



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

"Caracterización funcional de los genes *KTR4*, *KTR5* y *KTR7* de *Saccharomyces cerevisiae*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

NAHUM VALENTE HERNÁNDEZ

ASESOR:

DR. HÉCTOR MANUEL MORA MONTES

Guanajuato, Gto

Junio 2018

Índice

Índice general	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VII
Introducción	1
Glicosilación de proteínas	1
N-glicosilación	2
O-glicosilación	4
Importancia de la O-glicosilación	4
Familia <i>KRE2/MNT1</i> en <i>S. cerevisiae</i>	6
Familia <i>KRE2/MNT1</i> en <i>C. albicans</i> y otras especies	7
Justificación	9
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Materiales y métodos	11
Microorganismos y medios de cultivo	11
Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	11
Extracción de DNA genómico hongos	13
Construcción de los plásmidos pPSc <i>KTR4</i> , pPSc <i>KTR5</i> y pPSc <i>KTR7</i> para la expresión heteróloga <i>P. pastoris</i> .	13
Construcción de los plásmidos pAct1- <i>ScKTR4</i> , pAct1- <i>ScKTR5</i> y pAct1 <i>ScKTR7</i>	15
Amplificación por PCR de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i>	15
Mutagénesis sitio dirigida	15

Subclonación en pAct1	16
Transformación de bacterias	18
Transformación <i>P. pastoris</i>	18
Transformación <i>C. albicans</i>	19
Expresión heteróloga de las proteínas ScKtr7p	20
Ensayo de manosiltransferasa	21
Ensayo de unión al colorante azul alciano	21
Movilidad electroforética de la enzima <i>N</i> -acetilhexosaminidasa (Hex1p)	22
Ensayo de susceptibilidad a agentes perturbadores de la pared celular	22
Cromatografía en capa fina (TLC)	23
Electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoróforo (FACE)	24
Análisis estadísticos	25
Resultados	26
Construcción de los plásmidos pPScKTR4, pPScKTR5 y pPScKTR7.	26
Expresión heteróloga de ScKtr7p en <i>P. pastoris</i>	28
Caracterización funcional de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i> en <i>C. albicans</i>	31
Clonación de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i> en pJet1.2 blunt	31
Clonación en pACT1	32
Escrutinio de las transformantes de <i>C. albicans</i>	33
Ensayos de unión al colorante azul alciano	34
Ensayos de la movilidad electroforética de la enzima <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	35
Susceptibilidad hacia agentes perturbadores de pared celular	37
TLC y FACE de las <i>O</i> -mananas	41
Discusión	43

Conclusiones	50
Perspectivas	51
Bibliografía	52

Índice de figuras

Figura 1. Principales tipos de glicosilación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5
Figura 2. Amplificación por PCR de parte del marco de lectura abierto de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i> y clonación en pJet 1.2 blunt	27
Figura 3. Amplificación por PCR de los marcos de lectura parciales de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i> en el vector pPicZαC.	28
Figura 4. Expresión de <i>ScKtr7p</i> en <i>P. pastoris</i> .	29
Figura 5. Amplificación y clonación del marco de lectura abierto completo de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i> .	31
Figura 6. Clonación de los marcos de lectura abiertos completos de los genes <i>ScKTR4</i> , <i>ScKTR5</i> y <i>ScKTR7</i> en el plásmido pACT1.	32
Figura 7. Confirmación de la integración de las construcciones pACT1- <i>ScKTR4</i> , pACT1- <i>ScKTR5</i> y pACT1 <i>ScKTR7</i> en el locus <i>RPS10</i> .	33
Figura 8. Restauración en los niveles de fosfomanosilación.	35
Figura 9. Movilidad electroforética de la enzima Hex1.	37
Figura 10. Exposición a agentes perturbadores de la pared celular de las triples mutantes de <i>C. albicans</i> .	38
Figura 11. Exposición a agentes perturbadores de la pared celular de las dobles mutantes de <i>C. albicans</i> .	39
Figura 12. Comprobación de la viabilidad de las células expuestas a agentes perturbadores.	41
Figura 13. TLC y FACE de O-mananas.	42

Índice de Tablas

Tabla I. Genotipos de los organismos utilizados	12
Tabla II. Lista de oligonucleótidos iniciadores	17
Tabla III. Actividad enzimática de manosiltransferasa de ScKtr7p.	30

Abreviaturas

Alg	Glucanos ligados a asparagina
ANTS	Ácido 8-aminonaftaleno 1,3, 6-trisulfónico disódico
CFW	Blanco de calcoflúor
CR	Rojo Congo
Dol-PP	Dolicol difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etiendiamino tetra-acético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Retículo endoplasmático
ERAD	Degradación de proteínas asociada al RE
FACE	Electroforesis de carbohidratos acoplado a un fluoróforo
GDP-Man	Guanosin difosfato manosa
Glc	Glucosamina
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
Hyg B	Higromicina B
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria Bertani
Man-P	Manosa fosfato
MNT	Manosiltransferasa
MU-Glc	4-metil umbeliferil <i>N</i> -acetil β -D-glucosamínido
MU-GlcNAc	Metil umbeliferil- <i>N</i> -acetilglucosamina
NaH₃Br	Cianoborohidruro de sodio
pb	pares de bases
PMT	Proteína <i>O</i> -manosiltransferasa
PEG	Polietilenglicol
PIPES	Ácido piperazin- <i>N,N'</i> -bis(2-etanosulfónico)
PPO	2,5-difeniloxazole
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TAE	Amortiguador de tris, ácido acético y EDTA
TLC	Cromatografía en capa fina
x g	Valor de la gravedad
YPD	Medio con extracto de levadura, peptona y dextrosa
μF	microfaradio
μCi	microCurio
Ω	Ohmio

Resumen

La glicosilación de proteínas es una modificación postraducciona que empieza en el lumen del retículo endoplásmico y continúa en el aparato de Golgi, y es una de las rutas biosintéticas mayormente explorada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este hongo se han caracterizado a las enzimas involucradas en la elaboración de las O-glicanas y la mayoría de las enzimas participantes en la síntesis de las N-glicanas. Dentro de estas enzimas, llamadas glicosiltransferasas, se encuentra la familia de manosiltransferasas *KRE2/MNT1*, compuesta de nueve miembros, de los cuales, la mayoría han sido estudiadas y se ha establecido su participación en la elaboración de N y O-glicanas. Nuestro grupo está interesado en estudiar tres genes de esta familia: *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* que hasta la fecha no han sido caracterizados.

La estrategia experimental que se siguió fue la clonación de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en la bacteria *E. coli*, y posteriormente la complementación genética de tres diferentes mutantes de *C. albicans* deficientes en los procesos de N y O-glicosilación. Una vez obtenidas y verificadas las mutantes por ensayos de PCR, se demostró la funcionalidad de los genes de *S. cerevisiae* en *C. albicans* mediante ensayos de unión al colorante catiónico azul Alciano, la susceptibilidad a agentes perturbadores de la pared celular, la migración electroforética de la glicoproteína N-acetilhexosaminidasa y el análisis de las O-glicanas por electroforesis de carbohidratos acopladas a un fluoróforo. Con los datos obtenidos de todos estos experimentos demostramos la funcionalidad *in vivo* de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*, en donde *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* están involucrados en N-glicosilación y parecen tener una participación parcial en O-glicosilación.

Introducción

La pared celular es una estructura dinámica que permite la adaptación de los organismos a su medio ambiente cambiante para protegerlo de daños mecánicos, sustancias tóxicas, entre otros. En el caso de los hongos, esta pared celular debe tener la plasticidad suficiente que permita la división celular, la gemación, el crecimiento y la esporulación, entre otros fenómenos celulares (Orlean 2012). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la pared celular representa aproximadamente un 30% del peso seco; está compuesta por un 85% de polisacáridos y el 15% restante de proteínas (Klis *et al.*, 2006). Los oligosacáridos son en su mayoría glucanas unidas por enlaces β 1,6- y β 1,3-, manoproteínas y quitina (Lesage y Bussey, 2006, Klis *et al.*, 2006), estas glucanas son sintetizadas y ensambladas a través de la ruta secretora y en el espacio extracelular.

Glicosilación de proteínas

Las rutas de glicosilación son importantes para las células, y se estima que más de la mitad de las proteínas de los eucariontes sufren un proceso de glicosilación. Por otra parte, se conoce que alrededor del 2% de los genes codificados en el genoma de *S. cerevisiae*, son genes que codifican para enzimas involucradas en algún paso en los procesos de glicosilación (Apweiler *et al.*, 1999; Petrescu *et al.*, 2003). La glicosilación de proteínas constituye una de las modificaciones postraduccionales más importantes que sufren las proteínas durante su maduración (Spiro, 2002, Despande *et al.*, 2008). Existen tres tipos principales de glicosilación presentes en *S. cerevisiae*: la *N*-glicosilación, que comprende a las cadenas ramificadas de manosa unidas a residuos de asparagina; la *O*-glicosilación que comprende cadenas lineales de manosa unidas a serina o treonina; y la tercera comprende a proteínas acoplados a la molécula glicosilfosfatidilinositol o anclas de GPI. La glicosilación de proteínas es un proceso que se comparte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Esta importante modificación postraduccional incrementa la estabilidad de las proteínas contra la desnaturalización y la proteólisis, aumenta la solubilidad,

modula respuestas inmunitarias, entre otros efectos benéficos para las células (Sanders *et al.*, 1999, Helenius y Aebi, 2004).

N-glicosilación

La N-glicosilación se podría dividir en tres etapas, la primera comprende el ensamblaje del oligosacárido unido a una molécula lipídica de dolicol fosfato (Dol-PP), la segunda donde se presenta la transferencia del oligosacárido a los polipéptidos nacientes y la subsecuente modificación del oligosacárido núcleo por tres glicosidasas y que la proteína se pliegue de forma correcta para así evitar la degradación de proteínas asociado al RE (ERAD, por sus siglas en inglés); mientras que en la última etapa hay un alargamiento de las cadenas de manosa por acción de las manosiltransferasas residentes en el aparato de Golgi.

Para llevar a cabo el primer paso, se requiere un ensamblado ordenado del oligosacárido núcleo (DolP-GlcNac₂-Man₉-Glu₃) por una familia de manosiltransferasas llamada ALG (Asparagine Linked Glycan, por sus siglas en inglés) constituida por los siguientes miembros: Alg1p, Alg2p, Alg3p, Alg5p, Alg6p, Alg7p, Alg8p, Alg9p, Alg10p, Alg11p, Alg12p, Alg13p y Alg14p (Orlean, 2012). La interrupción génica de algunos miembros de la familia ALG causa la acumulación de los oligosacáridos unidos a lípidos, indicando que en esta familia no hay redundancia (Burda *et al.*, 1999, Burda y Aebi., 1999). Además, gracias a la interrupción génica de cada uno de los miembros de esta familia, se pudo conocer el ensamblaje del oligosacárido núcleo, puesto que las mutantes sencillas en los genes de la familia Alg mostraron acumulación en los intermediarios y las células presentaban una hipoglicosilación de proteínas (Burda *et al.*, 1999). Sin embargo, se sabe que las mutantes sencillas en los genes *alg4*, *alg1* y *alg2*, son letales (Kukuruzinska y Lennon, 2011).

Para la segunda etapa, el oligosacárido núcleo es transferido *en bloc*, en el lumen del retículo endoplásmico (RE), a un residuo específico de asparagina de un polipéptido recién sintetizado, por la enzima oligosacaridil transferasa que reconoce la secuencia consenso Asp-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa puede ser cualquier

aminoácido excepto prolina (Herscovics y Orlean, 1993, Spiro, 2002). Después, el oligosacárido es procesado por las glucosidasas I y II (Trombeta *et al.*, 1996, Romero *et al.*, 1997; Herscovics, 1999) y la α 1, 2-manosidasa de RE (Jelinek y Herscovics, 1988); estas enzimas procesan los tres residuos de glucosa y un residuo de manosa, respectivamente (Herscovics, 1999, Spiro 2002.). Este oligosacárido núcleo (GlcNac₂-Man₈) es reconocido por el par proteico calnexina/calreticulina, que son chaperonas asociadas al RE (Helenius 1994, Leach y Williams, 2003). Si el polipéptido es mal plegado entonces es procesado por la enzima UDP-glucosa glicoproteína glucosiltransferasa (UGGT), la cual monoglucosila a la proteína para que entre a un ciclo de plegamiento correcto (Helenius 1994, Trombeta y Parodi, 2003), el ciclo se rompe cuando la proteína adquiere su plegamiento correcto o bien cuando es llevada a degradación por el proteasoma, por un evento de control de calidad de síntesis de proteínas asociado al retículo endoplasmático o ERAD (Trombeta, 2003; Needham y Brodsky, 2013).

Si la proteína sortea con éxito el control de calidad asociado al RE, entonces entra en una tercera etapa, en donde es transportada al aparato de Golgi, en esta etapa el oligosacárido núcleo GlcNac₂-Man₈ es modificado por la adición de residuos de manosa (ilustrado en la Fig. 1). La primera enzima encargada de modificar el oligosacárido es la enzima manosiltransferasa Och1p (Nakayama *et al.*, 1992), que añade el primer residuo de manosa al oligosacárido núcleo mediante la formación de un enlace glicosídico α 1, 6-. Este residuo de manosa sirve para generar el esqueleto de la cadena lateral, que es un polímero de manosas unidos por enlaces α 1, 6-, cuya síntesis es llevada a cabo por dos complejos de manosiltransferasas Man pol I (compuesto por Mnn9p, y Van1p) y el complejo Man pol II (compuesto por Mnn9p, Anp1p, Hocp, Mnn10p y Mnn11p). Ambos complejos añaden de 40 a 60 residuos de manosa en enlace α 1,6- (Hashimoto y Yoda., 1997, Jungmann y Munro, 1998, Jungmann *et al.*, 1999), y después este esqueleto es adornado con manosas en enlace α 1,2- que son añadidos por las manosiltransferasas Mnn2p y Mnn5p, que colocan las primeras dos manosas (Rayner y Munro, 1998) y también algunos miembros de la familia Kre2/Mnt1, como lo son Ktr1p, Yur1p, Ktr2p y Ktr3p que colectivamente participan en la

adición de la segunda y subsecuentes manosas en enlace α 1,2 a la cadena lateral en α 1,6 (Lussier *et al.*, 1993, 1995, 1996, 1999.). Estas cadenas de manosas son decoradas con residuos de fosfomanosa mediante la acción de la fosfomanosiltransferasa Mnn6/Ktr6p (Wang *et al.*, 1997; Jigami y Odani, 1999). Finalmente, las cadenas detienen su alargamiento cuando la manosiltransferasa Mnn1p añade manosas en enlace α 1, 3- (Ballou 1990).

O-glicosilación

Por otra parte, y a diferencia de la *N*-glicosilación, la *O*-glicosilación se reduce a cadenas lineales de manosa que contiene 5 residuos en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *P. pastoris* (Goto, 2007). Se inicia en el lumen del RE, en donde los aminoácidos de serina y treonina son modificados debido a la adición de una única manosa por una familia de manosiltransferasas llamadas PMT (por sus siglas en inglés), esta familia cuenta con 7 miembros en *S. cerevisiae* (Gentzsch y Tanner, 1996, 1997, Willer *et al.*, 2005), y en *C. albicans* hay 5 miembros (Timpel *et al.*, 1998; 2000; Prill *et al.*, 2005).

Posteriormente, cuando las proteínas entran en el aparato de Golgi continua el alargamiento de las *O*-glicanas con la adición de manosas en enlace α 1, 2- por las manosiltransferasas Ktr1p, Ktr2p y Kre2p, tras lo cual las manosiltransferasas Mnn1p, Mnt2p y Mnt3p (Fig. 1) añaden de uno a dos residuos de α 1, 3-manosa (Lussier *et al.*, 1997b, Romero *et al.*, 1999). Por otra parte, se sabe que tanto en la *N*- como en la *O*-glicosilación la enzima Mnn6p/Ktr6p adiciona una o más manosas modificadas, llamadas fosfomananas, las cuales le dan una carga negativa neta a la pared celular (Odani *et al.*, 1996, 1997).

Importancia de la O-glicosilación

Como se mencionó anteriormente, la *O*-glicosilación la inicia una familia de enzimas llamadas PMT residentes en RE. Se tiene evidencia experimental que estas manosiltransferasas tienen una alta especificidad hacia su proteína blanco. Por ejemplo, las manosiltransferasas Pmt1p y Pmt2p añaden el primer residuo de

manosa en el RE sobre las proteínas quitinasa, proteasa Bar1p, Hsp150p, aglutinina, Kre1p y Kre9p (Gentzsch y Tanner, 1997, 1996; Girschbach y Strahl, 2003). Por otra parte, en ausencia del gen *ScPMT4*, existe una hipoglicosilación de las proteínas Kex2p, Fus1p, Gas1p, Ax12 (Gentzsch y Tanner, 1996, 1997). Se ha demostrado un fenómeno similar en células de mamífero, con las glucosaminil transferasas (Wandall., 1997). Tomando en cuenta los datos anteriores, se concluye que la O-glicosilación es indispensable para un correcto funcionamiento de cada una de las proteínas o enzimas que sufren dicha modificación (Gentzsch and Tanner, 1996, Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Aunado a esto, se ha demostrado que una disminución en los niveles de O-glicosilación afecta la estabilidad, la localización y la función adecuadas de las proteínas (Sanders *et al.*, 1999).

