelular revelaron que esta nueva glucosidasa no se encuentra en compartimientos lisosomales y que difiere en varios aspectos con la bien caracterizada GBA. En primer lugar, no es deficiente en la enfermedad de Gaucher, difiere en el pH óptimo al cual actúa, no es estimulada por Sap-C y es claramente diferente en su sensibilidad hacia inhibidores [47]. En la actualidad existe discrepancia con respecto a la localización subcelular exacta de GBA2, ya que ha sido reportado que está presente en la MP o muy cerca de ella [46] y que también se localiza en RE y en complejo de Golgi [48, 49]. Además, hay resultados contradictorios con respecto a la naturaleza de la asociación de GBA2 con las membranas [45, 46, 48]. Por otro lado, mediante experimentos de biotilación de superficie, se detectó que tanto GBA (o una isoforma con especificidad hacia sustratos y sensibilidad hacia inhibidores similar a GBA) como GBA2 están en parte asociadas a la MP de fibroblastos humanos [50]. En esa localización, y junto con β -galactosidasas, pueden

convertir LacCer a Cer, sin necesidad de detergentes ni proteínas activadoras, mostrando actividad trans.

Con respecto a las β -galactosidasas, se ha detectado su actividad en la MP de diferentes tipos celulares [51-53], pero la identidad de la proteína o proteínas responsables de la actividad observada todavía no se conoce. En fibroblastos humanos la β -galactosidasa presente en MP puede usar como sustrato a LacCer inmovilizada en soportes artificiales, sugiriendo que en la superficie celular está presente al menos una enzima de tipo β -galactocerebrosidasa y que la misma es capaz de tener actividad trans [50]. Por otra parte, la comúnmente llamada proteína de unión a elastina (EBP) ubicada en la superficie celular y responsable del ensamblaje de fibras elásticas, es idéntica a una variante inactiva de la β -galactosidasa GLB1.

Mediante experimentos de biotilación de superficie e inmunocitoquímica, se pudo demostrar la presencia de la β -hexosaminidasa HexA en MP de fibroblastos humanos [54]. Además, en experimentos *in vitro*, se observó que la enzima puede hidrolizar el sustrato natural GM2, en presencia de GM2-AP. HexA de superficie representa un 3-5% de la actividad hexosaminidasa total y tiene propiedades bioquímicas similares a su equivalente lisosomal. En este sentido, se observó que tanto HexA de MP como lisosomal actúan a un pH óptimo similar, y en las dos ocurre el mismo procesamiento proteolítico. Dado que hasta la fecha se sabe que el clivado proteolítico de los precursores de glicohidrolasas y el proceso final de maduración ocurre sólo en lisosomas, los autores sugieren que la enzima llega a MP luego de pasar por los lisosomas, por lo que podrían estar ocurriendo procesos de fusión entre dichos compartimientos. La pregunta que aún queda por responder es cómo la misma enzima puede ser a la vez una proteína lisosomal soluble y una proteína asociada a la superficie celular, ya que no posee segmentos transmembrana y no se ha descrito ninguna modificación post-traducciona que pueda anclarla a la membrana. Para tratar de responder en parte esa pregunta, en otro trabajo observaron que una porción de HexA lisosomal se comporta como una proteína periférica asociada a la membrana lisosomal, con características hidrofílicas, por lo que sugieren que el mismo comportamiento podría tener HexA de MP [55].

Con respecto a las sialidasas, se ha descrito la presencia de Neu1 lisosomal en MP, como así también la existencia de una isoforma particular, llamada Neu3, que será objeto de estudio en esta tesis, por lo que se desarrollará en detalle en la siguiente sección.

La presencia de enzimas involucradas en el metabolismo de glicolípidos asociadas a MP no descrito con anterioridad, abre un nuevo capítulo en el terreno de la glicobiología y pone en evidencia la existencia de mecanismos celulares alternativos y rápidos para el remodelado local de la composición de glicolípidos en respuesta a diferentes estímulos, contribuyendo de esta manera a modular procesos de señalización intracelular.

SIALIDASAS

Características generales

Las sialidasas (exo- α -sialidasas) son enzimas glicohidrolasas que catalizan la remoción de residuos de ácido siálico terminales unidos por enlace α a carbohidratos de glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero con un patrón poco común, ya que se encuentran en algunos virus, bacterias y protozoarios, en determinadas especies de aves y peces, y mayoritariamente en mamíferos. Por lo general, las sialidasas virales se denominan neuraminidasas, aunque es común que ambos términos se usen como sinónimos. Quizás la neuraminidasa más conocida sea la del virus influenza, la cual es necesaria para la liberación de los viriones recién formados de la célula huésped, evitando la agregación de los mismos, y es el blanco más común de los antivirales para combatir la gripe. Por otro lado, casi todas las bacterias que expresan sialidasas son patogénicas, por lo que estas enzimas en microorganismos son consideradas factores de virulencia.

En mamíferos, han sido identificadas cuatro sialidasas, denominadas Neu1, Neu2, Neu3 y Neu4. Cada isoforma está codificada por un gen distinto y tiene diferente localización subcelular y especificidad hacia sustratos. En la Tabla III se resumen algunas características de las sialidasas humanas.

Estas enzimas son ubicuas, se expresan en casi todos los tejidos humanos, aunque debido a sus bajos niveles de expresión, no es fácil detectar sialidasas endógenas. Neu1 por lo general es la que se expresa en mayor cantidad, mientras que los niveles de expresión de Neu2 son extremadamente bajos.

Tabla III. Características de las sialidasas humanas.

	Neu1	Neu2	Neu3	Neu4
Gen	<i>NEU1</i>	<i>NEU2</i>	<i>NEU3</i>	<i>NEU4</i>
Cromosoma	6p21.33	2q37.1	11q13.5	2q37.3
Exones	6	2	3	4
Localización subcelular	Lisosomas MP	Citosol	MP Endosomas	Mitocondrias (L) Endomembranas (S)
Aminoácidos totales	415	380	461	496 (L) 484 (S) *
Sustratos	Glicoproteínas Oligosacáridos Gangliósidos?	Glicoproteínas Oligosacáridos Gangliósidos	Gangliósidos Glicoproteínas?	Glicoproteínas Oligosacáridos Gangliósidos
Cristalizada	No	Sí	No	No
Asp boxes	5	3	3	3

* Existen dos isoformas de Neu4 (L, larga; S, corta), que difieren en 12 aminoácidos del extremo N-terminal.

Hay dos motivos altamente conservados en las sialidasas: el motivo YRIP (Y/F-R-I/V-P) y el motivo Asp-box (S-X-D-X-G-X-X-W/F; donde X representa cualquier aminoácido). El primero está localizado cerca del extremo N-terminal de las sialidasas, mientras que el motivo Asp-box se puede repetir hasta cinco veces a lo largo de la secuencia en todas las sialidasas con excepción de las virales, y pueden presentar algunas variaciones con respecto a la secuencia consenso. Los aminoácidos que participan en la formación del sitio activo, también están muy conservados en la familia de sialidasas y comprenden tres residuos de arginina que se unen al grupo carboxilato de todos los ácidos siálicos, un par tirosina/ácido glutámico que actúa como nucleófilo y un residuo de ácido aspártico que actúa como catalizador ácido-base (Fig. 7).

Entre las sialidasas humanas, el porcentaje de homología entre Neu1 y las demás es relativamente bajo (32-35%), mientras que Neu2, Neu3 y Neu4 tienen un 46-50% de homología entre ellas.



Figura 7. Alineamiento de secuencias de sialidasas humanas. Las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal Omega. El dominio YRIP y los Asp-boxes se encuentran marcados en recuadros rosa y celestes, respectivamente. En el recuadro amarillo se indica la secuencia correspondiente al péptido señal presente únicamente en Neu1. * residuo exactamente igual, : residuo diferente pero con propiedades similares, ° residuos involucrados en la formación del sitio activo basado en la estructura cristalina de Neu2.

Dado que los glicoconjugados que contienen uno o más residuos de ácido siálico están involucrados en eventos de interacción célula-célula, adhesión a la matriz extracelular y en eventos de señalización celular, la remoción de ácido siálico mediado por las sialidasas, modula variados procesos biológicos incluyendo la regulación de la diferenciación/proliferación celular, el control de la adhesión/migración celular y la modulación de receptores de superficie. Además, en los últimos años, evidencias experimentales señalaron la posible implicancia de sialidasas de mamíferos en la ocurrencia de varios tipos de tumores. En este sentido, se han observado cambios en los niveles de expresión de sialidasas en muestras de tumores primarios así como en líneas celulares tumorales. Tres de las sialidasas, Neu1, Neu2 y Neu4 muestran una tendencia a la regulación negativa, mientras que Neu3 muestra marcada sobreexpresión durante la carcinogénesis, promoviendo fenotipos malignos [56].

Neu1

Como se mencionó anteriormente, Neu1 es la sialidasa lisosomal y, para ser activa, forma un complejo multienzimático con al menos otras dos proteínas: β -galactosidasa y catepsina A. Neu1 actúa a pH ácido e hidroliza preferentemente sialoglicoproteínas y sialooligosacáridos. Es la única sialidasa que está ligada directamente a dos trastornos neurodegenerativos del metabolismo de glicoconjugados: sialidosis, causada por mutaciones en el gen *NEU1*, y galactosialidosis, una deficiencia combinada de Neu1 y β -galactosidasa que es secundaria a la ausencia de catepsina A funcional (ver Tabla II). Actualmente, no hay terapia eficaz para estos trastornos.

La secuencia primaria de aminoácidos de Neu1 comienza con un péptido señal convencional, que promueve su translocación al RE, y además contiene tres sitios de *N*-glicosilación que son importantes para el plegado y la estabilidad de la proteína. Aún no se sabe exactamente el mecanismo que la transporta a lisosomas, ya que se ha demostrado que dicho proceso es independiente del receptor de manosa 6-fosfato (M6PR), el modo canónico de transporte para enzimas lisosomales solubles. En este sentido, se han propuestos dos mecanismos alternativos. El primero propone que catepsina A, con su señal M6P tradicional, actúa como una chaperona para Neu1, y asiste en su transporte hacia lisosomas [57]. El segundo modelo se basa en la suposición que Neu1 no es una enzima soluble, y por el contrario, se comporta como una proteína integral de membrana que es

compartimentalizada en lisosomas a través de la interacción de un tetrapéptido C-terminal (⁴¹²YGTL) con proteínas adaptadoras de clatrina [58]. Éste es un mecanismo común mediante el cual proteínas transmembrana, como LAMP1, son transportadas a la membrana del lisosoma. Sin embargo, este modelo no fue muy aceptado porque Neu1 no posee segmentos hidrofóbicos característicos que puedan anclar la proteína a la bicapa lipídica, y no quedaba claro cómo podía exponer su extremo C-terminal a la hemicapa citosólica de las membranas para interactuar con las proteínas adaptadoras. Como se mencionó anteriormente, recientemente se demostró que Neu1 se comporta como una proteína transmembrana, cuya topología se describirá más adelante, ya que es relevante para esta tesis [33]. Por otra parte, se ha demostrado que bajo ciertas condiciones, Neu1 está presente en la MP, aunque los mecanismos moleculares por lo cual esto ocurre aún no se conocen. Neu1 no forma el típico complejo lisosomal en la MP, dado que se asocia a EBP (forma inactiva de β -galactosidasa), pero catepsina A no está presente [33, 59].

Además de su rol catabólico en lisosomas, Neu1 participa en varios fenómenos celulares como el ensamblado de fibras elásticas, la regulación de la exocitosis lisosomal, la modulación de respuestas inmunes, y principalmente en la modulación de receptores que propagan señales mitogénicas como PDGFR, EGFR, el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R, *Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*) y el receptor tipo Toll 4 (TLR4, *Toll-like Receptor 4*) [60-63]. En este sentido, se ha propuesto que la remoción de ácido siálico de receptores de superficie mediada por Neu1, controla la activación/inhibición de cascadas de transducción de señales, y tiene gran influencia en la proliferación celular. Además, se ha descrito que fibroblastos derivados de pacientes con sialidosis tienen mayores tasas de proliferación que los fibroblastos normales, y responden más a la adición de factores de crecimiento [61]. Estos resultados, sumados a que en distintos tumores la expresión de Neu1 está disminuida [64], permitieron establecer que Neu1 es un modulador negativo de la proliferación celular.

Neu2

Neu2 es una enzima soluble, citosólica capaz de hidrolizar glicoproteínas, oligosacáridos y gangliósidos a pH neutro *in vitro*. Su rol *in vivo* aún no se conoce con certeza, ya que por lo general, la ocurrencia de sialoglicoconjugados en el citosol es inusual.

Hasta la fecha, es la única sialidasa de mamíferos que ha sido cristalizada [65] y su estructura muestra el típico plegamiento llamado β -propeller o superbarril- β , que ya había sido descrito para las sialidasas virales y bacterianas, indicando que a pesar de existir poca homología de secuencia entre especies, las mismas tienen alta homología estructural. La estructura de β -propeller de la familia de sialidasas tiene seis caras, cada una de las cuales está formada por cuatro hojas- β antiparalelas unidas por segmentos conectores (Fig. 8). En esta distribución, los extremos N- y C- terminal de la proteína quedan cercanos uno de otro. A modo de comparación, algunas sialidasas bacterianas pueden tener dominios lectina u otros dominios adicionales que se originan en los segmentos conectores del β -propeller [66].

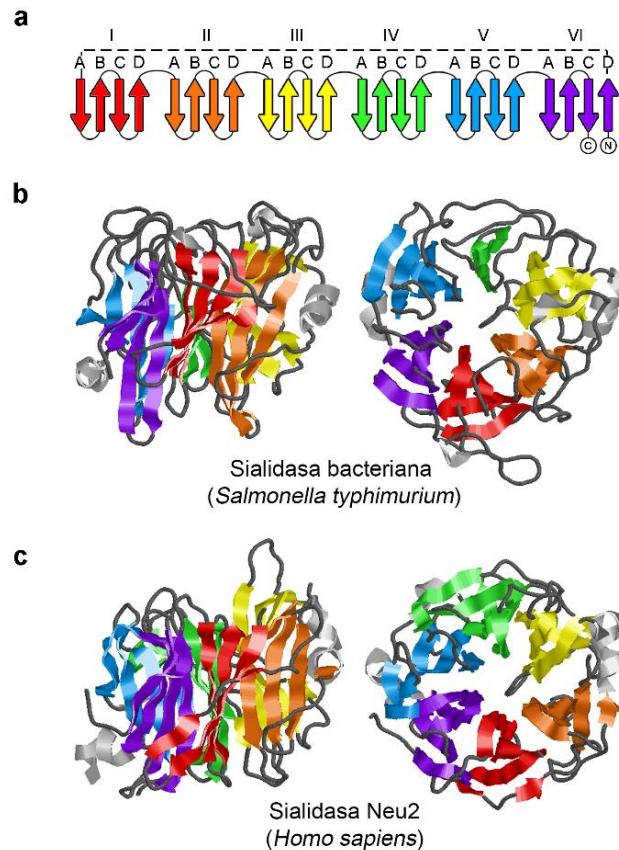


Figura 8. Estructura de β -propeller característica de la familia de sialidasas. (a) El plegamiento consiste en seis caras (I-VI), cada una de las cuales está formada por cuatro hojas- β antiparalelas (A-D). Se indican los extremos N- y C- terminal de la proteína. **(b)** Estructura cristalina de una sialidasa bacteriana (PDB 1dim). **(c)** Estructura cristalina de Neu2 humana (PDB 1snt). Las hojas- β de cada cara del β -propeller se colorearon con un color diferente con el programa RasMol. Las α -hélices se muestran en gris claro y los segmentos conectores en gris oscuro.

Neu3

Neu3 es una sialidasa con actividad preferencial sobre gangliósidos, que modifica la composición de estos glicolípidos presentes en la MP al convertir especies polisialiladas en monosialoderivados y al convertir al monosialo gangliósido GM3 en LacCer, siendo ineficiente para remover aquellos residuos de ácido siálico unidos a la galactosa interna de GM1 y GM2 [67, 68]. Además, Neu3 puede hidrolizar gangliósidos presentes en células vecinas, poniendo en evidencia su actividad trans [69]. La principal localización subcelular de esta sialidasa es la MP, pero también está presente en endomembranas, como se demostrará más adelante en esta tesis. También hay un solo reporte en el que detectan a Neu3 en la membrana nuclear [70].

Esta enzima se expresa en distintos niveles en casi todos los tejidos humanos, principalmente en músculo esquelético, testículos, timo, corazón, cerebro, hígado y próstata [71, 72]. Particularmente, Neu3 se encuentra sobreexpresada en varios tipos de neoplasias, incluyendo cáncer de colon, de riñón, de ovario, de próstata, de cabeza y cuello, y melanoma [73-78]. Su desregulación en cáncer se asocia con la supresión de apoptosis y el aumento en la proliferación, invasión y migración de las células tumorales, contribuyendo de esta manera al desarrollo de fenotipos malignos. En este sentido, recientemente se describió que en el suero de pacientes con cáncer de próstata, la actividad sialidasa se encuentra incrementada con respecto a la de individuos sanos, y que dicha actividad se asocia a la presencia de Neu3 en suero [79]. También se detectó Neu3 en plasma de ratones y humanos sanos [80].

Los ratones deficientes en Neu3 son menos susceptibles a desarrollar tumores de colon [81], mientras que ratones transgénicos que sobreexpresan Neu3 muestran la formación de focos de cripta aberrantes en la mucosa del intestino [82].

Debido a su localización y a su actividad específica sobre gangliósidos, Neu3 participa en la regulación de numerosos procesos tales como adhesión, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis. Por ejemplo, la conversión de GD1a y GT1b a GM1 mediada por Neu3 es necesaria para la regeneración axonal en el sistema nervioso periférico [83]. Por otro lado, dado que los gangliósidos actúan como receptores de virus, se ha demostrado que la disminución del contenido de GD1a luego de la sobreexpresión de Neu3, reduce la entrada del virus Newcastle y su propagación en células COS-7,

indicando que la alteración del patrón de gangliósidos en la superficie celular causada por Neu3, interfiere en las interacciones virus-célula huésped [84].

Uno de los mecanismos moleculares más aceptados que explica la relación entre Neu3 y la modulación de determinados procesos biológicos es que la sialidasa estimula la activación de receptores de factores de crecimiento, principalmente de EGFR, con la consiguiente activación de la señalización intracelular mediada por ERK y AKT [85, 86]. Como se mencionó anteriormente, la activación de EGFR es inhibida por el gangliósido GM3 mediante interacciones carbohidrato-carbohidrato entre el glicolípido y los *N*-glicanos presentes en el dominio extracelular de EGFR. El análisis del contenido de glicolípidos en células que sobreexpresan Neu3, indican una disminución significativa del contenido de GM3, sugiriendo que la modulación de gangliósidos por parte de Neu3 puede remover el efecto inhibitorio ejercido por GM3 sobre EGFR, promoviendo como resultado final, la proliferación celular. Además, Neu3 co-inmunoprecipita con EGFR [87] y en el año 2015 se propuso que Neu3 puede activarlo a través de la desialilación directa del receptor [88], sugiriendo que las glicoproteínas también pueden estar entre los sustratos de Neu3 y ampliando mucho más las implicancias biológicas de la enzima. La estimulación del EGFR mediada por Neu3, no deseada en tumores, puede tener efectos benéficos, como por ejemplo en situaciones de hipoxia. En estas condiciones, Neu3 se activa en células de músculo esquelético y en aurículas de corazón de pacientes con cardiopatías congénitas [89, 90], estimulando la señalización intracelular mediada por EGFR, que a su vez activa el factor inducible por hipoxia, dando como resultado un aumento en la supervivencia y protegiendo a las células de la apoptosis. Por otro lado, además de regular receptores de factores de crecimiento, esta sialidasa podría contribuir al mantenimiento de un estado indiferenciado y tumorigénico de células cancerosas, al regular la señalización mediada por la proteína Wnt [91].

Los efectos de la actividad de Neu3 en procesos celulares, no se limitan sólo a su capacidad de modular el contenido de ácido siálico, sino que también pueden ser el resultado de una interacción directa de la enzima con moléculas de señalización tales como integrina $\beta 4$ [92], Rac-1 [93], caveolina-1 [94], Src [85] y Grb-2 [95]. Por lo tanto, Neu3 regula diferentes procesos biológicos de dos maneras: indirectamente a través de su actividad catabólica sobre gangliósidos, o directamente a través de la interacción (y posible desialilación) con proteínas de señalización.

Neu4

Neu4 fue la última sialidasa de mamíferos en ser identificada. Es una enzima asociada a membranas, que en humanos está presente en dos isoformas, Neu4L (larga) y Neu4S (corta), generadas por corte y empalme (*splicing*) alternativo de un mismo transcrito, y que difieren en 12 aminoácidos del extremo N-terminal. Las dos isoformas tienen actividad sobre glicoproteínas, oligosacáridos y gangliósidos, y particularmente actúan sobre mucinas, por lo que se propone que podrían tener un rol en la modulación de O-glicanos [96].

Se ha reportado que los 12 aminoácidos extra en Neu4L actúan como señal de localización mitocondrial, por lo que la isoforma larga se encuentra en mitocondrias, y específicamente en la membrana externa de dichas organelas [96, 97]. Neu4L tendría un rol en procesos apoptóticos regulando los niveles de GD3, el cual es un gangliósido que ante estímulos apoptóticos es translocado desde MP a mitocondrias [98]. Por otra parte, Neu4S se localiza en membranas intracelulares que parcialmente co-localizan con marcadores de RE.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis se enmarca dentro de la línea de investigación del laboratorio que tiene como objetivo indagar sobre los mecanismos celulares que intervienen en el metabolismo y transporte intracelular de gangliósidos. Durante muchos años, en el laboratorio se estudiaron y caracterizaron varias enzimas que participan en la biosíntesis de gangliósidos, poniendo especial interés en las sialiltransferasas, es decir en las enzimas que transfieren moléculas de ácido siálico desde un nucleótido azúcar donador a un sustrato aceptor. Sin embargo nunca se había investigado el proceso contrario, es decir la remoción de ácido siálico de gangliósidos llevada a cabo por enzimas sialidasas. Dado que de todas las sialidasas humanas, Neu3 tiene actividad preferencial sobre gangliósidos y se localiza en MP al igual que sus sustratos, el objetivo general de este trabajo fue caracterizar algunos aspectos moleculares, celulares y funcionales de Neu3.

Como objetivos específicos se propuso:

- 1) Analizar la expresión, localización subcelular y modificaciones post-traduccionales de Neu3 humana, utilizando como modelo células CHO-K1 que expresan de manera ectópica la sialidasa.
- 2) Analizar la topología y el mecanismo de asociación de Neu3 a membranas celulares.
- 3) Analizar las consecuencias de cambios en la expresión de Neu3 sobre procesos endocíticos.

Para facilitar su lectura, este trabajo de tesis está separado en dos capítulos: el Capítulo I abarca los dos primeros objetivos específicos, mientras que el Capítulo II se focaliza en desarrollar el tercer objetivo.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Si bien Neu3 es una proteína ampliamente estudiada por sus implicancias en la modulación de vías de transducción de señales y su rol en tumorigénesis, en la actualidad no existe información acerca de algo tan básico como es el mecanismo de asociación de Neu3 con membranas biológicas. Es por ello que en esta tesis se decidió abordar ese aspecto, y resulta necesario hacer una breve introducción de cómo se pueden asociar las proteínas a la bicapa lipídica.

