

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**ROL DE LOS N-GLICANOS EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE
CRUZIPAINA EN *TRYPANOSOMA CRUZI***

Diez Tissera, Ana Laura – LU1036352

Licenciatura en Biotecnología

Tutores:

Dr. Caramelo, Julio Javier, Fundación Instituto Leloir

Dr. Labriola, Carlos, Fundación Instituto Leloir

Co-Tutor:

Prof. Prada, Federico, Fundación UADE

OCTUBRE 20, 2017



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre está apoyándome en todos mis proyectos y me dieron la oportunidad de estudiar esta carrera que elegí.

Al equipo del laboratorio del Dr. Julio Caramelo de la Fundación Instituto Leloir, que incondicionalmente me ayudaron en todo y a los que aprecio como amigos. Un agradecimiento especial, al Dr. Carlos Labriola, por su paciencia, dedicación, por ser mi principal maestro en la Ciencia y el trabajo de investigación.

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	5
2. Introducción.....	6
2.1 Retículo endoplásmico.....	6
2.2 N-glicosilación.....	7
2.3 Calreticulina y Calnexina.....	10
2.4 Control de calidad de plegado de glicoproteínas en el RE.....	11
2.5 N-glicosilación en <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
2.6 Cruzipaína, cisteína proteinasa principal de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3. Antecedentes.....	16
4. Objetivos e hipótesis.....	20
5. Materiales y métodos.....	21
5.1 Cultivos bacterianos.....	21
5.2 Purificación de ADN plasmídico.....	21
5.3 Transformación de bacterias.....	21
5.4 Cultivos de parásitos.....	22
5.5 Transfección de parásitos.....	22
5.6 Generación de mutantes.....	22
5.7 Preparación de extracto libre de células y fraccionamiento subcelular.....	24
5.8 Tratamiento con Concanavalina A-Sepharosa.....	25
5.9 Tratamiento con endoglicosidasa H.....	25
5.10 SDS PAGE y Western blot.....	26
6. Resultados.....	27
6.1 Generación de proteínas CZ-HA mutantes.....	27
6.2 Obtención de parásitos transfectantes y cultivos estables.....	28
6.3 Los cultivos estables expresan las CZ-HA mutantes.....	30
6.4 La concanavalina A-Sepharosa retiene las CZ-HA con oligosacáridos.....	31

6.5 Deglicosilación de las CZ-HA por endoglicosidasa H.....	32
6.6 Localización subcelular de las variantes de CZ-HA.....	34
7. Discusión.....	37
8. Bibliografía.....	40
9. Anexos.....	43

1-RESUMEN

Las proteínas que entran a la vía secretoria son sometidas a un estricto control de calidad dentro del Retículo endoplásmico (RE) para obtener su correcta conformación y así, llegar a su destino y realizar su función. En el lumen del RE, éstas sufren diversas modificaciones postraduccionales, siendo la más importante la *N*-glicosilación. La misma consiste en el agregado de oligosacáridos de alta manosa de composición Glc₀₋₃Man₉GlcNAc₂ a una Asn en la secuencia consenso Asn-Xxx-Ser/Thr, donde Xxx no puede ser Prolina. Estos oligosacáridos funcionan activamente en el control de calidad de plegado de glicoproteínas en el RE, donde participan enzimas y chaperonas que asisten la maduración conformacional y actúan como sensores del plegado. La Cruzipaina (CZ) es la principal cisteína proteinasa del parásito *Trypanosoma cruzi*. Dicha proteína pertenece a la vía secretoria, siendo su destino final el lisosoma. CZ posee tres sitios potenciales de *N*-glicosilación e interactúa con todos los componentes del control de calidad de plegado de glicoproteínas. En este trabajo se investigó el papel de los *N*-glicanos individuales sobre la maduración y tráfico intracelular de CZ.

ABSTRACT

Proteins that enter the secretory pathway are subjected to a strict folding quality control in the ER before attaining its correct conformation and reaching their final destination. In the ER lumen, they undergo several post-translational modifications, being the *N*-glycosylation the most important. This modification consist in the addition of the Glc₀₋₃Man₉GlcNAc₂ high mannose oligosaccharides to Asn residues displayed in the consensus sequence Asn-Xxx-Ser/Thr, where Xxx cannot be proline. These oligosaccharides participate actively in the folding quality control system of glycoprotein in the ER, which involves several enzymes and chaperones that assist in the folding maturation and act as conformational sensors. The *Trypanosoma cruzi* **Cruzipain (CZ)** is the main cysteine proteinase of this parasite. This protein belongs to the secretory pathway, being the lysosome its final destination. CZ possesses three potential *N*-glycosylation sites and interacts with all the components of the glycoprotein folding quality control system. In this work we investigated the effect of each *N*-glycosylation site in the conformational maturation and intracellular trafficking of CZ.

2-Introducción

Las proteínas, junto con los lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos, son los componentes principales de las células vivas. Estas macromoléculas son los pilares fundamentales para un correcto metabolismo celular general. Las proteínas cumplen una amplia variedad de funciones biológicas dentro de las células, por ejemplo sostén, actividades enzimáticas, regulatorias, inmunológicas, etc. Es decir, los polipéptidos están implicados en prácticamente todas las actividades celulares.

A diferencia de una célula procariota, que no posee organelas, las células eucariotas son sistemas altamente compartimentalizados y si bien la mayoría de las proteínas son sintetizadas en el citosol, muchas de ellas cumplen funciones en organelas diferentes.

Un tercio de las proteínas sintetizadas en el citosol siguen la vía secretoria. Éstas cumplirán funciones en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, membrana plasmática y en el espacio extracelular. El tránsito de proteínas dentro de las células está altamente regulado mediante secuencias aminoacídicas llamadas ‘secuencias de sorting’. En el caso particular de proteínas que seguirán la vía secretoria, esta secuencia es el péptido señal que permite la entrada al retículo endoplásmico, la primer organela de la vía secretoria (Alberts, 2010).

2.1 Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es una organela compleja formada por un sistema de sacos membranosos que se extiende desde el núcleo hasta el aparato de Golgi. La membrana del RE separa dos ambientes muy distintos, el del citosol y el del lumen del retículo endoplásmico. Esta membrana media la transferencia selectiva de moléculas entre ambos compartimentos.

Si bien el RE cumple varias funciones entre las que se destaca la biosíntesis de lípidos y la regulación del calcio intracelular, una de las principales es la de recibir las proteínas que están siendo translocadas de manera cotraduccional desde el citosol, vía péptido señal, y que seguirán la vía secretoria dentro de la célula.

Dentro del RE los polipéptidos deben adoptar su estructura tridimensional correcta. Y en el caso de multímeros, ensamblarse. Aquellas proteínas que no logren adoptar su estructura terciaria y/o cuaternaria correctamente, no podrán avanzar en la vía secretoria. En este sentido, el RE es un paso limitante en el tráfico hacia el aparato de Golgi, existiendo en el mismo un estricto mecanismo de control de calidad de plegado.

Durante el proceso de plegado, las proteínas pueden adoptar estructuras intermedias pasando por estadios de conformaciones extendidas, cuando emergen de los ribosomas, a otros de estructura más compacta en etapas más avanzadas. Debido a que el hacinamiento molecular existente en el lumen del RE (alta concentración proteica) favorece notablemente los procesos de agregación proteica, el camino productivo hacia el plegado debe ser asistido. Por lo tanto, el RE dispone de una batería de enzimas y proteínas facilitadoras del plegado, entre las que se encuentran: chaperonas (Naylor DJ, et. al. 2001), proteínas disulfuro isomerasas (PDIs, participan en la formación de puentes disulfuro) y peptidil prolil isomerasas (PPIasas, participan en la isomerización cis-trans de las uniones X-prolina) (Jessop CE, et. al. 2009).

Otro de los eventos importantes dentro del lumen del RE son las modificaciones postraduccionales, las cuales pueden estar involucradas en el proceso de plegado. Por lejos la más importante es la *N*-glicosilación. Esta modificación afecta a alrededor del 80% de las proteínas que ingresan a la vía secretoria (Caramelo JJ, et. al. 2015).

2.2 *N*-Glicosilación

La glicosilación de proteínas en el RE cumple funciones tanto biológicas como biofísicas. Entre las primeras se puede mencionar su participación en definir el destino intracelular de proteínas, en los procesos de reconocimiento célula-célula en el caso de proteínas de membrana plasmática y en la respuesta inmune, entre otras. En cuanto a las funciones biofísicas se destaca la naturaleza hidrofílica del oligosacárido que aumenta la solubilidad de las proteínas durante el plegado. Asimismo, el gran volumen de los oligosacáridos reduce la exposición superficial de las proteínas, disminuyendo los contactos inespecíficos proteína-proteína. En este sentido, los oligosacáridos pueden ser vistos como una chaperona química unida covalentemente a las proteínas.

La *N*-glicosilación comienza en la mayoría de las células eucariota con la adición de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Figura 1) a residuos de asparagina (Asn) en las proteínas nacientes a partir de un glicolípido (dolicol pirofosfato- $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). La transferencia de dicho oligosacárido de alta manos es realizada por el complejo enzimático denominado oligosacariltransferasa (OST). El mismo transfiere el oligosacárido en bloque desde el glicolípido a asparaginas ubicadas en la secuencia consenso Asn-Xxx-Ser/Thr, donde Xxx no puede ser Prolina. Esta secuencia se la denomina “secuón” de *N*-glicosilación (Figura 1)(Caramelo, et. al. 2015).

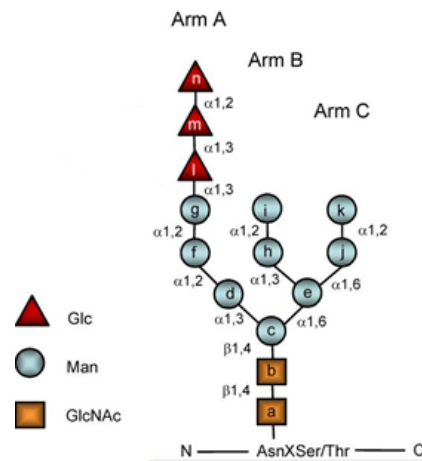


Figura 1: Oligosacárido de alta manosa

El oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G_3M_9) comienza a ser procesado inmediatamente luego de su transferencia a la proteína naciente. Los tres residuos de glucosa (Glc) son removidos por dos glucosidasas específicas localizadas en el RE. La glucosidasa I (GI), específica de uniones $\alpha 1,2$, hidroliza el residuo de Glc más externo, mientras que la glucosidasa II (GII), específica de uniones $\alpha 1,3$, remueve los dos residuos de Glc mas internos. También algunas manosas pueden ser removidas por manosidasas específicas localizadas en el RE (Figura 2). (Helenius, 1994)

Los oligosacáridos M_9 , M_8 , etc. formados por deglicosilación y demanosilación parcial pueden ser reglicosilados por la enzima UDP-Glc:glicoproteína

glucosiltransferasa (UGGT), la cual emplea UDP-Glc como dador de glucosa. La adición de este residuo regenera al oligosacárido intermediario $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Figura 2 A).