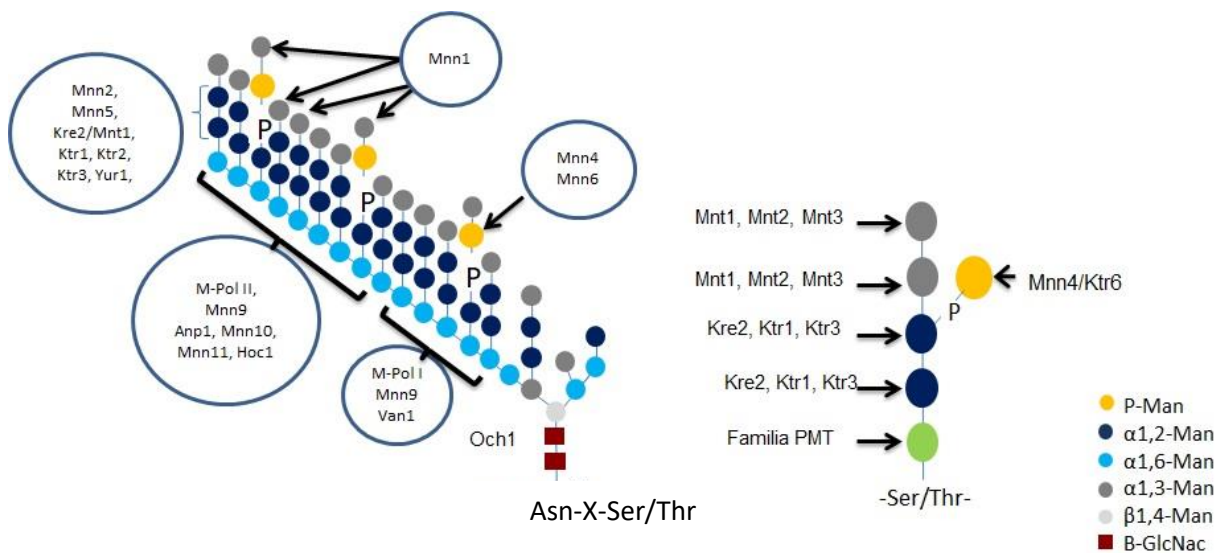


Figura 1. Principales tipos de glicosilación en *Saccharomyces cerevisiae*. En (A) se representa un esquema general de las N-glicanas, en donde se presentan dentro de círculos las manosiltransferasas residentes en el aparato de Golgi, estas enzimas participan en el alargamiento primero de manosas en enlace α 1,6- (en círculos azules), por la α 1,6-manosiltransferasa Och1, y el complejo de manosiltransferasas M-Pol I y M-Pol II. Después el oligosacárido sufre alargamiento con manosas en enlace α 1, 2- por las manosiltransferasas Mnn2p, Mnn5p, Kre2/Mnt1p, Ktr3p, Ktr2p, Ktr1p, y Yur1p. También se representa la adición de fosfomananas por Mnn4 y Mnn6/Ktr6, y finalmente la adición de manosas en enlace α 1, 3- por la manosiltransferasa Mnn1 que termina la glicana. En (B) se muestra un esquema general de la O-glicosilación que empieza con la adición de la primera manosa en el RE por la familia PMT (proteín O-manosiltransferasa) y en el aparato de Golgi se alarga por otras manosiltransferasas, tales como Mnt1. Modificada de Orlean 2012.

Se ha demostrado la importancia de la O-glicosilación, por ejemplo triples mutantes de los genes (*ScPMT1*, *ScPMT2*, *ScPMT3* y *ScPMT4*) son letales; algunas combinaciones de dobles mutantes producen fenotipos frágiles osmóticamente y requieren la adición de agentes estabilizadores, como sorbitol, para su correcto crecimiento como *Scpmt1Δ-Scpmt3Δ* y *Scpmt2Δ-Scpmt4Δ* (Gentzsch y Tanner, 1996). Sin embargo, las mutantes sencillas son viables, sugiriendo cierta redundancia funcional.

Familia *KRE2/MNT1* en *S. cerevisiae*

Dos grupos independientes, en el año de 1992, reportaron el aislamiento y clonación de un mismo gen, aunque nombrado de dos maneras diferentes como *ScKRE2* (Hill et al., 1992) o *ScMNT1* (Häusler y Robbins, 1992). A los anteriores reportes se sumó el hecho previamente del gen *ScYUR1* (Foreman et al., 1991), con lo cual se dio el nacimiento de una nueva familia de genes, la familia *KRE2/MNT1* (Foreman et al., 1991, Hill et al., 1992, Häusler y Robbins, 1992.). En los artículos del Dr. Hill y colaboradores, así como por los doctores Häusler y Robbins, se reportaron que las mutantes en el gen *Sckre2Δ* (*Scmnt1Δ*) presentan una alteración en los niveles normales de N-glicosilación (Hill et al., 1992), y en la O-glicosilación (Häusler et al., 1992).

En años posteriores se identificaron más genes de la familia *KRE2/MNT1*. Se identificaron 4 genes más, *ScKTR1* y *ScKTR2* (Lussier et al., 1993, 1996); *ScKTR3* (Bussereau et al., 1993); y *ScKTR4* (Mallet et al., 1994).

En adición, se demostró la actividad de manosiltransferasas de Yur1p, Ktr1p y Ktr2p (Lussier et al., 1993, 1995, 1996), y también que estas manosiltransferasas residían en el aparato de Golgi, y su actividad como manosiltransferasas involucradas en la ruta de N-glicosilación (Lussier et al., 1996, 1999). Finalmente, con la secuenciación masiva de genes y la secuenciación completa del genoma de *S. cerevisiae*, se encontraron tres miembros más de la familia *KRE2/MNT1*, a los cuales se les asignó el nombre de *ScKTR5*, *ScKTR6* y *ScKTR7* (Lussier et al., 1997a, 1997c). En este mismo año se caracterizó al gen *ScMNN6* como

fosfomanosiltransferasa, además se demostró que la interrupción de este gen no es esencial, y las células con esta mutación son susceptibles a higromicina B y blanco de calcoflúor. Con el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *ScMNN6*, se supo que es idéntico al gen *ScKTR6* (Wang et al., 1997). Por otra parte se había reportado ya el gen *MNN4* (Figura 1) como responsable de regular la acción de la fosfomanosiltransferasa Mnn6p (Odani et al., 1996, 1997).

Recientemente se demostró la actividad de manosiltransferasa del gen *ScKTR4* en *E. coli* y se describió su estructura cristalina, y al compararla con la estructura de la otra manosiltransferasa cristalizada Kre2p/Mnt1p, se muestran ciertas similitudes topológicas en el sitio activo. Además comparten la actividad de manosiltransferasa, los autores reportan una mayor actividad sobre α -metil manosido, usando como azúcar donador GDP-manosa y manganeso (Lobsanov et al., 2004; Possner et al., 2015).

Para dilucidar la función de los genes de la familia *KRE2/MNT1*, se interrumpió el gen *MNN6/KTR6* y se observó que las células carentes en este gen eran susceptibles a higromicina B y blanco de calcoflúor (CFW), similar a la mutante en *KRE2/MNT1* (Lussier et al., 1996). La mutante en el gen *KTR5* mostró una ligera diferencia en la sensibilidad al blanco de calcoflúor, en cambio, la mutante en el gen *KTR7* mostró mayor resistencia que la silvestre y un comportamiento similar se observó en la doble mutante *ptr5 Δ -ptr7 Δ* . Contrario a lo observado para *KTR5* y *KTR7*, la mutante sencilla *Ktr4 Δ* es hipersensible al CFW (Lussier et al., 1996).

Familia *KRE2/MNT1* en *C. albicans* y otras especies

A la fecha, se han identificado 5 miembros de la familia *KRE2/MNT1* en *C. albicans*, de los cuales se ha demostrado su actividad de manosiltransferasa en diferentes estudios (Thomson et al., 2000; Munro et al., 2005; Mora-Montes et al., 2010; Díaz-Jiménez et al., 2012). Las enzimas CaMnt1p y CaMnt2p participan en la O-glicosilación y tienen actividad parcialmente redundante (Munro et al., 2005), adicionando la segunda, tercera y cuarta manosa a las O-mananas; aunque CaMnt1p puede agregar hasta tres residuos más (Díaz-Jiménez et al., 2012). La

actividad bioquímica de CaMnt3p y CaMnt4p no ha sido probada directamente. Sin embargo, la interrupción génica de todos los miembros de la familia *KRE2/MNT1* de *C. albicans*, la triple mutante *Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ* presenta defectos en crecimiento, niveles del 50% de fosfomanosilación (~60 µg de colorante azul Alciano unidos), incrementa su unión a blanco de calcoflúor y las paredes celulares de estas mutantes presentan niveles mayores de quitina y β-glucanas, y una baja en los niveles de mananas, comparadas con las células del tipo silvestre (Mora-Montes *et al.*, 2010).

Por otra parte en el grupo de trabajo, se ha aislado y caracterizado el gen *MNT1* del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*, el gen se caracterizó y se demostró su actividad como manosiltransferasa involucrada en la ruta de *N*-glicosilación (Hernández-Cervantes *et al.*, 2012).

Justificación

La glicosilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes y es esencial para las células. La levadura *S. cerevisiae* es un hongo modelo, no patógeno, usado ampliamente en investigación; y se ha descrito gran parte de las rutas de glicosilación de proteínas, tanto a nivel de genes, como la batería de enzimas que sintetizan, procesan y maduran las cadenas de oligosacáridos. Dentro de estas enzimas, se encuentran las enzimas llamadas manosiltransferasas, dentro de las cuales se encuentra la familia *KRE2/MNT1*. Sin embargo, a la fecha no se ha establecido el papel funcional de tres miembros de esta familia dentro de las rutas de glicosilación. En el presente estudio se pretende dilucidar las funciones de estos tres genes: *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*.

Objetivos

Objetivo general:

Caracterizar la función de los productos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*

Objetivos específicos:

1. Expresar de manera heteróloga los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en *Pichia pastoris*.
2. Caracterización funcional de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* mediante su expresión en *C. albicans*.

Materiales y métodos

Organismos empleados, medios y condiciones de cultivo

Las distintas cepas de *S. cerevisiae*, de *C. albicans*, y de *P. pastoris* se encuentran en la Tabla I. Las células de *C. albicans* fueron crecidas en medio YPD [1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glucosa], se agregó uridina (50 µg/mL) en casos necesarios. Las células transformantes de *C. albicans* se crecieron en medio mínimo con glucosamina [0.77% (p/v) base nitrogenada de levadura, 25.64 mM de glucosamina] para la inducción de hexosaminidasa (Mora-Montes *et al.*, 2010). Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* cepa DH5α para la clonación de los genes. Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB) y se añadió ampicilina en los casos requeridos [1 (p/v) extracto de levadura, 0.5% (p/v) peptona, 0.5 % (p/v) NaCl, y ampicilina 100 µg/ml]. Las células transformantes de *P. pastoris* se crecieron en medio YPD agar suplementado con 1M de sorbitol como osmoprotector, y para la inducción de expresión de las proteínas heterólogas en *P. pastoris* se realizó un pre cultivo en medio YP para el crecimiento de las levaduras [2% (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) peptona de caseína, 1% (p/v) glicerol, histidina y biotina] y para la inducción el glicerol se cambió por metanol al 1% (v/v).

Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Las células de *E. coli* se crecieron a 37°C y 200 rpm por toda la noche en medio LB líquido con ampicilina a una concentración final de 100 ng/µL. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 2560 x g por 10 min. Se descartó el sobrenadante dejando de 50-100 µL de medio en el cual las células se resuspendieron. A estas células se agregaron 350 µL de regulador TENS (10 mM Tris pH 7.5, 0.001 M EDTA pH 8.0, 0.1 N NaOH y 0.5% SDS), se mezclaron por inversión, después se agregaron 150 µL de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y se mezcló por inversión. Después los microtubos se sometieron a centrifugación a 10 700 x g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se rescató y se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregaron 900 µL de etanol absoluto pre enfriado a -20 °C.

Tabla I. Genotipo de los organismos utilizados.

Cepa	Organismo	Genotipo	Referencia
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
CAI4	<i>C. albicans</i>	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	Fonzi and Irving (1993)
NGY152	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>RPS1/rps1Δ::cip10</i>	Brand <i>et al.</i> (2004)
C222	<i>C. albicans</i>	Como CAI4, pero <i>mnt1-mnt2Δ::hisG/mnt1-mnt2Δ::hisG, RPS/rps1Δ</i>	Munro <i>et al.</i> , (2005)
C86	<i>C. albicans</i>	Como C222 pero <i>RPS/rps1Δ::Cip10</i>	Munro <i>et al.</i> (2005)
C88	<i>C. albicans</i>	Como C222 pero <i>RPS/rps1Δ::Cip10-MNT1</i>	
C223	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt3Δ::hisG/mnt3Δ::hisG, mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ</i>	Mora-Montes <i>et al.</i> (2010)
C108	<i>C. albicans</i>	Como C223 pero <i>RPS1/rps1Δ::Cip10</i>	Mora-Montes <i>et al.</i> (2010)
C110	<i>C. albicans</i>	Como C223 pero <i>RPS1/rps1Δ::Cip10 MNT5</i>	Mora-Montes <i>et al.</i> (2010)
C125	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ</i>	Mora-Montes <i>et al.</i> (2010)
C123	<i>C. albicans</i>	Como C125 pero <i>RPS1/rps1Δ::Cip10</i>	Mora-Montes <i>et al.</i> (2010)
C124	<i>C. albicans</i>	Como C125 pero <i>RPS1/rps1Δ::Cip10-MNT5</i>	Mora-Montes <i>et al.</i> (2010)
HMY142	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt1Δ::dp1200/mnt1Δ::dp1200, mnt2::dp1200/mnt2::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR5</i>	Este estudio
HMY143	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR5</i>	Este estudio
HMY144	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt3Δ::hisG/mnt3Δ::hisG, mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR5</i>	Este estudio
HMY145	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt1Δ::dp1200/mnt1Δ::dp1200, mnt2::dp1200/mnt2::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR7</i>	Este estudio
HMY146	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR7</i>	Este estudio
HMY147	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt3Δ::hisG/mnt3Δ::hisG, mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR7</i>	Este estudio
HMY169	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt1Δ::dp1200/mnt1Δ::dp1200, mnt2::dp1200/mnt2::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR4</i>	Este estudio
HMY170	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt3Δ::hisG/mnt3Δ::hisG, mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR4</i>	Este estudio
HMY171	<i>C. albicans</i>	Como CAI4 pero <i>mnt4Δ::dp1200/mnt4Δ::dp1200, mnt5::dp1200/mnt5::dp1200, RPS1/rps1Δ::pAct1-ScKTR4</i>	Este estudio
X-33	<i>P. pastoris</i>	Silvestre	Invitrogen
C149	<i>P. pastoris</i>	Como x-33 pero <i>AOX1::pPicZaC</i>	Díaz-Jiménez <i>et al.</i> 2012.
C150	<i>P. pastoris</i>	Como X-33 pero <i>AOX1: pPicZaC-CaMNT1</i>	Díaz-Jiménez <i>et al.</i> 2012.
HMY502	<i>P. pastoris</i>	Como X-33 pero <i>AOX1: pPicZaC-ScKTR4</i>	Este estudio
HMY506	<i>P. pastoris</i>	Como X-33 pero <i>AOX1: pPicZaC-ScKTR7</i>	Este estudio

Se dejó incubar por 20 min a -20 °C, después se centrifugó a 10 700 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante por decantación y la pastilla se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70%, después del último lavado se dejó secar y se resuspendió en 40 µL de agua estéril. Para cuantificarlo, se usó el equipo Nanodrop (Thermo Scientific), usando 2 µL del DNA muestra y se visualizó en un gel de agarosa al 1% (p/v).

Extracción de DNA genómico hongos

El DNA genómico de *S. cerevisiae* y *C. albicans* se extrajo de la misma manera: De un cultivo de 25 mL con 10 h de incubación a 28 °C, las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con agua desionizada y enseguida se resuspendieron en un regulador compuesto de TRIS pH 8.0, EDTA y SDS 0.1 % (p/v) y se colocaron en un microtubo con perlas de vidrio; las células se rompieron mecánicamente por agitación vórtice por 4 min en períodos de 30 seg cada uno y un min de reposo en hielo. Se centrifugaron a 10 000 x g por 10 min y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se le agregaron 400 µL de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1 v/v); se mezclaron por agitación vórtice por 30 seg y se centrifugaron a 10 000 x g por 12 min, se separó la fase acuosa en un microtubo nuevo y el DNA se precipitó con etanol absoluto, dejando en reposo el microtubo por 30 min a -20 °C, tras lo cual, los microtubos se centrifugaron a 10 000 x g por 5 min, a la pastilla se le dieron dos lavados con etanol al 70% (v/v) y se dejaron secar a temperatura ambiente. El DNA purificado se resuspendió en 100 µL de agua desionizada y se visualizó en un gel de agarosa al 1% (p/v).

Construcción de los plásmidos pPScKTR4, pPScKTR5 y pPScKTR7 para la expresión heteróloga *P. pastoris*.