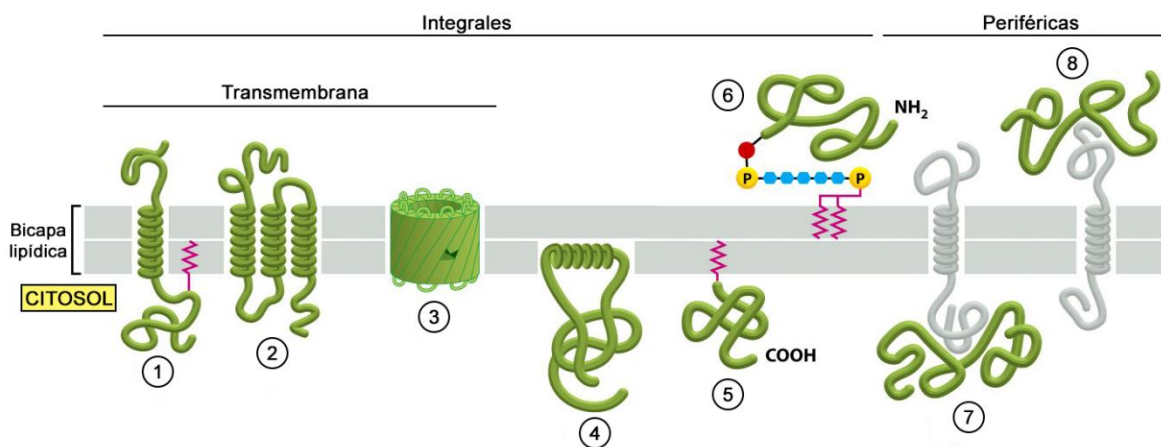


Figura 9. Formas en que las proteínas de membrana se asocian a la bicapa lipídica. Las proteínas de membrana se dividen principalmente en dos clases: integrales y periféricas. Dentro del primer grupo se encuentran las proteínas que atraviesan la membrana con una sola α -hélice (1), con múltiples α -hélices (2), como un barril de hojas- β (3), aquellas que solo atraviesan una hemicapa de la membrana (4) y aquellas que están ancladas a la membrana gracias a la unión covalente de ácidos grasos o grupos prenilo en la hemicapa citosólica (5) o de glicosilfosfatidilinositol en la hemicapa no citosólica (6). Por el contrario, otras proteínas se asocian a las membranas debido a interacciones no covalentes con otras proteínas o con la misma bicapa lipídica (7 y 8). Modificado de Molecular Biology of the Cell (6ta edición) [99].

Diferentes proteínas de membrana se asocian con la bicapa lipídica de diversas maneras, tal como se ilustra en la Figura 9. Muchas son proteínas integrales, es decir que están embebidas en la membrana. Dentro de éstas se pueden encontrar proteínas transmembrana, con regiones hidrofóbicas que atraviesan la totalidad de la bicapa lipídica, y regiones hidrofílicas expuestas al ambiente acuoso a cada lado de la membrana. La hidrofobicidad de algunas de estas proteínas transmembrana se puede incrementar por la unión covalente de una cadena de ácido graso que se inserta en la hemicapa citosólica de

la bicapa lipídica. En la mayoría de las proteínas transmembrana, la cadena polipeptídica cruza la bicapa lipídica en una conformación α -helicoidal. Una forma alternativa es que las múltiples hebras transmembrana de la cadena polipeptídica se dispongan como hojas- β en forma de un cilindro cerrado, denominado barril- β . Aunque los barriles- β pueden tener muchas funciones, como transportadores, receptores e incluso pueden ser enzimas, están restringidos a membranas externas de bacterias Gram negativas, mitocondriales y de cloroplastos. La gran mayoría de las proteínas transmembrana en células eucariotas contienen segmentos de aminoácidos que atraviesan la bicapa lipídica en una conformación de α -hélice.

Otras proteínas integrales no son transmembrana y están asociadas con la hemicapa citosólica de la bicapa lipídica ya sea por una α -hélice anfipática expuesta en la superficie de la proteína o por uno o más lípidos unidos covalentemente, que pueden ser cadenas de ácidos grasos o grupos prenilo. Sin embargo, otras proteínas integrales están totalmente expuestas al espacio extracitosólico (espacio extracelular o lumen de organelas), unidas a la bicapa lipídica por un enlace covalente al glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Por último, las proteínas periféricas no están embebidas en la membrana y se unen a cualquiera de las caras de la membrana mediante interacciones no covalentes (como puentes hidrógeno e interacciones electrostáticas) con otras proteínas de membrana (interacciones proteína-proteína) o con la misma bicapa lipídica (interacciones proteína-lípidos). Pueden liberarse de la membrana mediante procedimientos de extracción relativamente suaves, tales como exposición a soluciones de fuerza iónica muy alta o pH extremo, que interfieren con las interacciones proteína-proteína o proteína-lípidos pero que dejan la bicapa lipídica intacta.

En algunos trabajos se consideran proteínas integrales únicamente a las transmembrana, y el resto se considera que son proteínas periféricas ancladas a lípidos. Sin embargo, a lo largo de esta tesis se utilizarán los términos como se describieron en esta sección.

A pesar de que está completamente aceptado de que Neu3 es una proteína asociada a membranas, aún no se conoce con certeza de qué manera lo hace, y su topología es un misterio. En el año 1999 se propuso que Neu3 era una proteína transmembrana tipo I, con su extremo C-terminal orientado hacia el citosol, y con un único segmento transmembrana en el medio del polipéptido [67]. Cuando se cristalizó la sialidasa

Neu2 y se comprobó que poseía la misma estructura que las sialidasas virales y bacterianas se supuso que las otras sialidasas de mamíferos debían poseer un plegamiento similar [65], por lo que el modelo de proteína tipo I para Neu3 se descartó rápidamente ya que no permitiría la formación del β -propeller, y algunos aminoácidos del sitio activo quedarían en lados opuestos de la membrana. En la búsqueda de modelos alternativos, en el año 2007 se sugirió que Neu3 es una proteína periférica asociada con la hemicapa externa de la MP [100]. Por lo tanto, con tan pocos y contradictorios antecedentes, se decidió estudiar en profundidad este aspecto desconocido de Neu3.

RESULTADOS

Expresión de la sialidasa Neu3 humana en células epiteliales CHO-K1

Con el objetivo de caracterizar a nivel molecular y celular a la enzima Neu3, en primer lugar se trató de detectar con anticuerpos a la proteína endógena en una amplia variedad de líneas celulares. Luego de varios intentos fallidos debido a los bajos niveles de expresión de la sialidasa, se decidió transfectar y expresar la proteína de manera transiente en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) con un plásmido que contiene la secuencia de Neu3 humana fusionada en su extremo C-terminal a un epítoto c-Myc. La sialidasa utilizada en este trabajo es una proteína de 461 aminoácidos y además contiene el epítoto c-Myc de 10 aminoácidos. Esta construcción, se denominará a lo largo de esta tesis Neu3-Myc.

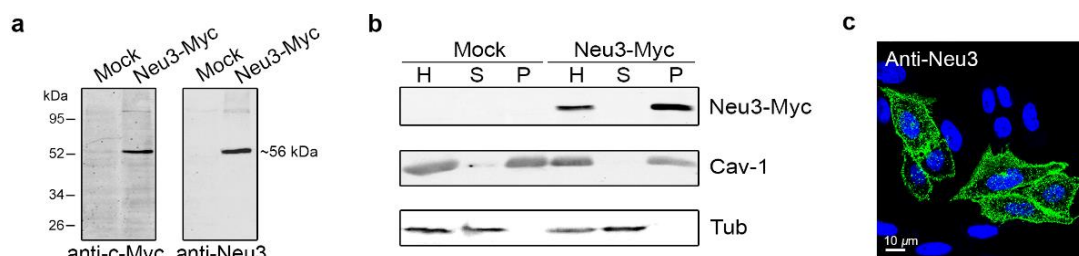


Figura 10. Expresión de Neu3 humana en células CHO-K1. (a) Western blot de homogenato total de células CHO-K1 transfectadas con el vector de expresión vacío (Mock) o con el constructo para la expresión de Neu3-Myc. El blot se reveló con anticuerpos anti-c-Myc o anti-Neu3. Los pesos moleculares (kDa) de las proteínas usadas como estándares se muestran a la izquierda. (b) Los homogenatos (H) obtenidos en el punto anterior se ultracentrifugaron a 400.000 g, y la distribución de Neu3 en el sobrenadante (S) y en el precipitado (P) se analizó mediante Western blot. Caveolina-1 (Cav-1) y α -tubulina (Tub) se utilizaron como controles endógenos del fraccionamiento. (c) Imagen obtenida mediante microscopía confocal de células transfectadas con el vector para la expresión de Neu3-Myc, fijadas, permeabilizadas y procesadas para la inmunodetección de Neu3. El núcleo de las células se tiñó con el colorante Hoechst y se muestra en azul.

La expresión de Neu3-Myc en homogenatos totales de células CHO-K1 se confirmó mediante experimentos de Western blot, utilizando tanto un anticuerpo que reconoce el epítoto c-Myc, como un anticuerpo monoclonal (anti-Neu3) que reconoce un epítoto interno de la proteína, al que denominaremos epítoto N. En ambos casos, se pudo detectar la expresión de Neu3 con un peso molecular de ~56 kDa (Fig. 10a), mientras que no se

observó ninguna banda en homogenatos de células transfectadas con el vector vacío. Estos resultados demuestran que la marca de ambos anticuerpos es específica para Neu3-Myc, e indican además, que anti-Neu3 no reconoce ninguna sialidasa endógena de las células CHO-K1. Debido a la similitud en las marcas obtenidas con los dos anticuerpos, en la mayoría de los experimentos que siguen a continuación se utilizó principalmente anti-Neu3, salvo en determinadas ocasiones en que el uso del anticuerpo anti-c-Myc se mencionará explícitamente.

Posteriormente, la ultracentrifugación de los homogenatos, llevada a cabo para separar las proteínas solubles de aquellas asociadas a membranas celulares, permitió recuperar a Neu3 completamente en el precipitado, demostrando claramente su fuerte interacción con membranas (Fig. 10b). Los marcadores endógenos caveolina-1 (Cav-1) y α -tubulina (Tub) fueron corridos simultáneamente y utilizados como controles de una proteína asociada a membranas y de una soluble, respectivamente.

Mediante microscopía confocal, se analizó la distribución subcelular de Neu3 en células CHO-K1. Acorde con lo reportado en la bibliografía, se observó que Neu3 está presente principalmente en la MP, pero también se detectó marca intracelular, indicando que existe una fracción de la sialidasa en endomembranas (Fig. 10c). Para realizar un estudio más detallado de la distribución intracelular de Neu3, se llevaron a cabo experimentos de co-transfección, utilizando marcadores establecidos de distintas organelas (Fig. 11). Los resultados obtenidos mostraron que Neu3 no co-localiza con β 4GalNAcT-I ni con lip33, marcadores de complejo de Golgi y de RE, respectivamente. Por el contrario, se observó cierto grado de co-localización con marcadores de endosomas tempranos (Rab5) y de endosomas de reciclado (Rab11a), y en menor medida con LAMP1, proteína residente de lisosomas. Estos resultados indican que, en principio, existen dos poblaciones de Neu3 humana, una en MP y otra en membranas de compartimentos endosomales, como ya había sido reportado para Neu3 de ratón [100].

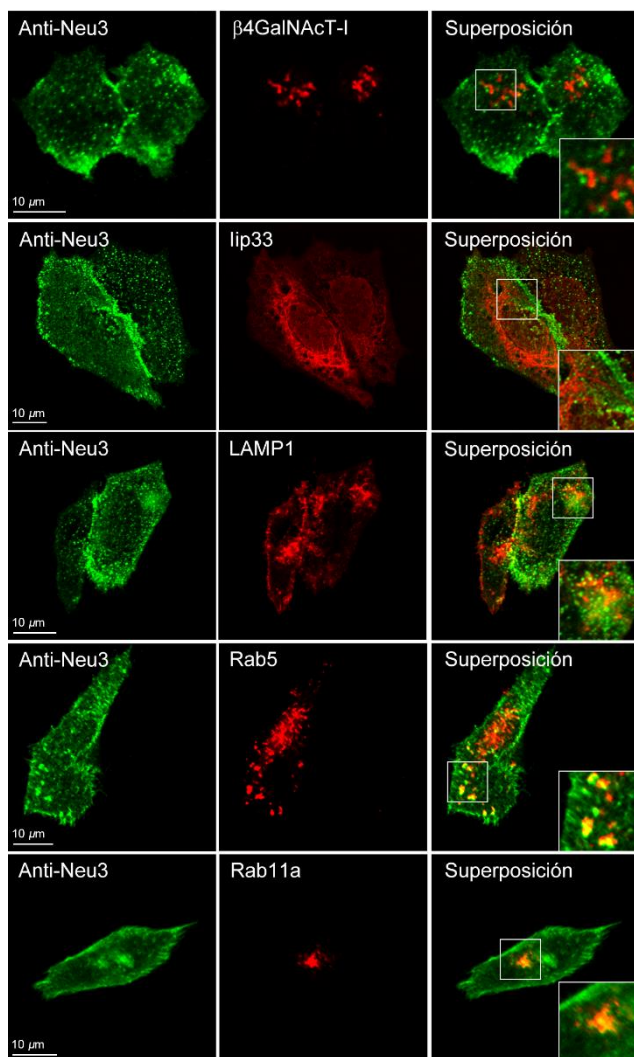


Figura 11. Distribución subcelular de Neu3. Células CHO-K1 co-transfectadas con el vector para la expresión de Neu3-Myc y con diferentes marcadores de organelas se fijaron, permeabilizaron y se sometieron a experimentos de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Neu3. La detección de las proteínas utilizadas como marcadores se realizó observando la fluorescencia intrínseca de GFP o de sus variantes espectrales fusionadas al marcador (β 4GalNAcT-I-YFP, lip33-YFP, LAMP1-GFP, Rab5-GFP y Rab11a-GFP). Las células transfectadas se analizaron mediante microscopía confocal. Se muestran cortes confocales representativos de 0,8 μ m. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación.

A continuación se evaluó si la sialidasa expresada era activa. Para ello se utilizó un sustrato exógeno, el ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico (4MU-Neu5Ac), y se determinó la fluorescencia de la 4-metilumbeliferona (4MU) hidrolizada cuando el mismo se incubó con homogenatos celulares. Los resultados mostraron un aumento significativo de la actividad sialidasa total en las células transfectadas con el constructo para la expresión de Neu3-Myc, con respecto a las transfectadas con el vector vacío (Fig. 12a). 4MU-Neu5Ac permite medir actividad sialidasa total, ya que es sustrato de las cuatro sialidasas humanas, por lo que estas determinaciones no son una medida directa de la actividad de Neu3. Para tener una medida más directa, y dado que Neu3 actúa principalmente removiendo ácido siálico de gangliósidos, se analizó si la expresión de la hidrolasa resulta en un cambio en los niveles de expresión de GD3, GD1a y GM1 a nivel celular. La células CHO-K1 salvajes

expresan únicamente el gangliósido GM3, pero se dispone en el laboratorio de una línea celular derivada de CHO-K1 que expresa de manera estable la sialiltransferasa ST8Sia-I, y por lo tanto estas células pueden sintetizar GD3 y en menor medida GT3 (CHO-K1^{GD3+}) [101]. Por otro lado, otra línea celular también derivada de CHO-K1 expresa principalmente los gangliósidos GM1 y GD1a (CHO-K1^{GM1/GD1a+}) como resultado de la expresión estable de las enzimas β 4GalNAcT-I y β 3GalT-IV (ver Fig. 2) [102].

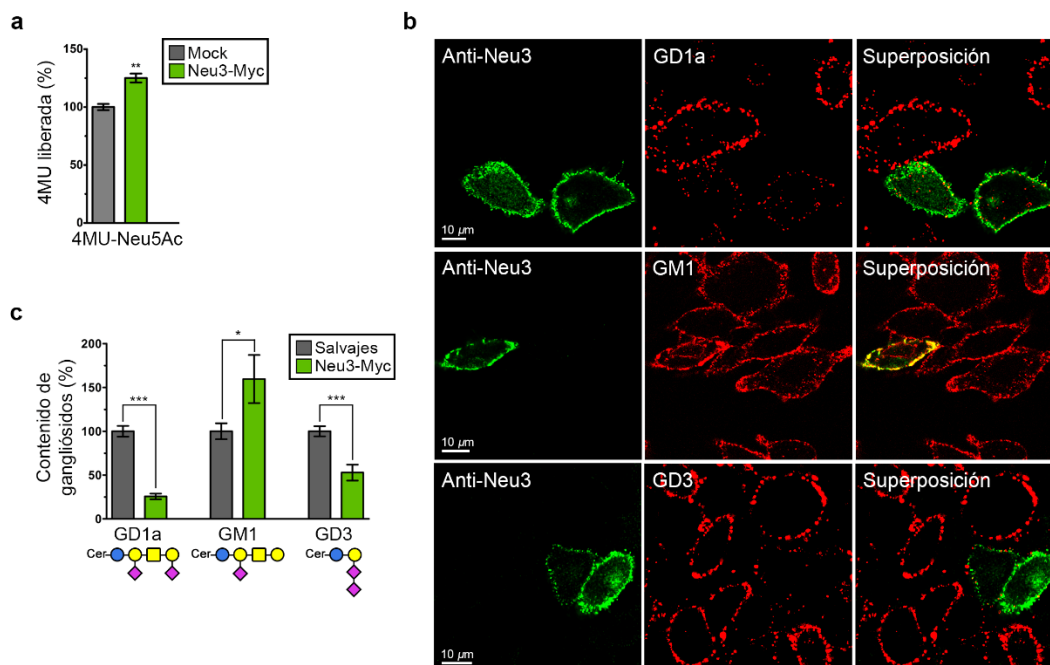


Figura 12. Actividad de Neu3. (a) Actividad sialidasa total en homogenato de células CHO-K1 transfectadas con el vector de expresión vacío (Mock) o con el vector para la expresión de Neu3-Myc, usando el sustrato artificial 4MU-Neu5Ac. (b) Células CHO-K1^{GM1/GD1a+} (primera y segunda fila) y CHO-K1^{GD3+} (tercera fila) se transfectaron para la expresión de Neu3-Myc y se incubaron con anticuerpo anti-GD1a, con CTx β (que une GM1) o con anticuerpo anti-GD3 durante 1h a 4°C para marcar los gangliósidos asociados a la MP. Luego, las células se fijaron, permeabilizaron y se procesaron para la inmunodetección de Neu3. Finalmente, se visualizaron mediante microscopía confocal. (c) Cuantificación del contenido de gangliósidos de acuerdo a la intensidad de fluorescencia obtenida en (b). Los valores están relativizados al porcentaje de cada gangliósido en células no transfectadas (salvajes). *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

La inmunodetección de GD3 y GD1a se realizó con anticuerpos monoclonales anti-GD3 y anti-GD1a, respectivamente, mientras que los niveles de GM1 se analizaron mediante la unión de dicho gangliósido a la subunidad β de la toxina colérica (CTx β) fusionada a un fluorescente (Fig. 12b). Mediante experimentos de doble

inmunofluorescencia, se observó una clara disminución de los niveles relativos de GD3 y GD1a en células que expresan Neu3-Myc comparadas con las no transfectadas, indicando que la enzima en estudio puede modificar los niveles de gangliósidos presentes en la MP. Paralelamente, los niveles de GM1, cuyo ácido siálico interno no es accesible a la enzima, se vieron incrementados (Fig. 12c) debido a la transformación de GD1a a GM1 (ver Fig. 2).

En conjunto, los resultados obtenidos hasta el momento, indican que Neu3 humana se expresa correctamente en células CHO-K1, tiene la distribución subcelular esperada y es activa tanto *in vitro* como *in vivo*.

Caracterización de la asociación de Neu3 a membranas

Como se mencionó anteriormente, en el año 2007 se propuso que Neu3 es una proteína periférica asociada con la hemicapa externa de la MP [100]. Dado que las proteínas periféricas se encuentran unidas a la bicapa lipídica mediante uniones no covalentes como puentes hidrógeno o interacciones electrostáticas, es relativamente fácil separarlas de la membrana mediante solubilización, al tratarlas con soluciones de alto pH o de alta concentración de sales. Las proteínas periféricas así extraídas, pueden luego ser separadas de las proteínas integrales de membrana mediante ultracentrifugación. Para determinar si este es el caso de Neu3, se realizó una extracción con carbonato de sodio a pH 11.5. La exposición de las membranas a condiciones alcalinas resultó en la completa solubilización de K-Ras, una proteína cuya unión a membranas está mediada principalmente por interacciones electrostáticas entre una región polibásica de aminoácidos presente en la región C-terminal, y los lípidos cargados negativamente [103]. Por el contrario, Neu3-Myc no se solubilizó bajo las mismas condiciones, y de hecho permaneció completamente en el precipitado luego del proceso de ultracentrifugación (Fig. 13a). Se observó el mismo comportamiento para Neu3 conteniendo un epítipo HA en el extremo C-terminal, excluyendo la posibilidad de que la adición de un epítipo particular pudiese modificar la asociación a membranas de la sialidasa. Como era de esperar, la proteína integral de membrana Cav-1 no se solubilizó luego del tratamiento, y la incubación de membranas con buffer control no tuvo efecto en la asociación de las proteínas analizadas con las membranas (Fig. 13a). No se encontró ninguna condición que permitiera la extracción de Neu3 de membranas, ni siquiera la exposición a altas concentraciones de sal (hasta 1,5 M de NaCl) (resultados no mostrados). Al contrario de lo que se había propuesto,

estos resultados sugieren que Neu3 tiene las características de una proteína integral de membrana.

Con el propósito de determinar la orientación del extremo C-terminal de la sialidasa, se realizaron ensayos de protección a proteasas en células intactas utilizando proteinasa K (PK), una proteasa que en la secuencia de Neu3 tiene más de 200 sitios de clivaje. Células intactas crecidas en placas se incubaron con PK durante 30 min a 37°C. Luego las células se lavaron, se cosecharon y los productos resistentes a PK se analizaron por Western blot. En estas condiciones, el receptor de transferrina (TfR), una proteína transmembrana cuyo dominio de mayor tamaño está expuesto al espacio extracelular fue completamente degradado por PK, mientras que la sialiltransferasa residente de complejo de Golgi ST3Gal-II y Cav-1 no fueron accesibles a la proteasa (Fig. 13b). En este punto cabe mencionar que Cav-1 es una proteína presente en la MP, que no atraviesa completamente la bicapa lipídica y por el contrario se inserta sólo en la hemicapa interna de la misma, por lo tanto ninguna región de esta proteína queda expuesta al espacio extracelular [104], como en el ejemplo número 4 de la Figura 9. Por otro lado, dado que TfR además de su localización en MP, también está presente en compartimientos endosomales, podría haberse esperado que un porcentaje de dicha proteína sea insensible a PK. Sin embargo, el reciclado del receptor es rápido (~2 min desde ET a MP y ~12 min desde ER a MP) [105], por lo que en el transcurso del experimento (30 min) todo el TfR alcanzó la MP y fue degradado por PK. Estos controles permitieron confirmar que en las condiciones experimentales de trabajo, PK sólo puede degradar fragmentos extracelulares de proteínas presentes en la MP.

En el caso de Neu3-Myc, el tratamiento con la proteasa generó la aparición de dos fragmentos protegidos, utilizando un anticuerpo anti-c-Myc (Fig. 13b). Uno de los fragmentos corresponde a la proteína completa (~56 kDa) y el otro se observó a ~48 kDa. Exactamente el mismo resultado se obtuvo utilizando el anticuerpo anti-Neu3 (Fig. 13b). Lamentablemente no existe información acerca del epítipo exacto reconocido por este anticuerpo comercial (epítipo N). En conjunto, estos experimentos permiten concluir lo siguiente: 1) Como ya se había observado mediante microscopía, una fracción de Neu3 (~56 kDa) se encuentra en compartimientos intracelulares ya que es insensible al tratamiento con la proteasa; 2) durante los 30 min del experimento esta fracción no recicla a la superficie celular; 3) la fracción de Neu3 presente en MP tiene una parte expuesta hacia el espacio extracelular que luego del tratamiento lleva a la generación de un fragmento de ~48 kDa; 4) el extremo C-terminal de Neu3 se encuentra protegido del exterior celular, lo

cual permite especular que dicho extremo podría estar expuesto hacia el lado citosólico de la membrana, y lo mismo ocurriría con el epítotope N.