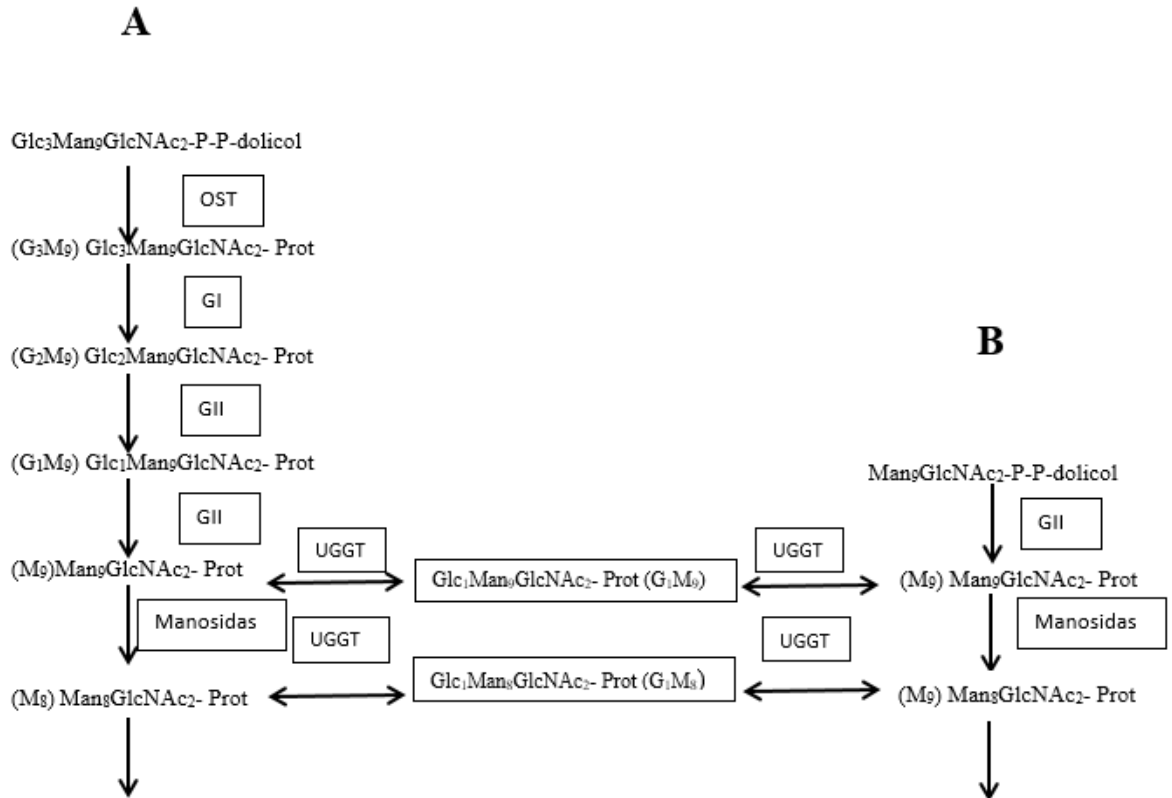


Figura 2: Reacciones iniciales del procesamiento de oligosacáridos transferidos a proteínas (A: mamíferos, B: *Trypanosoma cruzi*)

La UGGT se encuentra principalmente en el RE y en el compartimiento intermedio entre RE y aparato de Golgi. Es una proteína soluble y monomérica que posee alrededor de 1600 aminoácidos. La misma presenta un péptido señal hidrofóbico en su extremo N-terminal y un motivo KDEL en el extremo C-terminal (péptido de retención/recuperación), el cual mantiene a la proteína en el lumen del RE (Zuber et al., 2001). La actividad catalítica reside en el dominio C terminal (20% de la proteína) con residuos altamente conservados, mientras que el dominio N-terminal (80% de la proteína) es el responsable de reconocer conformaciones no nativas de glicoproteínas (Arnold SM, et al. 2003). El rasgo característico de la UGGT es que puede glucosilar aquellos oligosacáridos de glicoproteínas cuya porción proteica está parcialmente desplegada. Una

vez que las proteínas adquieren su conformación nativa no son más sustratos de la UGGT (Caramelo JJ, et al, 2003). Esta fue la primera evidencia de un sensor de plegado en el RE, donde aquellas proteínas que todavía no habían alcanzado su conformación correcta eran marcadas con una glucosa en los oligosacáridos de alta manosa (Sousa M, et. al. 1995).

2.3 Calreticulina y Calnexina

Posteriormente, fueron descritas dos lectinas presentes en el RE que funcionan como chaperonas no convencionales, la calreticulina (CRT) y la calnexina (CNX). La particularidad principal de estas lectinas es que son capaces de unirse a oligosacáridos de alta manosa solamente cuando la composición de los mismos es $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G_1M_9).

CRT es una proteína soluble del RE que posee aproximadamente 400 aminoácidos y pesa 46 kDa. Si bien la localización de CRT es predominante en el RE, se la ha encontrado en otras localizaciones subcelulares en pequeñas cantidades. No se conocen bien las funciones que allí cumple (Gold et al., 2010), (Raghavan M, et al. 2013). CNX es una proteína integral de membrana tipo I que se localiza en el RE, tiene 572 aminoácidos y pesa 65 kDa. La expresión de ambas lectinas es inducida por varios tipos de estrés como por ejemplo, shock térmico, metales pesados, privación de amino ácidos, agentes movilizadores de calcio, entre otros (Gold LI, et. al. 2010).

Estas lectinas presentan un 45% de similitud en su secuencia, con dominios y estructura similar. En su extremo N-terminal tienen un péptido señal y ambas comparten un dominio similar en forma de β -sándwich responsable de su actividad como lectina. Este dominio es seguido por un dominio rico en prolinas (dominio P) y por el dominio C-terminal ácido rico en ácidos glutámico y aspártico (Wada I, et. al. 1995).

2.4 Control de calidad de plegado de glicoproteínas en el RE

Lo expuesto anteriormente llevó a postular la existencia en el RE de un sofisticado sistema de control de calidad de plegado de glicoproteína. Dicho sistema reconoce fallas en el plegado o ensamblado de las glicoproteínas, gatillando su retención en el RE, para luego ser transportadas al citosol donde serán degradadas en el proteasoma (Hebert DN, et. al. 2010).

Este sistema consta de tres componentes principales: GII, UGGT y CNX y/o CRT. (Hammond C, et. al, 1994) (Peterson et. al. 1995). El procesamiento del glicano comienza en el RE luego de la transferencia a la proteína naciente. La acción secuencial de GI y GII elimina los dos residuos de Glc más externos, generando oligosacáridos intermediarios monoglucosilados. Por otro lado, una α -manosidasa del RE puede eliminar una o dos manosas del brazo B y C (Figura 1). Estas especies monoglucosiladas son reconocidas por CNX y/o CRT, las cuales se pueden asociar a la PDI ERp57 y a la PPIasa Ciclofilina B. Los complejos formados entre las lectinas y las glicoproteínas se disocian por la remoción a través de GII de la última Glc. En este punto, si la glicoproteína ha adquirido su plegado correcto, seguirá su tránsito hacia el aparato de Golgi. En caso contrario, las glicoproteínas mal plegadas serán reconocidas por la UGGT. Esta enzima, gracias a su actividad como sensor de la calidad de plegado, readicionará el residuo de glucosa removido por la GII, regenerando así la interacción con CNX y/o CRT (Figura 3).

La interacción con las lectinas previene la salida de las glicoproteínas mal plegadas del RE y aumenta la eficiencia de plegado al inhibir la formación de agregados. Por otra parte, la PDI ERp57 asociada a las lectinas facilita la correcta formación de los puentes disulfuro de las glicoproteínas unidas a las lectinas.

De esta manera, el RE juega un rol sumamente importante en la vía secretoria. Para poder salir del mismo, las proteínas deberán adoptar correctamente su estructura terciaria y/o cuaternaria. En el caso particular de las glicoproteínas (aproximadamente 80%), las mismas son sometidas a un estricto control de calidad plegado (Figura 3). Aquellas proteínas que no pasen dicho control serán retenidas en el RE y marcadas para posterior retrotranslocación al citosol y degradación en el proteasoma. Dicho proceso se conoce como ERAD (ER Associated Degradation).

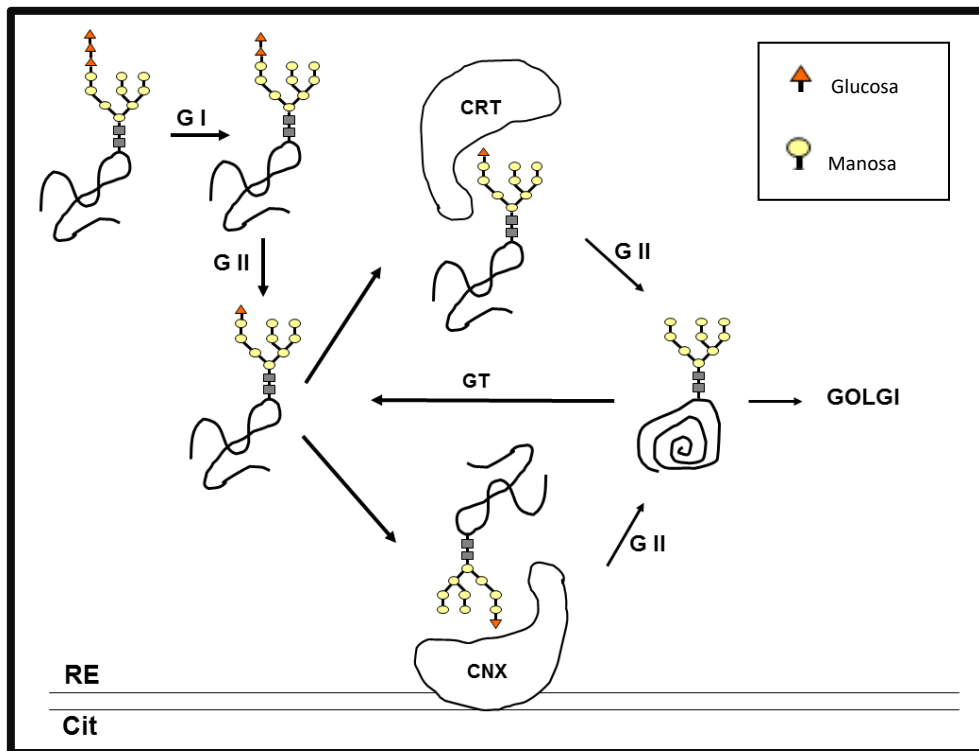


Figura 3: Esquema del control de calidad de glicoproteínas en el RE.

2.5 N-glicosilación y plegado en *Trypanosoma cruzi*

Los trypanosomátidos son protozoos parásitos flagelados pertenecientes al orden Kinetoplastida. Los mismos son causantes de diversas enfermedades del hombre y de animales domésticos en amplias regiones del planeta. En particular, *T. cruzi* es el causante de la enfermedad de Chagas, una endemia caracterizada por un proceso crónico y debilitante que afecta a aproximadamente 20 millones de personas en América Latina (Moncayo A, et. al. 2009). El agente transmisor del *T. cruzi* es el *Triatoma infestans*, conocido con el nombre quechua 'Vinchuca'. El *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo, que involucra dos formas replicativas (amastigotes y epimastigotes) y dos no replicativas pero infectivas (trypomastigotes sanguíneos y metacíclicos), encontrándose una de cada una de ellas en el hospedador mamífero y en el insecto vector (Figura 4).

