

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**POMT1: Estudio de la señal de retención en
el retículo endoplásmico, interacción con
otras proteínas y generación de ratones
quimera para el estudio de su función**

Almudena Peña Lobo
Madrid, 2008

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**POMT1: Estudio de la señal de retención en el
retículo endoplásmico, interacción con otras
proteínas y generación de ratones quimera
para el estudio de su función**

Memoria que presenta la licenciada en Bioquímica por la
Universidad Autónoma de Madrid

Almudena Peña Lobo
para optar al grado de doctora

Director de tesis: **Jesús Cruces Pinto**
Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

D. **Jesús Cruces Pinto**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica

CERTIFICA:

Que Doña **Almudena Peña Lobo**, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC el trabajo titulado:

POMT1: Estudio de la señal de retención en el retículo endoplásmico, interacción con otras proteínas y generación de ratones quimera para el estudio de su función

Una vez supervisado el trabajo, estoy de acuerdo con los métodos empleados y avalo los resultados obtenidos, y asimismo considero que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en,

Madrid, 22 de febrero de 2008

Fdo.: Jesús Cruces Pinto
Director de la Tesis

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Ummm... realmente va a ser esta la parte más difícil de escribir de la tesis... ahí va:

Hay momentos en la vida que parece que nunca van a llegar, pero como sucede muchas veces al final de cada etapa, cuando por fin llega ese momento y miras hacia atrás, sientes que el tiempo ha pasado rápido. Y después de todo el esfuerzo, los tropiezos, las dificultades... queda la satisfacción del trabajo realizado y el agradecimiento a todos aquellos que he conocido, me han acompañado y ayudado durante estos años:

Por supuesto, en primer lugar dar las gracias a Jesús, por darme la posibilidad de realizar la tesis en su laboratorio, por abrir la puerta a la curiosidad de la ciencia, por preocuparse por todas nosotras más allá de lo estrictamente profesional.

Y si voy recordando a toda la gente que he conocido y con la que he compartido durante estos años en el B-17...:

Pues sí, primeramente a ti, Belén, por la parte de “culpa” que compartes con Jesús de que yo esté aquí. Otra “forofa” de la ciencia que me ha enseñado gran parte de lo que he aprendido durante estos años. Y si de aprendizaje hablamos, no puedo olvidarme de Carmen Valero, con quien empecé a descubrir el mundo del laboratorio. Y de aquellos años: Pedro... cuantas risas. A Rocío, la compañera especialista en resolver dudas de PCRs y secuenciación. A Eva García, que parece que este mundo de la ciencia nos mantiene cerca. A Raúl, que también sabía poner una nota de alegría en el laboratorio. A Eva Barroso, que aunque no llegué a coincidir con ella en el laboratorio, parece que así haya sido. Y a todas las alumnas de prácticas: Henar, Bea (mi vecina segoviana), Sara, Ruth... Y sobre todo a Raquel, a Caridad, a Pilar, a Patri y a Almu, aquellas que me ayudasteis a aprender como más me gusta, enseñando... espero no haberlo hecho demasiado mal. En especial a Pilar, que cayó varias veces en mis manos, espero no haberte transmitido una visión demasiado pesimista de la ciencia; y a Patri por tolerar mis manías con los controles, los nombres, los tubos... Y de nuevo a Almu, a Patri, y al resto de la nueva generación del B-17, a Oihane, a Madalina, a Ana, por estos últimos meses de ayuda mutua.

Y si empezamos a hablar de generaciones y ampliando al resto del departamento: gracias a esa generación que pasó por delante nuestra y mirábamos con admiración: Belén del B-17, Raquel y Elena del B-18, Pablo y Cristina del B-19, y Susana del B-20. Y en general a todos los del departamento: Juan, Miguel, Pili, Pili L, Raquel C, las niñas del B-15, etc. que siempre han estado dispuestos a ayudar, a escuchar y responder una pregunta, a buscar y prestar un reactivo o protocolo; por las consultas y las charlas en los pasillos y en el cuarto de cultivos. Y a los

vecinos más recientes: Leti (ese derroche de alegría del B-18), Dioni (el “tío”), Ester (otro derroche de alegría)... por esos desayunos y comidas.