Las productos proteínicos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* son caracterizados bioinformáticamente como manosiltransferasas residentes en aparato de Golgi, con un paso transmembranal y una región citoplasmática, sin embargo la parte activa de las enzimas se encuentran orientadas al lumen del aparato de Golgi (Lussier *et al* 1996, 1999). Para la expresión heteróloga de los

genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en *P. pastoris* fue necesario diseñar los oligonucleótidos para que amplificaran la región codificante del dominio soluble de las proteínas. De esta manera, para el caso de *ScKTR4*, se tomó de la base 99 a la 1415, para el gen *ScKTR5* de la base 121 a la 1583 y para el gen *ScKTR7* se tomó desde la base 139 a la 1575 del marco de lectura abierto. Los oligonucleótidos se enlistan en la Tabla II. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos con una temperatura inicial de 94 °C por 30 seg, seguido de una temperatura de alineamiento a 57 °C (*ScKTR4*) ó 55°C (*ScKTR5* y *ScKTR7*) por 40 seg, y una extensión de 72 °C por 40 seg, y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR de cada gen se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1%, y a partir del gel se purificaron con ayuda del sistema de purificación illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE). Posteriormente, tras corroborar la purificación, el producto de PCR de cada gen se ligó y se clonó en el vector pJet1.2 blunt. Con estas construcciones se transformaron células de *E. coli* DH5α de acuerdo al protocolo enunciado anteriormente. Las colonias resultantes fueron sembradas en medio LB sólido con ampicilina a 100 µg/mL y posteriormente en medio LB líquido para aislar el DNA plasmídico y poder caracterizarlo mediante endonucleasas y PCR. A las colonias positivas se les extrajo nuevamente DNA plasmídico y fueron secuenciados para verificar un marco de lectura sin inserciones o deleciones.

Después de este proceso, los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* fueron clonados en el vector pPicZαC (Invitrogen), los genes se insertaron en dirección 5´a 3´ bajo el promotor *AOX1*, y en fase con la secuencia secretora del factor α. Esto fue corroborado por la secuenciación de cada una de las construcciones. Como se puede apreciar en la tabla II, para insertar los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* se utilizaron las secuencias que reconocen las endonucleasas *Cla* I y *Not* I para los genes *ScKTR4* y *ScKTR7*, y *Kpn* I y *Not* I para el gen *ScKTR5*. El factor α permite exportar las proteínas al medio extracelular para facilitar los pasos de purificación y/o caracterización subsecuentes.

Construcción de los plásmidos pAct1-ScKTR4, pAct1-ScKTR5 y pAct1ScKTR7

Amplificación por PCR de los genes ScKTR4, ScKTR5 y ScKTR7

Se utilizó DNA genómico de *S. cerevisiae* para amplificar el marco de lectura completo de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. Para el caso del gen *ScKTR4* se utilizaron los oligonucleótidos KTR4 comp Fw y KTR4 comp Rv (Tabla II), para el gen *ScKTR5* los oligonucleótidos KTR5 comp Fw y KTR5 Rv y para el gen *ScKTR7* los oligonucleótidos KTR7 Fw y KTR7 Rv (Tabla II). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos con una temperatura inicial de 94 °C por 30 seg seguido de una temperatura de alineamiento a 57 °C (*ScKTR4*), 54 °C (*ScKTR5*) o 56 °C (*ScKTR7*) por 30 seg, y una extensión de 72 °C por 1.20 min, y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y las bandas correspondientes a los tamaños de cada uno de los genes se cortaron con el fin de extraerlos del gel de agarosa. Cada uno de los amplicones se purificaron con el kit de purificación Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE), se corroboró la purificación tomando una alícuota producto del proceso de purificación y visualizándolo en un gel de agarosa al 1%. Tras lo cual, los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* se ligaron en el vector pJet1.2 blunt (Fermentas), siguiendo las instrucciones de la casa comercial y se transformaron células de *E. coli* DH5α químicamente competentes con el producto de la ligación. Se corroboró por PCR la clonación de cada uno de los genes el vector pJet1.2 blunt.

Mutagénesis sitio dirigida

Debido a que los genes *ScKTR5* y *ScKTR7* presentan naturalmente un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *HindIII*, se realizó mutagénesis sitio dirigida sobre la construcción pJet-*ScKTR5* y pJet-*ScKTR7* para eliminar dicho sitio. Puesto que se utilizaron las endonucleasas *HindIII* y *NheI* para realizar la subclonación de estos dos genes en el vector pACT1 (Barrelle *et al.*, 2005). Para llevar a cabo la mutagénesis se analizó la secuencia y se decidió cambiar

solamente la última base (A por G) del codón 259 para el caso del gen *ScKTR5* y la última base (A por G) del codón 261 del gen *ScKTR7*. Una vez diseñados los oligonucleótidos, la mutagénesis sitio dirigida se realizó con ayuda del sistema Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific), se siguieron las especificaciones experimentales de la casa comercial. Brevemente las reacciones de amplificación se realizaron en el siguiente orden: 33 μ L de agua, 10 μ L de amortiguador HF 5X; 0.3 μ M de la mezcla de cada uno de los dNTPs; 0.3 μ M del oligonucleótido directo; 0.3 μ M del oligonucleótido reverso, los oligonucleótidos están nombrados como Ktr5 mut Fw, Ktr5 mut Rv, Ktr7 mut Fw y Ktr7 mut Rv (Tabla II); 100 pM de DNA templado y 1 unidad de la enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase. La reacción se llevó a un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a una temperatura de 98°C por 30 seg, seguido de 25 ciclos con una desnaturalización a 98 °C por 10 seg, una temperatura de alineamiento de 65 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por dos min y medio, seguido de una extensión final a 72 °C por 5 min. Una vez terminada la reacción de PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para corroborar la amplificación. El producto de PCR se ligó con la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific), y con esta ligación se transformaron células de *E. coli* DH5 α ultracompetentes (Inoue *et al.*, 1990). De las transformantes obtenidas se aislaron los DNA plasmídicos, a los cuales se les sometió a digestión con la enzima *Hind* III para corroborar la mutación. Los DNA plasmídicos seleccionados fueron secuenciados para confirmar el cambio de las bases en la secuencia de ambos genes.

Subclonación en pACT1

Para llevar a cabo los experimentos de complementación, los tres marcos de lectura abierto *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* se liberaron del plásmido de mantenimiento pJet 1.2 blunt por doble digestión con las endonucleasas *Hind* III y *Nhe* I, las bandas correspondientes a cada uno de los tres genes se cortaron del gel de agarosa al 1% y a partir del gel se purificaron con el sistema de purificación para geles de agarosa.

Tabla II. Lista de oligonucleótidos iniciadores utilizados en el presente proyecto.

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción
Ktr5 mut Fw	5'GTTTAGACACACTAAGAGCTTTATCAGTCAAAAAGG	No
Ktr5 mut Rv	5'GACTGATAAAGCTCTTAGTGTGTCTAAACAAATTTG	No
Ktr7 mut Fw	5'G TTCAGAACAAACCAAGAGCTTTATAAAAAAAC	No
Ktr7 mut Rv	5'CGTTTTTTTTATAAAGCTCTTGGTTGTTCTG	No
KTR4 exp Fw	5' <u>ATCGATGG</u> GAGA ACTATTTGCAAGCAGTCAA	<i>Cla</i> I
KTR4 exp Rv	5' <u>GCGGCCGCT</u> CAATACATTTCTAACTCTTCCTCA	<i>Not</i> I
KTR5 exp Fw	5' <u>GGTACC</u> AGCATCCGTAGACGGA ACTATG	<i>Kpn</i> I
KTR5 exp Rv	5' <u>GCGGCCGCT</u> AGTTTCCGA ACTGTCTTAGAT	<i>Not</i> I
KTR7 exp Fw	5' <u>ATCGATG</u> ATTGTACATGATCCAAATAA	<i>Cla</i> I
KTR7 exp Rv	5' <u>GCGGCCGCT</u> ATTCAATTACTCTAAAAT	<i>Not</i> I
KTR4 comp Fw	5' <u>AAGCTT</u> ATGAGGTTTCTTTCAAAAAGG	<i>Hind</i> III
KTR4 comp Rv	5' <u>GCTAGCT</u> CAATACATTTCTAACTCTTCCT	<i>Nhe</i> I
KTR5 comp Fw	5' <u>AAGCTT</u> ATGTTGCTAATAAGAAGGACG	<i>Hind</i> III
KTR5 comp Rv	5' <u>GCTAGCC</u> TAGTTTCCGA ACTGTCTT	<i>Nhe</i> I
KTR7 comp Fw	5' <u>AAGCTT</u> ATGGCTATAAGATTGAATCCAAA	<i>Hind</i> III
KTR7 comp Rv	5' <u>GCTAGCC</u> TATTCAATTACTCTAAAATTTCTC	<i>Nhe</i> I
Clp10-IS	5' GATATCGAATTCACGCGTAG	No
RP10-GS	5' GTACATTCCTACTCCGTTCCG	No

Los productos de la purificación se ligaron al vector pACT1, previamente abierto con las endonucleasas *Hind* III y *Nhe* I y purificado a partir del gel de agarosa. Con las construcciones obtenidas se realizaron la transformaciones de células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes por un choque térmico. Las clonas resultantes se crecieron en medio líquido LB complementado con ampicilina, y a partir de estos cultivos se obtuvieron plásmidos, los cuales se analizaron por restricción con las endonucleasas *Hind* III y *Nhe* I y por amplificación de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* por PCR, antes de la transformación de las células mutantes de *C. albicans*. A los oligonucleótidos que se les adaptaron sitios de reconocimiento para endonucleasas, se muestran con las letras subrayadas en la Tabla II.

Transformación de bacterias

Las construcciones de los plásmidos una vez realizadas se subclonaron en células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes, las cuales se transformaron por choque térmico. El proceso se describe a continuación: se mezclaron 50 μ L de células competentes con 300 ng de cada una de las construcciones obtenidas, se utilizó agua estéril o plásmido vacío (pACT1) como controles. Las células se mezclaron en condiciones de esterilidad gentilmente con cada uno de los DNA plasmídicos que contienen las construcciones en el vector pACT1. Una vez agregado el plásmido, las células se dejaron reposar por 20 min en hielo, terminado este tiempo se sometieron a un choque térmico a 42 °C por 30 seg, seguido de una incubación en hielo por 5 min. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio LB sin antibiótico precalentado a una temperatura aproximada de 30-35 °C, e incubadas a 37°C con agitación a 200 rpm por 1 h. Terminado el tiempo de incubación, las células se sembraron en medio LB agar con ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ μ L ó 25 μ g/mL de zeocina. La caja de Petri con el medio de cultivo LB se precalentó a 37 °C para evitar otro choque térmico, las células se sembraron en el agar y se incubaron a 37 °C por toda la noche.

Transformación de *P. pastoris*

Células de la cepa X-33 de *P. pastoris* se transformaron por electroporación, según el protocolo del proveedor (Invitrogen). Brevemente, se obtuvieron células de *P. pastoris* competentes de la siguiente manera (todo el proceso de obtención de las células competentes hasta la electroporación se realizó en frío con las soluciones previamente enfriadas en hielo). Se colocó un inóculo de *P. pastoris* en 100 mL de medio YPD líquido y se incubó a 28 °C con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una $D.O_{.600nm} = 1.2-1.5$. Una vez alcanzada dicha densidad de cultivo, las células se cosecharon por centrifugaron a 1800 x g por 5 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces en agua estéril fría, se centrifugaron en cada lavado y se resuspendieron en 20 mL de sorbitol 1M frío dos veces. La pastilla celular

finalmente se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1M. De estas células se colocaron 80 μ L en un microtubo nuevo con 80 μ g del DNA plasmídico, linearizados previamente con la endonucleasa *Sac* I, y se dejó incubar por 10 min, esta mezcla se colocó en las celdas para electroporar y se incubó en hielo por 15 min. La electroporación se realizó utilizando las condiciones preestablecidas (Voltaje 2000 V, capacitancia 25 μ F, resistencia 200 Ω , cubeta de 2 mm de diámetro) para *P. pastoris* del electroporador (Bio-Rad). Inmediatamente después de la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 mL de sorbitol 1M frío, se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL y se incubaron sin agitación por 2 horas a 28 °C. Para evitar el arco durante la electroporación, los DNA plasmídicos se desalaron tras la digestión con la endonucleasa *Sac*I. Transcurrido el tiempo de recuperación, las células se sembraron en cajas Petri con medio YPD más 1M de sorbitol como agente osmoprotector (YPDS) conteniendo 100 μ g/mL de zeocina como marcador de selección. Se utilizó el vector pPic α C vacío como control de transformación y como control negativo en los experimentos de expresión de proteínas.

Transformación de *C. albicans*

Se transformaron células de *C. albicans* (*Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ , *Camnt3* Δ -*Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ y *Camnt1* Δ -*Camnt2* Δ) auxótrofas a uridina, por lo que se crecieron en medio YPD con uridina a una concentración final de 1 μ g/mL y se tomaron células en fase exponencial; estas células se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces con 20 mL de agua desionizada y dos veces con 5 mL de acetato de litio 100 mM. Las células se resuspendieron en 240 μ L de PEG 4000 al 50%, 36 μ L de acetato de litio 1M. A esta mezcla se le agregó 1 μ g de DNA de esperma de arenque (Clontech) como DNA acarreador y 10 μ g del DNA plasmídico linearizado con la enzima de restricción *Stu* I, de cada una de las construcciones obtenidas para los genes pACT1-*ScKTR4*, pACT1-*ScKTR5*, y pACT1-*ScKTR7*. Después, las células se incubaron a 30 °C por 40 min, seguido de un choque térmico a 42°C por 20 min, tras lo cual las células se centrifugaron a 8000 x g por

2 min, se resuspendieron en 200 μ L de agua desionizada y se sembraron 100 μ L de la suspensión celular en cajas Petri conteniendo medio mínimo (Gietz y Woods, 2001). Las colonias transformantes (HMY488, HMY142, HMY147, HMY491, HMY143, HMY146, HMY495, HMY144 y HMY147, véase Tabla I) aparecen de 3 a 7 días. Estas células transformantes de *C. albicans* obtenidas se crecieron en medio mínimo líquido, y a partir de este cultivo se aisló DNA genómico de cada transformante obtenidas. La inserción de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* de en el genoma de *C. albicans* se confirmaron por PCR amplificando el marco de lectura abierto del cada uno de los genes con los oligonucleótidos específicos para cada uno, utilizando DNA genómico de *C. albicans* como molde. Por otra parte, se utilizaron los oligonucleótidos RPS10 Fwd y CIP10 rev (Tabla II) para verificar que la la construcción se introdujo de manera específica en el locus neutro *CaRPS10*.

Expresión heteróloga de las proteínas ScKtr7p.

De las transformantes de *P. pastoris* con las construcciones pPic α C y con cada uno de los genes (*ScKTR4*, *ScKTR5* ó *ScKTR7*) se hicieron experimentos para la producción heteróloga de las proteínas a pequeña escala (5 mL de cultivo) por 72 h, a los cuales se les agregó metanol al 1% cada 24 h. Para analizar la expresión se precipitó 1 mL del medio de cultivo con ácido tricloroacético (TCA) 1M, las proteínas precipitadas se lavaron dos veces con acetona fría y se resuspendieron en 40 μ L de agua desionizada, se mezclaron con 12 μ L de regulador de carga (0.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% glicerol, 2% SDS, 0.0025% azul de bromofenol) y de esta mezcla se colocaron 20 μ L en un gel discontinuo desnaturizante de poliacrilamida al 12% (Laemli, 1970). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (50% metanol, 10% ácido acético, 0.25 Azul Brillante Coomassie R-250), el exceso de colorante se retiró con la solución acuosa de desteñido (40 % metanol, 10% ácido acético). Los geles fueron preservados en la solución de conservación (5% ácido acético) y la imagen se capturó exponiendo el gel a luz blanca con el equipo ChemDoc™ MP (Bio-Rad).

Ensayo de manosiltransferasa.

Para corroborar la expresión de las proteínas heterólogas, producto de los experimentos que se mencionan en el párrafo anterior, se montaron ensayos de actividad enzimática (Nakajima y Ballou, 1975) de la siguiente manera: se prepararon mezclas de reacción que contenían: PIPES 50 mM (pH 7.2), MnCl_2 10 mM, GDP- ^{14}C manosa 0.76 μM (0.01 μCi ; actividad específica 262 mCi/mmol), α -metil manósido 50 mM como aceptor, y de 200 a 300 ng de proteína a un volumen final de 50 μL . Las reacciones se incubaron 16 h a 30 °C. Para eliminar la GDP-manosa no unida al oligosacárido, las mezclas se pasaron a través una columna (~0.4 mL) de resina de intercambio iónico AG 2XB (Bio-Rad). Los productos neutros se recuperaron lavando la resina con 1.5 mL de agua; el agua conteniendo los productos se colocó en un vial, se agregaron 3 mL de líquido de centelleo acuoso [Triton X-100 60% (v/v), Agua 16% (v/v), Tolueno 24% (v/v), PPO 0.0035% (p/v)] y la radioactividad se determinó en un contador de centelleo Beckman LS 6500.

Ensayo de unión al colorante azul Alciano

Los ensayos de unión al colorante azul Alciano se realizaron con las células de *C. albicans* mutantes (C108, C123), silvestre (NGY152) y complementadas HMY170 y HMY171 (*ScKTR4*); HMY143 y HMY144 (*ScKTR5*); HMY146 y HMY147 (*ScKTR7*) y con el gen *CaMNT5* (C110 y C124). Para llevar a cabo el experimento, las células se crecieron en medio YPD sin uridina, se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con agua desionizada. Estas células se ajustaron a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}=0.2$, en un microtubo se añadieron a cada microtubo 1 mL de la suspensión celular, se centrifugaron a 10 000 x g por 5 min y se resuspendieron en 1 mL de colorante azul Alciano a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$, se incubaron por 15 min a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron y el sobrenadante libre de células se leyó a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Hobson *et al.*, 2004).