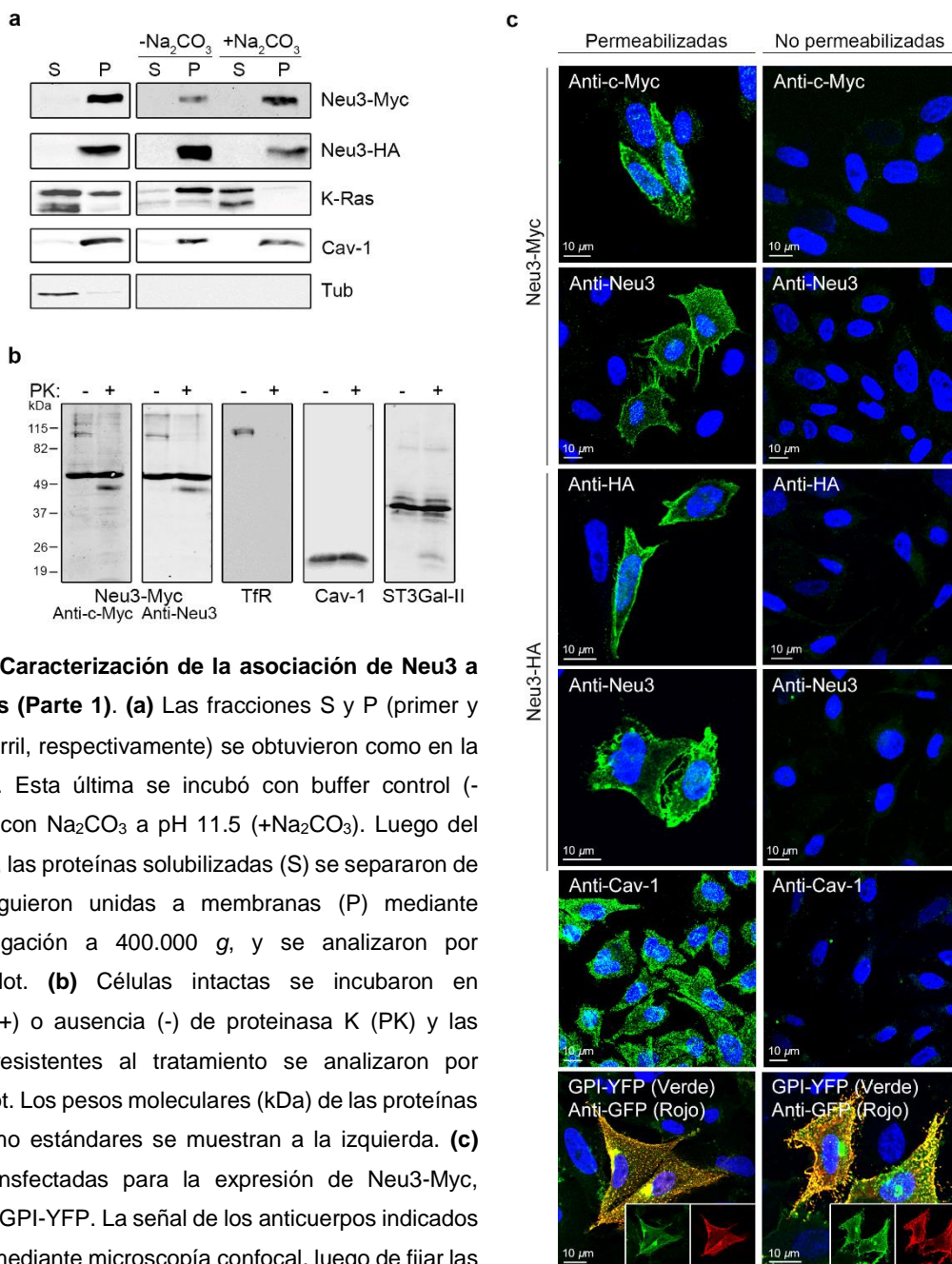


Figura 13. Caracterización de la asociación de Neu3 a membranas (Parte 1).

(a) Las fracciones S y P (primer y segundo carril, respectivamente) se obtuvieron como en la Figura 10b. Esta última se incubó con buffer control (-Na₂CO₃) o con Na₂CO₃ a pH 11.5 (+Na₂CO₃). Luego del tratamiento, las proteínas solubilizadas (S) se separaron de las que siguieron unidas a membranas (P) mediante ultracentrifugación a 400.000 g, y se analizaron por Western blot. **(b)** Células intactas se incubaron en presencia (+) o ausencia (-) de proteinasa K (PK) y las proteínas resistentes al tratamiento se analizaron por Western blot. Los pesos moleculares (kDa) de las proteínas usadas como estándares se muestran a la izquierda. **(c)** Células transfectadas para la expresión de Neu3-Myc, Neu3-HA o GPI-YFP. La señal de los anticuerpos indicados se analizó mediante microscopía confocal, luego de fijar las células y tratarlas con saponina al 0.1% en PBS-BSA (permeabilizadas) o sólo con PBS-BSA (no permeabilizadas). El núcleo de las células se tiñó con el colorante Hoechst y se muestra en azul. Los recuadros de la última figura muestran la señal de la fluorescencia intrínseca de GPI-YFP (verde) y del anticuerpo anti-GFP (rojo).

A continuación se realizaron experimentos de accesibilidad de anticuerpos en células permeabilizadas y no permeabilizadas mediante inmunofluorescencia indirecta. La marca del anticuerpo anti-c-Myc fue muy similar a la obtenida con el anti-Neu3 en células permeabilizadas con saponina al 0.1%. Sin embargo, no se observó señal con ninguno de los anticuerpos en células no permeabilizadas (Fig. 13c, primera y segunda fila). Por lo tanto, si bien la proteína se encuentra en MP, el epítipo c-Myc y el epítipo N no son accesibles a los anticuerpos desde el exterior celular. Exactamente los mismos resultados se obtuvieron con anticuerpos anti-HA y anti-Neu3 cuando las células se transfectaron con el vector para la expresión de Neu3-HA (Fig. 13c, tercera y cuarta fila). De la misma manera, Cav-1 endógena sólo se detectó en células permeabilizadas (Fig. 13c, quinta fila). Como control de una proteína expuesta al espacio extracelular, se utilizó GPI-YFP, una proteína de fusión conteniendo la secuencia de la proteína fluorescente YFP fusionada a una señal de anclaje a GPI. La distribución de GPI-YFP en células CHO-K1 incluye una fracción en la MP y otra en el complejo de Golgi, como ya había sido reportado por nuestro grupo [106]. Cuando células permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo anti-GFP, se observó una perfecta co-localización en MP y complejo de Golgi entre la señal del anticuerpo con la fluorescencia intrínseca de la YFP. En células no permeabilizadas, se observó señal de anti-GFP sólo en MP y no en complejo de Golgi (Fig. 13c, sexta fila), indicando que la permeabilización es necesaria para detectar epítipos intracelulares.

En su conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos de protección a proteasas y de accesibilidad a anticuerpos indican que el extremo C-terminal de Neu3 de alguna manera está protegido del exterior celular, muy probablemente orientado hacia el citosol, protegido por la bicapa lipídica. El mismo concepto se podría aplicar para el epítipo N.

Para confirmar que realmente existe una porción polipeptídica de Neu3 expuesta al espacio extracelular, se realizaron experimentos de biotinylación de superficie en células intactas, utilizando un reactivo biotinylante impermeable a membranas. Luego de la incubación, las proteínas biotinyladas (B) se separaron de las no biotinyladas (NB) haciendo un ensayo de *pull-down* con estreptavidina-agarosa. En concordancia con resultados anteriores, aproximadamente un 60% de la sialidasa fue recuperado en la fracción NB. El 40% restante sí fue accesible a biotina, sugiriendo que efectivamente existe una fracción de Neu3 en MP expuesta al espacio extracelular (Fig. 14a). Para descartar que las fracciones B estuvieran contaminadas con proteínas que proceden del interior celular, se

analizó la distribución de Cav-1. Como era de esperar para una proteína que no está expuesta al espacio extracelular, Cav-1 se detectó solo en fracciones NB (Fig. 14a). Aunque estos resultados parecieran indicar que la población mayoritaria de Neu3 se encuentra en endomembranas (60%), vale mencionar que debido al diseño experimental, no se puede sacar esa conclusión. El experimento de biotilación, al igual que el de protección a PK, se llevó a cabo en células intactas crecidas en monocapas en cápsulas, por lo que es probable que la porción de MP adherida a las cápsulas no esté accesible a los reactivos.

Posteriormente, se analizó la distribución de Neu3 entre las fases acuosa y detergente obtenidas después de la extracción de proteínas en presencia de Triton X-114, seguido de separación de fases inducida por temperatura. Estas condiciones experimentales permiten la separación de proteínas hidrofílicas (que particionan a la fase acuosa) de aquellas proteínas con carácter hidrofóbico (que particionan a la fase detergente). Estas últimas, por lo general son proteínas transmembrana o poseen anclas de GPI, ácidos grasos o grupos prenilo que contribuyen a la hidrofobicidad. En el caso de Neu3 más del 90% de la enzima se recuperó en la fase detergente de la fracción asociada a membranas, al igual que Cav-1. Por el contrario, una proteína soluble como Tub, particiona a la fase acuosa (Fig. 14b). La naturaleza hidrofóbica de Neu3 podría explicar la dificultad en obtener una estructura cristalina para esta proteína.

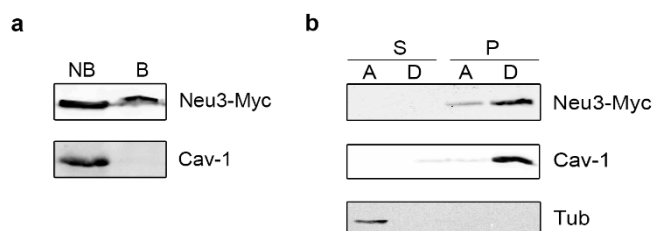


Figura 14. Caracterización de la asociación de Neu3 a membranas (Parte 2). (a) Células intactas se sometieron a biotilación de superficie y posterior *pull-down* con estreptavidina-agarosa. Las fracciones biotiladas (B) y las no biotiladas (NB) se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos anti-Neu3 y anti-Cav-1. (b) Las fracciones S y P obtenidas como en la Figura 10b, se sometieron a la partición en fase acuosa (A) o detergente (D) al incubarlas con Tritón X-114 y se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-Neu3, anti-Cav-1 y anti-Tub.

En conjunto, los resultados mostrados en las Figuras 13 y 14 claramente indican que Neu3 se comporta como una proteína transmembrana, con carácter hidrofóbico, que

tiene una porción expuesta hacia el espacio extracelular y una porción conteniendo al menos el extremo C-terminal y el epítipo N, expuestos hacia el interior celular.

Análisis de la presencia de segmentos transmembrana en la secuencia de Neu3

Como se mencionó en antecedentes, la gran mayoría de las proteínas transmembrana en células eucariotas atraviesan la bicapa lipídica por medio de segmentos de aminoácidos hidrofóbicos que adoptan una conformación α -helicoidal. La predicción de tales características en la secuencia de Neu3 utilizando diferentes programas, no reveló la presencia de ningún segmento de aminoácidos suficientemente hidrofóbico y del largo suficiente para atravesar la membrana (Tabla IV). Un solo programa (TMPred) arrojó resultados positivos, al encontrar dos regiones con dichas características, pero ese mismo programa arrojó resultados erróneos para las proteínas controles que se utilizaron: Tub como proteína soluble y TfR como proteína con un único paso transmembrana, por lo que el resultado fue desestimado.

Tabla IV. Predicción de segmentos transmembrana α -hélices.

Programa *	Predicción		
	Neu3	Tub	TfR
PHOBIUS	0	0	1 (66-88)
TMHMM	0	0	1 (64-86)
HMMTOP	0	0	1 (92-113)
PSORT	0	0	1 (101-117)
TOPCONS	0	0	1 (65-85)
PHILIUS	0	0	1 (66-87)
OCTOPUS	0	0	1 (65-85)
TMPred	2 (125-145, 208-227)	1 (172-192)	5 (99-121, 445-467, 481-500, 573-591, 768-784)
Real	?	0	1 (68-88)

Entre paréntesis se indica el segmento de aminoácidos predicho.

* En Materiales y Métodos se indica el URL de cada programa.

Por otra parte, una conclusión similar se obtuvo al realizar gráficos de hidrofobicidad basándose en la escala de Kyte y Doolittle [107]. En estos gráficos se representa en el eje Y el valor de hidrofobicidad ponderado de cada residuo aminoacídico, y en el eje X el

número de residuo. La ponderación de la hidrofobicidad de un residuo es muy importante, ya que le asigna como valor de hidrofobicidad, el promedio de las hidrofobicidades de los residuos colindantes encontrados en el interior de una ventana. Mediante el uso de un tamaño de ventana adecuado se puede llevar a cabo la predicción de diversas propiedades. Por ejemplo, dado que por lo general una α -hélice de aproximadamente 20 residuos es lo suficientemente larga como para atravesar el grosor de la bicapa lipídica, el tamaño de ventana recomendado para predecir segmentos transmembrana es de 19 (siempre es impar). Como se observa en la Figura 15, Neu3 pareciera no tener ningún segmento transmembrana ya que su puntaje de hidrofobicidad se mantiene debajo de la línea roja en la totalidad de la secuencia. La línea roja corresponde a un puntaje de 1.6 y es un valor de corte empírico para segmentos α -hélices transmembrana de ~ 19 aminoácidos de largo [107].

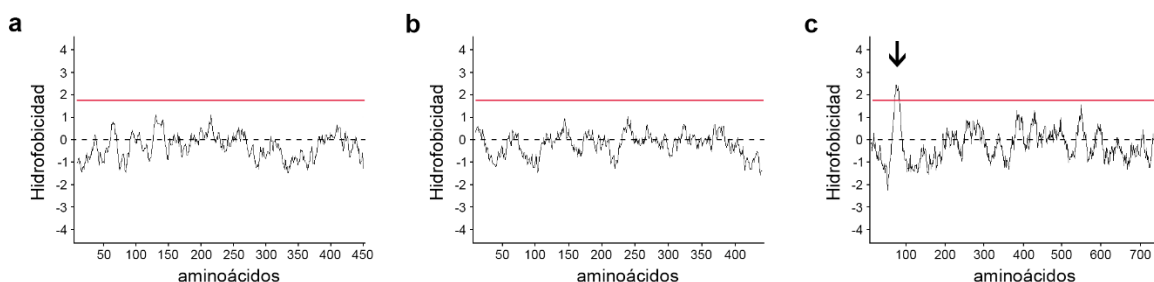


Figura 15. Gráficos de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle. Los gráficos se generaron utilizando un tamaño de ventana de 19 aminoácidos para la secuencia de Neu3 (a), de Tub (b) y de TfR (c). El dominio transmembrana de TfR se indica con una flecha en (c).

Estos resultados sugieren que Neu3 es una proteína que no presenta segmentos transmembrana α -hélice convencionales, y que por el contrario, debe atravesar la bicapa lipídica mediante un mecanismo diferente.

Análisis de posibles modificaciones lipídicas en Neu3

Debido al carácter hidrofóbico de Neu3 (Fig. 14b) y a la aparente ausencia de segmentos transmembrana convencionales (Tabla IV y Fig. 15), se decidió analizar si la proteína está modificada por la adición de algún tipo de lípido.

La lipidación de proteínas de células eucariotas puede ser dividida en dos categorías: aquellas que ocurren en el citosol o en la cara citosólica de membranas

celulares, y las que ocurren en el lumen de organelas que forman parte de la vía secretora [108]. Dentro de estas últimas, la unión de GPI en el lumen del RE es la mejor caracterizada (ver Fig. 9). Una vez modificada, la proteína transita la vía exocítica hasta llegar a la superficie celular, en donde permanece anclada a la cara extracelular de la MP [109]. Esta opción se descartó rápidamente en el caso de Neu3 por dos motivos. En primer lugar predicciones bioinformáticas indicaron que la sialidasa no contiene la secuencia necesaria en el extremo C-terminal para ser reconocida por la maquinaria de síntesis de GPI (resultados no mostrados), y en segundo lugar, si Neu3 fuera una proteína anclada a GPI, la fracción presente en MP tendría que haber sido completamente degradada en los experimentos con PK.

Por otra parte se pueden distinguir tres tipos de modificaciones lipídicas citosólicas: prenilación, N-miristoilación y S-acilación. Las dos primeras involucran la adición de un grupo isoprenilo a una cisteína por enlace tioéter y de un grupo miristoilo a una glicina por enlace amida, respectivamente. Ambas modificaciones poseen secuencias consenso que no están presentes en la secuencia de Neu3 (resultados no mostrados), por lo cual también se descartaron como posibles modificaciones lipídicas de la sialidasa. Por el contrario, la S-acilación (también llamada palmitoilación) es la unión post-traducciona de un ácido graso de cadena larga a una cisteína mediante un enlace tioéster. Es la única modificación lipídica que es reversible y la única que no posee una secuencia consenso, por lo que no es fácil predecir cisteínas S-acilables [110].

Para analizar si Neu3 está S-acilada, se llevó a cabo el experimento de intercambio de acilo por biotina (ABE, *Acyl-Biotin Exchange*), el cual permite intercambiar el acilo unido a una cisteína, por un grupo biotina, que posteriormente será detectado. Este ensayo, consiste en una secuencia de reacciones químicas (Fig. 16a): el bloqueo de los tioles libres de las proteínas con N-etilmaleimida (NEM), el tratamiento con hidroxilamina (HAM) para liberar los acilos unidos a través del enlace tioéster, y la biotinilación de los tioles de las cisteínas antes palmitoiladas. Posteriormente se realiza un ensayo de *pull-down* con estreptavidina-agarosa para purificar las proteínas palmitoiladas, y las mismas se analizan por Western blot. Luego de este procedimiento, una banda correspondiente a Neu3-Myc se recuperó en la muestra tratada con HAM, indicando que al menos un grupo acilo está unido a la sialidasa por enlace tioéster (Fig. 16b). En este experimento, Cav-1 se utilizó como control de una proteína S-acilada conocida [111]. Posteriormente se realizó el mismo ensayo de ABE utilizando una proteína Neu3 comercial purificada de células HEK-293

humanas, observándose el mismo resultado (Fig. 16b). Teniendo en cuenta que no existe una secuencia consenso para la S-acilación, y que Neu3 posee 21 cisteínas en su secuencia, queda aún por determinar cuál o cuáles de ellas están siendo S-aciladas.

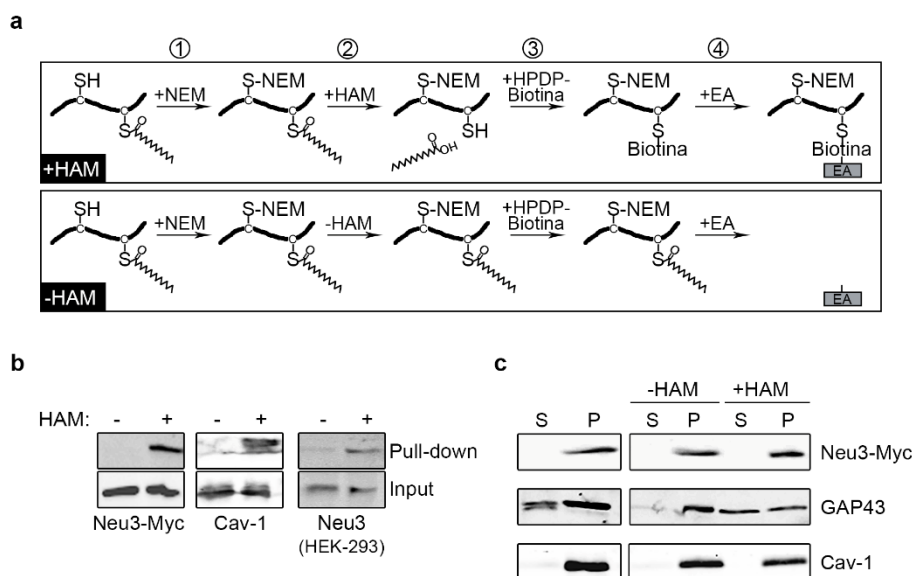


Figura 16. Ensayos de intercambio de acilo por biotina (ABE). **(a)** Representación esquemática de la metodología de ABE. Homogenatos celulares se incuban con N-etilmaleimida (NEM) para bloquear los grupos tioles de las cisteínas libres (1). Posteriormente se incuban con hidroxilamina (HAM), la cual produce la ruptura de los enlaces tioéster entre el ácido graso y la cisteína (2). Los tioles libres pueden ahora reaccionar con HPDP-Biotina (3) y luego se produce el *pull-down* de las proteínas biotiniladas por incubación con estreptavidina-agarosa (EA) (4). La omisión de HAM en este procedimiento sirve como un control negativo. **(b)** Células CHO-K1 transfectadas con el vector para la expresión de Neu3-Myc, y Neu3 recombinante purificada de células HEK-293 se sometieron al ensayo de ABE y se analizaron por Western blot. Los blots muestran las alícuotas analizadas antes (Input) y después de la purificación con EA (*pull-down*), en presencia (+) o ausencia (-) de HAM. Se utilizaron anticuerpos anti-Neu3 y anti-Cav-1. **(c)** Las fracciones S y P (primer y segundo carril, respectivamente) se obtuvieron como en la Figura 10b y estas últimas se incubaron en presencia (+) o ausencia (-) de HAM. Luego del tratamiento se separaron las proteínas solubilizadas (S) de las que siguieron unidas a membranas (P) mediante ultracentrifugación a 400.000 g y se analizaron por Western blot.

Hay muchos antecedentes en la bibliografía que dan cuenta de que la S-acilación de proteínas periféricas permite la asociación de dichas proteínas con membranas biológicas, y que la remoción del ácido graso causa una disminución en la afinidad por las mismas. Debido a ello, se evaluó si la deacilación mediada por HAM causa algún efecto en la asociación de Neu3 con las membranas. Para ello, fracciones de membrana obtenidas mediante ultracentrifugación de los homogenatos, se trataron con buffer control o

conteniendo HAM. Luego de una nueva ultracentrifugación, la distribución de Neu3-Myc y proteínas control en las fracciones solubles o precipitadas, se analizó mediante Western blot. La Figura 16c muestra que Cav-1 permanece asociada a membranas luego de tratar con HAM, ya que si bien está S-acilada, es una proteína integral de membrana. La efectividad del tratamiento con HAM se evaluó analizando el comportamiento de GAP43, una proteína que se une a membranas por medio de la S-acilación en dos residuos cisteína (C3 y C4) presentes en el extremo N-terminal. Como era de esperar, una fracción de GAP43 se solubilizó luego del tratamiento con HAM, indicando que el mismo es efectivo para remover los ácidos grasos unidos por enlace tioéster. En el caso de Neu3, el tratamiento con HAM no modificó la fuerte asociación de la sialidasa con las membranas (Fig. 16c), indicando que el/los ácidos grasos no son la única forma de unión que tiene Neu3 a la bicapa lipídica.

Por otro lado, debido a que la S-acilación ocurre en el lado citosólico de las membranas, el descubrimiento de esta modificación post-traducciona l apoya fuertemente la hipótesis de que Neu3 tiene parte de su estructura expuesta al citosol.

Capacidad de Neu3 para dimerizar y oligomerizar

A continuación se investigó si Neu3 posee la habilidad de dimerizar o de asociarse a otras proteínas. Hasta el momento, todos los Western blots realizados en esta tesis fueron hechos en condiciones reductoras, mediante el agregado de β -mercaptoetanol (β m), lo cual permitió distinguir una banda de ~56 kDa, como se mostró anteriormente. Al analizar la distribución de Neu3 en condiciones no reductoras, se observó la aparición de una banda mayoritaria de ~115 kDa, y dos minoritarias de ~56 y ~230 kDa (Fig. 17a). Estos resultados sugieren que las bandas de ~115 y ~230 kDa probablemente se forman por la asociación vía puentes disulfuro de dos y cuatro monómeros de ~56 kDa, respectivamente. Este es el primer reporte de que Neu3 tiene la habilidad de dimerizar y formar tetrámeros unidos por puentes disulfuro. En línea con estos resultados, la formación de multímeros también se observó en homogenatos de hígado y riñón de ratón que expresan de manera endógena la sialidasa (resultados no mostrados).