A la gente de los servicios que siempre está dispuesta a ayudar: las chicas de secuenciación, la gente del animalario, los de informática y los de imagen; a Lola, por las conversaciones en el confocal que hicieron más amenas las horas frente al microscopio.

A la “contraparte” de la universidad Rey Juan Carlos, Antonio, Adriana y Óscar, por sus propuestas e ideas, y alegrarnos un poco los seminarios.

Y más allá de estas puertas gracias:

A mis amigas de la carrera, las que mejor entendían las aventuras y desventuras del “labo”: Gema, M^aJo, Sonia, Arancha, Olivia, Miri, Cris, Camino. Sobre todo a esta última, por nuestras charlas, aquí y en la “pisci”. Y, claro, a los respectivos: Fernando, Miguel, Emilio, Roro, Carlos y Ricardo, por aguantar nuestras historias de PCRs, micoplasmas (o “microplastos” como decíais vosotros), ratones y demás bichitos.

A mis amigos, los que ya son de toda la vida (¡qué no me cabe como os ponga a todos! Ana Belén, Marta, Cristina, Gloria, Patri, Raúl, Juanra, Edu, Carlos, Fer, Dani, Jose y nuestra última adquisición, Elena). Gracias por preguntarme cómo iba, por los que se interesaron en estas cosas raras que hacía; y también por no preguntarme y dejarlo descansar. Por esos viajes y las raciones de los fineses, que hacían descansar y olvidar la semana, para volver con nuevas ganas. Por las charlas-debate de los correos infinitos (“pesaos”) que también enseñan...

A Hermitage (Luci, Óscar, Bea, David, Gabi y Ana) y a todos aquellos con los que puedo compartir algo más que la amistad. Gracias también, por vuestro interés en mis “bichitos”.

A mi familia: A mi familia política (qué feo suena), por acogerme siempre con los brazos abiertos y por preocuparos por mí en estos últimos pasos de la tesis. A mi hermana, y a Pedro, por darme una gran ilusión durante esta tesis: ver cómo crece tu barrigota a la par que van aumentando las páginas de mi tesis... aunque a Mario tendremos que esperarle unos meses más que a la tesis. A mis padres, porque en cada gesto, en cada actitud, en cada cualidad, me siento reflejo de ellos. Gracias porque me enseñasteis a trabajar con constancia, y la vida me enseñó a levantarme después de caer; y estas dos cosas me han permitido llegar hasta aquí.

Y ya sólo me quedas tú, niño, gracias por acompañarme, animarme y creer en mí durante este camino, incluso cuando yo lo creía imposible... pero todo llega y sólo queda decir:

GRACIAS

RESUMEN

RESUMEN

La O-manosilación es una modificación postraduccional importante y poco conocida en eucariotas. La proteína O-manosil transferasa, POMT1, junto con POMT2, manosila al α -dístroglicano. Esta proteína es un componente principal del complejo de unión a dístrofina, a través del cual se conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto. El déficit de glicosilación del α -dístroglicano da lugar a un grupo de dístrofias musculares congénitas con afectación neuronal y ocular, denominadas alfa-dístroglicanopatías. La más grave de todas ellas es el síndrome de Walker-Warburg (WWS), que está causado principalmente por mutaciones en el gen *POMT1*. Aún así, existe un gran número de casos en los que no se ha encontrado el gen responsable. El ratón “knock out” de *Pomt1* resultó ser letal embrionario, por la incorrecta formación de la membrana de Reichert. Por esta razón, estamos generando quimeras a partir de células ES^{*Pomt1*^{-/-}}. En este trabajo hemos demostrado la localización subcelular de POMT1 en el retículo endoplásmico. También hemos buscado la señal de retención en dicho orgánulo, mostrando que son redundantes a lo largo de la proteína: se encuentran en la mayoría de las transmembranas, así como en los lazos citoplasmáticos y los lumbinales. Además, hemos intentado corroborar la interacción de POMT1 con POMT2 y con DNAJB6, esta última con objeto de buscar nuevos posibles genes causantes de WWS.