Movilidad electroforética de la enzima *N*-acetilhexosaminidasa (Hex1p)

(Bates *et al.*, 2006) Para realizar los ensayos de movilidad electroforética de la enzima Hex1p (Bates *et al.*, 2005, Mora-Montes *et al.*, 2010) se crecieron células transformantes (enunciadas en el párrafo anterior y tabla I) de *C. albicans* en medio mínimo con 2% de glucosamina, estas células se cultivaron por 18 h a 28 °C con agitación de 200 rpm. Pasado este tiempo, las células se cosecharon por centrifugación a 3000 x g por 5 min y la pastilla celular se lavó dos veces con agua desionizada, tras lo cual, las células se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio en 400 µL de regulador Tris-HCl 100 mM, pH 7.0. Los microtubos se centrifugaron a 10 000 x g por 10 min (Bates *et al.*, 2005; Mora-Montes *et al.*, 2010; Hernández-Cervantes *et al.*, 2012). Antes de realizar los ensayos de movilidad electroforética de la enzima Hex1p, se hizo un experimento utilizando el extracto del rompimiento celular y el sustrato 4-metil umbeliferil *N*-acetil β-D-glucósido (MU-GlcNac; Sigma), y cuantificando la cantidad de 4-umbeliferona liberada por la enzima Hex1p en un espectrofotómetro (Beckman). El volumen de cada extracto que se utilizó para la electroforesis no desnaturizante, se normalizó en base a la 4-umbeliferona liberada en el ensayo enzimático.

Se realizó un gel de poliacrilamida al 6%, con un grosor de 0.75 mm, y las muestras se separaron en el gel con una transmisión de corriente eléctrica de 75 V por un periodo de 4 h a 4 °C, tras lo cual, los geles se lavaron con agua desionizada y se colocaron en una solución de citrato-KOH 100 mM pH 4.5 y 4 mM del sustrato MU-GlcNac, se incubaron por 30 min en baño María a 37 °C (Mora-Montes *et al.*, 2010; Hernández-Cervantes *et al.*, 2012), y el movimiento electroforético se reveló exponiendo el gel directamente a luz UV, las imágenes se capturaron con el fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) .

Ensayo de susceptibilidad a agentes perturbadores de pared celular

Los defectos en las vías de glicosilación de proteínas tienen como consecuencia directa una pared celular más susceptible a agentes externos que tienen afinidad por los componentes de la pared celular como a quitina y β-glucanas. Por lo cual,

se realizaron ensayos de confrontación contra estos agentes en medio YPD líquido. Las células de *C. albicans* complementadas con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* se crecieron hasta alcanzar la fase exponencial, tras lo cual se cosecharon por centrifugación, se lavaron con agua desionizada estéril, se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración final de 1×10^8 cel/mL. De esta dilución celular se tomaron 5 μ L y se colocaron con cada una de las concentraciones de los agentes perturbadores por triplicado (Mora-Montes *et al.*, 2010). Las microplacas de cultivo se incubaron a 28 °C por 40 h con agitación a 120 rpm, tras este tiempo el crecimiento celular se estimó en un espectrofotómetro para placas de ELISA Epoch (Biotek) a una longitud de onda de 600 nm.

Se utilizaron cuatro concentraciones de cada uno de los perturbadores de pared celular, rojo Congo (50, 100, 150 y 200 μ g/mL), blanco de calcoflúor (5, 10, 20 y 40 μ g/mL), higromicina B (20, 40, 100 y 150 μ g/mL) y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS; 0.01, 0.05, 0.25 y 0.5%). Se utilizó medio YPD como control de crecimiento.

Cromatografía en capa fina (TLC)

La O-glicosilación de proteínas se analizó con experimentos más directos, dada la facilidad para obtener las O-mananas de las células mediante un tratamiento alcalino (β -eliminación). Se utilizaron las células de *C. albicans* silvestre y mutantes en los genes *Camnt1 Δ –Camnt2 Δ* (C86) y complementadas con los genes *ScKTR4* (HMY169), *ScKTR5* (HMY142) y *ScKTR7* (HMY145) y *CaMNT1* (C88). A partir de un cultivo celular en fase exponencial las células se cosecharon, se lavaron con agua desionizada, y se resuspendieron en 20 mL de NaOH 0.1 M. El tubo conteniendo las células se colocó en un oscilador mecánico para mantenerlo con agitación suave por 16 h; tras este período se retiraron las células por centrifugación.

El sobrenadante, producto de la β -eliminación, se colocó en otro tubo y se neutralizó con HCl 1M, las muestras se concentraron por liofilización (Freezone 6,

Labconco). Para realizar la TLC se pesaron 25 mg del producto liofilizado de la β -eliminación y se resuspendieron en 50 μ L de agua, se precipitaron proteínas añadiendo 1 mL de acetona fría y se incubaron por 12 h a -20 °C, después se centrifugaron, los sobrenadantes se colocaron en microtubos nuevos y se dejaron destapados para evaporar la acetona, si la muestra presentaba niveles altos de sal, se dializaron contra agua desionizada en membranas de diálisis para DNA de 0.02 μ m (Milipore), se congelaron y se concentraron por liofilización. Los carbohidratos se resuspendieron en 20 μ L de agua desionizada y se tomó 1 μ L para llevar a cabo la separación de los carbohidratos por TLC en placas de silica gel 60 (Merk). La fase móvil se compuso de propanol:butanol:agua (Kanaya *et al* 1978; Mellado-Mojica y López, 2012). Las muestras se revelaron asperjando la solución de revelado compuesta de acetona:ácido fosfórico:anilina:difenilamina (Anderson *et al.*, 2000) e incubando la placa a 120 °C hasta la aparición de las manchas.

Electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoróforo (FACE)

De las muestras obtenidas de carbohidratos por los experimentos de β -eliminación se pesaron 10 mg de las O-mananas y se resuspendieron en 20 a 50 μ L de agua desionizada, se les agregaron 0.02M de solución ANTS (ácido 8-aminonaptaleno-1,3,6-trisulfónico didisódico) disuelta en ácido acético:agua en proporción 3:17 (v/v) y 0.1 M de NaBH_3CN (cianoborohidruro de sodio) disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido) puro (Jackson, 1990; Bardor *et al*, 2000). Los azúcares se dejaron derivatizar por 16 h a 37 °C, tras lo cual las muestras se secaron al vacío a 45 °C por 4 h. Las muestras se resuspendieron en 50 μ L de regulador de suspensión [0.625 M Tris pH 6.8, 20% glicerol (v/v)] y se separaron en un gel de poliacrilamida al 35% aplicándole al gel una corriente eléctrica de 150 V por 6-8 h a 4 °C. Una vez terminada la separación electroforética los geles se expusieron directamente a luz UV para visualizar la separación de los carbohidratos derivatizados en el gel, y las imágenes se capturaron con ayuda del fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

Análisis estadísticos

Los datos arrojados de los experimentos se les hicieron análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico R (<https://www.r-project.org>). Los análisis estadísticos se hicieron con los datos experimentales de unión del colorante azul alciano y de exposición a agentes perturbadores.

Resultados

Construcción de los plásmidos pPScKTR4, pPScKTR5 y pPScKTR7.

A partir de DNA genómico de *S. cerevisiae* se amplificaron y clonaron parte de los marcos de lectura abiertos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* que codifican para la parte soluble de las correspondientes proteínas. Los oligonucleótidos iniciadores mencionados en la Tabla II fueron usados para dicho objetivo, lo primero que se realizó fue un gradiente de temperatura para la temperatura de alineamiento de 50 a 60 °C, y las condiciones de amplificación finales fueron las siguientes: 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos con una temperatura de 94 °C por 30 seg, una temperatura de alineamiento de 57 °C (*ScKTR4*); 55 °C (*ScKTR5* y *ScKTR7*), una extensión de 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Se corroboró la amplificación en geles de agarosa al 1% (Fig. 2A) y se visualizaron en el fotodocumentador (ChemDoc Bio-Rad). Estos productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa, el producto de PCR de cada gen purificado se ligó al vector pJet1.2 blunt (Fermentas) siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y después de la ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . A partir de las células transformantes se aisló el DNA plasmídico, los cuales fueron caracterizados con la endonucleasa *Bgl* II (Fig. 2B) que flanquea el sitio de multiclonación liberando el producto clonado en pJet 1.2 blunt, en cada una de las figuras se aprecia el vector vacío de 3000 pb y en los genes *ScKTR4* y *ScKTR5* de tamaño de 1400 a 1500 pb; solamente en el caso del gen *ScKTR7* se aprecian dos bandas de 1000 y 500 pb (Fig. 2) aproximadamente, puesto que el gen *ScKTR7* tiene una secuencia naturalmente que reconoce la endonucleasa *Bgl* II. Las clonas positivas fueron corroboradas por PCR, los plásmidos positivos a ambas pruebas se enviaron a LANGEBIO (Cinvestav, Irapuato) para obtener la secuencia con los oligonucleótidos iniciadores propios del vector pJet1.2 blunt (Fermentas).

Una vez que los plásmidos fueron secuenciados se verificó que no hubo deleciones, inserciones o cambios de bases.

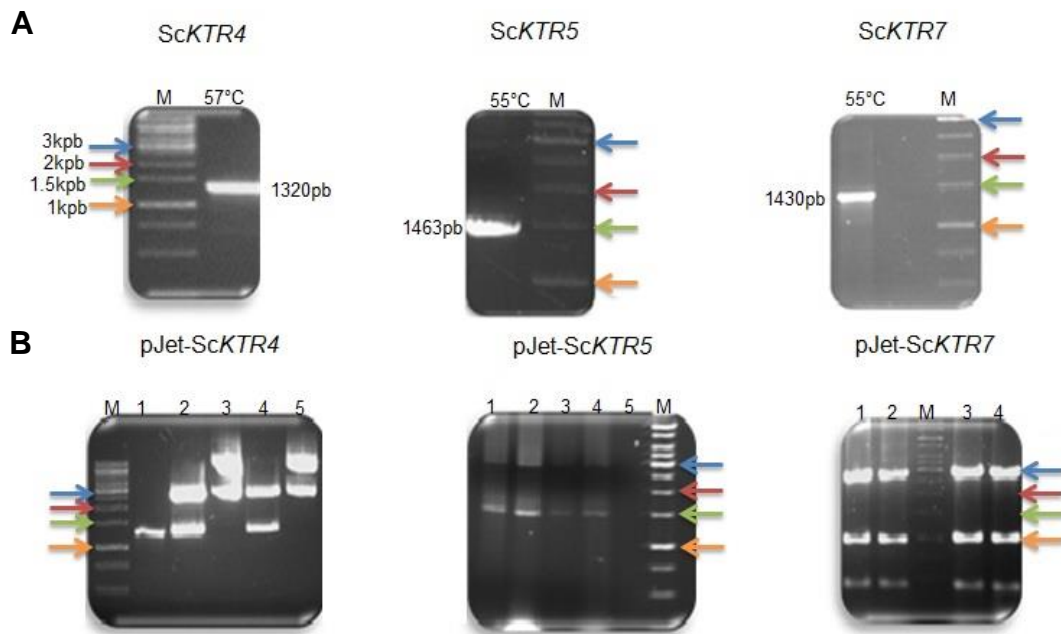


Figura 2. Amplificación por PCR de parte del marco de lectura abierto de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* y clonación en pJet 1.2 blunt. En (A) se muestra la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*, donde se muestra una banda única y la temperatura a la cual amplificaron. Estos genes se clonaron en el vector pJet1.2 blunt con el cual se transformaron células de *E. coli* DH5 α . De las transformantes se aislaron plásmidos, los cuales se sometieron a reacciones de digestión con la endonucleasa *Bgl* II para liberar el fragmento insertado, esperando la banda del plásmido vacío de ~3000pb. y la banda del inserto (señalada con el tamaño a un costado de cada figura) Para *ScKTR4* carril 1, control, carril 2 y 4 dos plásmidos digeridos con *Bgl* II, carril 3 y 5 los mismos plásmidos sin digerir; para *ScKTR5* y *ScKTR7* los carriles del 1 al 4 son diferentes plásmidos de transformantes. M representa al marcador en todos los casos (flecha azul 3 Kb, flecha roja 2 Kb, verde 1,5 Kb y naranja representa 1 Kb),

A partir de las construcciones en pJet 1.2 blunt los insertos se liberaron con las enzimas de restricción correspondientes para cada gen (ver Tabla II), y se ligaron en el plásmido de expresión pPicZ α C. Se realizaron de la siguiente manera: se hicieron reacciones de doble digestión con las enzimas específicas para cada gen (Tabla II), así como del vector pPicZ α C, tras las dobles digestiones, tanto el plásmido pPicZ α C como cada uno de los fragmentos liberados del vector pJet 1.2 blunt se purificaron del gel de agarosa. El plásmido pPicZ α C y cada uno de los genes se ligaron con la enzima T4 ligasa siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Invitrogen), una vez hechas las construcciones genéticas se transformaron células de *E. coli* DH5 α .

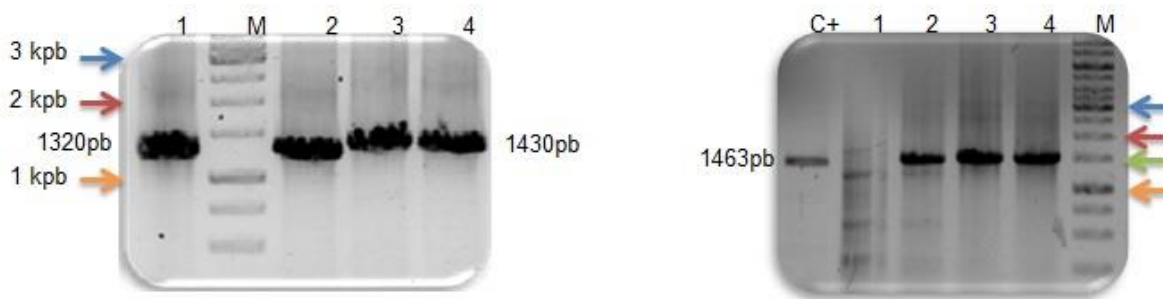


Figura 3. Amplificación por PCR de los marcos de lectura parciales de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en el vector pPicZαC. Se corroboró la ligación de cada uno de los genes de *S. cerevisiae* amplificando cada uno de los genes con los oligonucleótidos específicos para cada uno. En A se muestra la amplificación de *ScKTR4* (carriles 1 y 2) y *ScKTR7* (carriles 3 y 4); mientras en la otra figura (B) se muestra la amplificación del gen *ScKTR5* en 4 diferentes clonas, se incluyó C+ como control positivo de PCR utilizando DNA genómico de *S. cerevisiae* para amplificar dicho gen. M representa al marcador en todos los casos (flecha azul 3 Kb, flecha roja 2 Kb, verde 1,5 Kb y naranja representa 1 Kb), se muestra el tamaño de la banda esperada a un lado de cada uno de los geles.

Las bacterias transformantes obtenidas se seleccionaron por su resistencia a zeocina; de estas transformantes se aislaron plásmidos, a los cuales se les realizaron reacciones de PCR para corroborar las construcciones (Fig. 3). Se verificó también por reacciones de PCR con los oligonucleótidos iniciadores diseñados por el proveedor que flanquean en el promotor y terminador del gen *AOX1* del sistema de expresión (Invitrogen). Los plásmidos de las clonas que resultaron positivas con las reacciones de doble digestión con las endonucleasas y las reacciones de PCR se enviaron a secuenciar a LANGEBIO (CINVESTAV, Irapuato). De los resultados de la secuenciación, se pudo verificar que los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* se encontraban en fase con el promotor de la enzima alcohol oxidasa del plásmido pPicZαC y con el factor α del plásmido pPicZαC, que funciona como señal de exporte de la proteína al medio extracelular.

Expresión heteróloga de *ScKtr7p* en *P. pastoris*

Los plásmidos pPicZαC con los genes *ScKTR4* y *ScKTR5* se sometieron a digestión con la endonucleasa *Sac I* para linearizarlos antes de la transformación de células de *P. pastoris* por electroporación. Se obtuvieron 23 transformantes de

P. pastoris con el plásmido pPScKTR7 y cuatro transformantes con el plásmido pPScKTR4. De estas transformantes de *P. pastoris* con el gen *ScKTR7*, se realizaron ensayos de expresión de proteínas por un periodo de 72 h. Los sobrenadantes libres de células se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) 1M y dos lavados con acetona, las proteínas precipitadas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12% y se tiñeron con Azul de Coomassie.