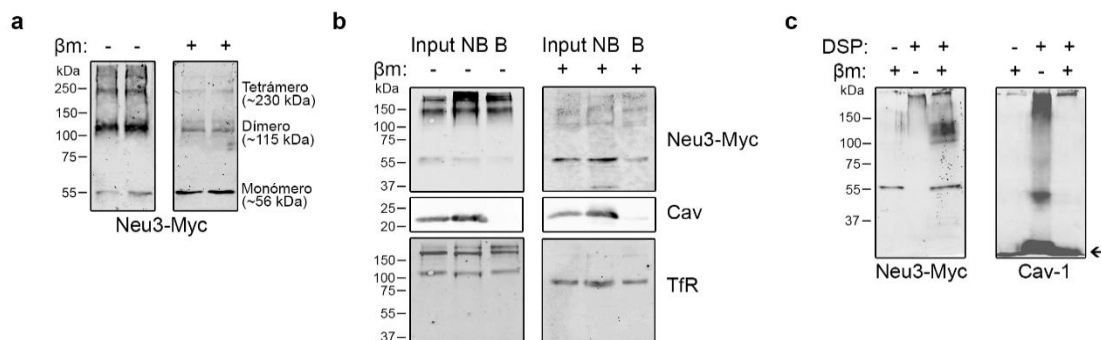


Figura 17. Dimerización y oligomerización de Neu3. **(a)** Homogenatos totales de células transfectadas para la expresión de Neu3-Myc, se analizaron por Western blot en condiciones no reductoras ($-\beta\text{m}$) y reductoras ($+\beta\text{m}$), utilizando un anticuerpo anti-Neu3. **(b)** Células transfectadas para la expresión de Neu3-Myc se sometieron a biotilación de superficie y posterior *pull-down* con estreptavidina-agarosa. Las fracciones biotiladas (B) y las no biotiladas (NB) se analizaron por Western blot en condiciones no reductoras ($-\beta\text{m}$) y reductoras ($+\beta\text{m}$). El input (10% del total) corresponde al homogenato antes de hacer el *pull-down*. Se utilizaron anticuerpos anti-Neu3, anti-Cav-1 y anti-TfR. **(c)** Células transfectadas para la expresión de Neu3-Myc se sometieron a experimentos de entrecruzamiento químico utilizando el reactivo permeable a membranas DSP. Luego, las proteínas resultantes se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos anti-Neu3 y anti-Cav-1. Debido a la presencia de un puente disulfuro en la molécula DSP, el entrecruzamiento puede ser revertido mediante la adición de βm . A la izquierda de los blots se indican los pesos moleculares (kDa) de las proteínas estándar.

Luego se analizó si las formas multiméricas de Neu3 residen en la MP o en compartimientos intracelulares. Para ello se realizaron experimentos de biotilación de superficie en células intactas, utilizando un reactivo biotilante impermeable a membranas, al igual que en la Figura 14a. Luego de la incubación, las proteínas biotiladas (B) se separaron de las no biotiladas (NB) mediante *pull-down* con estreptavidina-agarosa y se analizaron mediante Western blot. Los multímeros de Neu3-Myc se recuperaron tanto en la fracción B como en la NB en condiciones no reductoras, indicando que existen dímeros y tetrámeros tanto en la superficie celular como en membranas intracelulares. Lo mismo se observó para el TfR, una proteína de ~95 kDa que forma dímeros unidos por puente disulfuro. Por el contrario Cav-1 se recuperó sólo en la fracción NB, asegurando que la biotilación sólo ocurrió en proteínas expuestas al espacio extracelular (Fig. 17b).

Posteriormente se realizaron experimentos de entrecruzamiento químico con el reactivo permeable a membranas DSP, el cual posee un brazo espaciador de 1.2 nm y contiene un puente disulfuro que puede ser clivado en condiciones reductoras para revertir el entrecruzamiento. Luego del tratamiento con DSP en células intactas y el subsiguiente

análisis mediante Western blot, Neu3-Myc se detectó únicamente como un complejo de alto peso molecular (mayor a 250 kDa) que casi no entró en el gel. La reversión del entrecruzamiento, mediante el agregado de β m, permitió la reaparición del monómero de Neu3 y de una banda difusa entre 100 y 150 kDa (Fig. 17c). Cuando los mismos experimentos se realizaron para analizar el comportamiento de Cav-1 (~22 kDa, monómero), se observó que luego del tratamiento con DSP aparece una banda a ~45 kDa que corresponde a un dímero, y, además, se observan varias bandas a mayores pesos moleculares. La reversión del entrecruzamiento permitió recuperar el monómero Cav-1.

En conjunto, estos resultados sugieren que Neu3 puede interaccionar consigo misma mediante enlaces disulfuro para formar dímeros y tetrámeros, y a su vez tiene la capacidad de interaccionar con otras proteínas, probablemente con más de una, ya que la adición de un reactivo entrecruzador no permite identificar entidades moleculares separadas.

Modelado molecular de Neu3 basado en la estructura cristalina de Neu2

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, todos los miembros de la familia de sialidasas que han sido cristalizados tienen una estructura conservada de seis caras que se denomina β -propeller o superbarril- β (el cual no se debe confundir con los barriles- β). En este plegamiento, cada cara del superbarril está compuesta por cuatro hojas- β antiparalelas unidas por segmentos conectores, con el extremo N- y C- terminal cercanos uno de otro (ver Fig. 8). Como era de esperar, la predicción de elementos de estructura secundaria en la secuencia de Neu3 usando distintos programas reveló la presencia de numerosas regiones con hojas- β y un escaso contenido de α -hélices (Fig. 18a). Dado que la única sialidasa de mamíferos cristalizada hasta la fecha es Neu2 citosólica, se decidió crear un modelo de homología para Neu3 basado en la estructura cristalina de Neu2. Ambas secuencias comparten un 37% de aminoácidos exactamente iguales (identidades), y la homología aumenta a un 49% si se consideran también a aquellos aminoácidos con características fisicoquímicas similares. El modelo fue creado de manera automática por el programa Swiss-Model disponible *online* y se observa en la Figura 18b. Si bien el modelo de Neu3 es una herramienta muy útil, probablemente esté incompleto, ya que el programa modela desde el residuo S41 de Neu3 hasta Q445 (recordemos que Neu3 tiene 461 aminoácidos). Por otro lado, existe una región en la secuencia de Neu3 (de P325 a A354)

que no se superpone con el templado (ver Fig. 7), por lo que esa región se eliminó del alineamiento, ya que seguramente adopta un plegamiento diferente, imposible de ser modelado. En este sentido, ya ha sido reportado que dicha región corresponde a un segmento conector ubicado entre la primera y la segunda hojas- β de la quinta cara del β -propeller (Fig. 18a). Este segmento es altamente variable en largo y secuencia en Neu3 de otros vertebrados, y la eliminación de dicha región en Neu3 de *Gallus gallus* aparentemente no altera las propiedades de la enzima, ni modifica su unión a membranas [112, 113].

Cabe mencionar, que en la literatura ya se habían reportado modelos de homología para Neu3 [114, 115], pero en ninguno de esos trabajos intentaron asociar dicha estructura al mecanismo de inserción en las membranas biológicas. Por el contrario, dichos autores hicieron un excelente trabajo en tratar de identificar los residuos de Neu3 que forman parte del sitio activo. En la estructura tridimensional plegada, el sitio activo se encuentra en el centro del β -propeller, orientado hacia un lado de la molécula, en una cavidad poco profunda. De todos los residuos que participan en el sitio activo, existen seis aminoácidos que están totalmente conservados en sialidasas tanto virales, bacterianas y de mamífero: un residuo de tirosina y uno de ácido glutámico que actúan en conjunto como nucleófilo, una tríada de argininas que interactúan con el grupo carboxilato característico de todos los ácidos siálicos, y un residuo de ácido aspártico que es esencial para la catálisis ácido/base durante la hidrólisis (Figs. 7 y 18a). En el caso de Neu3, esos residuos corresponden a Y403, E258, R58, R278, R373 y D83, respectivamente [114, 115], y se encuentran representados en la Figura 19a. Por otro lado, el extremo N- y C-terminal de Neu2 se ubican en el lado opuesto del sitio catalítico y en contacto uno de otro, por lo cual se podría esperar que lo mismo ocurra en la estructura de Neu3 (Fig. 19a).

Si bien todas las sialidasas comparten un plegamiento muy similar, existen considerables variaciones, principalmente en la torsión que adoptan las hojas- β y en el largo de los segmentos conectores, que explican las diferencias de especificidad de cada enzima, y promueven el diseño de inhibidores selectivos. En la actualidad existen inhibidores específicos para las neuraminidasas del virus influenza, que no tienen efecto en las sialidasas humanas [116], pero aún no se han podido desarrollar inhibidores selectivos para Neu1, Neu2, Neu3 o Neu4 [117-119].

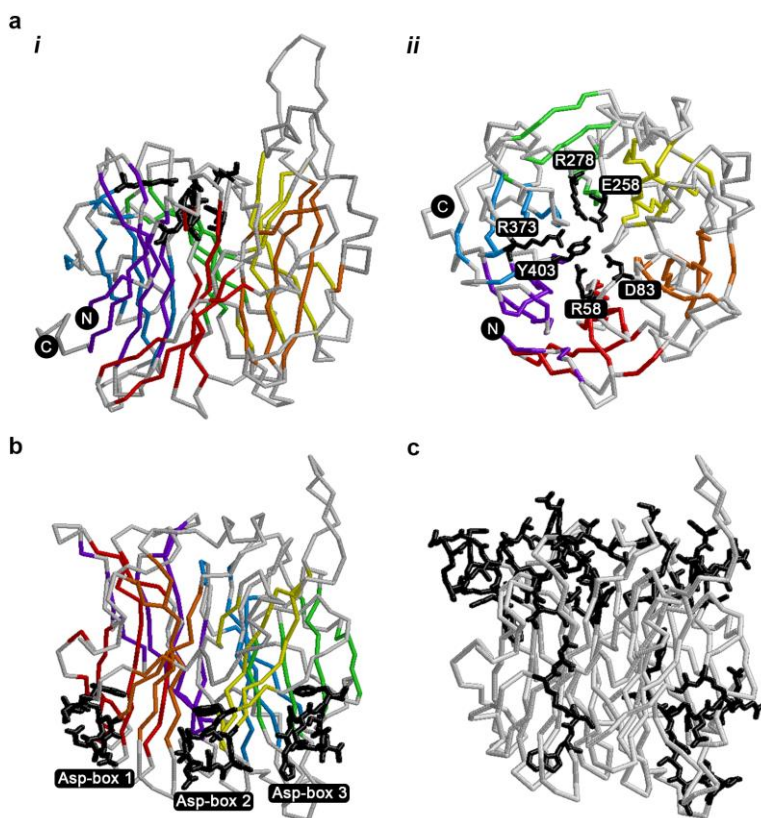


Figura 19. Aspectos estructurales del modelado de Neu3. (a) Representación esquemática de la estructura de Neu3 indicando los aminoácidos que forman parte del sitio activo como bastones negros. Las hojas- β están representadas con los mismos colores que en figuras anteriores. Se indica también la posición de los extremos N- y C-terminal. (i) vista lateral, (ii) vista de arriba. (b) Otra vista lateral de Neu3 destacando como bastones negros los aminoácidos que forman parte de los dominios Asp-boxes. (c) Vista lateral de Neu3 indicando como bastones negros las regiones con mayor hidrofiliidad de acuerdo a la escala de Kyte y Doolittle.

En la Figura 18a, al igual que en la Figura 7, se encuentran marcados con rectángulos los dominios YRIP y Asp-boxes de Neu3. El primero está ubicado cerca del extremo N-terminal y contiene una de las argininas involucradas en la formación de la triada de argininas en el sitio activo, que en el caso de Neu3 es R58. Por otra parte, los dominios Asp-boxes pueden repetirse de una a cinco veces a lo largo de la secuencia aminoacídica de todas las sialidasas a excepción de las virales. Estos motivos siempre se encuentran en posiciones topológicas equivalentes: en el giro entre la tercera y la cuarta hoja- β de ciertas

caras del β -propeller, y lejos del sitio activo. En el caso de Neu3 se encuentran tres Asp-boxes localizados en la segunda, tercera y cuarta cara del superbarril- β (Figs. 18a y 19b).

Con el objetivo de evaluar las regiones más hidrofílicas de este modelo que podrían estar en contacto con el medio acuoso, se realizaron gráficos de hidrofobicidad utilizando la escala de Kyte y Doolittle con un tamaño de ventana de 9 aminoácidos. A continuación se ubicaron los picos más hidrofílicos en la estructura modelada. Como se muestra en la Figura 19c, dichas regiones se localizan en extremos opuestos de la molécula, llámese “arriba” y en alguna áreas de “abajo”. Esta es sólo una predicción *in silico*, pero permite especular que quizás esas regiones estén en contacto con el ambiente acuoso. La búsqueda de las regiones más hidrofóbicas de Neu3 no brindó resultados tan claros, observándose regiones distribuidas en varios segmentos a lo largo de la estructura proteica.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el Capítulo I del presente trabajo de tesis proveen un análisis comprensivo de la topología de Neu3 y brindan nueva información acerca de su mecanismo de asociación a membranas biológicas. En primer lugar, se confirmó en el sistema celular elegido lo que ya estaba ampliamente descrito en la literatura: que Neu3 es una proteína que se asocia completamente a membranas, ya que mediante experimentos de fraccionamiento subcelular, el 100% de la sialidasa se recupera en el precipitado luego de ultracentrifugación (Fig. 10b). Por inmunofluorescencia indirecta y análisis mediante microscopía confocal confirmamos también que Neu3 se localiza en MP y en una serie de compartimientos intracelulares que co-localizan parcialmente con membranas de endosomas tempranos y endosoma de reciclado (Fig. 11). No se logró extraer de las membranas a la sialidasa bajo condiciones en que normalmente se solubilizan proteínas periféricas (Fig. 13a). Experimentos de protección a proteasas y de accesibilidad de anticuerpos en células no permeabilizadas, sugirieron que el extremo C-terminal de Neu3 está expuesto hacia el citosol (Fig. 13b y c). En este sentido, y dado que todas las sialidasas tienen el extremo N- y C-terminal cercanos uno de otro, es probable que el amino terminal de Neu3 también esté expuesto hacia el interior celular, aunque habría que confirmarlo experimentalmente. Además, una porción de Neu3 unida a MP es degradada por PK y accesible a la biotilación de superficie, y por lo tanto, expuesta al espacio extracelular (Figs. 13b y 14a). El análisis del comportamiento hidrofílico/hidrofóbico de Neu3 mediante partición en fase acuosa o detergente después del tratamiento con Tritón X-114, reveló la segregación casi completa de la sialidasa en la fase detergente, poniendo de manifiesto el carácter hidrofóbico de la misma (Fig. 14b). El mismo resultado fue reportado para Neu3 de *Gallus gallus* [112]. Curiosamente, este comportamiento difiere del de Neu3 de *Mus musculus*, que ha sido reportado que segrega a la fase acuosa [100].

En conjunto estos resultados indican que Neu3 se comporta como una proteína integral de membrana que atraviesa de alguna manera la totalidad de la bicapa lipídica. Sin embargo, análisis *in silico* de la secuencia de Neu3 indicaron que la sialidasa no contiene ningún segmento α -hélice lo suficientemente hidrofóbico y del largo necesario para atravesar la membrana, sugiriendo que la sialidasa debe atravesar la bicapa lipídica por un mecanismo diferente (Fig. 15 y Tabla IV).

El modelado de Neu3 utilizando a la estructura cristalina de Neu2 como templado, predijo que Neu3 es un típico β -propeller de seis caras, característico de todas las sialidasas, con un altísimo contenido de hojas- β y un escaso contenido de α -hélices (Fig. 18).

Por otro lado, se demostró que Neu3 está S-acilada (Fig. 16). Sin embargo se necesitarán más estudios para determinar cuál o cuáles de las 21 cisteínas presentes en Neu3 están siendo modificadas, y más importante aún, para determinar la implicancia biológica de esta modificación. Debido a que la S-acilación es diferente a todas las otras modificaciones lipídicas por su reversibilidad y regulación dinámica, se especula que podría ser importante para determinar la localización subcelular de la sialidasa y para regular su tráfico y su vida media. Si bien no existe una secuencia consenso para la S-acilación, se conoce que suele suceder en cisteínas que tienen características en común, ya que se encuentran cercanas a un entorno hidrofóbico o básico, adyacentes a otras modificaciones lipídicas como miristoilación o prenilación, o cerca de dominios transmembrana. Esto permitió la creación de softwares que utilizan algoritmos de predicción de potenciales sitios de palmitoilación, generando una importante herramienta para la investigación *in silico* de distintas proteínas candidatas. El análisis de la secuencia de Neu3 en dichos programas (Tabla V) reveló la presencia de varias cisteínas candidatas, pero no fueron muy reproducibles entre los distintos programas, por lo que con las herramientas actuales aún queda por determinar qué cisteínas son las que se S-acilan.

Tabla V. Predicción de sitios de S-acilación en la secuencia de Neu3.

Programa *	Predicción
WAP-Palm	C132, C139, C222, C227, C306, C401, C421
MDD-Palm	C160, C306, C417, C427
CSS-Palm 4.0	Ninguna C candidata
GPS-Lipid	C160, C328, C389
SwissPalm	Ninguna C candidata
NBA-Palm	C227, C421

En gris oscuro se encuentran resaltadas las cisteínas con mayor puntaje de cada programa.

* En Materiales y Métodos se indica el URL de cada programa.

Además de la S-acilación estudiada en este trabajo de tesis, previamente había sido descrito que Neu3 se tirosina-fosforila en respuesta a insulina [95]. En línea con este último resultado, al hacer un análisis filogenético de Neu3 en metazoa, se identificaron dos sitios

fosforilables putativos, altamente conservados (S170 y S289) [113], aunque aún queda por demostrar si dichos sitios se fosforilan realmente. Dado que estas modificaciones post-traduccionales están restringidas al lado citosólico de las membranas, estas observaciones claramente sugieren que Neu3 contiene un dominio citosólico.

Recientemente se describió que Neu3 posee la habilidad de interactuar con proteínas específicas en la MP y en endosomas, y mediante espectrometría de masas se pudo armar el interactoma de Neu3 [120]. Entre las proteínas que se identificaron se encuentran flotilina-1, flotilina-2, la cadena pesada de clatrina (CHC), sortin nexin-9 (SNX9) y Sec23A/Sec23B. Las flotilinas son proteínas asociadas a la hemicapa citosólica de la MP de una manera similar a Cav-1 [121]. CHC y SNX9 se encuentran en la cara citosólica de vesículas y están involucrados en endocitosis y tráfico intracelular [122], mientras que Sec23A/Sec23B son componentes de la maquinaria de cubierta COPII, y ciclan entre una población citosólica y una unida a la cara citosólica de vesículas [123]. Además, también se reportó que Neu3 interactúa con moléculas como Cav-1 y Grb2 [94, 95]. Considerando todos estos resultados, cómo es posible que una proteína periférica asociada con la hemicapa externa de la MP como había sido reportado pueda interactuar con todas estas proteínas citosólicas o unidas a la hemicapa citosólica? Más aún, existen evidencias de que Neu3 interactúa con ácido fosfatídico, un fosfolípido que se encuentra mayoritariamente en la hemicapa citosólica de las membranas [124]. Los hallazgos obtenidos en este trabajo, que indican que Neu3 es una proteína transmembrana, permiten que estas interacciones sean favorables topológicamente.

Los experimentos de entrecruzamiento también mostraron que Neu3 es capaz de interactuar con otras proteínas (Fig. 17). Algo importante que se demostró en esta tesis es que Neu3 puede formar dímeros y tetrámeros unidos por puente disulfuro, tanto en la MP como en endosomas (Fig. 17), siendo ésta la primera descripción de la habilidad de multimerización de Neu3. Este comportamiento había sido descrito para las neuraminidasas virales como la del virus influenza [125], pero nunca para sialidasas de mamíferos.

Teniendo en cuenta todos los resultados de este primer capítulo, es posible plantear un modelo en el que el β -propeller de Neu3 está inserto en la bicapa lipídica de una manera similar a la inserción de los barriles- β de proteínas mitocondriales y de cloroplastos. En esta configuración, la región de Neu3 que contiene el sitio catalítico quedaría expuesta al espacio extracelular, permitiendo la interacción con los gangliósidos insertos en la

hemicapa externa de la MP, o con ácido siálico asociado a glicoproteínas. Esto también sería consistente con el hecho de que Neu3 posee actividad trans y puede remover ácido siálico de gangliósidos presentes en células vecinas [69]. Por el contrario, el lado opuesto al sitio catalítico del β -propeller estaría orientado hacia el citosol y contendría las cisteínas S-aciladas y el extremo C-terminal de la proteína.

Sin embargo, esta configuración topológica de Neu3 no parece ser compatible con varios aspectos. En primer lugar sería la primera proteína que presenta esta topología, ya que la mayoría de las proteínas que se conocen que tienen estructura de β -propeller son o bien solubles o están embebidas en la membrana mediante segmentos α -hélice tanto en el extremo C- como en el N- terminal, de manera que todo el superbarril- β queda orientado hacia un solo lado de la membrana. Por ejemplo, las neuraminidasas del virus influenza son glicoproteínas integrales de membrana, ensambladas como un tetrámero de monómeros idénticos. Una región α -hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal sirve para anclar la neuraminidasa a la membrana viral [126]. Una región hidrofóbica similar no estaría presente en la secuencia de Neu3, ni en ninguna de las sialidasas de mamífero asociadas a membranas.

Por otro lado, la inserción completa del β -propeller que se propone para Neu3, dejaría expuestos muchos aminoácidos cargados en el interior de la bicapa lipídica, lo cual sería energéticamente desfavorable. Esta inconsistencia podría compensarse gracias a la formación de multímeros y/o a la asociación de la sialidasa con otras proteínas que enmascaren los aminoácidos cargados que estén expuestos a los lípidos. Las regiones más hidrofílicas de Neu3 se distribuyen mayoritariamente arriba y debajo de la molécula (Fig. 19c), lo que podría justificar la hipótesis planteada.

Es muy importante mencionar que muchos de los resultados de este trabajo son compatibles con aquellos obtenidos por Miyagi y colaboradores [67] cuando clonaron por primera vez a Neu3 de origen bovino. En ese trabajo hicieron una caracterización muy superficial de la topología de Neu3 y propusieron que la misma era una proteína integral de membrana tipo I, con un único paso transmembrana y con su extremo C-terminal expuesto al citosol. Llegaron a esa conclusión realizando experimentos de accesibilidad de anticuerpos en células no permeabilizadas. Por otro lado, la predicción del segmento transmembrana putativo fue hecha con el programa TMPred, el mismo que arrojó resultados erróneos para las proteínas utilizadas como control en este trabajo (ver Tabla IV). El modelo tipo I fue descartado rápidamente ya que la secuencia de Neu3 no contiene

segmentos transmembrana convencionales, y porque la topología propuesta no permitiría la formación del β -propeller. Es por ello que en la búsqueda de modelos alternativos se propuso que Neu3 es una proteína periférica asociada con la hemicapa externa de la MP [100]. Esta conclusión fue basada en el hecho que Neu3 se biotinila con un agente impermeable a membranas, y puede ser extraída de las mismas con carbonato de sodio a pH 11.5. El primer resultado es similar al obtenido en esta tesis, mientras que el segundo no lo es. Actualmente desconocemos el motivo de tal discrepancia, pero cabe mencionar que en dicho trabajo utilizan Neu3 de ratón.