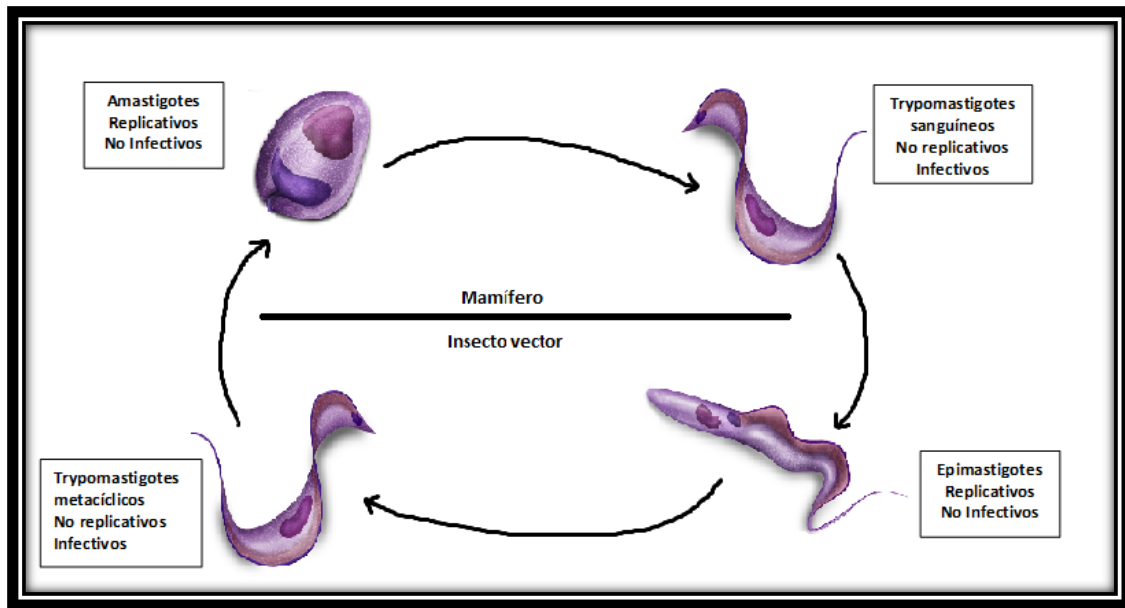


Figura 4: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Los trypanosomátidos tienen características particulares comparadas con la mayoría de las células eucariotas. En cuanto a las características genéticas se pueden destacar: la presencia de un sector especializado de la mitocondria llamado kinetoplasto con DNA distribuido en minicírculos y en maxicírculos entrelazados formando una gran red (DNA kinetoplastido); el ‘editing’, que consiste en la adición y remoción de uridinas a moléculas de mRNA generando nuevos marcos de lectura (Hajduk et al. 1993); ausencia de intrones y un proceso conocido como ‘trans splicing’ mediante el cual todos los mensajeros maduros se generan por el ligado de un miniexón al extremo 5’ del mRNA propiamente dicho. En cuanto a las características bioquímicas diferenciales de los trypanosomátidos, podemos mencionar la glicólisis compartimentalizada (glicosoma) y la presencia del bolsillo flagelar, una invaginación de la membrana plasmática alrededor del flagelo que es clave para exocitosis y endocitosis.

Por último cabe mencionar que la vía de *N*-glicosilación en estos parásitos difiere de la que ocurre en la mayoría de los mamíferos. La *N*-glicosilación en *T. cruzi* se define por ciertas características tales como la incapacidad de sintetizar dolicol-P-Glc, el cual es el dador de Glc para el precursor glucosilado $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Figura 1). Por lo tanto, los oligosacáridos transferidos por la OST del parásito son de composición

Man₉GlcNAc₂ (Figura 2 B). La OST no requiere la presencia de unidades de glucosa en el oligosacárido con el fin de catalizar una reacción de transferencia eficiente. *T. cruzi* dispone de GII, pero carece de GI, consistente con el hecho que los oligosacáridos transferidos no poseen unidades de Glc. Asimismo, el parásito posee CRT pero no CNX, y dispone de UGGT. De hecho, la actividad de esta enzima fue detectada por primera vez en estos parásitos (Parodi AJ, 1993). En resumen, *T. cruzi* dispone de todos los elementos necesarios para ejercer un control de calidad de plegado de glicoproteínas en el RE.

2.6 Cruzipaina, cisteína proteinasa principal de *T. cruzi*

Las proteinasas lisosomales de *T. cruzi* participan en la nutrición del parásito a expensas del hospedador, existiendo evidencias que sugieren su rol en la entrada del trypomastigote en la célula hospedadora (Harth G, et. al. 1993).

La cruzipaina (CZ) (nombre dado para enfatizar su homología con la catepsina L y papaína, a cuya superfamilia pertenece) es una cisteína proteinasa mayoritariamente lisosomal, aunque hay evidencias de otras localizaciones subcelulares en forma minoritaria. La enzima ha sido purificada a homogeneidad y secuenciados algunos de sus genes (Cazzulo JJ, et. al. 1989). En SDS PAGE la CZ se presenta como una doble banda ancha (según la cepa) con una masa molecular aparente entre 45-55 kDa, posiblemente por la presencia de isoformas de la enzima, la cual está codificada por alrededor de 130 genes (Campetella, et. al. 1992).

La purificación de cantidades considerables de enzima es posible porque ésta es mayoritaria en extractos crudos del parásito (en particular en el estadio epimastigote), pudiendo calcularse que constituye aproximadamente el 5% de la proteína total soluble de la célula (Cazzulo, 1984).

La CZ es una endoproteínasa capaz de degradar proteínas como caseína, albúmina bovina, hemoglobina, y sustratos cromogénicos y fluorogénicos sintéticos. Dado que en el sitio activo participa una cisteína reducida, la enzima es fácilmente inhibida por reactivos tales como E64 y iodoacetamida (Cazzulo JJ, 1994). También existen inhibidores proteicos naturales como las cistatínas, stefinas y los kininógenos. Desde un

punto de vista clínico, la CZ es considerada un promisorio blanco para el desarrollo de agentes antichagásicos (Stoka V, et. al. 1995).

CZ se sintetiza como una proteína formada por cuatro dominios: un pre-dominio (péptido señal) de 18 aminoácidos (aa) que se pierde al entrar al RE; un pro-dominio de 104 aa que se pierde probablemente al activarse la proteasa en el lisosoma; un dominio catalítico de 214 aa, homólogo a la catepsina L de mamífero; y un dominio C-terminal de 130 aa, característico de las cisteínas proteinasas de trypanosomátidos.

La enzima tiene 3 sitios potenciales de *N*-glicosilación, dos en el dominio catalítico (Asn 169 y Asn 292) y uno en la extensión C-terminal (Asn 377) (Figura 5).

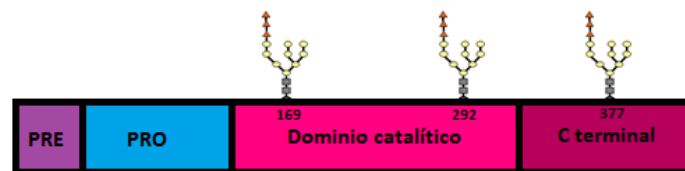


Figura 5. Esquema de la CZ.

En cuanto a las funciones de la CZ se puede mencionar: (1) digestión intralisosomal de proteínas, exógenas o del propio parásito; (2) protección contra la respuesta inmune del hospedador, ya sea por digestión intralisosomal de inmunoglobulinas endocitadas o por destrucción del fragmento Fc ligadas a los respectivos antígenos que imposibilita activar el complemento; (3) participa en la penetración del trypomastigote en la célula de mamífero (Harth, et. al. 1993).

Dado que la CZ es una glicoproteína de la vía secretoria, la misma es sometida al control de calidad de plegado de glicoproteínas. Nuestro interés radica en el análisis del plegado y tráfico intracelular de la CZ, basándonos en el estudio del rol que juegan los *N*-glicanos. Para ello, analizaremos el grado de ocupación de los secuencias y su papel en la cinética de llegada a lisosoma.

3. Antecedentes

Estudios previos indican que la CZ es una enzima lisosomal de *T. cruzi* que atraviesa la vía secretoria. Dado que es una glicoproteína de alta manosa se verificó que la CZ es glucosilada *in vivo* por la UGGT (Labriola, et. al. 1995).

Como se mencionó anteriormente, los oligosacáridos monoglucosilados en *T. cruzi* solo pueden ser formados vía UGGT, a diferencia de lo que sucede en la mayoría de las células eucariotas en donde se obtienen también por deglucosilación parcial del oligosacárido transferido inicialmente (Figura 2 A). Este es un punto central para el trabajo que será desarrollado aquí.

Por otra parte, se demostró la existencia de CRT y no de CNX en *T. cruzi*. El gen que codifica para dicha proteína fue secuenciado, clonado en un vector de expresión bacteriano y, con la proteína recombinante, se generaron anticuerpos. Se comprobó que la CRT de *T. cruzi* funciona exclusivamente como una lectina que une oligosacáridos monoglucosilados, no habiendo interacciones proteína-proteína entre CRT y sus sustratos. (Labriola, et. al. 1999)

El agregado de 2-deoxinojirimicina (DNJ), un análogo de la Glc que inhibe a la GII, a cultivos de parásitos, provoca que los oligosacáridos monoglucosilados no puedan deglucosilarse. Este mismo inhibidor agregado a otro tipo de células eucariotas provocaría una acumulación de oligosacáridos di y triglucosilados (DNJ también inhibe a GI) (Figura 2 A). Por este motivo, dada las características particulares de su vía de *N*-glicosilación, el uso de *T. cruzi* como modelo experimental nos asegura mediciones más directas acerca del rol de los *N*-glicanos. Mediante el agregado de DNJ y realizando experimentos de pulso-caza se demostró que la CZ, en estadio monoglucosilado, tiene un retraso en la llegada a su destino final (Figura 6). Este retraso, concordante con el modelo de control de calidad antes descrito, es provocado por la CRT en el RE (Figura 7) (Labriola, et. al. 1999).

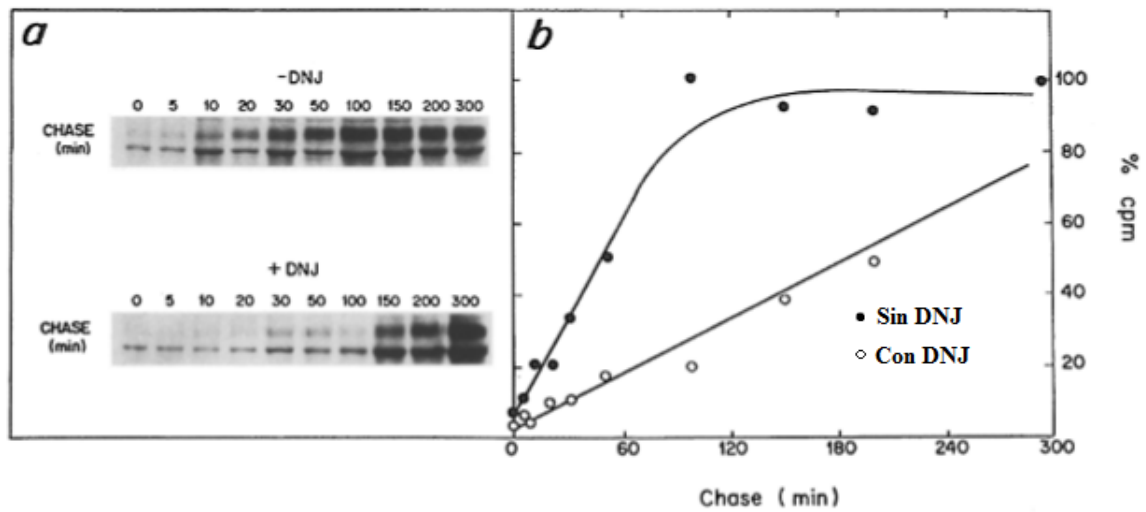


Figura 6: Efecto de la DNJ en el arribo de la CZ a los lisosomas.