ABSTRACT

O-mannosylation is an important and not well-known post-translational modification in eukaryotes. POMT1 works like a heterocomplex with POMT2, its homolog, to mannosylate α -dystroglycan. Dystroglycan is a major component of the dystrophin glycoprotein complex, implicated in the interaction between extracellular matrix and cytoskeleton proteins. The deficit of α -dystroglycan glycosylation causes a group of congenital muscular disorders with neuronal and ocular abnormalities, called alpha-dystroglycanopathies. The most severe is Walker Warburg Syndrome, which is mainly caused by mutations in the *POMT1* gene. However, there are still many cases in which associated mutations have not been found. Knockout mouse resulted in embryonic lethality due to the incorrect formation of Reichert's membrane. For this reason we are generating chimeras from ES^{*Pomt1*^{-/-}} cells. In this work we have demonstrated POMT1 localization in the endoplasmic reticulum. We have also studied the endoplasmic reticulum retention signal, showing that they are redundant all along the protein: they are found in nearly all the transmembranes, and in the cytoplasmic and luminal loops. Furthermore, we have tried to corroborate the interaction of POMT1 with POMT2 and with DNAJB6, in order to detect new responsible genes for WWS.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	14
INTRODUCCIÓN	
1. La glicosilación.....	17
1.1. La <i>O</i> -manosilación.....	17
2. El distroglicano y el complejo de glicoproteínas de unión a distrofina.....	18
2.1. Alfa-Distroglicanopatías.....	20
2.1.1. Síndrome de Walker-Warburg.....	20
2.1.2. Enfermedad músculo-ojo-cerebro.....	21
2.1.3. Distrofia muscular congénita tipo Fukuyama.....	22
2.1.4. Distrofia muscular congénita 1C y distrofia muscular de cinturas 2I.....	22
2.1.5. Distrofia muscular congénita 1D.....	23
3. Localización subcelular de las putativas o demostradas glicosiltransferasas...	24
4. Síntesis de las proteínas de la vía de secreción.....	25
5. Retención, salida, recuperación al retículo endoplásmico.....	28
6. Estructura de POMT1.....	29
7. Otras posibles dianas o proteínas de interacción con POMT1.....	30
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	
MATERIALES:	
1. Cepas bacterianas.....	37
2. Líneas celulares.....	37
3. Líneas celulares embrionarias pluripotentes de ratón.....	37
4. Vectores de clonaje.....	37
5. Cebadores.....	37
5.1. Cebadores utilizados para el clonaje de <i>POMT1</i> y deleciones del extremo 3'.....	37

5.2. Cebadores utilizados para el clonaje de fragmentos de <i>POMT1</i> en pauta con <i>CD44</i>	38
5.3. Cebadores utilizados para el clonaje de fragmentos de <i>PFK</i> en pauta con <i>CD44</i>	39
5.4. Cebadores utilizados para el clonaje de <i>DNAJB6</i> y <i>POMT2</i>	39
5.5. Cebadores utilizados para el rastreo de las células ES ^{Pomt1^{-/-}} en la generación de ratones quimera.....	40
6. Anticuerpos	
6.1. Anticuerpos utilizados para “western blot”.....	40
6.2. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.....	41
MÉTODOS:	
1. Clonajes en plásmidos de expresión.....	41
1.1. Clonaje de <i>POMT1</i> completo y deleciones del extremo 3’.....	41
1.2. Clonaje de proteínas de fusión entre <i>CD44</i> y <i>POMT1</i>	42
1.2.1. Clonaje de fragmentos de la región C-terminal de <i>POMT1</i> detrás de <i>CD44</i>	42
1.2.2. Clonaje de <i>CD44</i> con fragmentos de la región N-terminal de <i>POMT1</i>	43
1.2.3. Clonaje de <i>CD44</i> con fragmentos de la zona central de <i>POMT1</i>	44
1.3. Clonaje de <i>CD44</i> en pauta con fragmentos de <i>PFK</i>	45
1.4. Clonaje de <i>DNAJB6</i> y <i>POMT2</i>	45
2. Cultivos celulares y transfecciones.....	45
2.1. Obtención de extractos de proteína e inmunodetección (“Western blot”).	45
2.1.1. Extracción de proteínas de células en cultivo.....	45
2.1.2. Transferencia de proteínas a membranas e inmunodetección (“Western blot”).....	46
2.2. Ensayo de coimmunoprecipitación.....	46
2.3. Ensayos de deglicosilación de las cadenas N-glicosílicas.....	46
2.4. Inmunofluorescencia e imágenes de microscopía confocal.....	47
3. Rastreo de células ES ^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimera.....	47
3.1. Transferencia de DNA genómico a membranas e hibridación con sondas de DNA: “Southern Blot”.....	47
3.2. Amplificación del brazo corto de recombinación.....	48