Sorprendentemente, un estudio publicado hace pocos meses, demostró que la sialidasa lisosomal Neu1 también se comporta como una proteína transmembrana con sus extremos N- y C- terminal orientados hacia el citosol y con capacidad de dimerizar [33]. Estos autores hicieron experimentos similares a los realizados en este trabajo de tesis, y tampoco pueden explicar exactamente cómo un β -propeller puede atravesar la bicapa lipídica. Lo que proponen es que dicha estructura tiene cierta plasticidad para deformarse y que podría formar dos regiones α -hélices que actuarían como transmembrana. Sin embargo, los autores comprenden que esta organización daría como resultado que los residuos catalíticos estén separados por la bicapa lipídica. Además, un estudio previo había propuesto que Neu1 contiene un dominio C-terminal YXX ϕ (donde ϕ es un aminoácido voluminoso e hidrofóbico), similar a aquellos encontrados en otras proteínas lisosomales integrales de membrana como LAMP1 [58], además de demostrar que Neu1 se encuentra fosforilada.

Otro aspecto que queda aún por resolver es cuál es el mecanismo que regula el plegamiento y la inserción de Neu3 en las membranas y cómo se transporta hasta la MP. La mayoría de las sialidasas bacterianas son proteínas de secreción que tienen un péptido señal para su ingreso a la vía secretora [127]. En la secuencia de Neu3 humana, sin embargo, ningún péptido señal fue predicho utilizando SignalP 4.1 [128]. Además, observamos que la presencia de tunicamicina, un inhibidor de la *N*-glicosilación, no cambió la movilidad electroforética de Neu3 (resultados no mostrados), indicando una escasa probabilidad de que Neu3 tenga *N*-glicanos en su estructura. Estos resultados podrían sugerir que Neu3 no ingresa a la vía secretora clásica y que llega a la MP por un mecanismo no convencional.

CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio provee muchas evidencias experimentales que prueban que Neu3 posee las características de una proteína transmembrana, aunque aún queda por determinar exactamente cómo una proteína con una estructura de β -propeller puede atravesar la totalidad de una membrana en ausencia de segmentos transmembrana convencionales. Además, esta parte del trabajo plantea cuestiones importantes sobre nuestro actual conocimiento de las proteínas de membrana, ya que en principio, Neu3 presentaría una topología nunca antes descrita para ninguna proteína.

Para poder aclarar este panorama, en el futuro se necesitará utilizar otras técnicas como la cristalografía, microscopía electrónica y microscopía de súper-resolución. Por último, conocer exactamente la topología de Neu3 es crítico para comprender a nivel molecular su participación en numerosos procesos biológicos.

Los resultados que integran el Capítulo I de esta tesis forman parte de la publicación:
Human sialidase Neu3 is S-acylated and behaves like an integral membrane protein.

Rodriguez-Walker M. and Daniotti JL.

Scientific Reports (2017) | 7: 4167 | doi:10.1038/s41598-017-04488-w

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos. La construcción Neu3-Myc se obtuvo clonando entre los sitios de restricción EcoRI y NotI del vector de expresión constitutivo pCIneo (Promega, Madison, WI, USA), la secuencia codificante de Neu3 humana fusionada en su extremo C-terminal a un epítoto c-Myc, obtenido mediante el servicio de síntesis de GenScript (Piscataway, NJ, USA). La construcción Neu3-HA se obtuvo usando como templado Neu3-Myc, amplificando mediante PCR con primers específicos para introducir el epítoto HA y subclonando nuevamente en el vector pCIneo.

Alguno de los plásmidos utilizados como controles se describieron con anterioridad en otros trabajos: β 4GalNAcT-I-YFP [23], ^{14}C -K-Ras-YFP [103], GPI-YFP [106], ST3Gal-II-HA [129], ^{13}N GAP43-YFP [130], Rab5-GFP [130] y Rab11a-GFP [130]. LAMP1-GFP fue recibido de J.A. Martina (NIH, Bethesda, MD, USA) e lip33-YFP fue recibido de H.J.F. Maccioni (CIQUIBIC-UNC-CONICET, Córdoba, Argentina).

Cultivos celulares. Células CHO-K1 (ATCC, Manassas, VA, USA) se cultivaron a 37°C en una atmósfera conteniendo 5% CO₂, en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y antibióticos (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin). En determinados experimentos se utilizaron dos líneas celulares adicionales, derivadas de CHO-K1: un clon que expresa establemente la enzima ST8Sia-I y otro clon que expresa establemente las enzimas β 4GalNAcT-I y β 3GalT-IV. Como consecuencia de expresar diferentes glicosiltransferasas, pueden sintetizar diferentes gangliósidos (GD3 el primer clon, y GM1 y GD1a el segundo). Ambos clones ya se habían obtenido en el laboratorio y han sido ampliamente utilizados con anterioridad [101, 102, 106].

Transfecciones. Las transfecciones para la expresión transiente de las proteínas se realizaron con polietilenimina (PEI) (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) en DMEM libre de suero y libre de antibióticos, con 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{placa}$ de 35 mm del plásmido que corresponda, según las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron luego de 24 h de transfección.

Anticuerpos. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan a continuación: anticuerpo monoclonal anti-Neu3 humana producido en ratón (MBL International Corporation, Woburn, MA, USA), anticuerpo monoclonal anti-c-Myc producido en ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anticuerpo policlonal anti-c-Myc producido en conejo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anticuerpo monoclonal anti-HA producido en ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anticuerpo policlonal anti-HA producido en conejo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anticuerpo policlonal anti-Cav-1 producido en conejo (Abcam, Cambridge, UK), anticuerpo monoclonal anti- α -Tub producido en ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anticuerpo monoclonal anti-GFP producido en ratón (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), anticuerpo monoclonal anti-TfR producido en ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo monoclonal anti-GD3 producido en ratón (clon R24; A.T.C.C., Manassas, VA, USA) y anticuerpo monoclonal anti-GD1a producido en ratón (suministrado por P.H. López, INIMEC-CONICET, Córdoba, Argentina). Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan a continuación: anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor⁴⁸⁸ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor⁵⁴⁶ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor⁴⁸⁸ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor⁵⁴⁶ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a IRDye 800CW producido en cabra (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a IRDye 680RD producido en cabra (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a IRDye 800CW producido en cabra (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) y anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a IRDye 680RD producido en cabra (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE en presencia o ausencia de 5% (v/v) β -mercaptoetanol y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Las bandas de proteínas transferidas se visualizaron por tinción con 0.2 % (p/v) Ponceau S en 1% (v/v) ácido acético. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 5% (p/v) de leche en polvo descremada en buffer TBS (200 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl pH 7.5). Luego se incubaron 16 h a 4°C con el anticuerpo primario diluido en TBS conteniendo 0.05%

Tween 20 (TTBS), se lavaron tres veces con TTBS y se incubaron 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en TTBS. Las bandas de proteínas se revelaron con un sistema de detección de fluorescencia de alta resolución en el infrarojo cercano (*Odyssey Infrared Imaging System*, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). El peso molecular de las proteínas de interés se calculó basándose en marcadores de peso molecular conocido corridos en simultáneo en cada gel.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células crecidas en cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 1% (p/v) de paraformaldehído en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS, las células se permeabilizaron con 0.1% (p/v) de saponina en PBS conteniendo 1% (p/v) de BSA (PBS-BSA) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 16 h a 4°C con el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA. En este periodo de incubación, el núcleo de las células se tiñó con una dilución 1/10.000 de Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Luego de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante 2 h a 37°C con el anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA. Para la inmunofluorescencia de células no permeabilizadas se siguió el mismo protocolo, pero sustituyendo la saponina por PBS-BSA. Después de dos lavados con PBS y un lavado final con agua milli-Q, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con FluorSave (Calbiochem/EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para la marcación de los gangliósidos GD3, GD1a y GM1 presentes en membrana plasmática, las células vivas se incubaron con anticuerpo anti-GD3, anticuerpo anti-GD1a o CTx β acoplada a Alexa Fluor⁵⁵⁵ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), respectivamente, a 4°C durante 1 h antes de ser fijadas y permeabilizadas para la inmunodetección de Neu3. Las imágenes confocales se adquirieron con los microscopios confocales Olympus FluoView (Tokyo, Japan) FV1000 y FV1200, utilizando un objetivo 60x de inmersión en aceite. Se tomaron secciones de 0,8 μ m paralelas al cubreobjetos (secciones xy). Las imágenes se adquirieron con un tamaño de 1024x1024 píxeles y se procesaron con el software FV10-ASW del microscopio y con el software ImageJ. Las imágenes finales se compilaron con Adobe Photoshop CC.

Análisis cuantitativo de imágenes confocales. La cuantificación de las imágenes de microscopía se realizó con el software ImageJ. Los píxeles con fluorescencia significativa se seleccionaron aplicando un umbral para discriminarlos de aquellos correspondientes al

ruido, y se generaron máscaras binarias (con valores de 1 en la señal y 0 en los píxeles del ruido). Dichas máscaras se multiplicaron por las imágenes crudas correspondientes, utilizando la herramienta de cálculo de imágenes. Distintos ROIs (*regions of interest*) se generaron en las imágenes resultantes, según el área a cuantificar. La cantidad de GD3, GD1a y GM1 en las células (unidades arbitrarias por área celular), se determinó cuantificando la fluorescencia total de la señal del anticuerpo anti-GD3, anticuerpo anti-GD1a y de CTx β , respectivamente. No menos de 15 células se analizaron para cada condición.

Ensayos de actividad sialidasa. La actividad enzimática de sialidasas totales en homogenatos celulares se determinó usando como sustrato el ácido 4-metilumbeliferil- α -D-N-acetilneuramínico (4MU-Neu5Ac) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen final de 200 μ l, con 30 μ g de proteínas, 0.2 mM 4MU-Neu5Ac y 0.5 mM BSA en buffer citrato a pH 3.5. Las mezclas de reacción se incubaron durante 1 h a 37°C y se frenaron con la adición de 0.25 M glicina a pH 10. La fluorescencia emitida por la 4MU hidrolizada se detectó en un espectrofluorómetro FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, USA), a una longitud de onda de excitación y emisión de 365 y 445 nm, respectivamente.

Fraccionamiento subcelular. Las células crecidas en placas de Petri se lavaron dos veces con PBS y se cosecharon por *scraping* en buffer T (5 mM Tris-HCl pH 7.0) suplementado con un coctel inhibidor de proteasas (PIC) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Los extractos así obtenidos se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min para posteriormente resuspender las células en buffer T-PIC y dispersarlas con vortex cada 10 min. Luego de 30 min, los extractos se lisaron mecánicamente pasándolos 60 veces por aguja y jeringa de tuberculina, y se continuaron los vortex cada 10 min durante 30 min más. La fracción nuclear y las células enteras se removieron por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Los homogenatos totales así obtenidos se ultracentrifugaron a 400.000 g durante 1 h a 4°C utilizando un rotor TLA 120.1 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Las fracciones sobrenadante (S) y precipitado (P) se separaron, y P se resuspendió en buffer T-PIC. Las proteínas de cada fracción se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot, o bien se usaron para experimentos posteriores.

Extracción de proteínas de membrana. La fracción P obtenida luego del fraccionamiento subcelular se repartió en alícuotas iguales. La extracción de proteínas periféricas de membrana se llevó a cabo exponiendo la fracción P a 0.1 M Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a pH 11.5 durante 40 min a 4°C, mientras que la deacilación de proteínas de membrana se logró incubando la fracción P con 1 M de hidroxilamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a pH 7.4 durante 1 h a temperatura ambiente. Como control, las fracciones P se incubaron en presencia de buffer T-PIC sólo. Finalmente, las proteínas extraídas se separaron de las que siguieron asociadas a P mediante ultracentrifugación a 400.000 g durante 1 h a 4°C. Las fracciones resultantes se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot.

Tratamiento con Proteinasa K. Células intactas crecidas en placas de Petri se incubaron durante 30 min a 37°C con 100 µg/ml Proteinasa K (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en PBS. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS, se cosecharon por *scraping* y se incubaron con buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM glicina, suplementado con PIC) durante 1 h a 4°C. La fracción nuclear y las células enteras se removieron por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Los homogenatos así obtenidos se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot.

Biotinilación de superficie. Células intactas crecidas en placas de Petri se incubaron durante 1 h a 4°C con 0.5 µg/µl del reactivo impermeable a membranas EZ-Link Sulfo-NHS-SS-biotina (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA) en PBS. Luego de tres lavados con PBS, la biotina libre se quencheó por la adición de 50 mM glicina durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las células se cosecharon por *scraping* y se incubaron con buffer de lisis durante 1 h a 4°C. La fracción nuclear y las células enteras se removieron por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Las proteínas biotiniladas (B) se separaron de las no biotiniladas (NB) mediante *pull-down* con estreptavidina-agarosa (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA), según las instrucciones del fabricante. Las fracciones B y NB se ajustaron al mismo volumen final, se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot.

Partición en Tritón X-114. A las fracciones S y P obtenidas luego del fraccionamiento subcelular se les agregó 100 µl de 5% (v/v) Tritón X-114 en buffer T-PIC. Las muestras se incubaron durante 1 h a 4°C y luego se indujo la separación de fases a 37°C durante 3 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 1 min. La fase superior acuosa (A) y la inferior rica en detergente (D) se separaron y se sometieron a una nueva ronda de partición. Las fracciones resultantes se ajustaron al mismo volumen final y contenido de detergente, se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot.

Ensayos de intercambio de acilo por biotina (ABE, Acyl-Biotin Exchange). El ensayo de ABE se realizó siguiendo el protocolo descrito en [131], con algunas modificaciones. Brevemente, las proteínas provenientes de homogenatos totales de células se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se incubaron 16 h a 4°C con 3 mM de N-etilmaleimida (NEM) (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA). La NEM libre se removió realizando tres precipitaciones secuenciales con cloroformo:metanol (1:4 v/v). Cada muestra se dividió en dos fracciones: una de ellas se incubó con 1 M hidroxilamina (HAM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a pH 7.4 y 1 mM EZ-Link HPDP-Biotina (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA) por 1 h a temperatura ambiente para intercambiar los grupos S-acilo por biotina; mientras que en la otra fracción, se omitió el agregado de HAM. Luego, las proteínas se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) para remover la biotina que no reaccionó, y las muestras se incubaron con estreptavidina-agarosa (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA), durante 1 h a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se realizaron en un buffer conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 150 mM NaCl y PIC. Por último, las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 1 min, las proteínas unidas a estreptavidina-agarosa se eluyeron con DTT y las mismas se analizaron por Western blot. Una proteína Neu3 humana recombinante purificada de células HEK-293 y adquirida de la compañía Origene (Rockville, MD, USA) también se sometió al experimento de ABE.

Ensayos de entrecruzamiento. Células intactas crecidas en placas de Petri se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con 0.5 mM del reactivo permeable a membranas ditiobis(succinimidil propionato) (DSP) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) en PBS. Las moléculas libres de DSP se quenchearon por la adición de 50 mM glicina

durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS, se cosecharon por *scraping* y se incubaron con buffer de lisis durante 1 h a 4°C. La fracción nuclear y las células enteras se removieron por centrifugación a 500 g durante 5 min a 4°C. Los homogenatos así obtenidos se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot. La reversión del *cross-linking* se llevó a cabo agregando 5% (v/v) β -mercaptoetanol a las muestras.

Predicciones con herramientas bioinformáticas y modelado de Neu3. Para la predicción de segmentos transmembrana se utilizaron diferentes servidores disponibles *online*: PHOBIUS (<http://phobius.sbc.su.se/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>), PSORT (<https://www.genscript.com/tools/psort>), TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>), PHILIUS (<http://www.yeastrc.org/philius>), OCTOPUS (<http://octopus.cbr.su.se/index.php>) y TMPRED (<http://www.ch.embnet.org>). Para la predicción de elementos de estructura secundaria en la secuencia de Neu3 se utilizaron los siguientes servidores: PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), PORTER (<http://distill.ucd.ie/porter/>), YASPIN (<http://ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>) y JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). Para la predicción de cisteínas S-aciladas se utilizaron los siguientes servidores: WAP-Palm (<http://bioinfo.ncu.edu.cn/WAP-Palm.aspx>), MDD-Palm (<http://csb.cse.yzu.edu.tw/MDDPalm/>), CSS-Palm 4.0 (<http://csspalm.biocuckoo.org>), GPS-Lipid (<http://lipid.biocuckoo.org/webserver.php>), SwissPalm (<http://swisspalm.epfl.ch/>) y NBA-Palm (<http://nbapalm.biocuckoo.org/prediction.php>). El modelado de Neu3 se realizó con el servidor Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) [132] en modo automático, utilizando la estructura cristalina de Neu2 (PDB ID: 1SNT) como templado. El modelo se visualizó y analizó con el programa RasMol (Version 2.7.5.2).

Análisis estadístico. Los resultados de las cuantificaciones se presentan como la media \pm SEM. En los experimentos donde se comparan dos medias experimentales, se utilizó la prueba de t-Student para determinar si existen diferencias significativas entre ellas. En los experimentos donde se comparan más de dos medias experimentales, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) con posterior prueba post-hoc de Tukey. En todos los casos, los gráficos y su análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Es conocido que las moléculas son incorporadas al interior celular mediante procesos dependientes o independientes de vesículas recubiertas de clatrina [133, 134]. Existen evidencias que involucran a los esfingolípidos, y en particular a los GSLs, en la modulación de dichos eventos endocíticos. En este sentido, se ha descrito que una disminución en el contenido total de esfingolípidos inhibe la endocitosis independiente de clatrina; en tanto que la reducción en el contenido de GSLs inhibe selectivamente la endocitosis dependiente de caveolina en células epiteliales [135]. Por otro lado, se ha reportado que la síntesis *de novo* de esfingolípidos es necesaria para que ocurra endocitosis dependiente de clatrina en fibroblastos de ratón [136].

Durante la endocitosis, el material extracelular y parte de la MP de las células, se internalizan en vesículas que luego se fusionan con los endosomas. Existen varios mecanismos para internalizar moléculas desde la superficie celular, siendo el más conocido y caracterizado aquel que implica la internalización de receptores y sus ligandos mediante vesículas recubiertas con clatrina. Este proceso, en el cual participan un gran número de proteínas y lípidos claves, se denomina endocitosis mediada por clatrina (CME, *Clathrin-Mediated Endocytosis*). Durante la CME, ocurre una serie de eventos muy organizados que pueden resumirse de la siguiente manera: ensamblado de la cubierta de clatrina e invaginación de la MP, maduración, fisión, desensamblado de la cubierta y fusión de la vesícula desnuda con endosomas (Fig. 20).

Las cubiertas proteicas se ensamblan en la MP a partir de componentes solubles en el citosol. Cada subunidad de clatrina está compuesta por tres cadenas pesadas (CHC, *Clathrin Heavy Chain*) y tres cadenas livianas (CLC, *Clathrin Light Chain*), que juntas forman una estructura de tres patas llamada triskelion. Los triskeliones multimerizan y se ensamblan para formar un enrejado poligonal en la cara citosólica de la MP [137]. Aunque clatrina puede auto-ensamblarse en solución, su reclutamiento a membranas y montaje *in vivo* es mediado por proteínas adaptadoras, las cuales son otro componente mayoritario de las cubiertas [138].

El adaptador clásico de clatrina en MP es AP-2, un heterotetrámero compuesto por dos subunidades grandes de ~100 kDa (α y β 2), una subunidad media de ~50 kDa (μ 2) y una subunidad pequeña de ~20 kDa (σ 2) [137]. Las subunidades α y β 2 se unen a la MP, a clatrina y a múltiples proteínas accesorias. La subunidad μ 2 tiene los sitios de unión a los

cargos, que por lo general son receptores transmembrana que contienen alguna señal de internalización en su dominio citosólico, como el motivo basado en tirosina YXX ϕ (donde ϕ es un aminoácido voluminoso e hidrofóbico) o el motivo dileucina D/EXXXLL/I [138]. Por su parte, la subunidad $\sigma 2$ estabiliza el heterotetrámero y participa también en el reconocimiento del cargo. En esencia, AP-2 “adapta” los dominios citosólicos de los cargos con la cubierta de clatrina (Fig. 20).

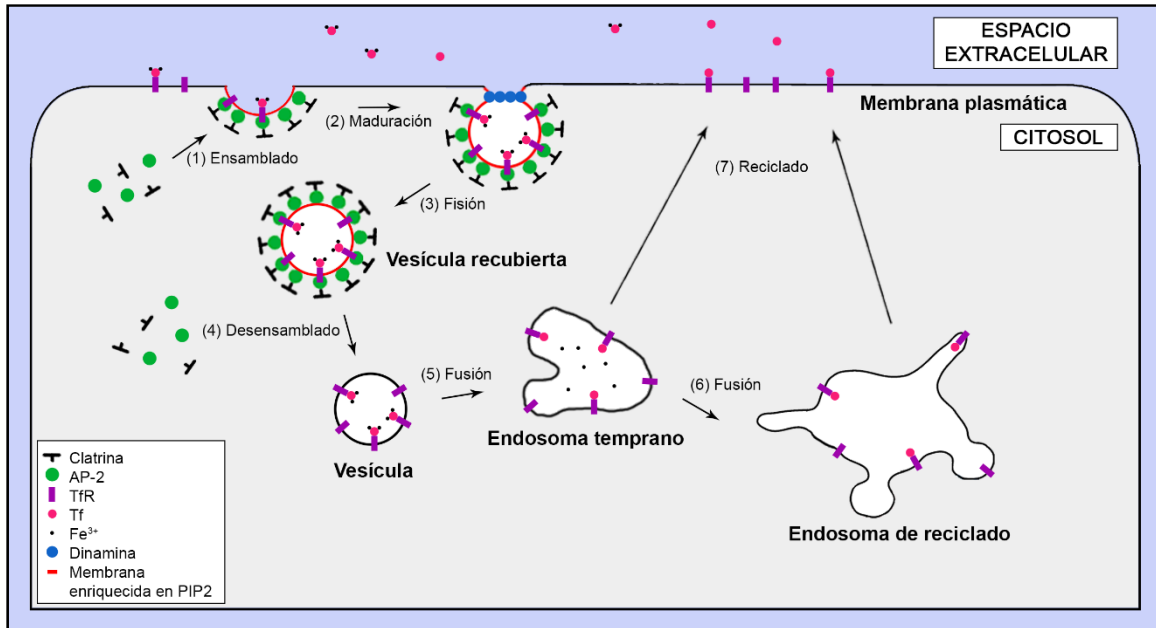


Figura 20. Esquema de la endocitosis mediada por clatrina de transferrina. Es un esquema simplificado donde se omiten varias proteínas accesorias importantes. En el texto se explica cada uno de los pasos indicados. Los primeros 5 pasos son comunes para todos los cargos que se internalizan por CME, aunque pueden intervenir otros adaptadores, además de AP-2.

El primer paso en CME es la asociación de AP-2 con la MP, mediada por fosfatidilinositol-4,5- bis-fosfato (PtdIns(4,5)P₂ o comúnmente llamado PIP₂), el cual recluta a la proteína adaptadora. La interacción es entre PIP₂ y regiones básicas presentes en las subunidades α y $\mu 2$ [139]. Dado que la distribución de fosfoinosítidos varía de una organela a otra, y que PIP₂ está altamente enriquecido en MP, la interacción entre AP-2 y este lípido asegura que el ensamblado de la cubierta de clatrina ocurra en MP. En este sentido, clatrina también participa en el transporte desde el complejo de Golgi a endosomas, pero en este caso la proteína adaptadora es AP-1, la cual es reclutada a las membranas por PtdIns(4)P, principal fosfoinosítido de la red del trans-Golgi. Una vez que AP-2 es reclutado en MP,

interacciona con los cargos a ser internalizados, y con los triskeliones de clatrina que comienzan a ensamblarse. La cubierta provoca la formación de estructuras invaginadas en la MP, denominados *pits* (CCPs, *Clathrin-Coated Pits*), que posteriormente se liberan como vesículas recubiertas. El evento de fisión de CCPs a vesículas se lleva a cabo gracias a la acción de la proteína dinamina, la cual se auto-ensambla en el cuello de las invaginaciones y forma un collar que estrangula y permite la fisión (Fig. 20). Una vez liberada de la membrana, la vesícula rápidamente pierde su cubierta, ya que una proteína con actividad fosfatasa hidroliza PIP2, lo cual hace que disminuya la afinidad de unión entre AP-2 y la membrana. Además, la chaperona Hsc70 actúa como una GTPasa que ayuda a desensamblar la cubierta, junto con la proteína auxilina [137]. De esta manera, la vesícula ahora sin revestimiento se fusiona con ET (Fig. 20).