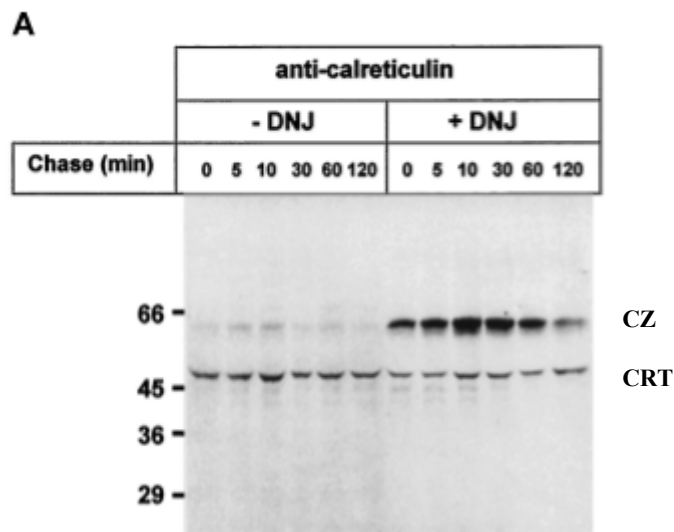


Figura 7: Efecto de la DNJ sobre interacciones CRT-glicoproteínas.

En el laboratorio se generaron mutantes nulos de UGGT. En dichos parásitos las glicoproteínas no puede ser monoglucosiladas y CZ pierde la capacidad de interactuar con CRT (Figura 8). Sin embargo, el arribo de CZ al lisosoma de estos parásitos siguió retrasado (Figura 9) (Conte, et. al. 2003).

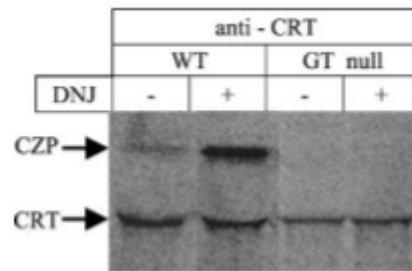


Figura 8: Interacción de CZ-CRT en parásitos wild type y mutantes GT nullos.

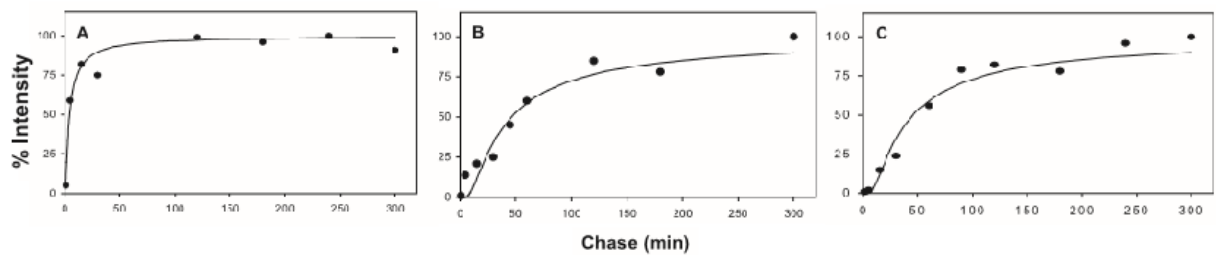


Figura 9: Cinética de arribo a lisosoma de CZ. Pulso-Caza de parásitos wild type (A y B) y mutantes GT nullos (C).

Este retraso fue producto de una interacción más prolongada en el tiempo de CZ con la Grp78/BiP (glucose regulated protein 78/ immunoglobulin binding protein, el homólogo de las HSP70s del RE). Esta proteína se vio sobre expresada en estos mutantes nullos. Por otra parte, la falta de interacción con CRT impidió la oxidación de la CZ por la ERp57, la PDI asociada a CRT (Figura 10) (Labriola, et. al. 2010).

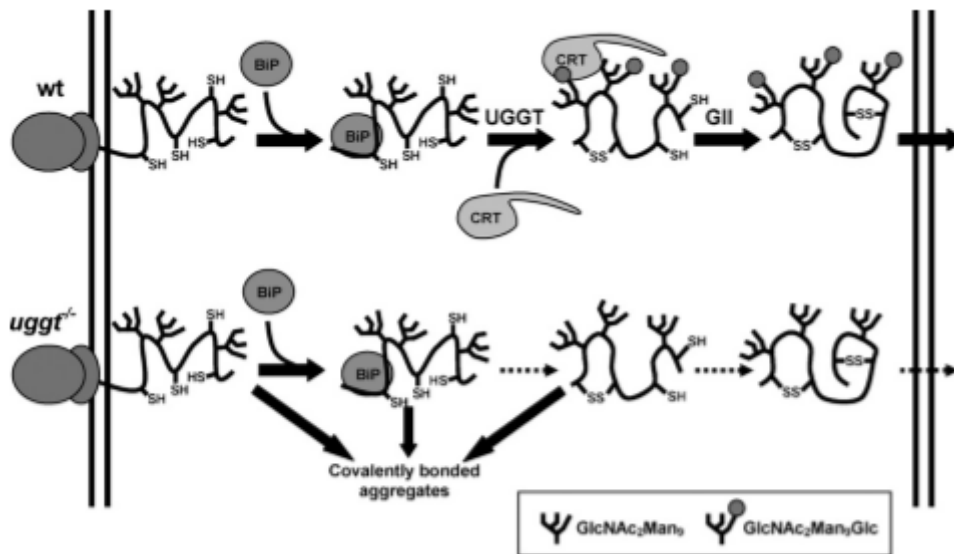


Figura 10: Modelo de interacción de CZ-Chaperona en el RE. En parásitos wt, CZ primero interactúa con BiP cuando está desplegada, en estados más oxidados interactúa con CRT luego de ser glucosilada por UGGT. En parásitos UGGT nulos se produce la interacción CZ-BiP en estados desplegados pero la ausencia de UGGT evita la interacción con CRT y genera un retraso en la oxidación.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

El objetivo general del proyecto es determinar el papel de los *N*-glicanos en el tráfico intracelular de la CZ. Trabajos previos del laboratorio indicaron que los *N*-glicanos cumplen un rol fundamental para que la enzima pueda madurar correctamente en el RE y luego seguir su camino hacia los lisosomas. Actualmente se desconoce el grado de ocupación de los sitios potenciales de *N*-glicosilación, así como el papel que juega cada uno de ellos en el proceso de maduración y tráfico de la CZ.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el grado de ocupación de los sitios potenciales de *N*-glicosilación de la CZ. Para ello se utilizarán métodos bioquímicos y enzimáticos.
- Estudiar el papel de cada glicano sobre el plegado de CZ en el RE y su tráfico a lisosoma. Para ello, mediante mutagénesis dirigida, se eliminarán del gen de CZ secuencialmente los secuencias presentes en la proteína de manera tal de anular la *N*-glicosilación en esos sitios. Se realizará el clonado en un vector de expresión para trypanosomátidos de las secuencias mutadas y se transformarán parásitos. Se estudiará el tránsito y la maduración de las distintas versiones de CZ mediante la técnica de pulso-caza.

4.3 Hipótesis

A partir de estudios previos sobre el control de calidad de CZ de *T. Cruzi*, a continuación se presentan las hipótesis que dieron lugar a la formulación de este trabajo experimental:

- No todos los sitios de *N*-glicosilación de CZ están ocupados. En particular, no hay evidencias si el segundo secunón (Asn 292) está ocupado.
- La ausencia progresiva de sitios de *N*-glicosilación provocará un impedimento cada vez mayor en la maduración y tráfico hacia lisosomas de CZ.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cultivos bacterianos

La cepa de *E. Coli* DH5 α fue cultivada a 37°C con agitación o en placas de Petri con 1,5% de agar en medio LB. Cuando fue necesario se seleccionó con ampicilina 100 μ g/ml.

5.2- Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue purificado utilizando la técnica miniprep. Para pequeña escala, las bacterias provenientes de 3 ml de cultivo fueron resuspendidas en 200 μ l de 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8 (P1); lisadas con 200 μ l de 0,2 M NaOH, 1 % p/v SDS (P2); y neutralizadas con 200 μ l KAc 3 M pH 4,8 (P3). El precipitado de una centrifugación a 14000 rpm fue descartado y el sobrenadante fue tratado con RNAsa 10 μ g/ml a 37°C durante 30 minutos. Se agregaron 400 μ l de cloroformo, se agitó y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos. A la fase superior se le agregaron 700 μ l de isopropanol. El precipitado es el ADN plasmídico. El mismo se lavó una vez con 500 μ l de etanol 70% y se dejó secar al aire. Se resuspendió en 30 μ l de agua con un rendimiento aproximado de 3-5 μ g cada 3 ml de cultivo.

Para la transformación de *T. cruzi* se requieren aproximadamente de 80-100 μ g de plásmido. Para ello hubo que escalar la preparación de plásmidos partiendo de 200 ml de cultivo bacteriano cada vez.

5.3- Transformación de bacterias

Las bacterias DH5 α electrocompetentes fueron transformadas por la técnica de electroporación. Brevemente, 10 μ l de solución de plásmido (dializado si fuera necesario) se combinaron con 50 μ l de bacterias electrocompetentes (preparadas en el laboratorio); y se las sometió a un pulso eléctrico de 2,5 V, 25 μ F y 200 Ω en un electroporador BioRad. Las células se recuperaron en medio LB a 37°C durante una hora y por último se sembraron en placa de LB con ampicilina. Posteriormente, las placas sembradas se incubaron en una estufa a 37°C durante toda la noche hasta aparición de colonias.

5.4 Cultivo de parásitos

La cepa CL Brener de *T. cruzi* fue cedida por el instituto de investigaciones Biotecnológicas de la universidad de General San Martín.

Los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron a 28°C con agitación en medio ‘Brain-Heart-Triptose’ (BHT) (por litro: infusión cerebro-corazón, 33 g (Difco); triptosa, 3 g (Difco); Na₂HPO₄, 3,2 g; KCl, 0,4 g; Glc, 0,3 g; hemina, 20 mg (sigma); pH 7,2-7,4), suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Natocor) inactivado previamente a 56 °C durante 45 minutos, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Cuando fue necesario se agregaron 100 µg/ml de geneticina (G418).

El recuento de parásitos se efectuó en cámara de Neubauer. Los parásitos se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos.

5.5 Transfección de parásitos

Se tomaron 70-100 millones de epimastigotes de CL Brener en fase exponencial, se cosecharon y se lavaron con PBS 1X (10 mM PO₄³⁻, 150 mM NaCl, pH 7,4), y se resuspendieron en 350 µl de la misma solución suplementada con 0,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂. Los parásitos se mezclaron con 100 µg del plásmido correspondiente en un volumen final de 50µl. La mezcla se incubó en una cubeta (0,4 cm electrode GenePulsor) por una hora en hielo y se sometió a un pulso de electroporación a 0,4 kV, 500 uF y 24 Ω en un electroporador BTX (BTX Electroporation System). Los parásitos fueron incubados 10 minutos a temperatura ambiente y diluidos con 4 ml de medio BHT suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Los cultivos se incubaron a 28 °C, a las 48 hs se agregó antibiótico G418 a una concentración final de 150 µg/ml y se monitorearon visualmente hasta obtención de población estable, realizando cambios de medio de cultivo suplementado con G418 siempre que fue necesario.