RESULTADOS

1. Localización de POMT1 en el retículo endoplásmico.....	50
2. Búsqueda de la señal de retención en el retículo endoplásmico de POMT1....	50
2.1. Localización subcelular de las deleciones del extremo C-terminal de POMT1.....	50
2.2. Búsqueda de la señal de retención en retículo endoplásmico de POMT1, analizando proteínas de fusión de CD44 con fragmentos de POMT1.....	52
2.2.1. Análisis de la implicación de la región C-terminal de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico	54
2.2.2. Búsqueda de la señal de retención en el retículo endoplásmico: control con CD44 y fragmentos de PFK.....	55
2.2.3. Análisis de la implicación de fragmentos más pequeños de la región C-terminal de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico.	57
2.2.4. Análisis de la implicación de las α -hélices del lazo 6 de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico.....	60
2.2.5. Análisis de la implicación de la región central de POMT1 en retención en el retículo endoplásmico.....	62
2.2.6. Análisis de la implicación de las α -hélices del lazo 4 de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico.....	63
2.2.7. Análisis de la implicación de la región N-terminal de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico.....	65
3. Interacción de POMT1 con DNAJB6.....	69
4. Colocalización de POMT1 y POMT2.....	70
5. Obtención de clones de células ES ^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimera.....	71

DISCUSIÓN

1. Localización subcelular de POMT1.....	76
2. Búsqueda de la señal de retención de POMT1.....	77
2.1. Implicación del extremo C-terminal en la retención en el retículo endoplásmico	78
2.2. Implicación de la transmembrana 7 en la retención en el retículo endoplásmico	79

2.3. Implicación de las transmembranas centrales (TM2–TM6) en la retención en el retículo endoplásmico.....	79
2.4. Implicación de la transmembrana 1 en la retención en el retículo endoplásmico	80
2.5. Implicación del extremo N-terminal en la retención en el retículo endoplásmico	81
2.6. Implicación de los lazos citoplasmáticos en la retención en el retículo endoplásmico	83
2.7. Implicación de los lazos lumbales en la retención en el retículo endoplásmico.....	83
3. Interacción de POMT1 con DNAJB6.....	86
4. Localización de POMT2 en el retículo endoplásmico y colocalización con POMT1.....	87
5. Obtención de clones de células ES ^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimera.....	88
CONCLUSIONES.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	94

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AG	Aparato de Golgi
BSA	Albúmina de Suero Bovino (en inglés “Bovine Serum Albumin”)
Células ES	Células Embrionarias Pluripotentes (en inglés “Embryonic Stem cells”)
CD44	Grupo de diferenciación 44 (en inglés “Cluster of Differentiation 44”)
cDNA	DNA complementario al mRNA
CMD	Distrofia Muscular Congénita (en inglés “Congenital Muscular Dystrophy”)
COPI	Proteína de revestimiento I (en inglés “coat protein I”)
COPII	Proteína de revestimiento II (en inglés “coat protein II”)
COS-7	Células embrionarias de riñón de mono verde africano
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DGC	Complejo Glicoproteico de Distrofina (“Dystrophyn Glycoprotein Complex”)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAJB6	Chaperona homóloga DnaJ (Hsp40) subfamilia B, miembro 6
DTT	1,4-Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Quimioluminiscente mejorado (en inglés “enhanced chemiluminescent”)
EDTA	Sal disódica del Ácido Etileno Diamino Tetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (en inglés “Enhanced Green Fluorescent Protein”)
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
FCMD	Distrofia muscular congénita de Fukuyama
FKRP	Proteína relacionada con la fukutina (en inglés “fukutin related protein”)
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
HA	Epítipo HA (residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana)
HEK293T	Células embrionarias de riñón humanas (en inglés “Human Embryonic Kidney Cells”)
HSP	Proteína de choque térmico (en inglés “Heat Shock Protein”)
IP ₃ R	Receptor de Inositol 1, 4, 5-trifosfato
Kb	Kilobase