Además de AP-2, hay muchos otros adaptadores que interaccionan directa o indirectamente con clatrina en MP y seleccionan cargos específicos para su incorporación en vesículas. Entre ellos se incluyen las proteínas ARH y Dab2 que unen dominios FXNPXY presentes en algunos receptores, y a su vez se unen a AP-2 [138].

El receptor de transferrina (TfR), responsable del transporte al interior celular de hierro, pertenece al grupo de receptores que transportan su ligando dentro de la célula vía CME. El sistema de captación de hierro por parte de las células tiene dos componentes: la transferrina (Tf), una proteína soluble que transporta hierro en la sangre, y el TfR, una proteína transmembrana que se endocita y se recicla continuamente a la MP. La afinidad de Tf por su receptor a pH neutro extracelular aumenta luego de que se unan dos átomos de hierro (Fe^{3+}) a la Tf. El complejo $\text{Tf}(\text{Fe}^{3+})\text{-TfR}$ se acumula en regiones de la MP recubiertas de clatrina gracias a que AP-2 reconoce la señal basada en tirosina $^{20}\text{YTRF}$ presente en el dominio citosólico del TfR. Luego de la fisión de la vesícula y el desensamblado de su cubierta, las vesículas desnudas se fusionan con ET. En este ambiente ligeramente ácido, la Tf libera los átomos de hierro, los cuales son transportados al citosol, mientras que el complejo apoTf-TfR es reciclado a la MP desde ET ($t_{1/2}$ de 2 min) o a través de ER ($t_{1/2}$ de 10-15 min). Al pH neutro extracelular, la apoTf se libera del receptor para iniciar un nuevo ciclo [105]. Por lo tanto, Tf cicla entre el espacio extracelular y compartimentos endosomales, evitando ingresar a la vía lisosomal y aportando hierro al interior de la célula, según sea necesario (Fig. 20).

Si bien existen evidencias que involucran a los gangliósidos en la modulación de eventos endocíticos, el rol de los mismos en estos procesos aún no se conoce en detalle.

A su vez, como se mencionó anteriormente, Neu3 está estrechamente asociada con muchas moléculas involucradas en el tráfico intracelular, como Cav-1 [94], flotilina-1, flotilina-2, subunidad β de coatómero, Sec23A/Sec23B, clatrina y sortin nexin-9 [120]. Dado que Neu3 modula el patrón de expresión de dichos glicolípidos ácidos en la superficie celular, en este trabajo de tesis se propuso investigar las consecuencias de la expresión de la sialidasa en procesos endocíticos, principalmente en CME. Para ello, se utilizó como modelo la internalización de Tf en células CHO-K1 salvajes o que sobreexpresan Neu3 humana.

RESULTADOS

Análisis del efecto de la expresión de Neu3 sobre la endocitosis de transferrina

A fin de investigar los efectos de la expresión de Neu3 en determinados procesos endocíticos, se comenzó estudiando la endocitosis de Tf, un marcador establecido de endocitosis mediada por vesículas recubiertas con clatrina. Para ello, células CHO-K1 (que expresan únicamente el gangliósido GM3) transfectadas con un vector para la expresión transiente de Neu3-Myc, se incubaron durante 45 min a 37°C en presencia de Tf acoplada a Alexa Fluor⁶⁴⁷. Posteriormente, las células se fijaron, permeabilizaron, se procesaron para la inmunodetección de Neu3 y se analizaron mediante microscopía confocal. En condiciones normales, a esa temperatura ocurre la endocitosis y la Tf se acumula principalmente en ER. Las células transfectadas con Neu3-Myc mostraron una drástica disminución en la cantidad de Tf internalizada con respecto a las células salvajes (Fig. 21a) correspondiendo aproximadamente a un 60% de inhibición (Fig. 21b). La misma disminución se observó en células CHO-K1 modificadas genéticamente para expresar diferentes tipos de gangliósidos y en células COS-7 (resultados no mostrados).

Dado que Neu3 convierte gangliósidos polisialilados en especies monosialiladas, y convierte al monosialo gangliósido GM3 en LacCer, podría estar ocurriendo que los gangliósidos sean necesarios para la internalización de Tf, y la desialilación de los mismos causada por Neu3, esté impidiendo que dicho proceso se lleve a cabo con normalidad. Para probar esa hipótesis, células CHO-K1 se incubaron con P4, un potente inhibidor de la enzima UGCG (ver Fig. 2), y por lo tanto de la síntesis de GSLs, el cual es ampliamente utilizado en nuestro laboratorio [43, 106]. La disminución del contenido de GSLs no afectó la endocitosis de Tf en células CHO-K1 (Fig. 21b), indicando que al menos la presencia de GM3 no es necesaria para que ocurra endocitosis de Tf, como ya había sido descrito con anterioridad [135]. Por el contrario, la drástica reducción en la internalización de Tf causada por Neu3 se continuó observando en células tratadas con P4 (Fig. 21b). Estos resultados indican que incluso en ausencia de gangliósidos, la sobreexpresión de Neu3 produce una marcada disminución de la endocitosis de Tf, sugiriendo que la inhibición de la internalización no es atribuible a la actividad de la sialidasa sobre estos glicolípidos.

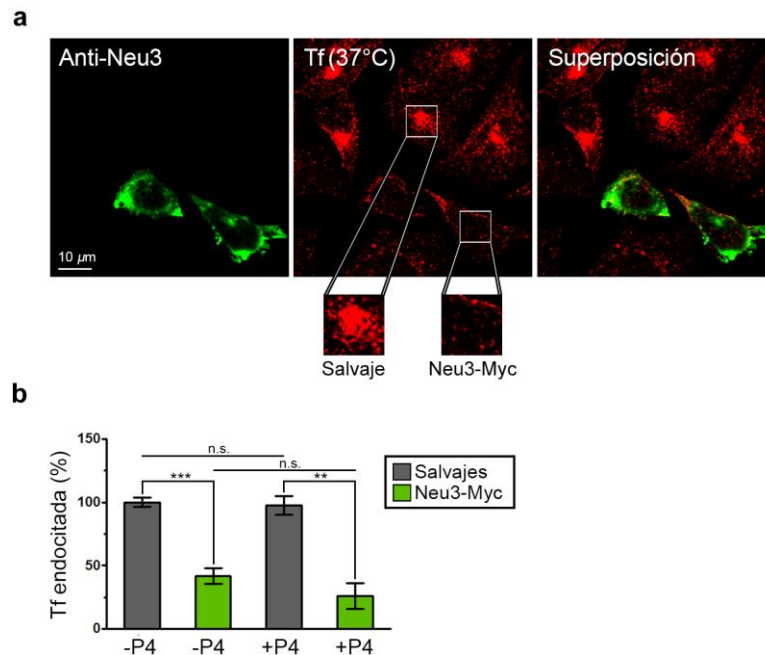


Figura 21. Endocitosis de Tf a 37°C en células que sobreexpresan Neu3. (a) Células CHO-K1 transfectadas para la expresión transiente de Neu3-Myc se incubaron durante 45 min a 37°C con Tf-Alexa⁶⁴⁷. Luego las células se fijaron, permeabilizaron y se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia para la detección de Neu3 mediante microscopía confocal. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación. (b) Cuantificación de la fluorescencia de Tf total en células salvajes y en aquellas que expresan Neu3-Myc, en ausencia (-) o presencia (+) del inhibidor de la síntesis de gangliósidos (P4). **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; n.s., no significativo.

En principio, los resultados obtenidos hasta acá pueden ser explicados por una disminución en la unión de Tf a su receptor en la superficie celular, por una alteración en la distribución subcelular del TfR, por una disminución en el proceso endocítico propiamente dicho, o por un aumento en el reciclado de Tf, en células que sobreexpresan Neu3.

Como el primer paso de este proceso es la formación del complejo Tf-TfR en la MP, se analizó la posibilidad de que Neu3 pudiera estar interfiriendo de alguna manera con la unión de Tf a su receptor. Para ello, células CHO-K1 transfectadas con la sialidasa, se incubaron durante 30 min a 4°C con Tf-Alexa⁶⁴⁷. A esa temperatura, se bloquea la endocitosis y es posible analizar la unión de Tf a su receptor en la MP. Se observó que la unión de Tf a 4°C es solo ligeramente menor en células que expresan Neu3-Myc (Fig. 22a), sugiriendo que la enzima no está interfiriendo en la unión del ligando a su receptor. Luego se realizaron estudios endocíticos de Tf a 16°C, condición establecida para bloquear el transporte a nivel de ET. Los resultados mostraron una marcada disminución de Tf en ET de células que expresan Neu3-Myc (Fig. 22b), sugiriendo que la sialidasa afecta eventos

tempranos de la endocitosis. Por otra parte, la distribución del TfR endógeno en los diferentes compartimientos subcelulares (MP, ET y ER) no se vio afectada por la expresión de Neu3-Myc (Fig. 22c), sugiriendo que la disminución en la cantidad de Tf endocitada puede deberse a una alteración cinética del proceso endocítico, mediada por Neu3.

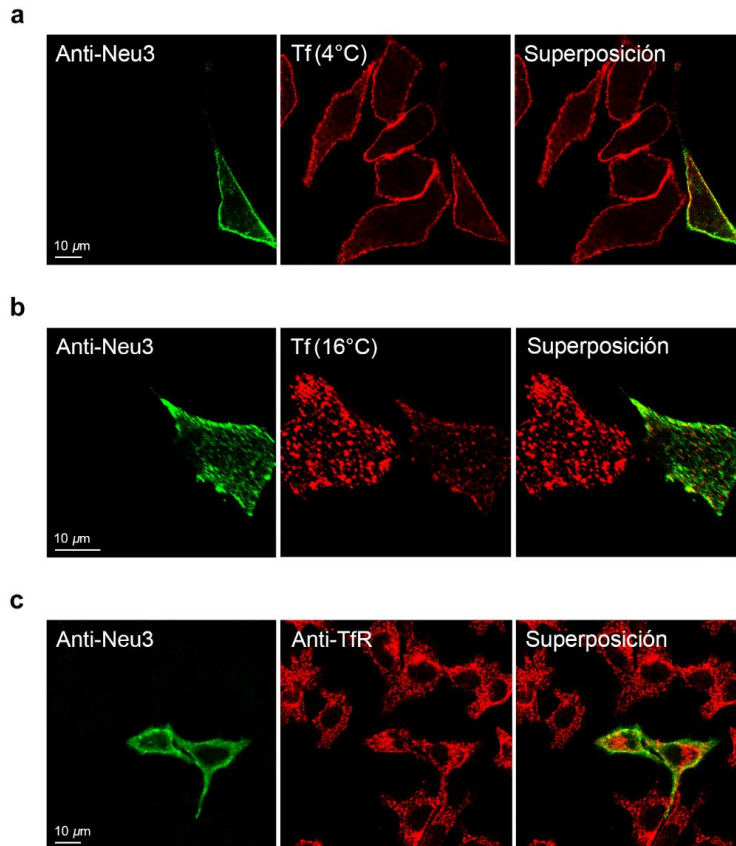


Figura 22. Efecto de Neu3 en la incorporación de Tf a diferentes temperaturas. (a) Células CHO-K1 transfectadas para la expresión de Neu3-Myc se incubaron durante 30 min a 4°C con Tf-Alexa⁶⁴⁷. Luego las células se fijaron, permeabilizaron y se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia para la detección de Neu3 mediante microscopía confocal. (b) Mismo procedimiento descrito en (a), pero incubando durante 30 min a 16°C con Tf-Alexa⁶⁴⁷. (c) Células CHO-K1 transfectadas para la expresión de Neu3-Myc se fijaron, permeabilizaron, y se sometieron a ensayos de doble inmunofluorescencia indirecta para la detección de Neu3 y de TfR mediante microscopía confocal.

Cinética de incorporación de transferrina

Posteriormente se decidió estudiar la relación entre Neu3 y el proceso endocítico de Tf en células vivas. Para ello, células CHO-K1 se transfectaron con el vector de expresión pTracerNeu3, el cual expresa Neu3-Myc y GFP bajo promotores independientes, permitiendo la detección de células que expresan Neu3-Myc como aquellas que expresan la proteína fluorescente GFP (Fig. 23a). Estas células se incubaron durante 45 min a 37°C en presencia de Tf-Alexa⁶⁴⁷ y se analizaron *in vivo* mediante microscopía confocal. Las células que sobreexpresan Neu3-Myc mostraron una drástica disminución en la cantidad de Tf internalizada con respecto a las células salvajes (Fig. 23b), al igual que se observó en experimentos con células fijadas, correspondiendo aproximadamente a un 50% de inhibición (Fig. 23c).

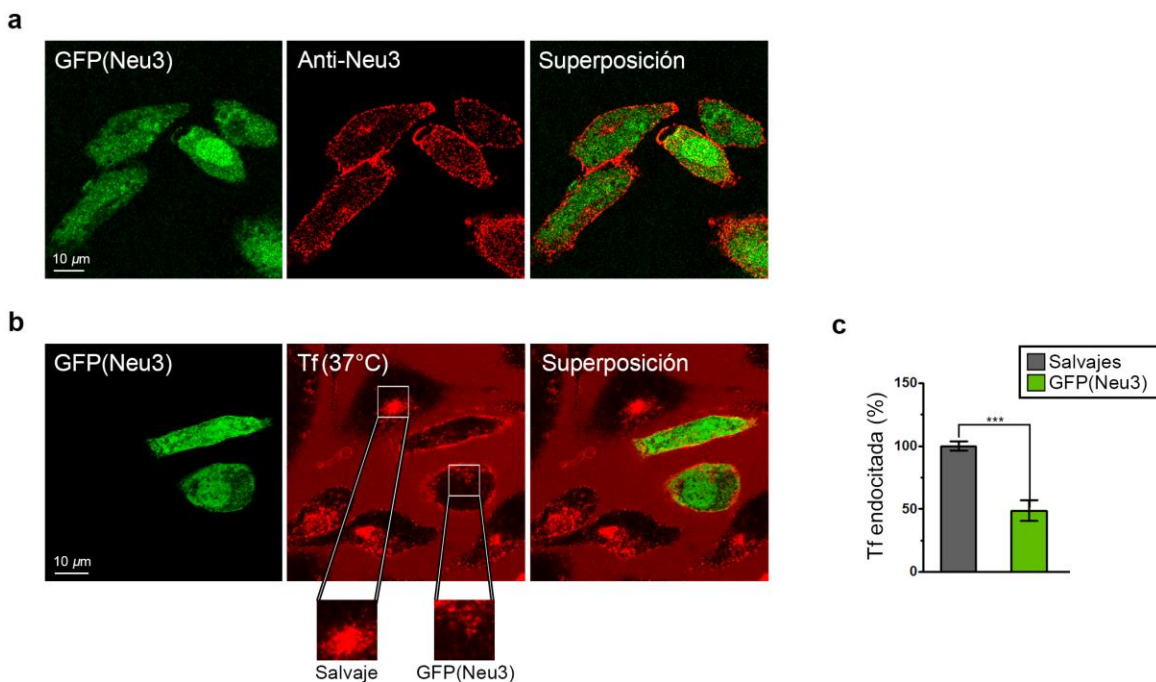


Figura 23. Efecto de Neu3 en la endocitosis de Tf a 37°C en células vivas (Parte 1). (a) Células transfectadas con pTracerNeu3 [GFP(Neu3)] se fijaron, permeabilizaron y se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia para la detección de Neu3 mediante microscopía confocal. (b) Células transfectadas con pTracerNeu3 se incubaron durante 45 min a 37°C con Tf-Alexa⁶⁴⁷ y se visualizaron *in vivo* mediante microscopía confocal. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación. (c) Cuantificación de la fluorescencia de Tf endocitada obtenida en (b) en células salvajes y transfectadas. ***, $p \leq 0,001$.

A continuación se realizaron experimentos para monitorear la internalización de Tf *in vivo*. A células transfectadas con pTracerNeu3 o con pTracer vacío, se les agregó Tf-Alexa⁶⁴⁷ a 37°C y se tomaron fotografías cada 30 seg durante 20 min. Posteriormente se continuó incubando las células con Tf y se tomaron fotografías a tiempo final (45 min). Aproximadamente a los 10 min luego del agregado de Tf, y tanto en células no transfectadas como en células transfectadas con el vector vacío, se comenzó a observar una mayor concentración de la proteína fluorescente en una región perinuclear correspondiente a ER. En tanto que en las células transfectadas con pTracerNeu3, recién a los 45 min se pudo empezar a apreciar un botón perinuclear de Tf, pero con una intensidad de fluorescencia significativamente menor que la observada en células que no sobreexpresan Neu3 (Figura 24a). Por lo tanto, estos resultados sugieren que Neu3 afecta de alguna manera la cinética de internalización de Tf, y por ende su acumulación en ER. La cuantificación de dicho fenómeno se muestra en la Figura 24b.

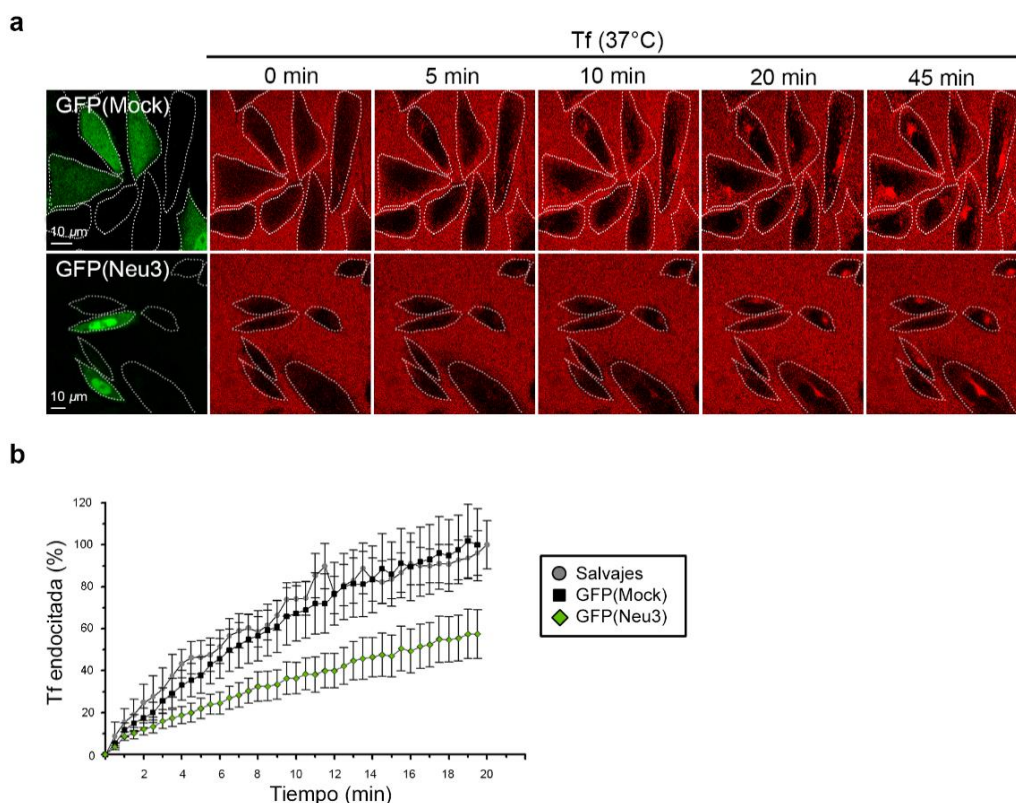


Figura 24. Efecto de Neu3 en la endocitosis de Tf a 37°C en células vivas (Parte 2). (a) Células vivas transfectadas con pTracer [GFP(Mock)] o con pTracerNeu3 [GFP(Neu3)] se incubaron a 37°C con Tf-Alexa⁶⁴⁷ y se tomaron fotografías a distintos tiempos para registrar la internalización de Tf. (b) Cuantificación de la fluorescencia de Tf total a distintos tiempos en células salvajes y transfectadas.

Análisis del efecto de la expresión de Neu3 sobre la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina

Para analizar si Neu3 interfiere en la correcta organización de los componentes de la maquinaria de CME, se decidió analizar el efecto de la expresión de la sialidasa en la localización subcelular y en el contenido de clatrina, AP-2 y PIP2.

En primer lugar se generaron clones de células CHO-K1 que expresan de manera estable CLC fusionada a YFP o la subunidad $\sigma 2$ de AP-2 fusionada a GFP. Estos clones se transfectaron para la expresión transiente de Neu3-Myc, antes de ser fijados, permeabilizados e inmunomarcados con anti-Neu3. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal mostraron el patrón puntillado esperado para CLC y AP-2 $\sigma 2$ en células salvajes, que corresponden a CCPs y a vesículas recubiertas de clatrina. AP-2 $\sigma 2$ localiza principalmente en MP, mientras que CLC tiene una distribución más amplia, que comprende MP, endosomas y complejo de Golgi (Fig. 25). Como se muestra en la Figura 25a, se observó que AP-2 $\sigma 2$ tiende a acumularse en células que sobreexpresan Neu3 con una estructuración que aún queda por identificar, mientras que no se observó esa deslocalización cuando se analizó la distribución de CLC (Fig. 25b). El número de partículas (CCPs y vesículas) conteniendo AP-2 $\sigma 2$ de tamaño normal en células que expresan Neu3-Myc fue notoriamente menor comparado al número presente en células salvajes (Fig. 25a). Esto se puede atribuir a la redistribución de AP-2 $\sigma 2$ en clústeres de mayor tamaño, mientras que el número de partículas conteniendo clatrina no se vio modificado por la sobreexpresión de Neu3 (Fig. 25b). En línea con los resultados anteriores, la disminución en la endocitosis de Tf también se observó en los clones que expresan AP-2 $\sigma 2$ o CLC transfectados para la expresión transiente de Neu3-Myc (resultados no mostrados).

Debido a que AP-2 se une a PIP2, se analizó si Neu3 puede de alguna manera regular los niveles de dicho fosfoinosítido en la MP. Para ello, células CHO-K1 se co-transfectaron con pTracerNeu3 y con un plásmido que codifica para el dominio PH de la fosfolipasa C $\delta 1$ (PH-PLC $\delta 1$) fusionado a la proteína fluorescente roja. Esta construcción es una sonda que reconoce PIP2 [140]. Como se observa en la Figura 25c, la expresión de la sialidasa no modificó la distribución subcelular ni la cantidad de sonda unida a PIP2, descartando la hipótesis planteada.