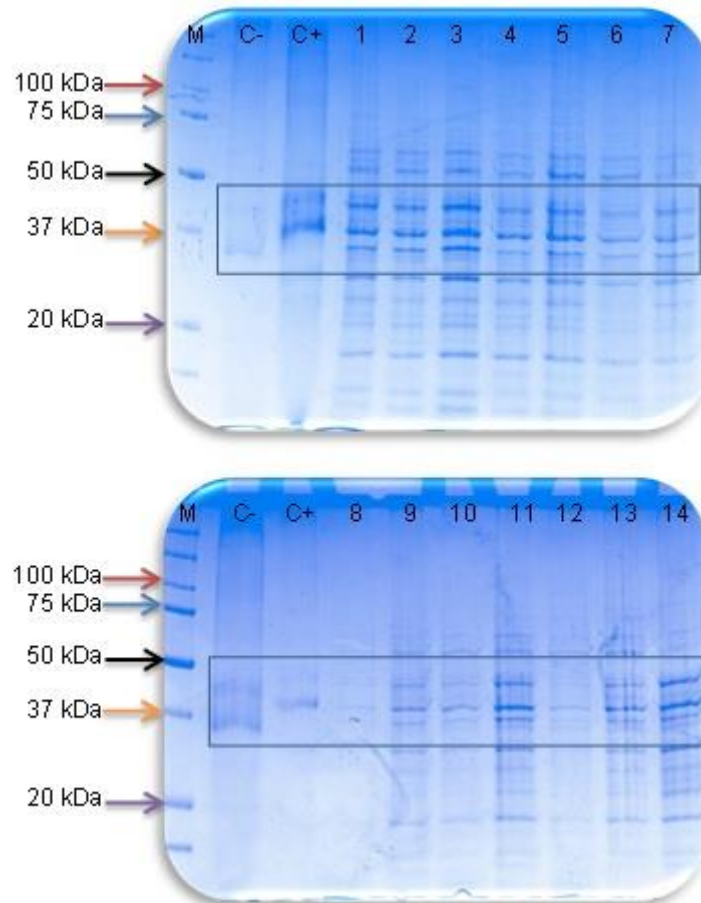


Figura 4. Expresión de ScKtr7p en *P. pastoris*. Las células transformantes obtenidas con la construcción pPicZaCKTR7 se sometieron a experimentos de expresión; a partir del medio extracelular, se concentró por precipitación con TCA, descrito en materiales y métodos. Las proteínas precipitadas se separaron por SDS-PAGE al 12%. En el gel no vemos una banda prominente de expresión al comparar el carril 2 (en ambos geles) con el resto de los carriles. El peso esperado de la proteína ScKtr7p es alrededor de 47 kDa (señalada con el recuadro), y solamente en los carriles 6, 8, 13 y 16 parece haber una mayor expresión de proteínas totales. C- se refiere a control negativo (vector vacío); C+ control positivo (CaMnt1p), carriles de 1 al 14 corresponden a las diferentes clonas transformantes de *P. pastoris* con el gen *ScKTR7*. Se indican las bandas principales del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio-Rad).

El análisis bioinformático de la secuencia nos predice que la proteína producida tendría un peso molecular de 47 kDa para ScKtr7p (Molecular Weight Predictor, ExPASy.org). En la figura 4 se ven dos geles SDS-PAGE donde se muestra la expresión de varias proteínas en los sobrenadantes de las células de *P. pastoris* (carriles 1 al 14) transformadas con el gen *ScKTR7*, las cuales no aparecen en el sobrenadante de las células transformadas con el vector vacío (C-); sin embargo, no se aprecia una banda prominente de proteína del peso molecular predicho con el software.

Tabla III. Actividad enzimática de manosiltransferasa de ScKtr7p. Se hicieron tres mezclas de los sobrenadantes producidos de manera heteróloga por células transformadas con el gen *ScKTR7* de *P. pastoris*.

Condiciones	Cuentas por minuto/ mg proteína total
Sin α -metilmanosido	1286
Vector vacío	2707
Sin enzima	2406
Mezcla 1	2178
Mezcla 2	4813
Mezcla 3	3690
CaMnt1p	26617

Se hicieron tres mezclas con los sobrenadantes para hacer ensayos enzimáticos de incorporación de radioactividad (Tabla III), utilizando GDP-manosa marcada con ^{14}C , en este ensayo se utilizó la enzima Camnt1p expresada por células de *P. pastoris* como control positivo de expresión y actividad enzimática (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012). Los ensayos enzimáticos realizados no muestran una gran incorporación de radioactividad, solamente destaca la mezcla 2; sin embargo, la actividad de CaMnt1p es 5 veces mayor que la mostrada por las proteínas de la mezcla 2 (Tabla III). Por lo cual, podemos sugerir que las enzimas podrían estar degradadas, dado el bandeo que se observa en los geles SDS-PAGE (Fig. 4). Esta idea se refuerza puesto que las construcciones genéticas están en fase con

el promotor *AOX1* del plásmido pPicZαC y el péptido señal de exporte, así como la secuencia del gen *ScKTR7* no tiene errores.

Caracterización funcional de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en *C. albicans*

Clonación de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en pJet1.2 blunt

Para llevar a cabo la caracterización de los tres genes en mutantes dobles y triples de *C. albicans* (ver tabla II), primero se obtuvieron por PCR todos los marcos de lectura abiertos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*, a partir del DNA genómico de *S. cerevisiae* (Fig. 5). Estos productos de PCR se purificaron a partir de gel de agarosa y se ligaron al vector pJet1.2 blunt, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, las construcciones se confirmaron por digestión y PCR (Figura 5).

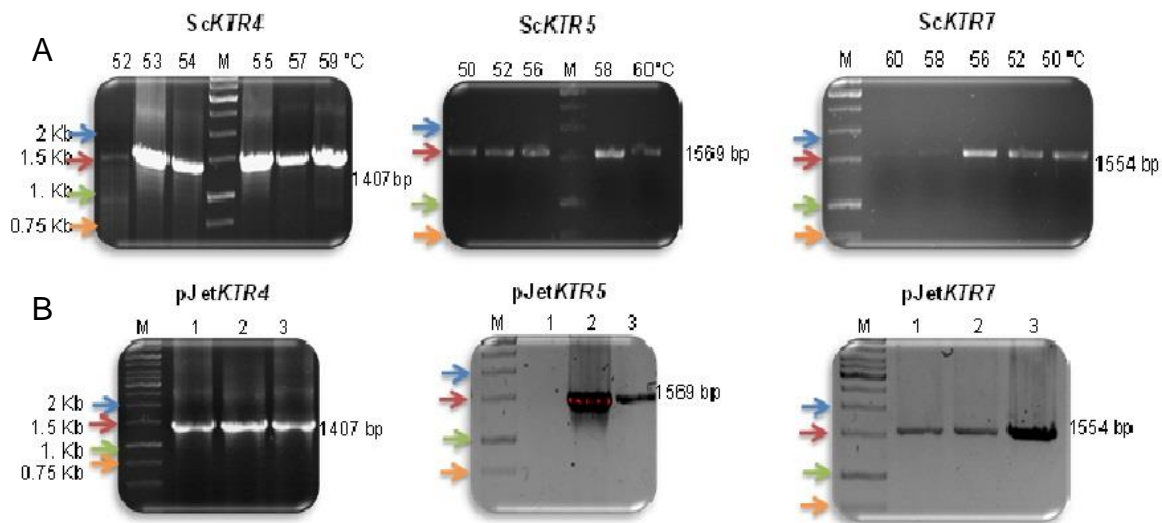


Figura 5. Amplificación y clonación del marco de lectura abierto completo de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. Se amplificaron por PCR los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* con los oligonucleótidos iniciadores citados en la Tabla II, con los cuales se realizaron gradientes de temperatura de alineamiento (A) se clonaron en el vector pJet 1.2 blunt, la inserción de los genes se corroboró por PCR (B) con los oligonucleótidos iniciadores específicos para cada gen, y se muestra a un costado el tamaño de la banda esperada. En los carriles del 1 a 3 representa a cada una de las clonas ensayadas para cada caso, M representa al marcador en todos los casos (flecha azul 2 Kb, flecha roja 1.5 Kb, verde 1 Kb y naranja representa 0.75 Kb).

En los casos de los genes *ScKTR5* y *ScKTR7* se llevaron a cabo experimentos de mutagénesis sitio dirigida utilizando el sistema Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Termo Scientific™) para eliminar un sitio interno para la enzima de restricción *Hind* III y así llevar a cabo su clonación en el vector pACT1-GFP (Barrele *et al.*, 2004).

Clonación en pACT1

Una vez confirmadas las construcciones y hecha la mutagénesis en cada uno de los genes, los marcos de lectura abiertos de *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* se liberaron del vector pJet 1.2 blunt con las endonucleasas *Hind* III y *Nhe* I, se purificaron de gel de agarosa y se ligaron al vector pACT1 (previamente abierto con *Hind* III y *Nhe* I) con la enzima T4 ligasa (invitrogen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se transformaron células de *E. coli* DH5 α y de las transformantes obtenidas se aislaron los respectivos plásmidos, los cuales se utilizaron para amplificar los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* por PCR con los oligonucleótidos iniciadores específicos (Figura 6). Estos plásmidos se utilizaron para llevar a cabo la transformación de células de *C. albicans*.

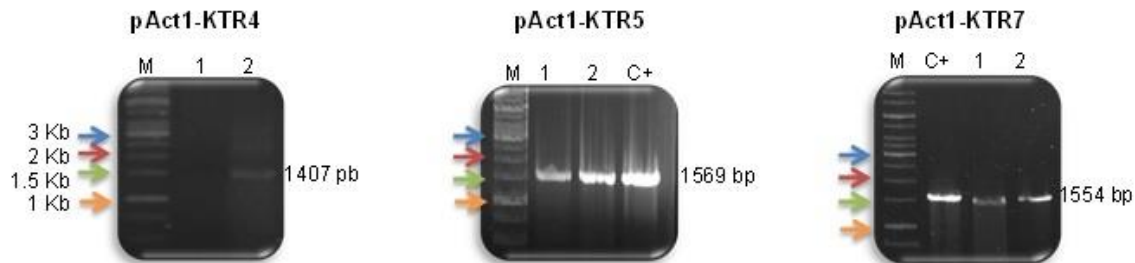


Figura 6. Clonación de los marcos de lectura abiertos completos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* en el plásmido pACT1. Una vez ligados y clonados en el vector pACT1, se corroboró que la construcción contuviera los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. El plásmido se obtuvo de las células de *E. coli* transformantes, dichos plásmidos fueron verificados por PCR, amplificando cada uno de los genes con oligonucleótido iniciadores específicos para cada gen (Tabla II). En cada uno de los casos se ven bandas únicas de amplificación. Carril 1 y 2, clonas 1 y 2, C+, reacción de PCR con DNA genómico de *S. cerevisiae*. M representa al marcador en todos los casos (flecha azul 3Kb, flecha roja 2 Kb, verde 1,5 Kb y naranja representa 1 Kb).

Escrutinio de las transformantes de *C. albicans*

Las construcciones realizadas con el vector pACT1 y los marcos de lectura abiertos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* (Barelle *et al.*, 2001) se restringieron con la enzima *Stu* I, que corta los plásmidos en el gen *CaRPS10*, para transformar diferentes células mutantes de *C. albicans*. La inserción de los genes de *S. cerevisiae* se hace en el locus neutro *CaRPS10* por recombinación homóloga, para así disminuir las integraciones ectópicas en el genoma de *C. albicans*. Las transformantes obtenidas, tras el crecimiento en medio mínimo, fueron crecidas en medio YPD para obtener DNA genómico.

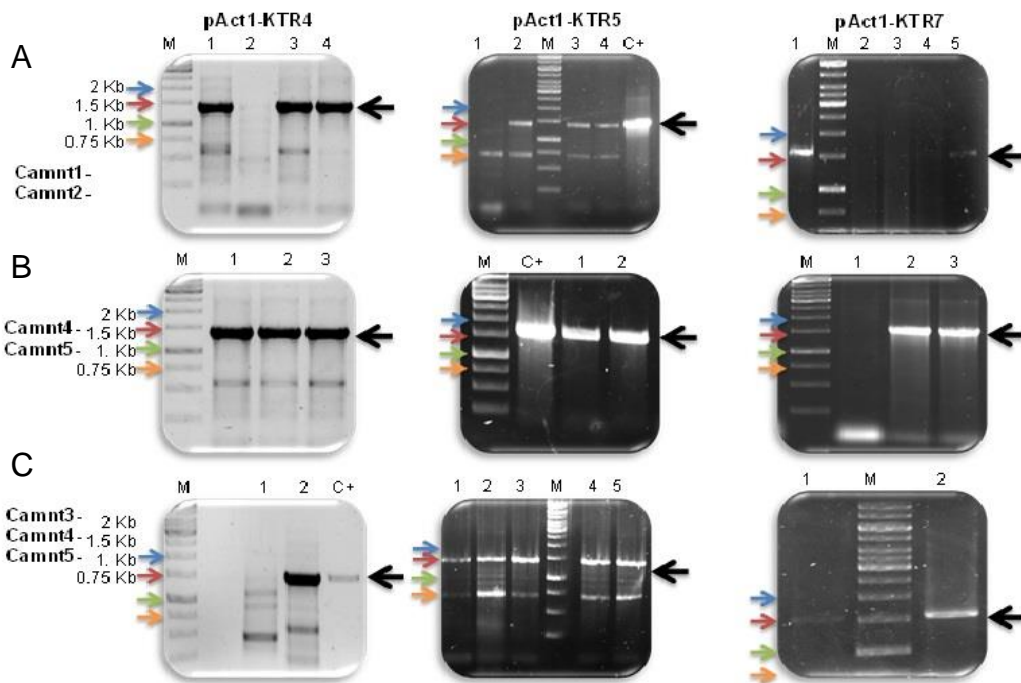


Figura 7. Confirmación de la integración de las construcciones pACT1-*ScKTR4*, pACT1-*ScKTR5* y pACT1-*ScKTR7* en el locus *CaRPS10*. La confirmación de la inserción sitio dirigida de los vectores pACT1-*ScKTR4*, pACT1-*ScKTR5* y pACT1-*ScKTR7* se realizó amplificando por PCR con los oligonucleótidos iniciadores *RPS10* y *CIP10*, uno de los oligonucleótidos alinea en el locus *RPS10* del DNA genómico de *C. albicans* mientras el otro alinea en la construcción insertada (Tabla II). Para llevar a cabo lo anterior, Se extrajo DNA genómico de las células transformantes de las dobles mutantes *Camnt1* Δ -*Camnt2* Δ (A); *Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ (B); y la triple mutante *Camnt3* Δ -*Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ (C) y se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 1500 pb en todos los casos. C+: control positivo (DNA genómico de *S. cerevisiae*); y las clonas ensayadas están enlistadas con números arábigos. M representa al marcador en todos los casos (flecha azul 2 Kb, flecha roja 1,5 Kb, verde 1 Kb y naranja representa 0.75 Kb).

La integración dirigida se confirmó por reacciones de PCR, utilizando los oligonucleótidos RP10 y Cip10 que flanquean el gen *CaRPS10* de *C. albicans* (iniciador director) y la construcción insertada (iniciador reverso). El producto de PCR obtenido con el uso de estos oligonucleótidos fue de ~1500 pb (flecha negra en la Fig. 8), lo que nos indica que las construcciones se integraron de manera sitio dirigida. El uso de estos oligonucleótidos es independiente de la construcción insertada, por lo cual en todos los casos se espera la misma banda de 1500 pb. Sin embargo, en algunas de las reacciones también podemos ver bandas de menor tamaño que son inespecificidades de la reacción de PCR.

Ensayos de unión al colorante azul Alciano

Para conocer la ruta de glicosilación dentro de la cual se encuentran involucradas las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p, estos genes se expresaron en mutantes nulas de *C. albicans* en miembros de la familia *Kre2/Mnt1*. Una vez confirmada la inserción de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* (Fig. 7) se empezaron los análisis de dichas transformantes.

Un primer ensayo fue el estimar los niveles de fosfomananas en la pared celular, como un parámetro indirecto de la *N*-glicosilación (Bates *et al.*, 2005, Mora-Montes *et al.*, 2010), por la unión del colorante catiónico azul Alciano, el cual se une a la carga negativa que le confiere el grupo fosfato a las fosfomananas (Fig. 1).

Se aprecian con claridad que los niveles de fosfomanosilación disminuyen en las células de la triple mutante *Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ* de *C. albicans* (Figura 8), la cantidad de microgramos unidos en la triple mutante es de $58.13 \mu\text{g} \pm 25.8$ que se restaura al del tipo silvestre con un valor de $101.7 \mu\text{g} \pm 16.32$, y cuando se complementan con los genes de *S. cerevisiae* muestran valores de $122.5 \mu\text{g} \pm 9.8$ para *ScKTR4*; de $121.2 \mu\text{g} \pm 8.03$ para *ScKTR5* y de $134.33 \mu\text{g} \pm 3.14$ para *ScKTR7* de colorante unido (Figura 8). La diferencia entre la triple mutante y la triple mutante complementada con los tres genes de *S. cerevisiae* es significativa a una $p < 0.001$, en tanto que la complementación con los genes *ScKTR5* y *ScKTR7* son significativamente diferentes del tipo silvestre a una $p < 0.05$. En el

caso de las cepas de *C. albicans* que contienen la doble mutación *Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ , la unión al colorante azul Alciano no se ve tan afectada, puesto que el gen *MNT3* es funcional (Mora-Montes *et al.*, 2010), y se aprecian las cepas complementantes a un nivel similar de fosfomanosilación con la cepa doble mutante y el análisis estadístico reveló que no son significativas las diferencias observadas ni con la doble mutante ni con el tipo silvestre.