5.6 Generación de mutantes

Cruzipaina posee tres sitios potenciales de *N*-glicosilación. Con esos datos se diseñaron tres pares de oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido) que incorporan mutaciones seleccionadas en cada sitio. Las mutaciones eliminan los sitios de

N-glicosilación al cambiar las Asn de los secuencias por Gln. En la tabla 1 se resumen los sitios mutados y los primers utilizados.

TABLA I: Especificaciones de los primers utilizados

Nombre de Primer	Secuencia de primer	Secuencia de <i>N</i> -glicano original	Secuencia de <i>N</i> -glicano mutado
635	GGTCGGTAACGTCACCTGCTCGCACCCGACAAT	<u>AAC CTG TCG</u>	<u>CAG CTG TCG</u>
a1129c_c1131g _638	ATTGTCGGGTGCGAGCAGGTGACGTTACCGACC	(NLS)	(QLS)
a874c_t876g_ antisense 636	CACTGCGGCGCTGTCCTGGTAGCCGACGAGAAG	<u>AAT GAC AGC</u>	<u>CAG GAC AGC</u>
a874c_t876g 640	CTTCTCGTCGGCTACCAGGACAGCGCCGCAGTG	(NDS)	(QDS)
a505c_c507g 637	CCACCCGCTGACGCAGCTGTCGGAGCAGA	<u>AAC GTG ACG</u>	<u>CAG GTG ACG</u>
a595c_c507g_ antisense 639	TCTGCTCCGACAGCTGCGTCAGCGGGTGG	(NVT)	(QVT)

Como punto de partida se utilizó el plásmido pTEX-CZ-HA. El mismo contiene la secuencia original de la proteína Cruzipaina con un epítipo de 3X HA en el C-terminal, flanqueado por sitios para las enzimas Bam HI y Hind III.

Con el objetivo de conseguir mutaciones se realizaron PCRs donde las condiciones de reacción fueron las siguientes:

DNA pTEX-CZ-HA	1 µl
Primer Fw	10 µM
Primer Rev	10 µM
MgSO ₄	1,5 mM
dNTPs	0,25 mM
Buffer pfu	1X
BSA	1X
Pfu DNA polimerasa	1 µl

H₂O

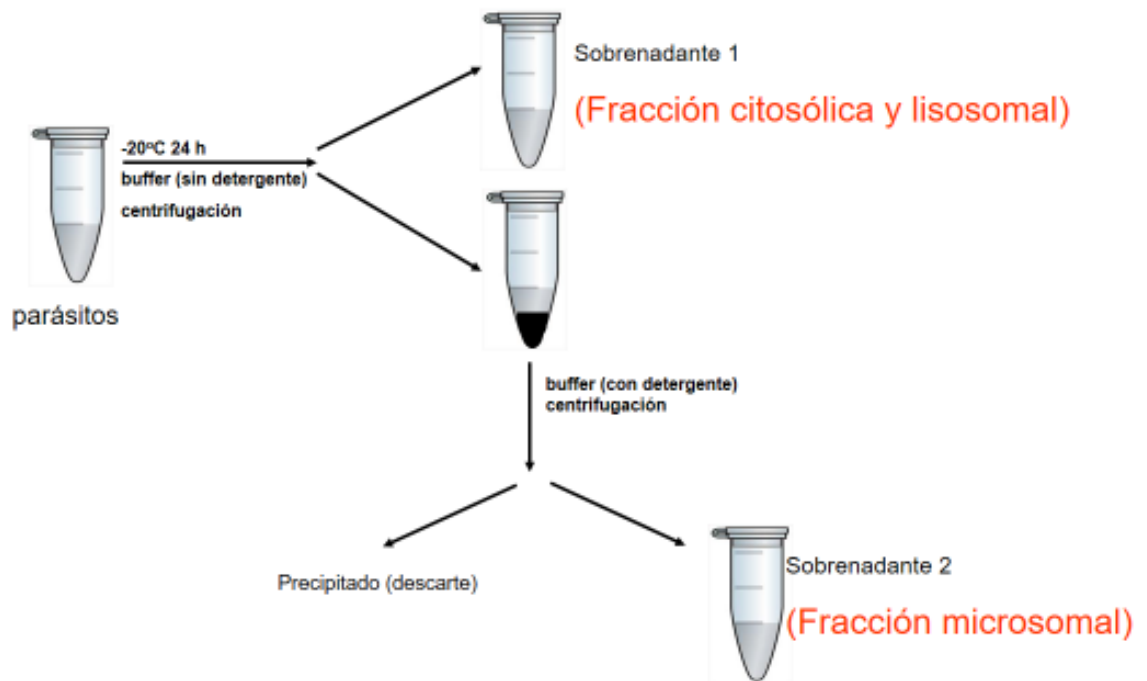
c.s.p. 50 µl

La reacción de la PCR consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; apareamiento a 55 °C por 30 segundos; elongación a 73 °C por 14 minutos; y una elongación final a 73 °C por 5 minutos.

Los productos de las amplificaciones fueron digeridos con la enzima de restricción Dpn1. Esta enzima corta específicamente ADN metilado; de esta forma, se digieren las cadenas parentales, conservando únicamente las portadoras de la mutación.

5.7 Preparación de extracto libre de células y fraccionamiento subcelular.

Se cosecharon 5.10⁶ parásitos en fase exponencial y se congelaron a -20 °C durante 24 hs. Se descongelaron a 4 °C y se resuspendieron en 50 µl de 50 mM Hepes, 200 mM NaCl, pH 7.4, 5 mM Iodoacetamida (IAM). Se incubaron durante media hora en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante es el extracto libre de células que corresponde a la fracción lisosomal. Los pellet se resuspendieron en 50 µl de la solución anterior suplementada con 1 % NP40. Se incubaron durante 30 minutos en hielo. Se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos y se guardaron los sobrenadantes pertenecientes a la fracción microsomal. (Labriola C, et. al., 1995). Esquemáticamente:



5.8 Tratamiento con Concanavalina A-Sepharosa

$5 \cdot 10^6$ epimastigotes se cosecharon y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs. Se descongelaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron resuspendidos con $50\text{ }\mu\text{l}$ de TBS 1X, 5 mM IAM pH 7.6 suplementado con 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 y se incubaron 30 minutos en hielo con agitación. Las muestras se sometieron a centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos y se descartó el pellet. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con $50\text{ }\mu\text{l}$ de suspensión de Concanavalina A-Sepharosa previamente equilibrada en el buffer antes mencionado. Se incubaron en hielo por 45 minutos. Se dejó decantar, se separó el sobrenadante y el pellet fue lavado con $500\text{ }\mu\text{l}$ del buffer ya mencionado. Ambas muestras fueron sometidas a Western Blot.

5.9 Tratamiento con endoglicosidasa H

$5 \cdot 10^6$ epimastigotes se cosecharon y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs. Se descongelaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron resuspendidos en 50 mM Hepes, 200 mM NaCl, 5 mM IAM, NP40 1% , y se incubó media hora en hielo. Se centrifugó a 13000 rpm por 5

minutos y se descartó el pellet. Los sobrenadantes fueron incubados a 37 °C con 1 mU de endoglicosidasa H (SIGMA-ALDRICH) a distintos tiempos dependiendo del experimento. Posteriormente los sobrenadantes se sometieron a análisis por Western Blot.

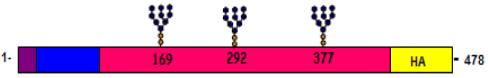
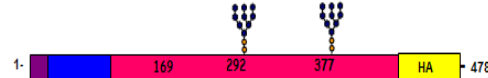
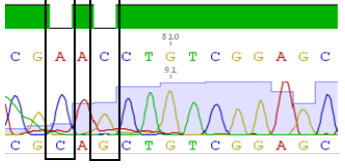

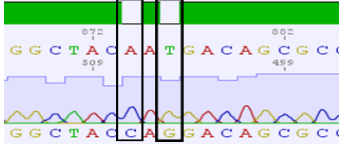
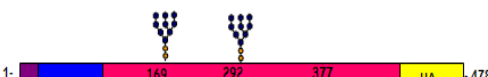
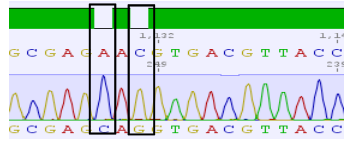
5.10- SDS PAGE y Western Blot

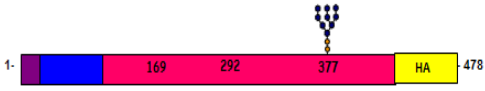
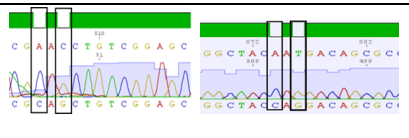
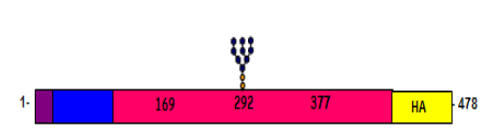
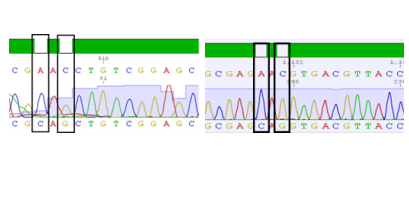
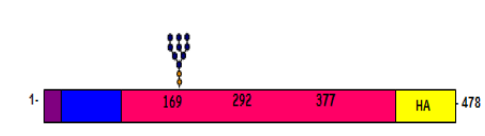
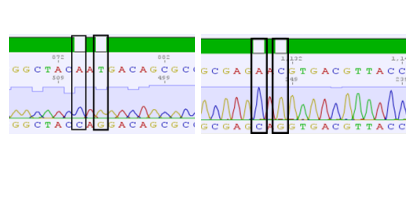
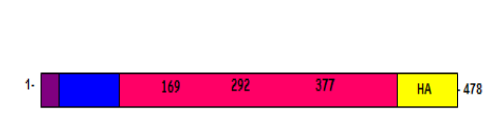
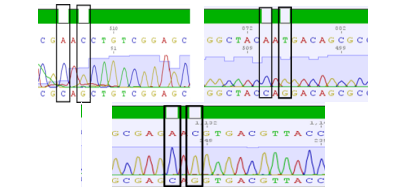
Para la electroforesis de minigeles en presencia de SDS se utilizó la técnica descrita por Laemmli ((Laemmli UK, Nature 227 1970) 680-685).

Las muestras obtenidas fueron corridas en un gel de poliacrilamida 7,5% con SDS y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Immobilon®-P transfer membrane). Las membranas fueron bloqueadas durante una hora en una solución de TBS suplementada con 5 % p/v leche descremada. Luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en una dilución 1/1000, durante toda la noche. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS, y se incubó dos horas con el anticuerpo secundario. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS y se reveló con el reactivo ECL plus (GE Healthcare) en un foto documentador LAS4000. Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron: anti-HA (Thermo Scientific) y anti-CZ (policlonal en conejo fabricado en el laboratorio) como anticuerpos primarios, y por otro lado anti-RAT-peroxidasa (SIGMA) y anti-Rabbit-peroxidasa (ROCHE) como secundarios.