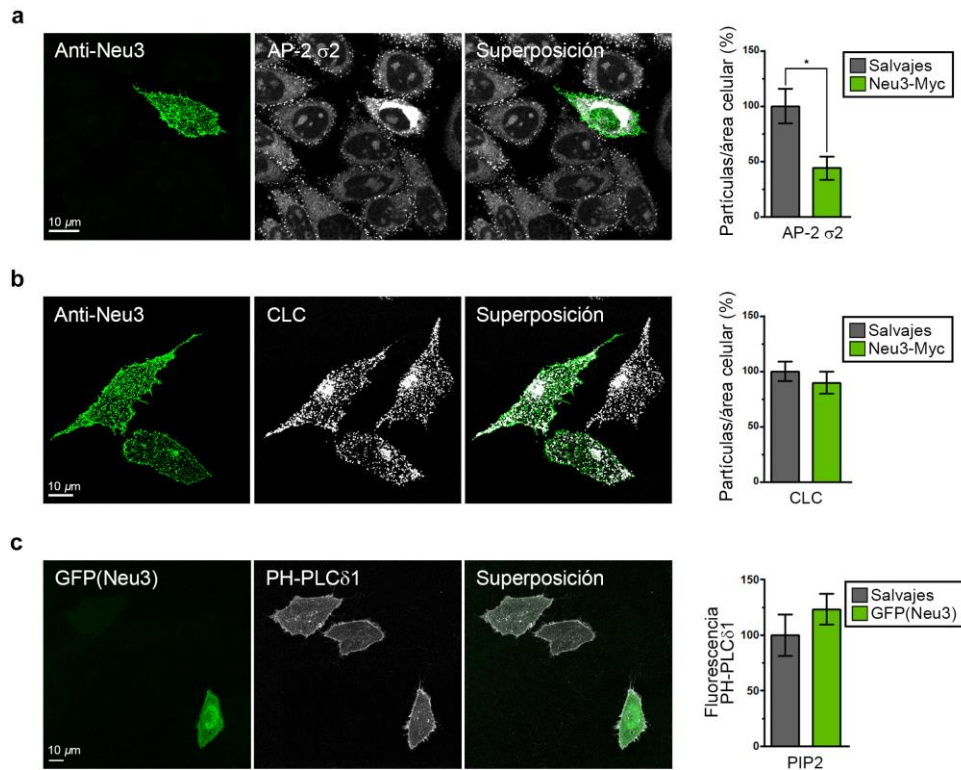


Figura 25. Distribución subcelular de componentes de la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina. Efecto de la expresión de Neu3. (a) Células CHO-K1 que expresan establemente la subunidad σ_2 de AP-2 fusionada a GFP se transflectaron para la expresión transiente de Neu3-Myc. Posteriormente se procesaron para la inmunodetección de Neu3 y se analizaron mediante microscopía confocal. A la derecha de las fotografías se muestra la cuantificación del número de partículas conteniendo AP-2 σ_2 por área celular en células salvajes y transfectadas. (b) Mismo procedimiento descrito en (a) pero en células que expresan establemente la cadena liviana de clatrina (CLC). (c) Células CHO-K1 se co-transfectaron con pTracerNeu3 y con la sonda fluorescente para detección de PIP2, PH-PLC δ_1 . Posteriormente se analizaron *in vivo* mediante microscopía confocal. A la derecha de las fotografías se muestra la cuantificación de la fluorescencia de la sonda (como una medida indirecta del contenido de PIP2) en células salvajes y transfectadas.

Estos resultados sugieren que el efecto de Neu3 en la endocitosis de Tf ocurriría probablemente afectando la organización estructural de las proteínas de la cubierta de clatrina y estaría asociado a una distribución aberrante de AP-2 σ_2 .

Posteriormente, se investigó si la expresión de Neu3 afectaba la internalización de otras moléculas. En este sentido, al igual que lo observado para Tf, la expresión de Neu3-Myc resultó en una drástica disminución en la internalización de α_2 -macroglobulina ($\alpha_2\text{M}$), correspondiendo aproximadamente a un 50% de disminución (Fig. 26). $\alpha_2\text{M}$ es una proteína plasmática que actúa como inhibidor de proteasas. Al unirse a la proteasa blanco, $\alpha_2\text{M}$ se

activa y se une al receptor LRP (*LDL Receptor-related Protein*) en MP. El complejo proteasa- α_2 M-LRP es internalizado por vesículas recubiertas de clatrina y de esta manera α_2 M es finalmente degradada en lisosomas, junto con las proteasas a las que se une, eliminándolas de la circulación [141, 142]. Una disminución similar del 50% se observó al analizar la internalización de la lipoproteína de baja densidad (LDL, *Low-Density Lipoprotein*), la cual luego de unirse a su receptor LDLR se endocita vía CME (resultados no mostrados).

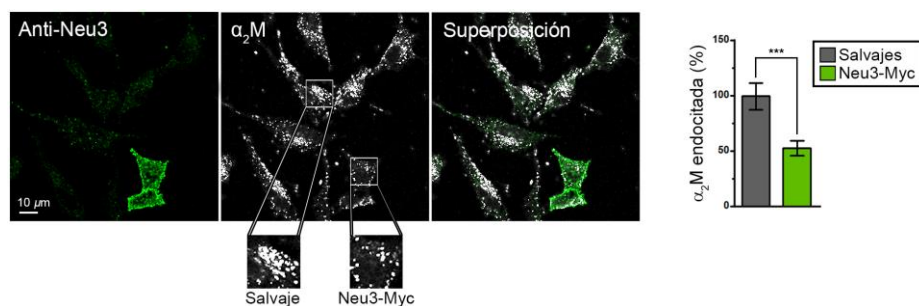


FIGURA 26. Endocitosis de α_2 M en células que sobreexpresan Neu3. Células CHO-K1 transfectadas para la expresión transiente de Neu3-Myc se incubaron durante 45 min a 37°C con α_2 M-Alexa⁵⁹⁴. Luego las células se fijaron, permeabilizaron, se procesaron para la inmunodetección de Neu3 y se analizaron mediante microscopía confocal. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación. A la derecha se muestra la cuantificación de la fluorescencia total de α_2 M en células salvajes y transfectadas.

Análisis del efecto de la expresión de Neu3 sobre la endocitosis independiente de clatrina

Si bien CME constituye la principal ruta y la más caracterizada para la internalización de receptores en células eucariotas, se han reportado varias vías de endocitosis independiente de clatrina (CIE, *Clathrin-Independent Endocytosis*). Dentro de estas últimas, uno de los mecanismos más estudiados, es aquel que involucra la formación de caveolas, pequeñas invaginaciones en la MP, enriquecidas en esfingolípidos, colesterol y en la proteína Cav-1. Se ha demostrado que esta vía endocítica está implicada en la internalización de ciertos virus, bacterias y toxinas como la toxina colérica [134].

Teniendo en cuenta que Neu3 interacciona con Cav-1 [94], y que se ha descrito que los GSLs son necesarios para que ocurra endocitosis mediada por caveolas [135], se analizó si la expresión de la sialidasa produce algún cambio en la distribución intracelular o en el grado de organización de Cav-1. Como se muestra en la Figura 27a, la expresión de

Neu3-Myc no modificó ninguno de estos aspectos. En línea con este resultado, se observó que la endocitosis de CTx β , ocurre con normalidad en células CHO-K1 que expresan GM1 y Neu3-Myc (Fig. 27b), ya que se observa la acumulación de la toxina en un compartimento perinuclear correspondiente a ER, tanto en células transfectadas como salvajes. Desafortunadamente, no existen otros marcadores establecidos de endocitosis mediada por caveolas en células CHO-K1. Por ejemplo, a pesar de que la albúmina se internaliza por esta vía en varios tipos celulares, no lo hace en células CHO-K1 [135], por lo que este aspecto deberá ser investigado en más detalle en el futuro. En conjunto, estos resultados sugieren que, en principio, Neu3 no participaría en eventos de CIE dependientes de caveolina.

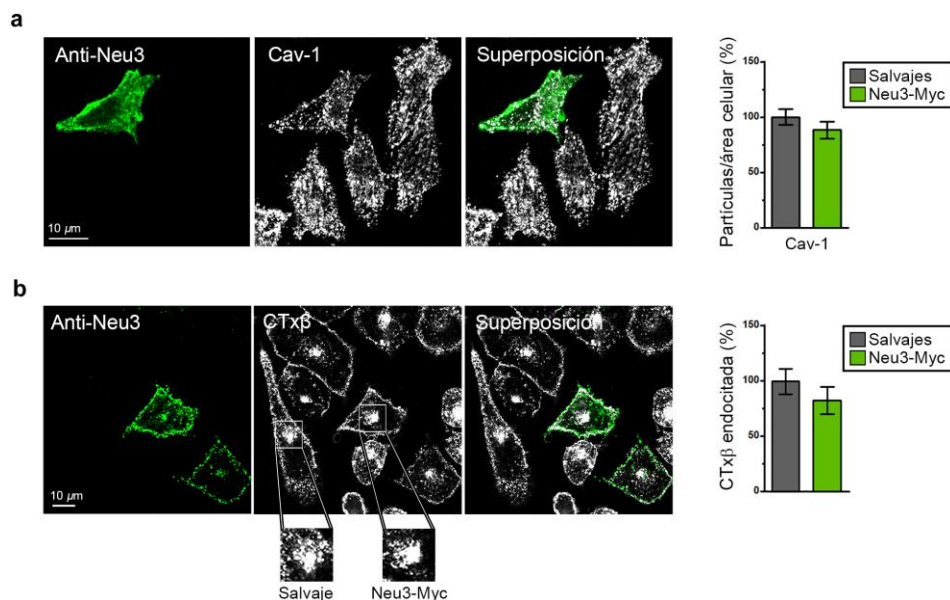


Figura 27. Distribución subcelular de Cav-1 y endocitosis de CTx β en células que sobreexpresan Neu3. **(a)** Células CHO-K1 se transfectaron para la expresión transiente de Neu3-Myc. Posteriormente se procesaron para la inmunodetección de Neu3 y de Cav-1 endógena, y se analizaron mediante microscopía confocal. A la derecha de las fotografías, se muestra la cuantificación del número de partículas conteniendo Cav-1 por área celular en células salvajes y transfectadas. **(b)** Células CHO-K1^{GM1/GD1a+} transfectadas para la expresión de Neu3-Myc se incubaron durante 45 min a 37°C con CTx β -Alexa⁵⁵⁵. Luego las células se fijaron, permeabilizaron, se procesaron para la inmunodetección de Neu3 y se analizaron mediante microscopía confocal. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación. A la derecha de las fotografías se muestra la cuantificación de la fluorescencia de CTx β endocitada en células salvajes y transfectadas.

DISCUSIÓN

En el Capítulo II del presente trabajo de tesis, se presenta una serie de evidencias que permiten establecer que Neu3 regula de alguna manera la endocitosis mediada por clatrina. Encontramos que la expresión ectópica de Neu3 en células CHO-K1 afecta drásticamente la cinética de endocitosis de Tf, impidiendo su acumulación en ER (Figs. 21 a 24). Esta reducción de la internalización de Tf se continuó observando en células con reducida o nula expresión de gangliósidos, indicando que la participación de Neu3 en este fenómeno es independiente de su actividad catalítica sobre los mismos (Fig. 21b). La expresión de Neu3 también redujo la endocitosis de α_2 M y de LDL, ambas moléculas internalizadas vía CME, mientras que no afectó la endocitosis de CTx β , la cual puede ingresar a la célula tanto por CME como por CIE (Fig. 27b) [143, 144]. En este sentido, una de las rutas principales por las que ingresa la toxina colérica es vía caveolas, y dado que no se encontró alteración alguna en la distribución subcelular ni en el contenido de Cav-1 en las células que expresan Neu3-Myc (Fig. 27a), esto podría explicar por qué la endocitosis de la toxina no se ve afectada.

La formación de vesículas recubiertas con clatrina es un proceso complejo que involucra una serie de pasos altamente regulados. Las moléculas a ser endocitadas se unen a su receptor en la MP, el cual contiene secuencias específicas de reconocimiento en su dominio citosólico mediante las cuales interaccionan con proteínas adaptadoras como AP-2. Tanto clatrina como AP-2 son los principales componentes de las vesículas que se originan en la MP, y un desbalance en sus funciones conlleva a la alteración del proceso endocítico normal. En este contexto, estudios previos demostraron claramente que AP-2 es requerido para la internalización eficiente de Tf, y que la depleción de AP-2 por siRNA, inhibe completamente la endocitosis de Tf [145]. Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron que la expresión de Neu3 resulta en una redistribución subcelular de AP-2 en comparación con la distribución puntillada normal que se observa en células salvajes (Fig. 25a). Además, se ha reportado que la ausencia de una única subunidad de AP-2 conlleva a la degradación de las otras subunidades [145], por lo que se podría asumir que la agregación de la subunidad σ_2 observada en este trabajo podría tener una repercusión en la estabilidad y localización de las otras tres subunidades, volviendo el complejo heterotetramérico poco funcional. Por el contrario, el reclutamiento de la cadena liviana de clatrina a las vesículas no pareció estar afectado por la sobreexpresión de Neu3 (Fig. 25b),

ya que no se observaron cambios en su distribución subcelular ni en la cantidad de partículas recubiertas por célula. Este resultado podría estar indicando que en células que sobreexpresan Neu3, otras proteínas adaptadoras diferentes a AP-2 pueden mantener el reclutamiento de clatrina a las vesículas, pero que cada vesícula que se forma tiene menos moléculas de AP-2 funcional, por lo tanto la internalización de los receptores (por ejemplo el TfR) se ve dificultada. Algo que resultaría de utilidad y pendiente de realizar sería la visualización de la distribución endógena de las dos subunidades de clatrina y de las cuatro subunidades de AP-2 utilizando anticuerpos específicos, para confirmar estos resultados.

Por otra parte, los fosfoinosítidos juegan un rol importante en el tráfico de membranas, y en particular PIP2 permite la unión de AP-2 a MP para iniciar la formación de las vesículas recubiertas. Además, un estudio anterior demostró que la sobreexpresión de una epsina mutante con baja afinidad por PIP2 causa que AP-2 se agregue en el citosol [146]. Sin embargo, la expresión de Neu3 no modificó ni la localización subcelular ni el contenido de PIP2 (Fig. 25c), indicando que la agregación de AP-2 ocurre por un mecanismo que es independiente de dicho fosfoinosítido.

En la Figura 28 se resumen de manera gráfica los resultados obtenidos en este capítulo.

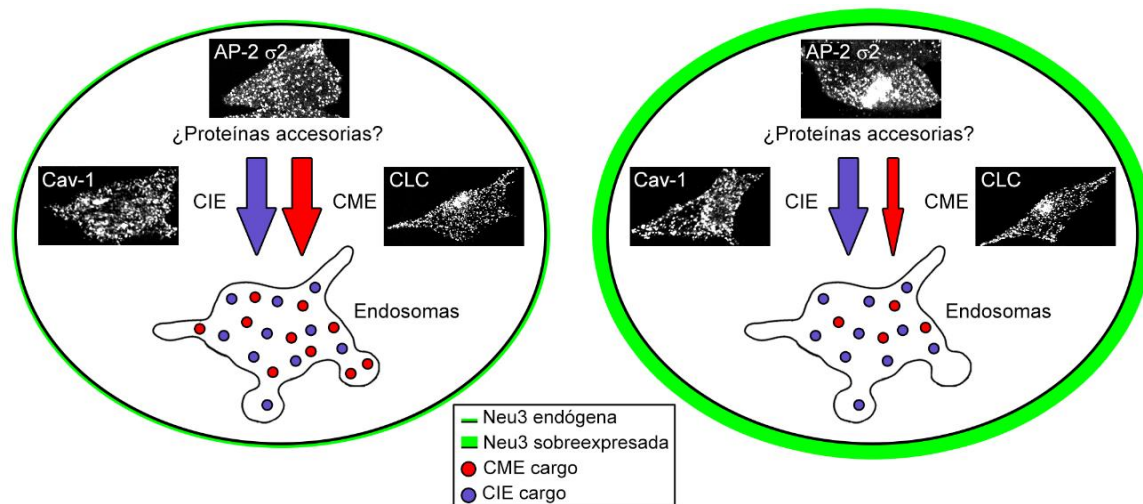


Figura 28. Representación esquemática del efecto de Neu3 sobre procesos endocíticos. La sobreexpresión de Neu3 inhibe la endocitosis mediada por clatrina (CME), al influir en la organización subcelular de la proteína adaptadora de clatrina AP-2. Por su parte, la endocitosis independiente de clatrina (CIE), en principio, no estaría afectada.

En línea con los resultados obtenidos en este trabajo, recientemente se ha publicado que Neu3 interacciona con la cadena pesada de clatrina y con SNX9 [120]. SNX9 es una proteína que remodela la membrana durante el proceso de CME y estimula la actividad GTPasa de dinamina para facilitar la fisión de la vesícula de la MP [122]. Esta observación indica que la sialidasa realmente interacciona con moléculas que participan en CME.

Por otro lado, la secuencia de Neu3 contiene una secuencia basada en tirosina (⁴⁰³YSDL) que podría ser reconocida por AP-2. Sin embargo, Y403 es la tirosina conservada que actuaría como nucleófilo en el sitio activo expuesto al espacio extracelular, por lo que es poco probable que interaccione con AP-2 en el lado citosólico de la membrana. Como se mencionó anteriormente, Neu1 sí contiene la señal de reconocimiento de proteínas adaptadoras (⁴¹²YGTL) y la mutación de Y412 causa la acumulación de Neu1 en MP [58]. Los autores concluyen que la tirosina en cuestión es la responsable de interactuar con los adaptadores de clatrina y que la mutación de la misma, impide la correcta endocitosis de la sialidasa, y por eso se acumula en MP.

CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio provee la primera observación de que existe una estrecha relación entre Neu3 y eventos endocíticos mediados por clatrina. Será necesario profundizar estos estudios para determinar exactamente cuál es el mecanismo molecular que involucra a Neu3 con este proceso. Aún queda por demostrar si Neu3 afecta directamente la asociación de AP-2 a las vesículas recubiertas con clatrina, o si es una consecuencia indirecta que involucra otras proteínas accesorias. En un futuro, cuando se disponga de buenos anticuerpos para detectar Neu3 endógena, se podría analizar si el efecto observado en la endocitosis mediante expresión transiente de la sialidasa se puede reproducir en células tumorales en las cuales Neu3 se encuentra sobreexpresada. Además resultaría muy interesante estudiar si la sialidasa también afecta la endocitosis inducida por EGF del EGFR. Se conoce que EGFR luego de unirse a su ligando y transmitir las señales mitogénicas, es internalizado mediante CME y degradado en lisosomas [147]. De esta manera se disminuye la cantidad de receptores en la superficie celular, lo cual reduce la sensibilidad subsiguiente de la célula a EGF y se reprime rápidamente la transmisión de señales. Se podría especular que si el mismo efecto observado para TfR ocurre para EGFR, el proceso de internalización de este último en células que sobreexpresan Neu3, sería más lento, por lo que las señales mitogénicas se generarían de una forma continua, contribuyendo a la proliferación celular y a la supresión de apoptosis.

Los resultados que integran el Capítulo II de esta tesis forman parte de la publicación:
Role of plasma-membrane-bound sialidase Neu3 in clathrin-mediated endocytosis.

Rodríguez-Walker M., Vilcaes AA., Garbarino-Pico E. and Daniotti JL.

Biochem. J. (2015) 470, 131–144 doi:10.1042/BJ20141550

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos. La construcción Neu3-Myc se obtuvo clonando entre los sitios de restricción EcoRI y NotI del vector de expresión constitutivo pCIneo (Promega, Madison, WI, USA), la secuencia codificante de Neu3 humana fusionada en su extremo C-terminal a un epítipo c-Myc, obtenido mediante el servicio de síntesis de GenScript (Piscataway, NJ, USA). A fin de poder realizar experimentos *in vivo*, se subclonó entre los sitios de restricción EcoRI y NotI, la secuencia de nucleótidos de Neu3-Myc en el vector de expresión constitutivo pTracer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), el cual posee diferentes promotores para expresar el gen de interés y el gen de la GFP. Esta última construcción se denomina pTracerNeu3.

Los plásmidos AP-2 σ 2-GFP y CLC-YFP, los cuales codifican para la subunidad σ 2 de AP-2 fusionada a GFP y para la cadena liviana de clatrina humana fusionada a YFP, respectivamente, fueron recibidos de J. Bonifacino (NIH, Bethesda, MD, USA). El plásmido PH-PLC δ 1-RFP que codifica para el dominio PH (*Pleckstrin Homology*) de la fosfolipasa C δ 1 (PLC δ 1), fusionado a la proteína fluorescente roja (RFP) fue recibido de S. Grinstein (The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada).

Cultivos celulares. Células CHO-K1 (ATCC, Manassas, VA, USA) se cultivaron a 37°C en una atmósfera conteniendo 5% CO₂, en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y antibióticos (100 μ g/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina). En determinados experimentos se utilizó una línea celular adicional, derivada de CHO-K1: un clon que expresa establemente las enzimas β 4GalNAcT-I y β 3GalT-IV, y como consecuencia de ello, puede sintetizar los gangliósidos GM1 y GD1a [101, 106]. Para generar clones de células CHO-K1 que expresen de manera estable AP-2 σ 2-GFP o CLC-YFP, los constructos correspondientes se transfectaron por separado en células salvajes. Luego de 48 h de expresión, las células se cultivaron en el medio descrito anteriormente suplementado con 1 μ g/ μ l de geneticina (G418) para seleccionar clones positivos. Tres colonias de células transfectadas estables se aislaron de cada condición y se mantuvieron con 0.5 μ g/ μ l del antibiótico de selección.

Transfecciones. Las transfecciones para la expresión transiente de las proteínas se realizaron con polietilenimina (PEI, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) en DMEM libre de suero y libre de antibióticos, con 0.5-1 µg/ placa de 35 mm del plásmido que corresponda, según las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron luego de 24 h de transfección.

Anticuerpos. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan a continuación: anticuerpo monoclonal anti-Neu3 humana producido en ratón (MBL International Corporation, Woburn, MA, USA), anticuerpo policlonal anti-c-Myc producido en conejo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anticuerpo policlonal anti-Cav-1 producido en conejo (Abcam, Cambridge, UK) y anticuerpo monoclonal anti-TfR producido en ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan a continuación: anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor⁴⁸⁸ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor⁵⁴⁶ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor⁴⁸⁸ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor⁵⁴⁶ producido en cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células crecidas en cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 1% (p/v) de paraformaldehído en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS, las células se permeabilizaron con 0.1% (p/v) de saponina en PBS conteniendo 1% (p/v) de BSA (PBS-BSA) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 16 h a 4°C con el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA. Luego de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante 2 h a 37°C con el anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA. Después de dos lavados con PBS y un lavado final con agua milli-Q, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con FluorSave (Calbiochem/EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Las imágenes confocales se adquirieron con un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 (Tokyo, Japan), utilizando un objetivo 60x de inmersión en aceite. Se tomaron secciones de 0,8 µm paralelas al cubreobjetos (secciones xy). Las imágenes se adquirieron con un tamaño de 1024x1024

pixeles y se procesaron con el software FV10-ASW del microscopio y con el software ImageJ. Las imágenes finales se compilaron con Adobe Photoshop CC.

Estudios endocíticos con marcadores fluorescentes. Se utilizaron los siguientes marcadores: Tf humana conjugada a Alexa Fluor⁶⁴⁷ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), CTx β conjugada a Alexa Fluor⁵⁵⁵ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y α_2 M conjugada a Alexa Fluor⁵⁹⁴ (proporcionada por G. Chiabrando, CIBICI, UNC-CONICET, Córdoba, Argentina). Antes de cualquier incubación con las moléculas fluorescentes, las células crecidas en cubreobjetos, se incubaron en DMEM libre de suero, durante 60 min a 37°C. Posteriormente, se incubaron con DMEM suplementado con Tf-Alexa⁶⁴⁷ (4 μ g/ml), CTx β -Alexa⁵⁵⁵ (0.2 μ g/ml) o α_2 M-Alexa⁵⁹⁴ (60 nM) a diferentes temperaturas. Las incubaciones a 37°C se realizaron durante 45 min, mientras que las incubaciones a 16°C y a 4°C fueron de 30 min. Posteriormente las células se lavaron y se procesaron para inmunofluorescencia o para análisis *in vivo* mediante microscopía confocal.

Microscopía confocal in vivo (Live cell imaging). Imágenes de células vivas se adquirieron con un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000, usando un objetivo de inmersión en aceite 60x. En estos experimentos, se aumentó la apertura confocal con respecto a los estudios en células fijadas, a fin de minimizar la detección de cambios de fluorescencia debidos a movimientos en el eje z (*Z-drift*) ocurridos en el lapso de tiempo en que se toman las fotografías. Células CHO-K1 se transfectaron con pTracerNeu3 o con pTracer vacío. Una hora antes de empezar los experimentos se incubaron a 37°C con DMEM sin rojo fenol libre de suero y antibióticos, y al momento de empezar, se les agregó Tf-Alexa⁶⁴⁷ (4 μ g/ml). Se siguió el proceso de internalización de Tf tomando fotos cada 30 seg durante 20 min. Las células se mantuvieron a 37°C durante el tiempo de adquisición de las imágenes, utilizando un incubador con control de temperatura y CO₂ (Tokai hit, Japón). El tamaño de las imágenes fue de 512x512 pixeles, y se utilizó una velocidad de escaneo de 10 μ s/pixel.