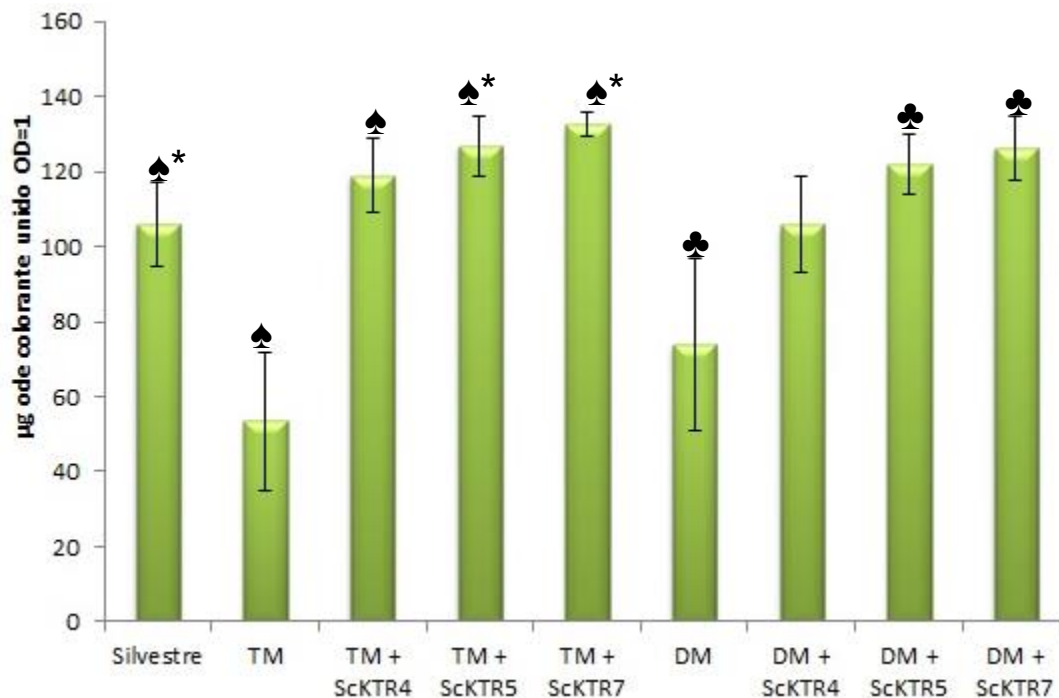


Figura 8. Restauración en los niveles de fosfomanosilación. Se midieron los niveles de fosfomanosilación mediante la unión al colorante catiónico azul Alciano en las cepas mutantes y cepas mutantes más los genes de estudio. Se grafica el promedio de cuatro ensayos independientes y la desviación estándar, se hizo un análisis estadístico y las diferencias observadas son de ** $p < 0.05$ y ♠ $p < 0.001$. TM, triple mutante *mnt3* Δ , *mnt4* Δ , *mnt5* Δ ; DM, doble mutante *mnt4* Δ , *mnt5* Δ .

Ensayos de movilidad electroforética de la enzima *N*-acetil hexosaminidasa

Se sabe que hay enzimas o proteínas que son exclusivamente *N*-glicosiladas en diferentes hongos, tales como la fosfatasa en *C. albicans* (Bates *et al.*, 2006), la invertasa y la carbopeptidasa Y en *S. cerevisiae* (Puccia *et al.*, 1993), entre otras. En *C. albicans* también se encuentra la enzima *N*-acetil hexosaminidasa (Bates *et al.*, 2005, Mora-Montes *et al.*, 2010). Por lo cual, usamos dicha actividad

enzimática como un parámetro para estimar el estado de la ruta de la *N*-glicosilación de proteínas intracelulares. Usando geles de poliacrilamida en condiciones nativas se separaron los extractos celulares de *C. albicans* obtenidos tras un crecimiento en presencia de *N*-acetil glucosamina como inductor. La actividad enzimática se reveló incubando los geles de poliacrilamida después del corrimiento electroforético, con el sustrato MU-GlcNAc, la 4-umbeliferona precipitada tras la liberación del azúcar por la acción enzimática queda atrapada en el gel de poliacrilamida y fluoresce al exponer el gel a luz UV, la imagen se capturó con el fotodocumentador (ChemDoc Bio-Rad). En la figura 9 se presenta un resultado representativo de este ensayo, en donde se aprecia un mayor desplazamiento electroforético de la enzima en los carriles de las mutantes de *C. albicans*. Este desplazamiento nos da indicios de un menor grado de glicosilación. Por el contrario, los carriles con un menor desplazamiento electroforético sugieren un mayor grado de glicosilación de la enzima. Como referencia, usamos un extracto celular de las células silvestres (carril 1).

Sin embargo, podemos apreciar que hay un mayor grado de glicosilación en las triples mutantes complementadas con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* o *ScKTR7* (carril 4 en todos los geles). Este efecto no es tan evidente en el caso de las dobles mutantes (carril 5), pues como se mencionó anteriormente, el gen *CaMNT3* es funcional; por lo cual la *N*-glicosilación es mayor que en las triples mutantes. Al complementar las dobles mutantes *CaMNT4-CaMNT5* con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* o *ScKTR7*, solamente se aprecia una diferencia ligera en el desplazamiento (carril 7 en todos los geles) con respecto a los extractos de las dobles mutantes y dobles mutantes complementadas con *CaMNT5* (carril 5 y 6, respectivamente).

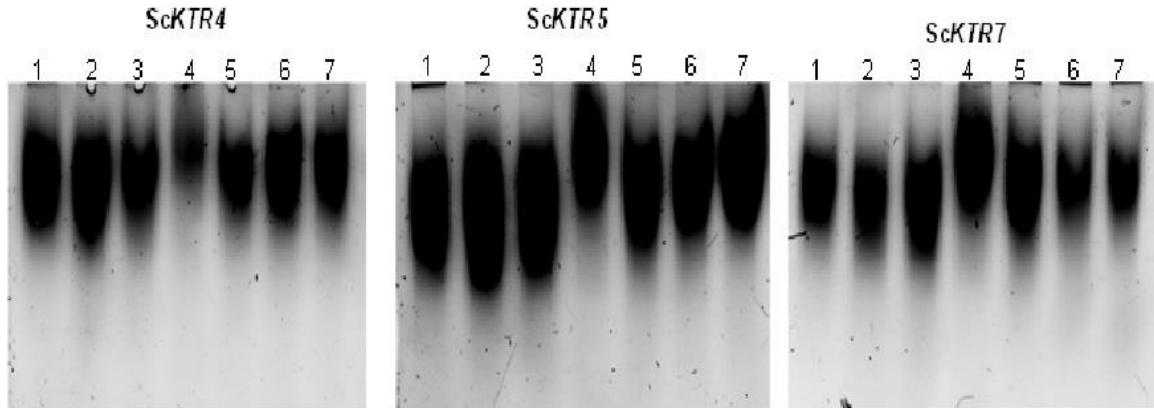


Figura 9. Movilidad electroforética de la enzima Hex1p. Extractos celulares de las mutantes dobles y triples, así como las complementadas con *CaMNT5*, *ScKTR4*, *ScKTR5*, *ScKTR7* (Véase Tabla I), se sometieron a una separación electroforética en geles de poliacrilamida al 6% para analizar la movilidad de la enzima Hex1p exclusivamente *N*-glicosilada. Carril 1: Silvestre; 2 Triple mutante (*Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ*); 3: Triple mutante + *CaMNT5*; 4: Triple mutante + *ScKTR4*, *ScKTR5* o *ScKTR7*; 5: Doble mutante (*Camnt4Δ-Camnt5Δ*); 6: Doble mutante + *CaMNT5*; 7: Doble mutante + *ScKTR4*, *ScKTR5* ó *ScKTR7*.

Susceptibilidad hacia agentes perturbadores de pared celular

Para corroborar una restauración completa de los niveles de *N*-glicosilación al insertar los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* o *ScKTR7* en los genomas de las células mutantes de *C. albicans*, se ensayó la susceptibilidad de la triple mutante (*Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ*) y doble mutante (*Camnt4Δ-Camnt5Δ*) a agentes perturbadores de la pared celular. Estos agentes perturbadores fueron rojo Congo, que inhibe la formación de β 1,3 glucanas; blanco de calcoflúor, que se intercala entre las cadenas de quitina de la pared celular, higromicina B, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, y al detergente aniónico SDS, que disuelve la membrana celular.

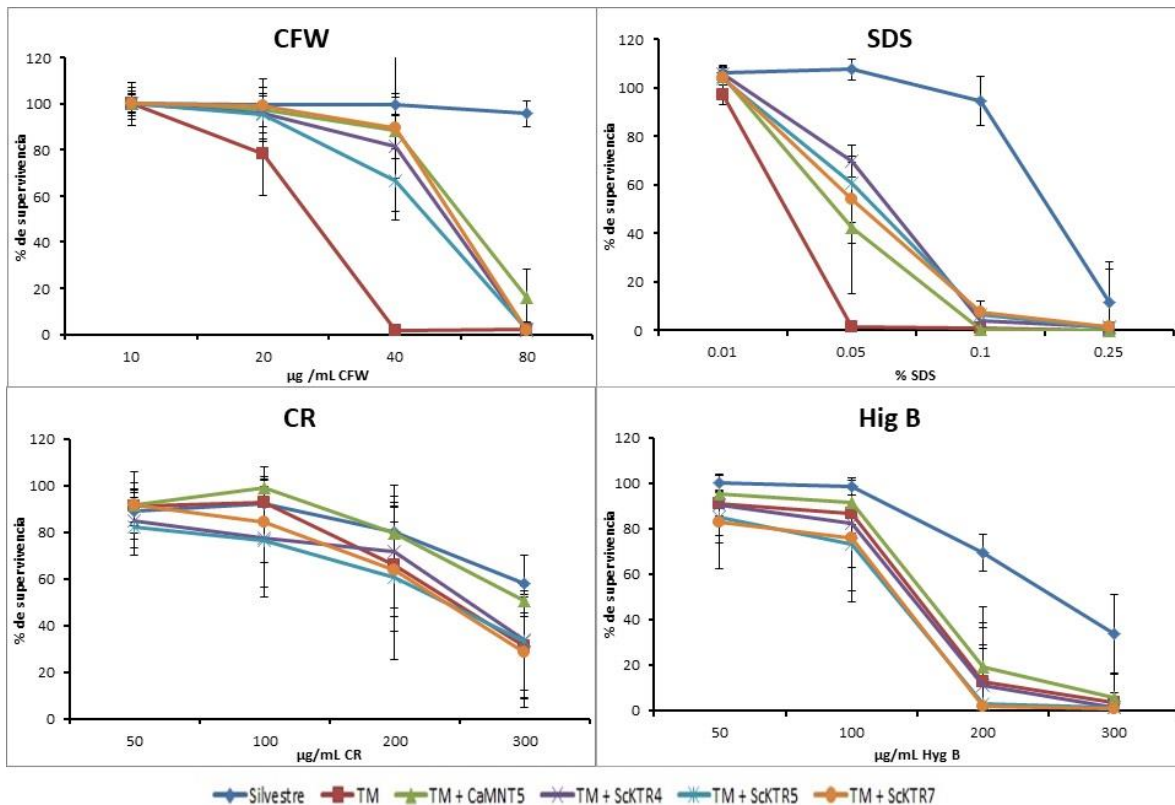


Figura 10. Exposición a agentes perturbadores de la pared celular de las triples mutantes de *C. albicans*. En las gráficas se muestra el promedio del porcentaje de supervivencia de células de *C. albicans* expuestas a agentes perturbadores de la pared celular. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado, dichos experimentos se realizaron en microplacas de 96 pozos con medio YPD por 40 horas a 28°C con agitación a 120 rpm, tal como se indica en la sección de materiales y métodos. Los valores se normalizaron a % de supervivencia tomando como el 100% el crecimiento de la cepa silvestre a una D.O= $_{600\text{nm}}$, tomando la primera concentración de cada uno de los agentes perturbadores de la pared celular. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. TM se refiere a la triple mutante *Camnt3 Δ -Camnt4 Δ -Camnt5 Δ* ; CFW: blanco de calcoflúor; CR: rojo Congo; SDS, dodecilsulfato de sodio; Hig B: higromicina B.

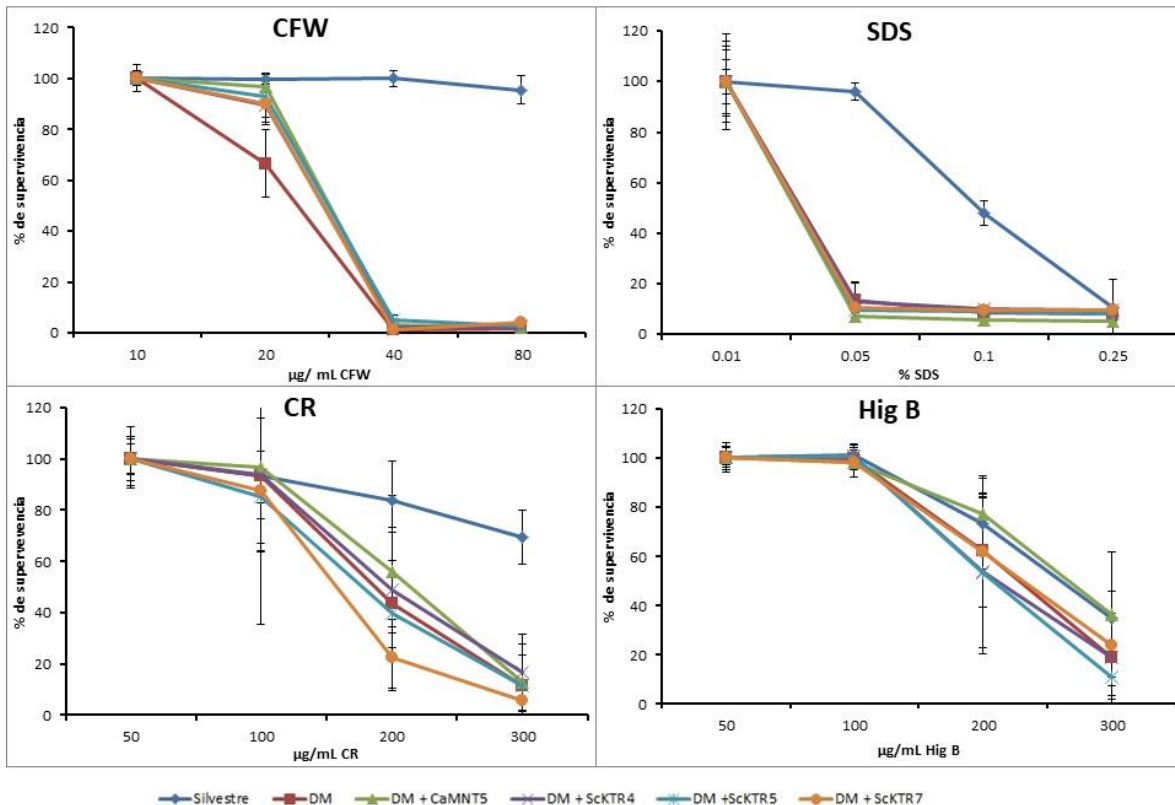


Figura 11. Exposición a agentes perturbadores de la pared celular de las dobles mutantes de *C. albicans*. En las gráficas se muestra el promedio del porcentaje de supervivencia de células de *C. albicans* expuestas a agentes perturbadores de la pared celular. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado, dichos experimentos se realizaron en microplacas de 96 pozos con medio YPD por 40 horas a 28°C con agitación a 120 rpm, tal como se indica en la sección de materiales y métodos. Los valores se normalizaron a % de supervivencia tomando como el 100% el crecimiento de la cepa silvestre a una D.O=_{600m}, tomando la primera concentración de cada uno de los agentes perturbadores de la pared celular. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los experimentos. DM se refiere a la doble mutante *Camnt4Δ-Camnt5Δ*; CFW: blanco de calcoflúor; CR: rojo Congo; SDS, dodecilsulfato de sodio; HigB: higromicina B.

Los resultados nos muestran que la triple mutante *Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ* muestra una mayor susceptibilidad a rojo Congo en comparación con la cepa silvestre y las células de las triples mutantes *Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ* complementadas con los genes *CaMNT5*. La complementación con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* o *ScKTR7* parece no conferirle mayor resistencia a este agente perturbador (Figura 10). En el caso de la higromicina B, solamente las células de la cepa silvestre parecen tener una mayor resistencia, en tanto el resto se comporta de manera similar que las células de la triple mutante. Sin embargo, se observa un comportamiento claramente diferente al exponer a las células a blanco

de calcoflúor y SDS, estos ensayos nos muestran que las células de las triples mutantes son muy susceptibles a estos dos agentes perturbadores, pues las células de las triples mutantes complementadas con los genes de *S. cerevisiae* y con el gen nativo de *C. albicans* son el doble de resistentes que la triple mutante, sin embargo, no llegan a complementar a los niveles de las células silvestres.

Se hizo este mismo ensayo para evaluar la susceptibilidad de las dobles mutantes *Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ , y complementadas con los genes de *S. cerevisiae* *ScKTR4*, *ScKTR5* ó *ScKTR7* y con el gen *CaMNT5* (Figura 11). El comportamiento que mostraron estas dobles mutantes no se diferencia claramente a las células mutantes de las células complementadas con los genes de *S. cerevisiae* o el gen de *CaMNT5* cuando las células son expuestas a rojo Congo, SDS y blanco de calcoflúor, las únicas que muestran una clara diferencia son las células silvestres. Sin embargo, cuando las células se expusieron a higromicina B, todas las células se comportan de manera similar a las células de la cepa silvestre. De estos experimentos se demuestra que el comportamiento mostrado por las células de las triples y las dobles mutantes se deben a los agentes a los cuales estuvieron expuestas, dado que se comprobó la viabilidad celular en ausencia de perturbadores de pared celular y todas alcanzan prácticamente la misma densidad de cultivo, pues no muestran diferencias significativas en su crecimiento a una $p < 0.05$ (Figura 12).