6. Resultados

6.1 Generación de proteínas CZ mutantes

Identificación	Esquema de la proteína	Resultados de secuenciación
Wild type : pTEX-CZ-HA-wild type		
Primer sequon mutado: pTEX-CZ-HA-1seq		
Segundo sequon mutado: pTEX-CZ-HA-2seq		
Tercer sequon mutado: pTEX-CZ-HA-3seq		

Primer y segundo sequon mutados: pTEX-CZ-HA-1,2seq		
Primer y tercer sequon mutados: pTEX-CZ-HA-1,3seq		
Segundo y tercer sequon mutados: pTEX-CZ-HA-2,3seq		
Primer, segundo y tercer sequon mutados: pTEX-CZ-HA-1,2,3seq		

La cruzipaina posee tres sitios potenciales de *N*-glicosilación, dos en el dominio catalítico y uno en el dominio C-terminal. El experimento inicial consistió en generar mutaciones en dichos sitios como se especifica en la sección 5.6 de Materiales y Métodos, generando así una serie de plásmidos conteniendo diversas versiones de CZ con diferentes números de secuones. En la TABLA II se muestra un esquema de la secuencia de las proteínas que se obtendrían luego de las mutaciones. Utilizando el pTEX-CZ-HA como molde y los primers descritos en Materiales y Métodos, se hicieron las PCRs necesarias para lograr la serie de mutaciones. En la TABLA II se observa el cromatograma obtenido luego de la secuenciación, en el que se evidencian los cambios puntuales realizados. Estas mutaciones puntuales cambiaron el aminoácido Asn por Gln, provocando la desaparición de los secuones.

TABLA II:

6.2 Obtención de parásitos transfectantes y cultivos estables

100.10⁶ epimastigotes en fase exponencial de la cepa CL Brener fueron electroporados según la sección 5.5 de Materiales y Métodos con los plásmidos obtenidos en la TABLA II. Luego de 48 horas de ser transformados, se seleccionaron con G418 (100 µg/µl) hasta obtener una población estable. De todas las transfecciones realizadas se obtuvieron poblaciones estables de los epimastigotes transfectados con: pTEX-CZ-HA-wild type, pTEX-CZ-HA-mut3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,2,3seq los cuales se mantuvieron siempre con dicha concentración de G418. En la figura 11 se esquematiza la curva de crecimiento que siguen los epimastigotes cuando son transfectados y seleccionados.

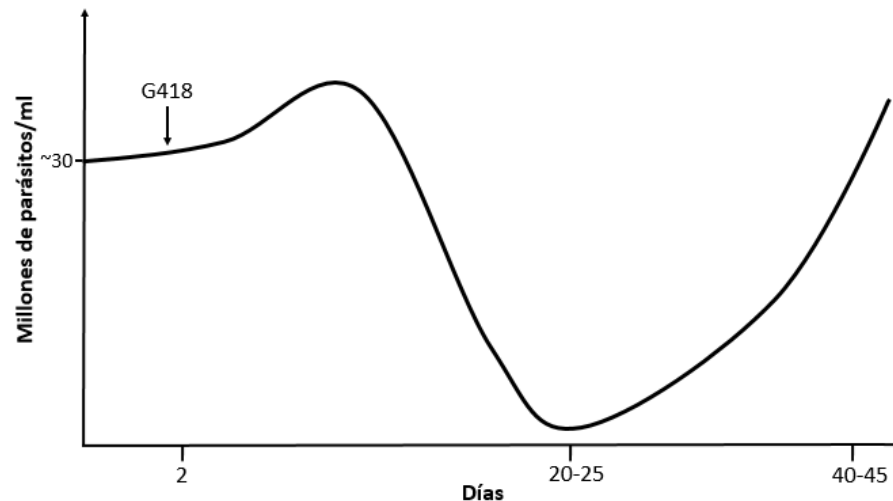


Figura 11: Curva esquemática de crecimiento de epimastigotes transfectados.

Con los parásitos transfectantes estables obtenidos se realizaron curvas de crecimiento y se compararon con la cepa original de CL Brener. La figura 12 muestra que los plásmidos incorporados por los parásitos no afectan, en principio, el metabolismo general.

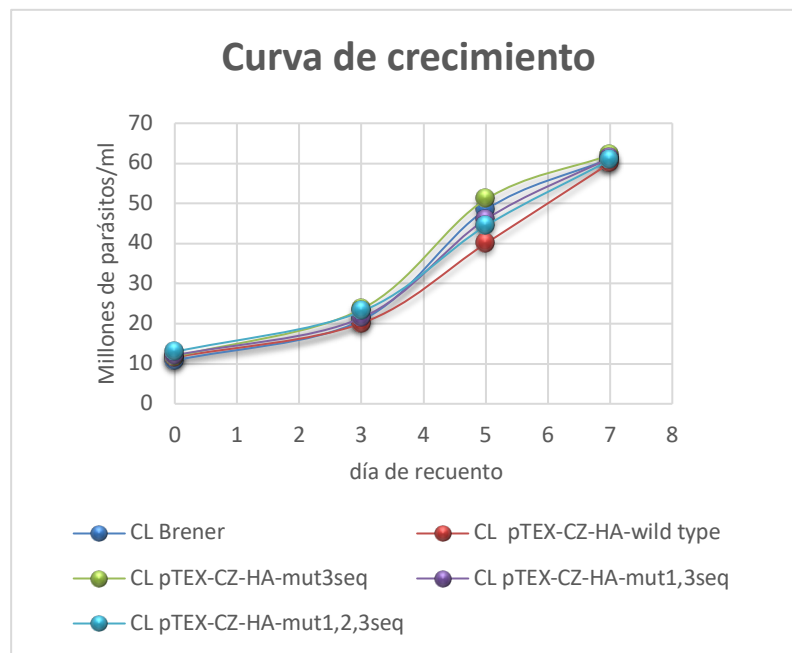


Figura 12: Curvas de crecimiento de cultivos estables de epimastigotes CL Brener con sus respectivos plásmidos transfectados.

6.3 Los cultivos estables expresan las CZ mutantes

Para verificar la expresión de las CZ mutadas, $5 \cdot 10^6$ parásitos en fase exponencial de los transfectantes pTEX-CZ-HA-wild type, pTEX-CZ-HA-mut3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,3seq y pTEX-CZ-HA-mut1,2,3seq fueron cosechados y congelados a -20°C por 24 hs. Los mismos fueron lisados según la sección 5.7 de Materiales y Métodos en presencia de 1 % NP40 y los extractos libres de células obtenidos luego de una centrifugación fueron sometidos a SDS PAGE con posterior revelado por western blot utilizando α -HA y α -CZ como antisueros.

La figura 13A muestra que las variantes CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq, CZ-HA-mut1,3seq y CZ-HA-mut1,2,3seq fueron expresadas por los epimastigotes transfectados con los respectivos plásmidos. La diferencia de movilidades de las bandas (calle 1 a 4) posiblemente se deba a los distintos grados de ocupación de los secuencias en las distintas proteínas. La figura 13B muestra la expresión de la CZ endógena que dichos parásitos expresan con movilidad mayor, dado que la misma no tiene el tag de 3 HA. Cabe aclarar que, dado que la CZ endógena es una proteasa lisosomal mayoritaria en los

epimastigotes, la cantidad sembrada en la figura 13B fue muchísimo menor que en 13A (5000 parásitos en lugar de $5 \cdot 10^6$).

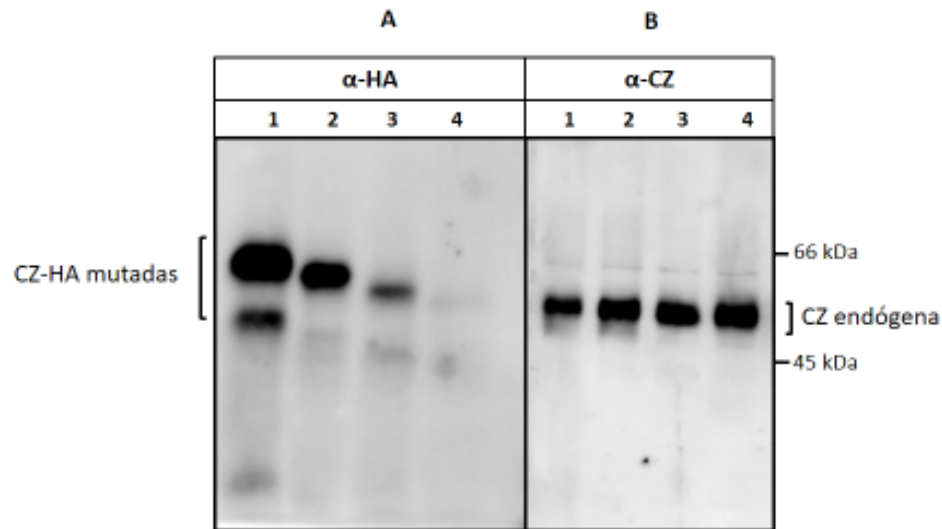


Figura 13: Revelado por Western Blot con α -HA (A) y α -CZ (B). CZ-HA-wild type (calle 1), CZ-HA-mut3seq (calle2), CZ-HA-mut1,3seq (calle3), CZ-HA-mut1,2,3seq (calle 4).

6.4 La Concanavalina A-Sepharosa retiene aquellas CZ con oligosacáridos de alta manosa

Con el objetivo de analizar la presencia de *N*-glicanos en las proteínas expresadas por los parásitos transfectados, se realizó un tratamiento con Concanavalina A-Sepharosa. La concanavalina A (conA) es una lectina que reconoce entre otros, los oligosacáridos de alta manosa, uniéndose fuertemente a ellos. $5 \cdot 10^6$ de parásitos en fase exponencial de los transfectantes pTEX-CZ-HA-wild type, pTEX-CZ-HA-mut3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,3seq y pTEX-CZ-HA-mut1,2,3seq fueron cosechados y tratados como se especifica en la sección 5.8 de Materiales y Métodos.

La figura 14 muestra que las variantes CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq, CZ-HA-mut1,3seq fueron unidas por la concanavalina A (calles 1 a 3) indicando la presencia de oligosacáridos de alta manosa, mientras que CZ-HA-mut1,2,3seq no fue reconocida

por la lectina, apareciendo en la fracción no unida (calle 4 y 8) indicando la ausencia de oligosacáridos de alta manosa.

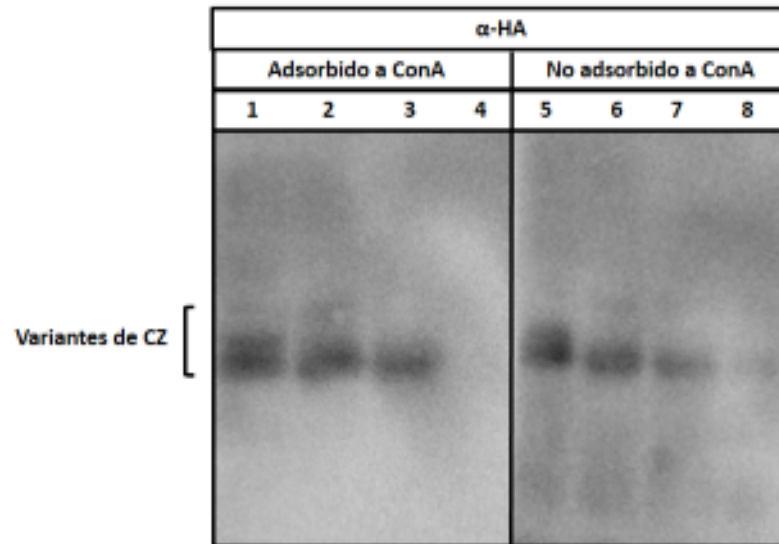


Figura 14: Revelado por Western Blot con α -HA del tratamiento con concanavalina A-Sepharosa. CZ-HA-wild type (calle 1 y 5), CZ-HA-mut3seq (calle 2 y 6), CZ-HA-mut1,3seq (calle 3 y 7), CZ-HA-mut1,2,3seq (calle 4 y 8), adsorbido y no adsorbido a conA respectivamente.