Análisis cuantitativo de imágenes confocales. La cuantificación de las imágenes de microscopía se realizó con el software ImageJ. Los pixeles con fluorescencia significativa se seleccionaron aplicando un umbral para discriminarlos de aquellos correspondientes al ruido, y se generaron máscaras binarias (con valores de 1 en la señal y 0 en los pixeles del

ruido). Dichas máscaras se multiplicaron por las imágenes crudas correspondientes, utilizando la herramienta de cálculo de imágenes. Distintos ROIs (*regions of interest*) se generaron en las imágenes resultantes, según el área a cuantificar. La cantidad de Tf, $\alpha_2\text{M}$ y CTx β endocitada (unidades arbitrarias por área celular), se determinó cuantificando la fluorescencia total de las células para cada marcador. Lo mismo se realizó para medir indirectamente el contenido de PIP2 de las células, cuantificando la fluorescencia total (unidades arbitrarias por área celular) de la sonda PH-PLC δ 1. La cuantificación de las partículas (CCPs y vesículas) conteniendo AP-2 σ 2, CLC o Cav-1 se realizó usando el *plugin* de análisis de partículas del programa ImageJ. No menos de 15 células se analizaron para cada condición.

Depleción de glicoesfingolípidos. Para reducir el contenido de gangliósidos y de glicoesfingolípidos neutros, se siguió el procedimiento descrito en [106, 148]. Brevemente, células CHO-K1 se trataron durante 4 días con D,L-threo-1-fenil-2-hexadecanoilamino-3-pirrolidino-1-propanol-HCl (P4) (Matreya LLC, State College, PA, USA) agregado en el medio de cultivo. Posteriormente, las células se sometieron al mismo procedimiento indicado para células no tratadas.

Análisis estadístico. Los resultados de las cuantificaciones se presentan como la media \pm SEM. En los experimentos donde se comparan dos medias experimentales, se utilizó la prueba de t-Student para determinar si existen diferencias significativas entre ellas. En los experimentos donde se comparan más de dos medias experimentales, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) con posterior prueba post-hoc de Tukey. En todos los casos, los gráficos y su análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Como consecuencia directa o indirecta de los resultados obtenidos en esta tesis, se concretaron las siguientes publicaciones:

★ **Gangliosides in cancer cell signaling.**

Groux-Degroote S., **Rodriguez-Walker M.**, Dewald JH., Daniotti JL., Delannoy P.

Libro: Gangliosides in health and disease. Series: Progress in Molecular Biology and Translational Science.

En prensa. Publicación prevista para 2/2018.

★ **Human sialidase Neu3 is S-acylated and behaves like an integral membrane protein.**

Rodriguez-Walker M., Daniotti JL.

Sci Rep. 2017 Jun 23;7(1):4167. doi: 10.1038/s41598-017-04488-w.

★ **Role of plasma-membrane-bound sialidase Neu3 in clathrin-mediated endocytosis.**

Rodriguez-Walker M., Vilcaes AA., Garbarino-Pico E., Daniotti JL.

Biochem J. 2015 Aug 15;470(1):131-44. doi: 10.1042/BJ20141550. Epub 2015 Jun 24.

★ **Metabolism of glycolipids at the cell surface.**

Daniotti JL., Vilcaes AA., **Rodriguez-Walker M.**, Ruggiero FM.

Libro: Sphingolipids: Biology, Synthesis and Functions. Series: Biochemistry Research Trends.

2015 p 67-90. ISBN: 978-1-63483-708-8. Ebook.

★ **Glycosylation of glycolipids in cancer: basis for development of novel therapeutic approaches.**

Daniotti JL., Vilcaes AA., Torres Demichelis V., Ruggiero FM., **Rodriguez-Walker M.**

Front Oncol. 2013 Dec 19;3:306. doi: 10.3389/fonc.2013.00306. Review.

REFERENCIAS

1. Merrill, A.H., *Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 6387-422.
2. Angata, T. and A. Varki, *Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective*. Chem Rev, 2002. **102**(2): p. 439-69.
3. Svennerholm, L., *Ganglioside designation*. Adv Exp Med Biol, 1980. **125**: p. 11.
4. Svennerholm, L., *Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids*. Prog Brain Res, 1994. **101**: p. XI-XIV.
5. Yu, R.K., Y. Nakatani, and M. Yanagisawa, *The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S440-5.
6. Daniotti, J.L. and R. Iglesias-Bartolomé, *Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides*. IUBMB Life, 2011. **63**(7): p. 513-20.
7. Daniotti, J.L., et al., *Glycosylation of glycolipids in cancer: basis for development of novel therapeutic approaches*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 306.
8. Yuki, N., *Guillain-Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist's journey*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2012. **88**(7): p. 299-326.
9. Schnaar, R.L., *Gangliosides of the Vertebrate Nervous System*. J Mol Biol, 2016. **428**(16): p. 3325-36.
10. Miljan, E.A. and E.G. Bremer, *Regulation of growth factor receptors by gangliosides*. Sci STKE, 2002. **2002**(160): p. re15.
11. Julien, S., et al., *How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling?* Cells, 2013. **2**(4): p. 751-67.
12. Zurita, A.R., H.J. Maccioni, and J.L. Daniotti, *Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 2): p. 465-72.
13. Bremer, E.G., J. Schlessinger, and S. Hakomori, *Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 1986. **261**(5): p. 2434-40.
14. Yoon, S.J., et al., *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 18987-91.
15. Mitsuda, T., et al., *Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11239-46.

16. van Echten-Deckert, G., M. Gurgui, and M. Guravi, *Golgi localization of glycosyltransferases involved in ganglioside biosynthesis*. *Curr Drug Targets*, 2008. **9**(4): p. 282-91.
17. Marks, D.L., et al., *Oligomerization and topology of the Golgi membrane protein glucosylceramide synthase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(1): p. 451-6.
18. Marks, D.L., et al., *Identification of active site residues in glucosylceramide synthase. A nucleotide-binding catalytic motif conserved with processive beta-glycosyltransferases*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26492-8.
19. Paulson, J.C. and K.J. Colley, *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(30): p. 17615-8.
20. Lannert, H., et al., *Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus*. *FEBS Lett*, 1994. **342**(1): p. 91-6.
21. Degroote, S., J. Wolthoorn, and G. van Meer, *The cell biology of glycosphingolipids*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15**(4): p. 375-87.
22. Roseman, S., *The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion*. *Chem Phys Lipids*, 1970. **5**(1): p. 270-97.
23. Giraudo, C.G., J.L. Daniotti, and H.J. Maccioni, *Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(4): p. 1625-30.
24. Giraudo, C.G. and H.J. Maccioni, *Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 40262-71.
25. Rao, F.V., et al., *Structural insight into mammalian sialyltransferases*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(11): p. 1186-8.
26. Kuhn, B., et al., *The structure of human α -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2013. **69**(Pt 9): p. 1826-38.
27. Volkers, G., et al., *Structure of human ST8SialIII sialyltransferase provides insight into cell-surface polysialylation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2015. **22**(8): p. 627-35.
28. Simpson, M.A., et al., *Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase*. *Nat Genet*, 2004. **36**(11): p. 1225-9.
29. Boccuto, L., et al., *A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(2): p. 418-33.

30. Boukhris, A., et al., *Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2013. **93**(1): p. 118-23.
31. Harlalka, G.V., et al., *Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis*. Brain, 2013. **136**(Pt 12): p. 3618-24.
32. Kolter, T., *Ganglioside biochemistry*. ISRN Biochem, 2012. **2012**: p. 506160.
33. Maurice, P., et al., *New Insights into Molecular Organization of Human Neuraminidase-1: Transmembrane Topology and Dimerization Ability*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38363.
34. Kolter, T. and K. Sandhoff, *Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 81-103.
35. Xu, Y.H., et al., *Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism*. J Lipid Res, 2010. **51**(7): p. 1643-75.
36. Yogeewaran, G., R.A. Laine, and S. Hakomori, *Mechanism of cell contact-dependent glycolipid synthesis: further studies with glycolipid-glass complex*. Biochem Biophys Res Commun, 1974. **59**(2): p. 591-9.
37. Roth, S. and D. White, *Intercellular contact and cell-surface galactosyl transferase activity (cell culture-mouse-radioautography-contact inhibition-cis-and trans-galactosylation)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(2): p. 485-9.
38. Roth, S., E.J. McGuire, and S. Roseman, *Evidence for cell-surface glycosyltransferases. Their potential role in cellular recognition*. J Cell Biol, 1971. **51**(21): p. 536-47.
39. Durrie, R. and A. Rosenberg, *Anabolic sialosylation of gangliosides in situ in rat brain cortical slices*. J Lipid Res, 1989. **30**(8): p. 1259-66.
40. Ivanov, S., et al., *Multiple forms of chicken liver and hepatoma Mc-29 microsomal and plasma-membrane sialyl and fucosyltransferases*. Int J Biochem, 1984. **16**(12): p. 1307-11.
41. Preti, A., et al., *Occurrence of sialyltransferase activity in the synaptosomal membranes prepared from calf brain cortex*. J Neurochem, 1980. **35**(2): p. 281-96.
42. Iwamori, M. and Y. Iwamori, *Changes in the glycolipid composition and characteristic activation of GM3 synthase in the thymus of mouse after administration of dexamethasone*. Glycoconj J, 2005. **22**(3): p. 119-26.
43. Crespo, P.M., V.T. Demichelis, and J.L. Daniotti, *Neobiosynthesis of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycosyltransferases*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29179-90.

44. Vilcaes, A.A., V.T. Demichelis, and J.L. Daniotti, *Trans-activity of plasma membrane-associated ganglioside sialyltransferase in mammalian cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(36): p. 31437-46.
45. Matern, H., et al., *Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37929-33.
46. Boot, R.G., et al., *Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 1305-12.
47. van Weely, S., et al., *Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1181**(1): p. 55-62.
48. Körschen, H.G., et al., *The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 3381-93.
49. Yildiz, Y., et al., *Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 2985-94.
50. Aureli, M., et al., *Activity of plasma membrane beta-galactosidase and beta-glucosidase*. FEBS Lett, 2009. **583**(15): p. 2469-73.
51. Aureli, M., et al., *Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts*. J Inherit Metab Dis, 2012. **35**(6): p. 1081-91.
52. Aureli, M., et al., *Cell surface sphingolipid glycohydrolases in neuronal differentiation and aging in culture*. J Neurochem, 2011. **116**(5): p. 891-9.
53. Magini, A., et al., *Glycohydrolases β -hexosaminidase and β -galactosidase are associated with lipid microdomains of Jurkat T-lymphocytes*. Biochimie, 2012. **94**(3): p. 684-94.
54. Mencarelli, S., et al., *Identification of plasma membrane associated mature beta-hexosaminidase A, active towards GM2 ganglioside, in human fibroblasts*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5501-6.
55. Magini, A., et al., *Identification and characterization of mature beta-hexosaminidases associated with human placenta lysosomal membrane*. Biosci Rep, 2008. **28**(4): p. 229-37.
56. Miyagi, T. and K. Yamaguchi, *Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions*. Glycobiology, 2012. **22**(7): p. 880-96.
57. van der Spoel, A., E. Bonten, and A. d'Azzo, *Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A*. EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1588-97.

58. Lukong, K.E., et al., *Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46172-81.
59. D'Avila, F., et al., *Identification of lysosomal sialidase NEU1 and plasma membrane sialidase NEU3 in human erythrocytes*. J Cell Biochem, 2013. **114**(1): p. 204-11.
60. Hinek, A., et al., *Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly*. J Biol Chem, 2006. **281**(6): p. 3698-710.
61. Hinek, A., et al., *Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors PDGF-BB and IGF-2*. Am J Pathol, 2008. **173**(4): p. 1042-56.
62. Lillehoj, E.P., et al., *NEU1 sialidase expressed in human airway epithelia regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) and MUC1 protein signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(11): p. 8214-31.
63. Amith, S.R., et al., *Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling*. Cell Signal, 2010. **22**(2): p. 314-24.
64. Miyagi, T., et al., *Human sialidase as a cancer marker*. Proteomics, 2008. **8**(16): p. 3303-11.
65. Chavas, L.M., et al., *Crystal structure of the human cytosolic sialidase Neu2. Evidence for the dynamic nature of substrate recognition*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 469-75.
66. Gaskell, A., S. Crennell, and G. Taylor, *The three domains of a bacterial sialidase: a beta-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll*. Structure, 1995. **3**(11): p. 1197-205.
67. Miyagi, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a plasma membrane-associated sialidase specific for gangliosides*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5004-11.
68. Rodriguez, P.E., B. Maggio, and F.A. Cumar, *Acid and enzymatic hydrolysis of the internal sialic acid residue in native and chemically modified ganglioside GM1*. J Lipid Res, 1996. **37**(2): p. 382-90.
69. Papini, N., et al., *The plasma membrane-associated sialidase MmNEU3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cells supporting its involvement in cell-to-cell interactions*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 16989-95.
70. Wang, J., et al., *Sialidase occurs in both membranes of the nuclear envelope and hydrolyzes endogenous GD1a*. J Neurochem, 2009. **111**(2): p. 547-54.

71. Wada, T., et al., *Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ganglioside sialidase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **261**(1): p. 21-7.
72. Monti, E., et al., *Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane*. *Biochem J*, 2000. **349**(Pt 1): p. 343-51.
73. Kakugawa, Y., et al., *Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(16): p. 10718-23.
74. Ueno, S., et al., *Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in renal cell carcinoma and promotes interleukin-6-induced apoptosis suppression and cell motility*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(12): p. 7756-64.
75. Nomura, H., et al., *Expression of NEU3 (plasma membrane-associated sialidase) in clear cell adenocarcinoma of the ovary: its relationship with T factor of pTNM classification*. *Oncol Res*, 2006. **16**(6): p. 289-97.
76. Kawamura, S., et al., *Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(1): p. 170-9.
77. Shiga, K., et al., *Upregulation of sialidase NEU3 in head and neck squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis*. *Cancer Sci*, 2015. **106**(11): p. 1544-53.
78. Miyata, M., et al., *Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides*. *Cancer Sci*, 2011. **102**(12): p. 2139-49.
79. Hata, K., et al., *Increased sialidase activity in serum of cancer patients: Identification of sialidase and inhibitor activities in human serum*. *Cancer Sci*, 2015. **106**(4): p. 383-9.
80. Yang, W.H., et al., *An intrinsic mechanism of secreted protein aging and turnover*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(44): p. 13657-62.
81. Yamaguchi, K., et al., *Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41132.
82. Shiozaki, K., et al., *Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(4): p. 588-94.
83. Kappagantula, S., et al., *Neu3 sialidase-mediated ganglioside conversion is necessary for axon regeneration and is blocked in CNS axons*. *J Neurosci*, 2014. **34**(7): p. 2477-92.

84. Anastasia, L., et al., *Over-expression of mammalian sialidase NEU3 reduces Newcastle disease virus entry and propagation in COS7 cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(3): p. 504-12.
85. Yamamoto, K., et al., *Potentiation of epidermal growth factor-mediated oncogenic transformation by sialidase NEU3 leading to Src activation*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0120578.
86. Bonardi, D., et al., *Sialidase NEU3 dynamically associates to different membrane domains specifically modifying their ganglioside pattern and triggering Akt phosphorylation*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e99405.
87. Wada, T., et al., *A crucial role of plasma membrane-associated sialidase in the survival of human cancer cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(17): p. 2483-90.
88. Mozzi, A., et al., *NEU3 activity enhances EGFR activation without affecting EGFR expression and acts on its sialylation levels*. *Glycobiology*, 2015. **25**(8): p. 855-68.
89. Scaringi, R., et al., *NEU3 sialidase is activated under hypoxia and protects skeletal muscle cells from apoptosis through the activation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α* . *J Biol Chem*, 2013. **288**(5): p. 3153-62.
90. Piccoli, M., et al., *NEU3 sialidase role in activating HIF-1 α in response to chronic hypoxia in cyanotic congenital heart patients*. *Int J Cardiol*, 2017. **230**: p. 6-13.
91. Takahashi, K., et al., *Sialidase NEU3 contributes neoplastic potential on colon cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(7): p. 1560-73.
92. Kato, K., et al., *Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signalling*. *Biochem J*, 2006. **394**(Pt 3): p. 647-56.
93. Yamaguchi, K., et al., *Epidermal growth factor-induced mobilization of a ganglioside-specific sialidase (NEU3) to membrane ruffles*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **346**(2): p. 484-90.
94. Wang, Y., et al., *A close association of the ganglioside-specific sialidase Neu3 with caveolin in membrane microdomains*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 26252-9.
95. Sasaki, A., et al., *Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(30): p. 27896-902.
96. Yamaguchi, K., et al., *Evidence for mitochondrial localization of a novel human sialidase (NEU4)*. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 85-93.

97. Bigi, A., et al., *Human sialidase NEU4 long and short are extrinsic proteins bound to outer mitochondrial membrane and the endoplasmic reticulum, respectively*. *Glycobiology*, 2010. **20**(2): p. 148-57.
98. Hasegawa, T., et al., *Role of Neu4L sialidase and its substrate ganglioside GD3 in neuronal apoptosis induced by catechol metabolites*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(3): p. 406-12.
99. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. ed. 2015, New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group. 1 volume (various pagings).
100. Zanchetti, G., et al., *Sialidase NEU3 is a peripheral membrane protein localized on the cell surface and in endosomal structures*. *Biochem J*, 2007. **408**(2): p. 211-9.
101. Daniotti, J.L., et al., *GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase): protein characterization and sub-golgi location in CHO-K1 cells*. *J Neurochem*, 2000. **74**(4): p. 1711-20.
102. Daniotti, J.L., et al., *GD3 expression in CHO-K1 cells increases growth rate, induces morphological changes, and affects cell-substrate interactions*. *Neurochem Res*, 2002. **27**(11): p. 1421-9.
103. Gomez, G.A. and J.L. Daniotti, *Electrical properties of plasma membrane modulate subcellular distribution of K-Ras*. *FEBS J*, 2007. **274**(9): p. 2210-28.
104. Root, K.T., S.M. Plucinsky, and K.J. Glover, *Recent progress in the topology, structure, and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae*. *Curr Top Membr*, 2015. **75**: p. 305-36.
105. Maxfield, F.R. and T.E. McGraw, *Endocytic recycling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(2): p. 121-32.
106. Crespo, P.M., A.R. Zurita, and J.L. Daniotti, *Effect of gangliosides on the distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in plasma membrane from Chinese hamster ovary-K1 cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47): p. 44731-9.
107. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. *J Mol Biol*, 1982. **157**(1): p. 105-32.
108. Nadolski, M.J. and M.E. Linder, *Protein lipidation*. *FEBS J*, 2007. **274**(20): p. 5202-10.
109. Orlean, P. and A.K. Menon, *Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(5): p. 993-1011.
110. Chamberlain, L.H. and M.J. Shipston, *The physiology of protein S-acylation*. *Physiol Rev*, 2015. **95**(2): p. 341-76.

111. Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin, *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6838-42.
112. Giacomuzzi, E., et al., *Gallus gallus NEU3 sialidase as model to study protein evolution mechanism based on rapid evolving loops*. BMC Biochem, 2011. **12**: p. 45.
113. Giacomuzzi, E., et al., *New insights on the sialidase protein family revealed by a phylogenetic analysis in metazoa*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44193.
114. Magesh, S., et al., *Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: hints for the design of selective NEU3 inhibitors*. J Mol Graph Model, 2006. **25**(2): p. 196-207.
115. Albohy, A., et al., *Insight into substrate recognition and catalysis by the human neuraminidase 3 (NEU3) through molecular modeling and site-directed mutagenesis*. Glycobiology, 2010. **20**(9): p. 1127-38.
116. Hata, K., et al., *Limited inhibitory effects of oseltamivir and zanamivir on human sialidases*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3484-91.
117. Albohy, A., et al., *Inhibitor selectivity of a new class of oseltamivir analogs against viral neuraminidase over human neuraminidase enzymes*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(9): p. 2817-22.
118. Magesh, S., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of human sialidase inhibitors. Part 1: selective inhibitors of lysosomal sialidase (NEU1)*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(2): p. 532-7.
119. Zhang, Y., et al., *Identification of selective inhibitors for human neuraminidase isoenzymes using C4,C7-modified 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid (DANA) analogues*. J Med Chem, 2013. **56**(7): p. 2948-58.
120. Cirillo, F., et al., *NEU3 Sialidase Protein Interactors in the Plasma Membrane and in the Endosomes*. J Biol Chem, 2016. **291**(20): p. 10615-24.
121. Otto, G.P. and B.J. Nichols, *The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 23): p. 3933-40.
122. Lundmark, R. and S.R. Carlsson, *Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46772-81.
123. Sato, K. and A. Nakano, *Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting*. FEBS Lett, 2007. **581**(11): p. 2076-82.

124. Shiozaki, K., et al., *Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration*. FASEB J, 2015. **29**(5): p. 2099-111.
125. Varghese, J.N., W.G. Laver, and P.M. Colman, *Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution*. Nature, 1983. **303**(5912): p. 35-40.
126. da Silva, D.V., et al., *The influenza virus neuraminidase protein transmembrane and head domains have coevolved*. J Virol, 2015. **89**(2): p. 1094-104.
127. Roggentin, P., et al., *The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer*. Mol Microbiol, 1993. **9**(5): p. 915-21.
128. Petersen, T.N., et al., *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat Methods, 2011. **8**(10): p. 785-6.
129. Ruggiero, F.M., et al., *Critical role of evolutionarily conserved glycosylation at Asn211 in the intracellular trafficking and activity of sialyltransferase ST3Gal-II*. Biochem J, 2015. **469**(1): p. 83-95.
130. Gomez, G.A. and J.L. Daniotti, *H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34997-5010.
131. Wan, J., et al., *Palmitoylated proteins: purification and identification*. Nat Protoc, 2007. **2**(7): p. 1573-84.
132. Schwede, T., et al., *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3381-5.
133. Mousavi, S.A., et al., *Clathrin-dependent endocytosis*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 1): p. 1-16.
134. Mayor, S., R.G. Parton, and J.G. Donaldson, *Clathrin-independent pathways of endocytosis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(6).
135. Cheng, Z.J., et al., *Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(7): p. 3197-210.
136. Meyer, S.G., et al., *Myriocin, an inhibitor of serine palmitoyl transferase, impairs the uptake of transferrin and low-density lipoprotein in mammalian cells*. Arch Biochem Biophys, 2012. **526**(1): p. 60-8.
137. Kirchhausen, T., D. Owen, and S.C. Harrison, *Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(5): p. a016725.

138. Traub, L.M. and J.S. Bonifacino, *Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(11): p. a016790.
139. Maldonado-Báez, L. and B. Wendland, *Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(10): p. 505-13.
140. Mason, D., et al., *Alteration of epithelial structure and function associated with PtdIns(4,5)P2 degradation by a bacterial phosphatase*. J Gen Physiol, 2007. **129**(4): p. 267-83.
141. Herz, J. and D.K. Strickland, *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 779-84.
142. Barcelona, P.F., et al., *Activated α 2-macroglobulin induces Müller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 3181-97.
143. Chinnapen, D.J., et al., *Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **266**(2): p. 129-37.
144. Torgersen, M.L., et al., *Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3737-47.
145. Boucrot, E., et al., *Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10597.
146. Ford, M.G., et al., *Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 361-6.
147. Goh, L.K. and A. Sorkin, *Endocytosis of receptor tyrosine kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a017459.
148. Giraud, C.G., V.M. Rosales Fritz, and H.J. Maccioni, *GA2/GM2/GD2 synthase localizes to the trans-golgi network of CHO-K1 cells*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 633-40.