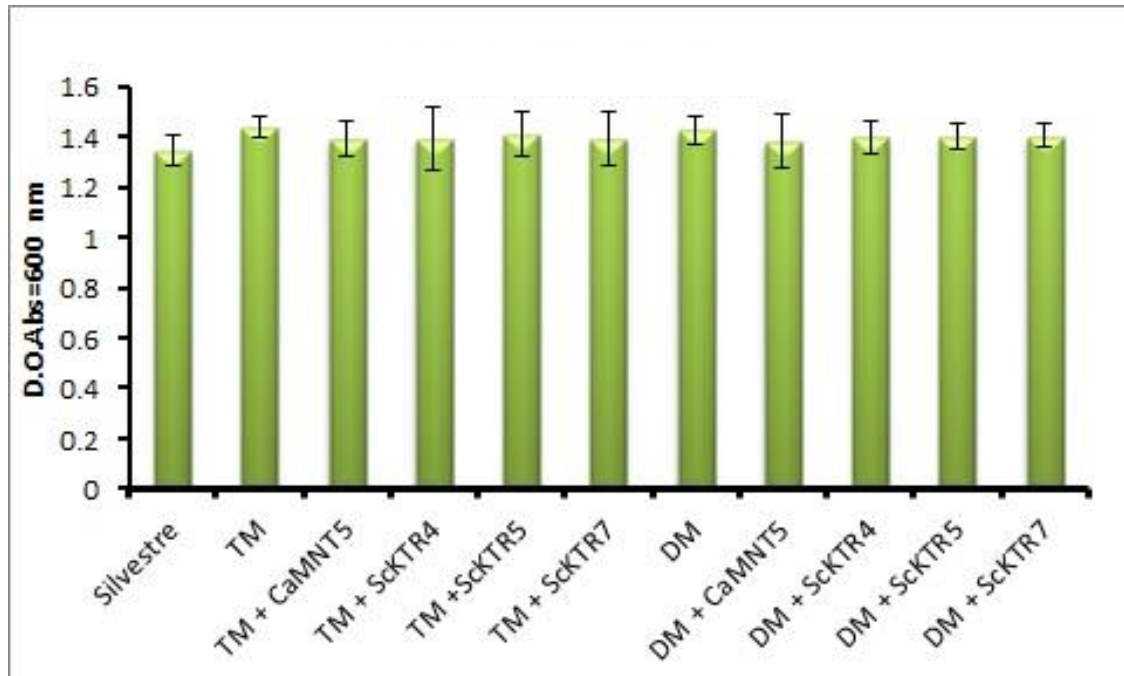


Figura 12. Comprobación de la viabilidad de las células expuestas a agentes perturbadores. Se tomaron células de *C. albicans* a la misma concentración que las usadas en los experimentos de exposición a agentes perturbadores de la pared celular y se dejaron crecer en medio YPD libre de cualquier agente perturbador por 40 horas a 28°C con agitación a 120 rpm en microplacas de 96 pozos. TM se refiere a la triple mutante *Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ* y DM se refiere a la doble mutante *Camnt4Δ-Camnt5Δ*.

TLC y FACE de las O-mananas

Hasta este punto, los parámetros evaluados solamente han abarcado la ruta de *N*-glicosilación. Para abordar y ahondar en el papel que estas manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p, podrían tener en la ruta de *O*-glicosilación, se realizaron extracciones de *O*-mananas en condiciones alcalinas.

Estos oligosacáridos se sometieron a una eliminación de proteínas con acetona y desalado contra agua desionizada, se concentraron por liofilización. Se utilizó la cromatografía en capa fina como plataforma para analizar las *O*-mananas provenientes de la β -eliminación. Los resultados presentados en la figura 13 A, nos sugieren que las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p de *S. cerevisiae* no participan en la ruta de *O*-glicosilación, puesto que el patrón cromatográfico de la doble mutante (*Camnt1Δ-Camnt2Δ*) y las dobles mutantes complementadas con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* ó *ScKTR7* es similar. Lo cual se

observa al comparar las manchas que aparecen a la altura del marcador M1 en los carriles 2 (mutante) contra los carriles del 4 a 6 (complementantes) (Fig. 13 A). Este patrón cromatográfico es diferente del presentado en el carril 1 y 3, de la cepa silvestre y reintegrante con el gen *CaMNT1*, respectivamente.

En un experimento más fino, y con el objetivo de confirmar los resultados de la TLC, se derivatizaron 10 mg del producto de la β -eliminación con ANTS y cianoborohidruro de sodio. Las muestras derivatizadas se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 35%. En la Figura 13 B se muestra una imagen representativa de FACE, donde vemos una mayor abundancia de un carbohidrato un poco arriba del marcador M1 (glucosa), que también lo presenta la mutante *Camnt1 Δ -Camnt2 Δ* (carril 2), sin embargo gracias a la resolución que nos brinda el gel de poliacrilamida también podemos observar que los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* ó *ScKTR7* confieren una complementación parcial, pues vemos la producción de carbohidratos que corresponden a trisacáridos y tetrasacáridos, sin llegar a producir los hexasacáridos o heptasacáridos que producen las células de la cepa silvestre (carril 1).

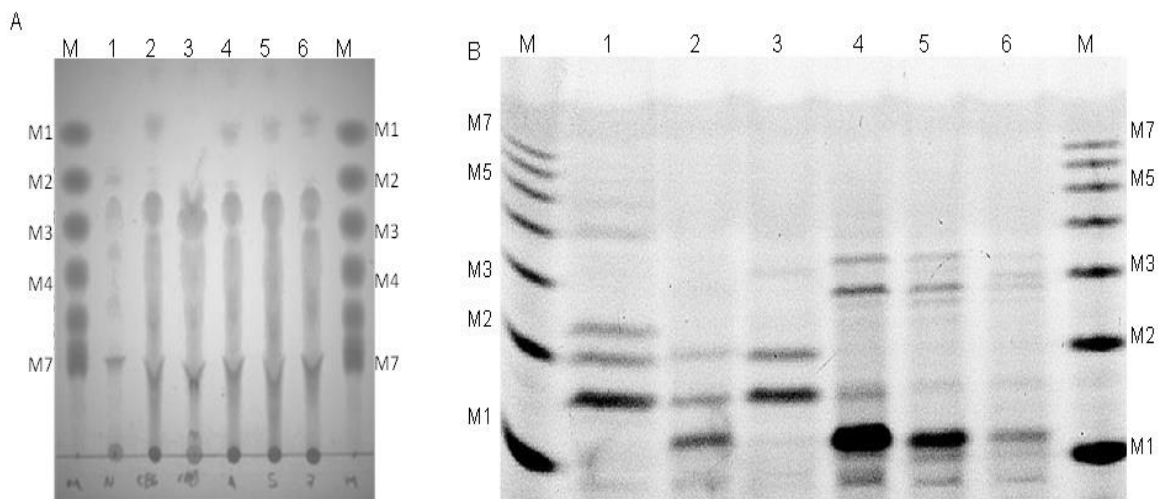


Figura 13. TLC y FACE de O-mananas. Los oligosacáridos extraídos de las paredes celulares de las células de las dobles mutantes (*Camnt1 Δ -Camnt2 Δ*) y complementantes tanto con los genes de *S. cerevisiae* como el gen nativo de *C. albicans*, se sometieron a β -eliminación, se eliminó la proteína y los carbohidratos se separaron por TLC (A) y FACE (B). El orden de los carriles es el mismo en ambos casos. Se utilizaron maltooligosacáridos de 1 a 7 residuos como marcadores, empezando por glucosa hasta maltoheptosa (M1 a M7). Carril 1: cepa silvestre; carril 2: doble mutante *Camnt1 Δ -Camnt2 Δ* ; carril 3: doble mutante + *CaMNT1*; carril 4: Doble mutante + *ScKTR4*; carril 5: Doble mutante + *ScKTR5* y carril 6: Doble mutante + *ScKTR7*.

Discusión

S. cerevisiae es uno de los organismos más utilizados para estudiar la glicosilación de proteínas. Se han estudiado las rutas de *N* y *O*-glicosilación como las anclas de GPI (Herscovisc 1999, Strahl-bolsinger *et al.*, 1999, Spiro 2002, Orlean, 2012). Se ha demostrado que los primeros pasos de la *N*-glicosilación se comparten con organismos eucariotas superiores (Spiro 2002). La glicosilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que sufren las proteínas, en este proceso participan muchas proteínas involucradas en la síntesis, modificación y transporte de los azúcares monosacáridos (Orlean 2012). Dentro de esta serie de enzimas se encuentran las manosiltransferasas capaces de añadir manosas en enlaces α - o β - (Levin 2012). Estas enzimas participan en la maduración del oligosacárido que contiene dos residuos de *N*-acetilglucosamina y manosas, que varían de 9 a 200 residuos de manosa, dependiendo del destino celular de la proteína (Spiro 2002).

La familia *KRE2/MNT1* es una de las familias de genes que codifican para manosiltrasnferasas (Lussier *et al.*, 1999). En *S. cerevisiae*, de los nueve miembros que tiene esta familia, seis han sido caracterizados bioquímicamente como manosiltransferasas, Kre2/Mnt1p (Hilll *et al* 1992, Häusler *et al.*, 1992), Yur1p Ktr1p, Ktr2p, Ktr3p (Lussier *et al.*, 1993, 1995, 1997; Romero *et al.*, 1997); y Ktr6p (Jigami y Odani, 1999) como fosfomanosiltransferasa. Estos miembros comparten secuencias que codifican para seis cisteínas y además son catalogados como proteínas de membrana tipo II, por lo que se sugiere que tienen una estructura tridimensional similar (Lussier *et al.*, 1997a, 1997c 1999). Todos los miembros de esta familia se les ha designado como manosiltransferasas residentes en Golgi; sin embargo, experimentalmente solamente Kre2/Mnt1 ha sido localizada en la cisterna media (Lussier *et al.*, 1995), y la estructura cristalina de esta proteína es la única reportada hasta la fecha (Lobsanov *et al.*, 2004). Aunque durante la realización de este estudio, se reportó también la caracterización bioquímica y cristalización de la manosiltransferasa Ktr4p (Possner *et al.*, 2015).

En *C. albicans* existen 5 manosiltransferasas, las cuales han sido catalogadas dentro de la familia *KRE2/MNT1* (Prill *et al.*, 2005), se clasificaron en subfamilias, en donde Kre2/Mnt1 forma una subfamilia con Ktr1p y Ktr3p, estas proteínas son más cercanas a las CaMnt1p y CaMnt2p, sin embargo CaMnt3p es más cercana a la subfamilia de las proteínas Yur1p y Ktr2p (Lussier *et al.*, 1999). Los genes *ScKTR5* y *ScKTR7* forman entre sí una subfamilia, ambos genes además presentan dos regiones insertadas y conservadas que interrumpen la homología con los otros miembros de la familia (Lussier *et al.*, 1999). Por otra parte, los genes *CaMNT4* y *CaMNT5* tienen ortólogos en *S. cerevisiae* de *ScKTR4* y *ScKTR2*, respectivamente (Candida Genome Database). La homología entre estas proteínas podría dar luz sobre la función que tienen los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*; sin embargo los reportes de las mutantes nulas sencillas en estos genes en *S. cerevisiae* no es del todo clara (Lussier *et al.*, 1997c).

En el presente estudio la expresión en un sistema heterólogo como *C. albicans* nos permite obtener datos sobre la función de estos genes, puesto que están disponibles una serie de mutantes dobles y triples en miembros de la familia *KRE2/MNT1* de *C. albicans* deficientes en *N* y *O*-glicosilación respectivamente (Mora-Montes *et al.*, 2010). Experimentos de complementación génica en los fondos genéticos de estas mutantes, presentan una complementación con los tres genes de *S. cerevisiae* restaurando la ruta de *N*-glicosilación y parcialmente la de *O*-glicosilación de proteínas. Lo anterior lo podemos sugerir, dado que los experimentos de unión al colorante azul Alciano se recuperan o incluso unen más colorante con respecto al fenotipo silvestre cuando las triples mutantes *Camnt3Δ-Camnt4Δ-Camnt5Δ* se complementan con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. Este fenómeno es más discreto en las mutantes dobles *Camnt4Δ-Camnt5Δ*, sin embargo al complementar con los genes de *S. cerevisiae* hay una ligera tendencia a incrementar la cantidad de colorante unido, la cual es significativa solamente cuando comparamos la doble mutante *Camnt4Δ-Camnt5Δ* con las células dobles mutantes que tienen los genes *ScKTR5* y *ScKTR7*. Estos datos sugieren que los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* tienen actividad sobre la cadena externa de la *N*-glicanas, posiblemente agregando residuos de manosa en enlace α 1,2-. En el

caso de ScKtr4p podría estar añadiendo la primera y posiblemente segunda manosa en la cadena lateral dado que reconoce como azúcar aceptor al α -metil manosido y tiene poca afinidad hacia el azúcar aceptor manobiosido (Posner *et al.*, 2015), este fenómeno es similar a lo reportado para ScKre2p/MNt1p (Lobsanov *et al.*, 2004). Estas manosas en enlace α 1,2- son reconocidas por la manosiltransferasa *KTR6/MNN6* en los cuales pueda unir residuos de fosfomananas (Jigami y Odani, 1999).

La restauración en los niveles de unión del colorante azul Alciano nos habla acerca de la glicosilación de proteínas de pared celular. Sin embargo, para conocer si los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* participan en la *N*-glicosilación de proteínas intracelulares, realizamos experimentos en donde estimamos la *N*-glicosilación de la enzima CaHex1p (Bates *et al.*, 2005). La movilidad electroforética de la enzima derivada de las triples mutantes *Camnt3* Δ -*Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ presenta un desplazamiento mayor, sugiriendo un menor grado de *N*-glicosilación, este fenómeno se revierte cuando se complementan las mutantes con los genes de *S. cerevisiae* *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. Sin embargo, en las enzimas provenientes de las dobles mutantes *Camnt4* Δ -*Camnt5* Δ no se observa una diferencia en la movilidad electroforética de Hex1p dado que estas mutantes tienen funcional el gen *CaMNT3* que puede realizar la actividad de manosiltransferasa.

Está demostrado que algunos miembros de la familia *KRE2/MNT1* tienen un papel tanto en *N*- como en la *O*-glicosilación (Lussier *et al* 1993, 1995, 1997a, 1999), por lo que se hicieron ensayos de complementación en la doble mutante *Camnt1* Δ -*Camnt2* Δ , deficientes en la ruta de la *O*-glicosilación (Mora-Montes *et al.*, 2010). Se aislaron *O*-mananas de células de *C. albicans* doble mutante *Camnt1* Δ -*Camnt2* Δ y complementadas con los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. Estas *O*-mananas se separaron por cromatografía en capa fina, los resultados obtenidos en estos experimentos nos sugerían que no hay una participación de las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p en la ruta de *O*-glicosilación.

Dado que la técnica que TLC, tiene como fase móvil a una mezcla de solventes orgánicos, los resultados pueden verse afectados por la afinidad que tengan estos oligosacáridos con la fase móvil, además la forma de revelado es una tinción y se requiere de una alta abundancia alta del carbohidrato para ser detectada. Dado el tipo de oligosacáridos que analizamos se requiere una técnica más sensible y con mayor poder de resolución como es la electroforesis de carbohidratos (FACE).

Por lo tanto, se decidió analizar los oligosacáridos proveniente de la β -eliminación por la técnica de FACE, en ésta técnica se utiliza un fluoróforo que nos da mayor sensibilidad que la tinción para marcar específicamente los carbohidratos. Y a diferencia del TLC, en el FACE no hay un efecto adverso si la muestra presenta residuos de sales o proteínas contaminantes. El resultado nos sugiere una participación parcial de las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p en las rutas de O-glicosilación, pues vemos una producción de carbohidratos intermedia entre las células del tipo silvestre y las células que tienen reintegrado el gen *CaMNT1*. Una posibilidad para que el alargamiento de O-mananas no sea el mismo que en las células del tipo silvestre, es que las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p tengan una actividad de α 1,3- (nativa en las O-mananas de *S. cerevisiae*), y el carbohidrato resultante con enlace α 1,3 no sea reconocido por las subsecuentes enzimas Ca, Mnt2p y CaMnn5, pues estas enzimas reconocen y añaden manosas en enlace α 1,2- (Goto., 2007). Por otra parte, puede ser que la carga génica no sea la adecuada, pues la síntesis de manosiltransferasas no cubriría la demanda para la síntesis de estos oligosacáridos. Además el fenómeno observado en los experimentos lo podemos relacionar directamente a la función de estos genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*, y no a fenómenos de integración ectópica, pues el plásmido pACT1, mediante el cual se integraron los genes en el genoma de las mutantes de *C. albicans*, ha sido desarrollado para integrarse de forma sitio dirigida sobre el locus neutro *CaRPS10* (Munir *et al.*, 2000, Bates *et al* 2005, Barrelle *et al.*, 2005). Dicha inserción fue corroborada experimentalmente por reacciones de PCR.

Se sugiere que los productos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* participan en la elaboración de la cadena externa de las N-glicanas, similar a las proteínas

ScKtr2p y ScYur1p, las cuales están involucradas solamente en la elaboración de la cadena externa de las *N*-glicanas (Lussier *et al.*, 1996, 1999). Sin embargo, presentan una actividad de manosiltransferasa en mutantes deficientes en *O*-glicosilación, aunque sea parcialmente. Se debe demostrar la actividad bioquímica *in vitro* y el tipo de enlace generado para tener certeza del papel que tienen estos tres genes de *S. cerevisiae* en las rutas de glicosilación de proteínas; por ejemplo Kre2p se caracterizó como una α 1,2-manosiltransferasa involucrada en *N*-glicosilación (Hill *et al.*, 1992), sin embargo también se demostró que estaba involucrada en la ruta de *O*-glicosilación de proteínas (Häusler y Robbins 1992).