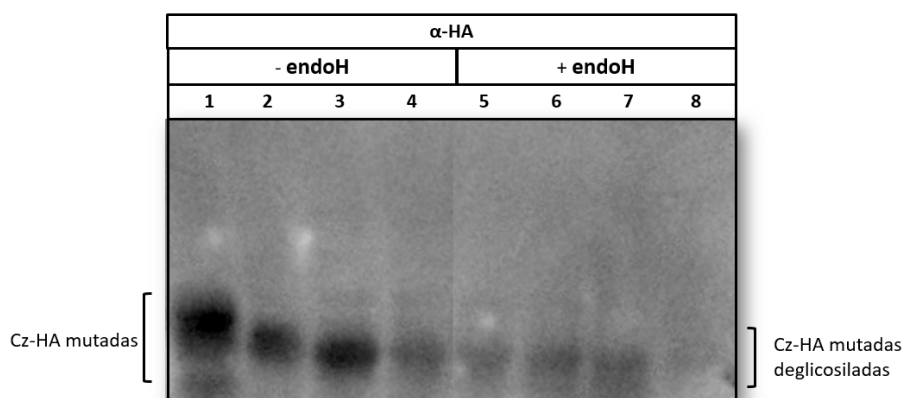
Por otro lado, se observa la presencia de las variantes CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq, CZ-HA-mut1,3seq en la fracción no unida a conA (calles 5 a 7). Esto puede deberse a un exceso de proteína en comparación con la cantidad de conA, excediendo su capacidad de unión.

Estudios previos indicaron que los oligosacáridos de alta manosa de la CZ son monoglucosilados *in vivo* por la UGGT (Labriola, et. al. 1995), y de esta forma, serán reconocidos por la CRT (Labriola, et. al. 1999), paso clave en el control de calidad de plegado de glicoproteínas. Podemos especular que las variantes CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq y CZ-HA-mut1,3seq, al ser *N*-glicoproteínas, se comportarán como la CZ endógena ingresando al control de calidad. Es de esperar también que la variante CZ-HA-mut1,2,3seq que no posee *N*-glicanos, no sea reconocida por los componentes del control de calidad.

6.5 Deglicosilación de las CZ por endoglicosidasa H

Para verificar que la diferencia en las movilidades de las bandas en la figura 13A fue debida al diferente contenido de *N*-glicanos, se sometieron las muestras proteicas a un tratamiento con endoglicosidasa. $5 \cdot 10^6$ parásitos en fase exponencial de cada uno de los transfectantes fueron tratados como en la sección 5.7 de Materiales y Métodos. Previamente a realizar el western blot, las muestras fueron incubadas por 2 hs a 37 °C con 1 mU de endoglicosidasa H.

La figura 15 muestra el tratamiento con endoglicosidasa H de las proteínas: CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq, CZ-HA-mut1,3seq y CZ-HA-mut1,2,3seq. Se puede observar que la diferencia en la movilidad de las bandas observadas en la figura 13 fueron



debidas a la presencia diferencial de oligosacáridos de alta manosa. Como era de esperar, la CZ-HA-wild type presenta mayor diferencia en la movilidad luego del tratamiento con endoglicosidasa H por poseer más oligosacáridos de alta manosa (calle 1 y 5), mientras que la CZ-HA-mut1,2,3seq no presenta cambio en la movilidad luego del tratamiento con endoglicosidasa H conforme a que no dispone de oligosacáridos (calle 4 y 8). De este resultado se puede inferir que la mutante CZ-HA-wild type posee sus tres sitios de *N*-glicosilación ocupados, la mutante CZ-HA-mut3seq posee ocupado sus dos sitios, CZ-HA-mut1,3seq posee el único sitio disponible ocupado y por último CZ-HA-mut1,2,3seq no posee ningún sitio ocupado (calles 1 a 4).

Figura 15: Revelado por Western Blot con α -HA de: CZ-HA-wild type (calle 1 y 5), CZ-HA-mut3seq (calle 2 y 6), CZ-HA-mut1,3seq (calle 3 y 7), CZ-HA-mut1,2,3seq (calle 4 y 8), sin tratar y tratadas con endoglicosidasa H.

Por otro lado, se tomó la variante CZ-HA-wild type y se la sometió a una digestión parcial con endoglicosidasa H. $5 \cdot 10^6$ parásitos del transfectante pTEX-CZ-HA-wild type fueron tratados como en la sección 5.7 de Materiales y Métodos y previamente a realizar el Western Blot, fueron incubados por diferentes tiempos a 37°C con 1 mU de endoglicosidasa H. La figura 16A muestra la proteína CZ-HA-wild type, que posee todos sus sitios de *N*-glicosilación ocupados, va presentando movilidades cada vez mayores a medida que la deglicosilación avanza, confirmando que las distintas movilidades en la figura 15 corresponden a diferentes grados de ocupación de oligosacáridos de alta manosa. La figura 16B muestra un control de las distintas versiones de CZ mutadas (con 3, 2, 1 y ningún sitio de *N*-glicosilación).

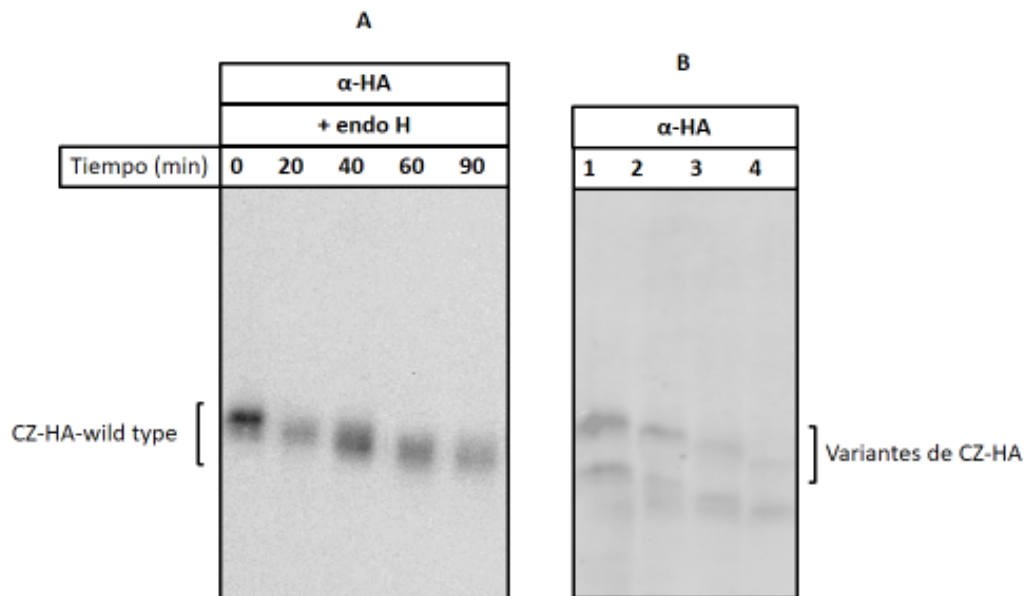


Figura 16: (A) Revelado por Western Blot con α -HA de digestión parcial con endoglicosidasa H de CZ-HA-wild type. (B) Revelado por Western Blot con α -HA identificando: CZ-HA-wild type (1), CZ-HA-mut3seq (2), CZ-HA-mut1,3seq (3), CZ-HA-mut1,2,3seq (4).

6.6 Localización subcelular de las variantes de CZ

Como primera aproximación para verificar si las CZ-HA mutadas pudieron madurar correctamente, se realizó un fraccionamiento subcelular para determinar si la proteína arribó a su destino final, el lisosoma, o si fue retenida en el RE. Para ello, 5.10^6 parásitos de cada uno de los transfectantes obtenidos fueron cosechados, procesados como en la sección 5.7 de Materiales y Métodos hasta obtener las fracciones lisosomales y microsomales y analizados por a Western Blot.

La Figura 17A muestra que tanto la variante CZ-HA-wild type como CZ-HA-mut3seq están presentes en abundancia en la fracción citosólica (calle 1 y 3), indicando que gran parte de la proteína maduró a través del RE y pudo arribar a los lisosomas. Como era de esperar parte de la proteína se visualiza en la fracción reticular (calle 2 y 4). Por otro lado, la variante CZ-HA-mut1,3seq, si bien se visualiza en la fracción citosólica (calle 5) lo hace en menor grado que las anteriores (calle 1 y 3). Por último, la versión CZ-HA-mut1,2,3seq casi no se visualiza en la fracción citosólica (calle 7), como tampoco en su fracción reticular (calle 8). La figura 17 B muestra como es el fraccionamiento subcelular de la CZ endógena, donde se evidencia la presencia de la proteína en forma abundante en ambas fracciones.

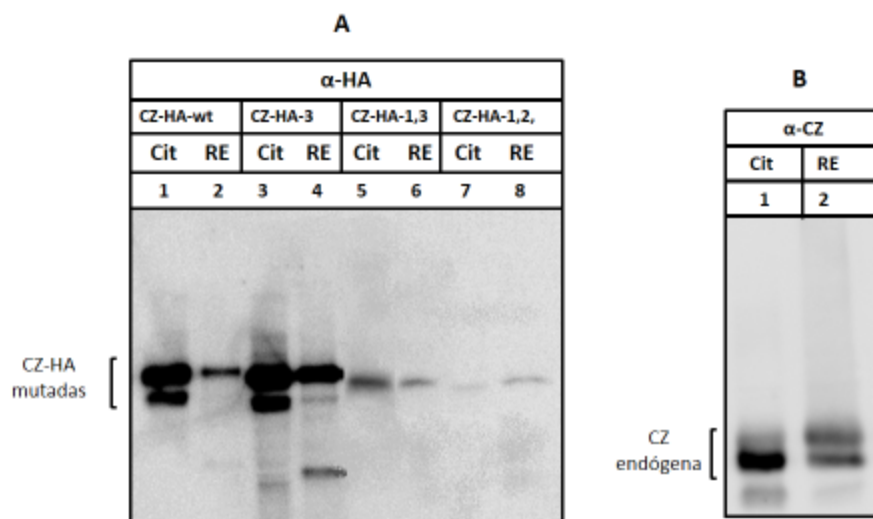


Figura 17: (A) Revelado por Western Blot con α -HA del fraccionamiento subcelular de los transfectantes obtenidos. Calles 1, 3, 5 y 7 fracción citosólica y calles 2, 4, 6 y 8 fracción microsomal de pTEX-CZ-HA-wild type, pTEX-CZ-HA-mut3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,3seq y pTEX-CZ-HA-mut1,2,3seq respectivamente. (B) Revelado por Western Blot con α -CZ del fraccionamiento subcelular de CL Brener. Calle 1 fracción citosólica y calle 2 fracción microsomal.

El fraccionamiento subcelular indica que la maduración exitosa de las variantes de CZ-HA es fuertemente dependiente de la cantidad de oligosacáridos presentes. Como se dijo anteriormente, la *N*-glicosilación es una de las principales modificaciones postraduccionales que sufren la mayoría de las proteínas que entran en el RE, estando fuertemente vinculada con el control de calidad de plegado. De esta manera se puede especular que en la CZ la falta de *N*-glicanos produce defectos en su maduración. La figura 17 muestra claramente la presencia de la CZ-HA-wild type en el lisosoma (calle 1), proteína que tiene sus tres sitios naturales de glicosilación ocupados, mientras que la CZ-HA-mut1,2,3seq se encuentra ausente en dicha organela (calle 7). Esto indicaría que la ocupación de los sitios de *N*-glicosilación está fuertemente vinculada con el proceso de maduración en el RE.