KDa	Kilodalton
LGMD	Distrofia muscular de cintura (en inglés “Limb-Girdle Muscular Dystrophy”)
μCi	Microcurio
Man	Manosa
MDC1C	Distrofia muscular congénita tipo 1C (en inglés “Muscular Dystrophy Congenital type 1C”)
MDC1D	Distrofia muscular congénita tipo 1D (en inglés “Muscular Dystrophy Congenital type 1D”)
MEB	Enfermedad músculo-ojo-cerebro (en inglés “Muscle-Eye-Brain”)
MEC	Matriz extracelular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (en inglés “Phosphate-Buffer Saline”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés “Polymerase Chain Reaction”)
PFK	Fosfofructoquinasa
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro (en inglés “phenylmethylsulphonyl fluoride”)
PMT	Proteína <i>O</i> -manosiltransferasa
PNGasa F	<i>N</i> -glicosidasa F
POMGnT1	Proteína <i>O</i> -manosa β1,2- <i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa 1
POMT1	Proteína <i>O</i> -manosiltransferasa 1
POMT2	Proteína <i>O</i> -manosiltransferasa 2
RE	Retículo endoplásmico
RT-PCR	Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés “Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”)
RyR	Receptor de rianodina
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser	Serina
TBS	Tampón Tris-HCl (en inglés, “Tris-Buffered Saline”)
Thr	Treonina
TM	Transmembrana
UTR	Secuencia no traducida (en inglés “untranslated region”)
WWS	Síndrome de Walker-Warburg (en inglés, “Walker-Warburg Syndrome”)
wt	Fenotipo o genotipo salvaje (en inglés “wild type”)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. La glicosilación

La glicosilación es una de las principales modificaciones postraduccionales que sufren muchas proteínas. Los dos tipos de glicosilación más importantes según el tipo de enlace que se forme son: la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación. En la *N*-glicosilación los azúcares se unen al grupo amida, mayoritariamente de asparaginas, mientras que en la *O*-glicosilación se unen al grupo alcohol, principalmente de serinas o treoninas. Además, se diferencian en que en la *N*-glicosilación se une el bloque de azúcares completo, $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, transferido desde dolicol pirofosforil. Este oligosacárido será modificado durante su paso a través del retículo endoplásmico (RE) y del aparato de Golgi (AG). Sin embargo, en la *O*-glicosilación los azúcares se van uniendo monosacárido a monosacárido. La *N*-glicosilación suele tener un mayor número de azúcares que la *O*-glicosilación.

1.1. La *O*-manosilación

Los diferentes tipos de *O*-glicosilación se clasifican de acuerdo al primer azúcar que se une a la Ser/Thr de la proteína. La *O*-manosilación, como su propio nombre indica, es la que comienza por manosa. Esta manosa se introduce a partir del sustrato dolicol-fosfato-manosa (Girrbach et al., 2000). Las enzimas encargadas de este proceso, fueron descritas por primera vez en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), denominándose PMTs (proteín *O*-manosiltransferasas) (Strahl-Bolsinger et al., 1993). Se han identificado siete PMTs en *S. cerevisiae*, donde la *O*-manosilación es indispensable para el mantenimiento de la integridad celular, ya que una de las principales funciones de estas proteínas consiste en glicosilar proteínas de la pared celular (Strahl-Bolsinger et al., 1999). No obstante, también existen enzimas y otras proteínas *O*-manosiladas en levadura (Hutzler et al., 2007). Estas siete PMTs se pueden agrupar en tres familias: familia PMT1, en la que se incluyen PMT1 y PMT5; familia PMT2, en la que se incluyen PMT2, PMT3 y PMT6; y la familia PMT4 (Gentzsch and Tanner, 1997). PMT7 es ligeramente distinta del resto de PMTs y la única de la que no se ha demostrado su actividad enzimática, por lo que podría ser un pseudogen. Las proteínas de las familias PMT1 y PMT2 interactúan para formar heterodímeros y realizar su función, mientras que PMT4 lo hace formando homodímeros (Girrbach and Strahl, 2003). La cadena de azúcares en levaduras está formada por varias manosas, en número

variable según la especie y en algunos casos, también contiene galactosa. Y pueden existir ramificaciones de dichas cadenas (Willer et al., 2003).