Para los experimentos de actividad de manosiltransferasa de las enzimas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p solamente logramos tener transformantes con el gen *ScKTR7* y *ScKTR4*. Sin embargo, en los experimentos de inducción solamente se hicieron con las células de *P. pastoris* transformadas con *ScKTR7*, los resultados muestran una producción de proteínas aunque sin llegar a una producción de proteína similar al control positivo Camnt1p (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012). Sin embargo, se hicieron mezclas de cada uno de los sobrenadantes de diferentes cepas y se realizaron experimentos de actividad de manosiltransferasa de ScKtr7p, dada la sensibilidad de los experimentos de incorporación de radioactividad. Se utilizó como azúcar aceptor α -metil-manosido utilizado por otras manosiltransferasas como CaMnt1p, ScKtr4p y ScKre2p (Lobsanov *et al.*, 2004, Díaz Jiménez *et al.*, 2012, Posner *et al.*, 2015), el resultado nos da una incorporación de radioactividad dos veces mayor al ruido experimental pero menor al control positivo, por lo cual sugerimos que la enzima ScKtr7p se podría estar degradando pues en los geles de SDS-PAGE se aprecia un bandeo abajo del marcador de 50 kDa. Esta idea la podemos validar dado que el medio no tiene un regulador de pH y tampoco utilizamos inhibidores de proteasas durante los ensayos de expresión con lo cual la degradación de proteínas es muy probable. A pesar de estas condiciones experimentales, es de llamar la atención que la mezcla de proteínas (llamada mezcla 2), nos da una incorporación de radioactividad dos veces mayor al ruido experimental, aunque solamente es una quinta parte de los valores de radioactividad incorporada por la CaMnt1p. Tal diferencia podría deberse también

a bajos niveles de expresión de ScKtr7p, pues el gen *CaMNT1* fue sintetizado artificialmente y optimizado con uso de codones preferente para *P. pastoris* (Díaz-Jiménez *et al.*, 2012). Dadas las circunstancias experimentales del momento, el rendimiento de proteína por L de cultivo se podría mejorar podríamos utilizar matraces con hendiduras (matraces bafleados) para aumentar la aireación del medio de cultivo y aumentar el metabolismo oxidativo del metanol en las células de *P. pastoris*, así como el uso de inhibidores de proteasas y el medio con un regulador de pH.

Por otra parte como ya se mencionó anteriormente, la baja incorporación de radioactividad se puede deber también a que utilizamos α -metil manosido como azúcar aceptor, y este azúcar podría no ser reconocido como sustrato natural y por lo tanto haya poca actividad sobre este azúcar aceptor. Este mismo pensamiento lo podríamos citar cuando observamos los resultados de la complementación con las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p en las células mutantes de *C. albicans* *Camnt1* Δ -*Camnt2* Δ . Puesto que observamos una restauración parcial en la producción de O-mananas, con lo que podemos sugerir que no hay una elaboración de O-mananas mayores a 5 residuos de manosa, pues estas manosiltransferasas no tendrían afinidad hacia el azúcar aceptor similar a lo que pasa utilizando α -metil manosido.

Además, por los estudios realizados con los otros miembros de la familia *KRE2/MNT1*, al parecer la mayoría participa en las rutas de N-glicosilación de proteínas (Lussier *et al.*, 1999). Sin embargo, durante una situación de estrés, posiblemente los miembros de esta familia *KRE2/MNT1* puedan actuar no solamente en N- y O-glicosilación sino posiblemente en otro tipo de rutas de glicosilación como anclas de GPI. En *S. cerevisiae* se encuentra muy estudiada la respuesta de integridad de la pared celular (CWI), en donde las células buscan sobrevivir y se compensa la falta de algún componente de la pared celular, por ejemplo mutantes en O-glicosilación compensan la porosidad de la pared celular incrementando la cantidad de β -glucanas (Levin 2005). En este sentido, los experimentos con los agentes perturbadores de la pared celular pueden disparar diferentes respuestas dentro de las células, y los comportamientos se aprecian

diferentes, sobre todo en células que tienen la triple mutación en los genes *Camnt3Δ*- *Camnt4Δ*- *Camnt5Δ*. Por ejemplo con el blanco de calcoflúor las células muestran una mayor sensibilidad, que se restaura parcialmente cuando se le complementa genéticamente con los genes de *S. cerevisiae*.

La familia *KRE2/MNT1* parece tener cierta redundancia genética, sin embargo, puede ser que estas manosiltransferasas en condiciones normales (sin agentes perturbadores) en el medio tengan actividad enzimática sobre una proteína de pared celular blanco específica. Sin embargo, en una situación de estrés, como la presencia de algún xenobiótico se vea afectada la glicosilación de esta proteína impidiendo que realice correctamente su función (Sanders *et al.*, 1999) y como consecuencia se vea reflejado un fenotipo como una baja tolerancia a ese agente. Este fenómeno ha sido reportado en los miembros de la familia PMT (Strahlbolsinger *et al.*, 1999). Lo anterior se sugiere pues mutantes sencillas en los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* presentan diferencias en la resistencia a blanco de calcoflúor (Lussier *et al.*, 1997). Este fenómeno de que alguna manosiltransferasa tenga una proteína blanco específica se ha visto en las dobles mutantes *Scpmt1Δ*-*Scpmt2Δ*, en las cuales dos proteínas, Kre9 y Kre1, no son glicosiladas correctamente, lo que afecta su actividad (Gentzsch y Tanner 1997), esto mismo podría estar afectando a alguna proteína esenciales para la viabilidad celular o alguna proteína involucradas en la síntesis de quitina u otro componente de la pared celular en las mutantes sencillas de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7*. Aunado a esto las manosiltransferasas tienen una actividad secuencial, es decir el producto de la actividad de una es el sustrato de la otra y así subsecuentemente, esto ha sido demostrado para los genes de la familia ALG (Orlean., 2012), pues la ausencia de alguna enzima de la maquinaria celular puede causar la acumulación de algún oligosacárido (Verostek *et al.*, 1992)

Conclusiones

Se demostró que los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* participan en la *N*-glicosilación en una mutante nula *Camnt3-Camnt4-Camnt5*.

Los productos de los genes *ScKTR4*, *ScKTR5* y *ScKTR7* participan parcialmente en la ruta de *O*-glicosilación en las condiciones experimentales usadas en este estudio.

Perspectivas

Determinar los tipos de enlace que realizan las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p.

Determinar los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p mediante cristalización de las proteínas.

Determinar exactamente la cisterna dentro de la cual se encuentran las manosiltransferasas ScKtr4p, ScKtr5p y ScKtr7p, lo que podría ser relevante para la función biológica en *S. cerevisiae*.

Bibliografía

Anderson K., Li S. C. y Li Y. T. (2000). Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin layer chromatography plates. *An. Biochem.* **287**: 337-339

Apweiler R., Hermjakob H. y Sharon N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1473**: 4–8.

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

Bardor M., Cabanes-Macheteau M., Faye L. y Lerouge P. (2000). Monitoring the *N*-glycosylation of plant glycoproteins by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electroph.* **21**: 2550-2556

Barelle C. J., Manson C.L., MacCallum D. M., Odds F. C., Gow N. A. R. y Brown A. J. P. (2004). GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast.* **21**: 333–340.

Bates S., Hughes H. B., Munro C. A., Thomas W. P. H., MacCallum D. M., Bertram G., Atrih A., Ferguson M. A. J., Brown A. J. P., Odds F. C. y Gow N. A. R. (2006). Outer chain *N*-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **281**: 90–98.

Brand A., Gow N. A. R. y Odds F. C. (2004). Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryot. Cell.* **3**: 900–909.

Burda P. y Aebi M. (1999). The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**: 239–257.

Burda P., Jakob C. A., Beinhauer J., Hegemann J. H. y Aebi M. (1999). Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 617–625.

Bussereau F., Mallet L., Gaillon L. y Jacquet M. (1993). A 12.8 kb segment, on the right arm of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae* including part of the *DUR1,2* gene contains five putative new genes. *Yeast.* **9**:797-806

Díaz-Jiménez D. F., Mora-Montes H. M., Hernández-Cervantes A., Luna-Arias J. P., Gow N. A. R. y Flores-Carreón A. (2012). Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**: 77–82.

Fonzi W. A. e Irwin M. Y (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* **134**: 717-728

Foreman P. K., Davis R. W. y Sachs A. B. (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* *RPB4* gene is tightly linked to the *TIF2* gene. *Nucleic Acids. Res.* **19**: 2781

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

Gentsch M. y Tanner W. (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology.* **7**: 481–486.

Gietz R. D. y Woods R. A. (2001) .Genetic transformation of yeast. *Biotech.* **30**: 816-831.

Girrbach V. y Strahl S. (2003). Members of the evolutionarily conserved *PMT* family of protein-O-mannosyltransferases from distinct protein complexes among themselves. *J. Biol. Chem.* **278**: 12554-12562

Goto M. (2007) Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1415-1427.

Hashimoto H. y Yoda K. (1997). Novel membrane protein complexes for protein glycosylation in the yeast Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 682–686

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

Helenius A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* **5**: 253-265

Helenius A. y Aebi M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 1019-1049

Hernández-Cervantes A., Mora-Montes H. M., Álvarez-Vargas A., Díaz-Jiménez D. F., Robledo-Ortiz C. I. y Flores-Carreón A. (2012). Isolation of *Sporothrix schenckii* *MNT1* and the biochemical and functional characterization of the encoded α 1,2-mannosyltransferase activity. *Microbiol.***158**: 2419–2427.

Herscovics A. (1999). Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**: 275–285.

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

Hill K., Boone C., Goebel M., Puccia R., Sdicu A. y Bussey H. (1992). Yeast *KRE2* defines a new gene family encoding probable secretory proteins, and is required for the correct *N*-glycosylation of proteins. *Genetics.* **130**: 273–283.

Hobson R. P., Munro C. A., Bates S., MacCallum D. M., Cutler J. E., Heinsbroek S. E. M., Brown G. D., Odds F. C. y Gow N. A. R. (2004). Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J. Biol. Chem.* **279**: 39628–39635.

Inoue H., Nojima H. y Okoyama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

Jackson P. (1990). The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labeled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. *Biochem J.* **270**: 705-713

Jelinek-Kelly S. y Herscovics A. (1988). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of the α -mannosidase which removes one specific mannose residue from Man₉GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **263**: 14757–14763.

Jigami Y. y Odani T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim Biophys Acta.* **1426**: 335-45

Jungmann J. y Munro S. (1998). Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with α -1, 6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* **17**: 423–434.

Jungmann J., Rayner J. C. y Munro S. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J Biol Chem.* **274**: 6579-6585

Kanaya K. I., Chiba S. y Shimomura T. (1978). Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1947-1948

Klis F. M., Boorsma A. y De Groot P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **23**: 185-202

Kukuruzinska M. A. y Lennon-Hopkins K. (1999). *ALG* gene expression and cell cycle progression. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1426**: 359–372.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Leach M. R. y Williams D. B. (2003). Calnexin and calreticulin, molecular chaperones of the endoplasmic reticulum. Madame Curie bioscience database [Internet]. Austin (TX): *Landes Bioscience*. 2000-2013

Lesage G. y Bussey H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 317–343.

Levin ED (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 262-291.

Lobsanov Y. D., Romero P. A., Sleno B., Yu B., Yip P., Herscovics A. y Howell P. L. (2004). Structure of Kre2/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 17921–17931.

Lussier M., Camirand A., Sdicu A. y Bussey H. (1993). *KTR2*: a new member of the *KRE2* mannosyltransferase gene family. *Yeast.* **9**: 1057–1063.

Lussier M., Sdicu A. M., Ketela T. y Bussey H. (1995). Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p α 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi Compartment. *J. Gen. Microbiol.* **35**: 913–927.

Lussier M., Sdicu A. M., Camirand A. y Bussey H. (1996). Functional characterization of the *YUR1*, *KTR1*, and *KTR2* genes as members of the yeast *KRE2/MNT1* mannosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* **271**: 11001–11008.

Lussier M., Sdicu A. M., Winnett E., Vo D. H., Sheraton J., Düsterhöft A., Storms R. K. y Bussey H. (1997a). Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of *KTR5*, *KTR6* and *KTR7* and definition of the nine-membered *KRE2/MNT1* mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast.* **13**: 267–274.

Lussier M., Sdicu A. M., Jacquet M. y Bussey H. (1997b). Participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.* **272**: 15527–15531.

Lussier M., White A. M., Sheraton J., di Paolo T., Treadwell J., Southard S. B., Horenstein C. I., Chen-Weiner J., Ram A. F., Kapteyn J. C., Roemer T. W., Vo D. H., Bondoc D. C., Hall J., Zhong W. W., Sdicu A. M., Davies J., Klis F. M., Robbins P. W. y Bussey, H. (1997c). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435–450.

Lussier M., Sdicu A. M. y Bussey H. (1999). The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**: 323–334.

Mallet L., Bussereau F. y Jacquet M. (1994). Nucleotide sequence analysis of an 11-7 kb fragment of yeast chromosome 11 including *BEMI*, a new gene of the WD-40 repeat family and a new member of the *KRE2/IMNT1* family. *Yeast* **10**: 819–831.

Mellado-Mojica E. y López M. G. (2012). Fructan metabolism in *A. tequilana* weber blue variety along its developmental cycle in the field. *J. Agric. Food Chem.* **60**: 11704–11713

Mora-Montes H. M., Bates S., Netea M. G., Castillo L., Brand A., Buurman E. T., Díaz-Jiménez D. F., Kullber B. J., Brown A. J. P., Odds F. C. y Gow N. A. R. (2010). A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J. Biol. Chem.* **285**: 12087–12095.

Munir A., Murad A., Lee P. R., Broadbent I. D., Barelle C. J. y Brown A. J. P. (2000). Cip10, an efficient and convenient integrating vector for transforming *Candida albicans*. *Yeast.* **16**:325-327

Munro C. A, Bates S., Buurman E. T., Hughes H. B., MacCallum D. M., Bertram G., Atrih A., Ferguson M. A. J., Bain J. M., Brand A., Hamilton S., Westwater C., Thomson L. M., Brown A. J. P., Odds F. C. y Gow N. A. R. (2005). Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J. Biol. Chem.* **280**: 1051–1060.

Nakajima T y Ballou CE (1975). Yeast manno-protein biosynthesis: solubilization and selective assay of four mannosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 3912–3916.

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

Needham P. G. y Brodsky J. L. (2013). How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: The early history of ERAD. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**: 2447–2457.

Odani T., Shimma Y., Tanaka A. y Jigami Y. (1996). Cloning and analysis of the *MNN4* gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology.* **6**: 805–810.

Odani T., Shimma Y., Wang X. H. y Jigami Y. (1997). Mannosylphosphate transfer to the cell wall mannan is regulated by the transcriptional factor of the *MNN4* level gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **420**: 186-190

Orlean P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics.* **192**: 775–818.

Petrescu A. J., Milac A. L., Petrescu S. M., Dwek R. A. y Wormald M. R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of *N*-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology.* **14**: 103–114.

Prill S. K. H., Klinkert B., Timpel C., Gale C. A., Schröppel K. y Ernst J. (2005). *PMT* family of *Candida albicans*: five proteins mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol. Microbiol.* **55**: 546-560.

Puccia R., Grondin B. y Herscovics A. (1993). Disruption of the processing alpha-mannosidase gene does not prevent outer chain synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **290**: 21-26.

Rayner J. C. y Munro S. (1998). Identification of the *MNN2* and *MNN5* mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* **273**: 26836-26843

Romero P. A., Lussier M., Sdicu A. M., Bussey H. y Herscovics A. (1997). Ktr1p is an alpha-1,2-mannosyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of the enzymic properties of soluble recombinant Ktr1p and Kre2p/Mnt1p produced in *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* **321**: 289–295.

Romero P. A., Lussier M., Véronneau S., Sdicu A. M., Herscovics A. y Bussey H. (1999). Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of α -1, 3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of *O*-linked oligosaccharides. *Glycobiology.* **9**: 1045–1051.

Sanders S. L., Gentsch M., Tanner W. y Herskowitz I. (1999). *O*-glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *J. Cell. Biol.* **145**: 1177–1188.

Spiro R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* **12**. 43R-56R

Strahl-bolsinger S., Gentsch M, y Tanner W. (1999). Protein *O*-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**: 297–307.

Thomson L. M., Bates S., Yamazaki S., Arisawa M., Aoki Y. y Gow N. A. R. (2000). Functional characterization of the *Candida albicans* *MNT1*

mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **275**: 18933-18938

Timpel C., Strahl-Bolsinger S., Ziegelbauer K. y Ernst J. F. (1998). Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 20837-20846

Timpel C., Zink S., Strahl-Bolsinger S., Schröppel K. y Ernst J. F. (2000). Morphogenesis, adhesive properties and antifungal resistant depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Bact.* **182**: 3063-3071

Trombetta E. S., Simons J. F. y Helenius A. (1996). Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J. Biol. Chem.* **271**: 27509–27516

Trombetta E. S. (2003). The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology.* **13**: 77–91.

Trombetta E. S. y Parodi A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 649–676.

Verostek M. F., Atkinson P. H. y Trimble R. B. (1992). Glycoprotein biosynthesis in the *alg3 Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Biol. Chem.* **268**: 12104-12115.

Wandall H. H., Hassan H., Mirgorodskaya E., Kristensen A. K., Roepsforff P., Bennett E. P., Nielsen P. A., Hollingsworth M. A., Burchell J., Taylor-Papadimitriou J. y Clausen H. (1997). Substrate specificities of three members of the human UDP N-acetyl alpha D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. *J. Biol. Chem.* **272**: 23503–23514.

Wang X. H., Nakayama K. I., Shimma Y. I., Tanaka A. y Jigami Y. (1997). *MNN6*, a member of the *KRE2/MNT1* family, is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 18117–18124.

Willer T., Brandl M., Sipiczki M. y Strahl S. (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **57**: 156–170.