7. Discusión

Como se expuso en la introducción, el RE es una organela compleja que cumple varias funciones esenciales. Una de las funciones más destacadas es la de recibir las proteínas que están siendo sintetizadas en la membrana del RE y que iniciarán la vía secretoria. En el lumen del RE las proteínas adquirieron su conformación correcta. Para ello se ponen en juego una batería de chaperonas moleculares y enzimas facilitadoras del plegado. También allí son sometidas a diversas modificaciones postraduccionales. El RE posee un estricto sistema de control de calidad de plegado de proteínas. Aquellas proteínas que no adquieran su conformación correcta y que, en el caso de los multímeros, no se ensamblen correctamente, no podrán continuar la vía secretoria y serán retrotranslocadas al citosol donde se degradarán por el proteasoma.

Una de las modificaciones postraduccionales más destacadas del RE es la *N*-glicosilación. Los *N*-glicanos cumplen un rol fundamental en el plegado de diversas glicoproteínas, siendo componentes esenciales en el sistema de control de calidad de plegado. En este sentido, los *N*-glicanos son aprovechados como una plataforma para codificar información acerca del estado de plegado de las glicoproteínas (Figura 3).

En este trabajo se estudió el efecto de los *N*-glicanos sobre el tráfico intracelular de CZ de *T. cruzi*. Esta proteína es la cisteína proteinasa lisosomal mayoritaria del estadio epimastigote del parásito. La CZ presenta en su estructura primaria tres sitios potenciales de *N*-glicosilación, desconociéndose el grado de ocupación de los mismos. Se investigó en principio si estos sitios están realmente ocupados por oligosacáridos. Luego se analizó

si la presencia de los oligosacáridos en cada uno de los sitios afectaba la maduración de la CZ en RE.

Para este trabajo se partió de la secuencia de uno de los genes de CZ, clonada en el vector de expresión para trypanosomátidos pTEX, el cual disponía de un tag de 3X HA en la extensión C-terminal. Sobre este plásmido se realizaron mutaciones puntuales que eliminan los distintos sitios de *N*-glicosilación formando un conjunto de plásmidos con las diferentes versiones de CZ: pTEX-CZ-HA-wild type, pTEX-CZ-HA-mut1seq, pTEX-CZ-HA-mut2seq, pTEX-CZ-HA-mut3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,2seq, pTEX-CZ-HA-mut2,3seq y pTEX-CZ-HA-mut1,2,3seq (TABLA II). Éstos plásmidos se transfectaron en epimastigotes de la cepa CL Brener para que expresen las distintas variantes de CZ.

Los epimastigotes transfectados con éxito fueron pTEX-CZ-HA-wild type, pTEX-CZ-HA-mut3seq, pTEX-CZ-HA-mut1,3seq y pTEX-CZ-HA-mut1,2,3seq. Esto resultó en la expresión de variantes de CZ conteniendo tres, dos, uno y ningún sitio de *N*-glicosilación respectivamente. La figura 13 muestra que los parásitos expresaron las proteínas mutadas con diferente movilidad electroforética, lo que indica que las mismas están glicosiladas en forma diferencial (Figura 14 y 15). Asimismo, se observa que la mutante CZ-HA-mut1,2,3seq no fue retenida por la concanavalina A-Sepharosa (conA), lo que indica la ausencia de oligosacáridos. Las otras versiones de CZ fueron retenidas por la conA acorde a la presencia de los mismos. En base a los datos previos (Labriola, et. al. 1995; Labriola, et. al. 1999), podemos pensar que las versiones CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq y CZ-HA-mut1,3seq entrarán al sistema de control de calidad de plegado, mientras que CZ-HA-mut1,2,3seq no lo hará.

En los ensayos realizados, se sembró muestra de forma cuantitativa y es llamativa la diferencia en los niveles de expresión de las distintas variantes de CZ. Se observa mayor expresión en las variantes CZ-HA-wild type y CZ-HA-mut3seq (tres y dos oligosacáridos respectivamente), en menor grado la variante CZ-HA-mut1,3seq (un oligosacárido) y casi imperceptible CZ-HA-mut1,2,3seq (ningún oligosacárido) (Figura 13). Esto sugiere una dependencia entre el nivel de expresión de proteína y la cantidad de oligosacáridos presentes en la misma. Una posible explicación para esta diferencia es que algunas variantes de CZ no están siendo plegadas correctamente, y por lo tanto no

atraviesan el control de calidad y son dirigidas por retrotranslocación a degradación. Para poder corroborarlo se realizó un fraccionamiento subcelular y se evaluó la cantidad de proteína presente tanto en el citosol como en el RE. Como se observa claramente en la figura 17, tanto las versiones CZ-HA-wild type, CZ-HA-mut3seq y CZ-HA-mut1,3seq aparecen en el citosol, siendo mayoritarias las dos primeras, indicando que las proteínas pudieron seguir la vía secretoria y llegar a su destino final. También se observa en la figura, que la CZ-HA-mut1,2,3seq lo pudo lograr de forma muy ineficiente (calle 7) sugiriendo que muy poca proteína pudo atravesar el RE. Cabe mencionar también que la cantidad de proteína de esta mutante en el RE fue escasa comparada con las otras, esto nos permite pensar que esta variante sin oligosacáridos es retenida en el RE y rápidamente enviada a degradación. Un posible experimento para verificar lo antedicho sería incubar las células con un inhibidor de proteasoma como el MG132, e identificar un acúmulo en el RE de la variante CZ-HA-mut1,2,3seq.

Para validar la hipótesis de que la ausencia progresiva de sitios de glicosilación provocará un impedimento cada vez mayor en la maduración y tráfico hacia lisosomas de CZ, sería necesario realizar un experimento de ‘Pulso y Caza’. En este ensayo mediante una marcación con S^{35} y tomando alícuotas a distintos tiempos, se permitiría visualizar la cinética de arribo de la proteína a los lisosomas, dando la posibilidad de analizar si hubo o no un retraso cuando está alterada la ocupación de *N*-glicanos naturales de la proteína. De la misma forma, en las fracciones de RE se podría verificar si la proteína queda retenida allí o no. De haber conseguido los transfectantes faltantes: pTEX-CZ-HA-mut1seq, pTEX-CZ-HA-mut2seq, pTEX-CZ-HA-mut1,2seq, pTEX-CZ-HA-mut2,3seq, se podría haber realizado un análisis más exhaustivo e incluso determinar si algún secunón es más importante que otro para la maduración y tráfico de la CZ.

De lo expuesto en este trabajo podemos concluir que habría una dependencia directa entre el grado de ocupación de los oligosacáridos de alta manosa de la CZ y su capacidad de maduración en el RE y arribo a su destino final, el lisosoma. Los resultados sugieren que a medida la CZ dispone de menos oligosacáridos se dificulta su plegado y maduración.

8. Bibliografía

A sweet code for glycoprotein folding. **Caramelo JJ , Parodi AJ. 2015.** s.l. : FEBS, 2015.

Biología molecular de la célula. **Alberts, Bruce. 2010.**s.l. : Omega, 2010.

Calreticulin in the immune system: ins and outs. **Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, Del Cid N. 2013.** 2013, Trends Immunol.

Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. **Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, Michalak M, Murphy-Ullrich JE. 2010.** 2010, FASEB J. .

Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. **Wada I, Imai S, Kai M, Sakane F, Kanoh H. 1995.** s.l. : J Biol Chem. , 1995.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **UK, Laemmli. 1970.** s.l. : Nature, 1970.

Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells. **Naylor DJ, Hartl FU. 2001.** s.l. : Biochem Soc Symp., 2001.

Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Moncayo A, Silveira AC. 2009.** s.l. : Mem Inst Oswaldo Cruz. , 2009.

ERAD substrates: which way out? **Hebert DN, Bernasconi R, Molinari M. 2010.** s.l. : Semin Cell Dev Biol., 2010.

Functional cooperation between BiP and calreticulin in the folding maturation of a glycoprotein in Trypanosoma cruzi. **Labriola CA, Giraldo AM, Parodi AJ, Caramelo JJ. 2010.** 2010, Mol Biochem Parasitol. .

Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi. **Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U. 1989.** 1989, Mol Biochem Parasitol. .

How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. **Helenius, A. 1994.** 1994, Mol Biol Cell.

Immunolocalization of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control. **Zuber C, Fan J, Guhl B, Parodi A, Fessler JH, Parker C, et al. 2001.** s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A., 2001.

Informe sobre Chagas. **Analía C. Pérez, Elsa Segura, Estela Cura, Mirta Carlomagno. 1989.** 1989, Ciencia Hoy.

Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, Trypanosoma cruzi, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. **Stoka V, Nycander M, Lenarcic B, Labriola C, Cazzulo JJ, Björk I, Turk V. 1995.** 1995, FEBS Lett. .

Intermediate metabolism in Trypanosoma cruzi. **Cazzulo, JJ. 1994.** 1994, J Bioenerg Biomembr. .

Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of Trypanosoma cruzi. **Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. 1993.** 1993, Mol Biochem Parasitol.

Protein and amino acid catabolism in Trypanosoma cruzi. **Cazzulo JJ. 1984.** 1984, Comp Biochem Physiol B. .

Protein N-glycosylation in trypanosomatids. A pathway with odd enzymes at both ends. **Parodi, AJ. 1993.** 1993, Biol Res.

Retention of glucose units added by the UDP-GLC:glycoprotein glucosyltransferase delays exit of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. **Labriola C, Cazzulo JJ, Parodi AJ. 1995.** 1995, J Cell Biol. .

RNA editing in kinetoplastid mitochondria. **Hajduk SL, Harris ME, Pollard VW. 1993.** 1993, FASEB J.

Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. **Hammond C, Braakman I, Helenius A. 1994.** s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A., 1994.

Substrate specificity of the oxidoreductase ERp57 is determined primarily by its interaction with calnexin and calreticulin. **Jessop CE, Tavender TJ, Watkins RH, Chambers JE, Bulleid NJ. 2009.** s.l. : J Biol Chem., 2009.

The interplay between folding-facilitating mechanisms in Trypanosoma cruzi endoplasmic reticulum. **Conte I, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ. 2003.** 2003, Mol Biol Cell. .

The major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. 1992.** 1992, Mol Biochem Parasitol.

The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. **Sousa M, Parodi AJ. 1995.** 1995, EMBO J.

The noncatalytic portion of human UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase I confers UDP-glucose binding and transferase function to the catalytic domain. **Arnold SM1, Kaufman RJ. 2003.** 2003, J Biol Chem.

Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. **Peterson JR, Ora A, Van PN, Helenius A. 1995.** 1995, Mol Biol Cell. .

Trypanosoma cruzi calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. **Labriola C, Cazzulo JJ, Parodi AJ. 1999.** 1999, Mol Biol Cell.

UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. **Caramelo JJ, Castro OA, Alonso LG, De Prat-Gay G, Parodi AJ. 2003.** 2003, Proc Natl Acad Sci U S A.

UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying yang of the ER quality control. **D'Alessio C, Caramelo JJ, Parodi AJ. 2010.** s.l. : Semin Cell Dev Biol. , 2010.

9. Anexos

Plásmido pTEX

En este trabajo se utilizó un plásmido pTEX, en el cual se encontraba clonada una de las secuencias de CZ fusionado a un epítipo de 3X HA en su C-terminal flanqueado por las enzimas Bam HI y Hind III.