En eucariotas superiores solamente existen dos tipos de protein-*O*-manosiltransferasas homólogas de las PMTs de levaduras. Así, en *Drosophila melanogaster* se han descrito dmPOMT1 y dmPOMT2, cuyas mutaciones producen los fenotipos de *rotated abdomen (rt)* y *twisted (tw)*, respectivamente. Estos mutantes se caracterizan por tener el abdomen rotado, lo que se debe a la ausencia de anclaje de las células musculares a las células tendinosas del exoesqueleto de la mosca (Martin-Blanco and Garcia-Bellido, 1996). En estas enzimas también se ha demostrado la necesidad de formar heterodímeros entre ambas para llevar a cabo la *O*-manosilación (Ichimiya et al., 2004).

Las proteínas ortólogas en humano son POMT1, proveniente de la familia de PMT4, y POMT2, proveniente de la familia PMT2. Durante la realización de este trabajo, se ha demostrado que actúan como heterodímeros en la *O*-manosilación (Manya et al., 2004), así como su interacción (Akasaka-Manya et al., 2006), a pesar de que las familias de PMTs de las que provienen, PMT2 y PMT4, no interaccionan en las levaduras. La unión de manosa también se produce a partir del sustrato dolicol-fosfato-manosa, a diferencia de la mayoría de *O*-glicosilaciones, como las de tipo mucinas o la continuación de esta cadena de *O*-manosilglicanos, en las que los donantes de azúcares son nucleótidos, por ejemplo UDP-*N*-Acetilglucosamina.

2. El distroglicano y el complejo de glicoproteínas de unión a distrofina

Este tipo de modificación postraduccional, la *O*-manosilación, es muy abundante en levaduras. Y aunque se pensaba que no tenía lugar en mamíferos, también se ha demostrado su existencia: primeramente, se describió en los proteoglicanos del cerebro (Finne et al., 1979) y posteriormente en el distroglicano, tanto del cerebro como del músculo (Chiba et al., 1997).

Sin embargo, la única diana de *O*-manosilación por POMT1-POMT2 demostrada hasta la fecha es el α -distroglicano (Manya et al., 2004). El distroglicano es una proteína de membrana plasmática formada por dos subunidades: el α -distroglicano y el β -distroglicano. Ambas son codificadas por un solo gen (*DAG1*), el cual se traduce como una única proteína que sufre un corte proteolítico. El β -distroglicano queda integrado en la membrana plasmática y el α -distroglicano en la matriz extracelular, unidas ambas subunidades por interacciones no covalentes (Ibraghimov-Beskrovnaya et

al., 1992 y Cohn, 2005). El β -dístroglicano es una proteína transmembranal que interacciona con proteínas del citoesqueleto de actina mediante la distrofina; mientras que el α -dístroglicano se encuentra en la cara extracelular, interaccionando mediante sus residuos glicosílicos con proteínas de la matriz extracelular (MEC) como laminina- $\alpha 2$ (Ervasti and Campbell, 1993), agrina (Gee et al., 1994) y perlecano (Peng et al., 1998) en el músculo esquelético, y también neurexina en el cerebro (Sugita et al., 2001). La cadena *O*-glicosílica más abundante en el α -dístroglicano es el tetrasacárido: NeuAc $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -2Man-Ser/Thr (Chiba et al., 1997).

El dístroglicano es el componente principal del complejo de glicoproteínas de unión a distrofina (DGC) sirviendo de puente entre el citoesqueleto de actina y la MEC (Fig. 1) (Cohn, 2005). Este complejo está formado por múltiples proteínas como: los α -, β -, δ -, γ - y ζ -sarcoglicanos y el sarcospan, que también son proteínas integrales de membrana; o la α -dístrobrevina. Fallos en este complejo de unión a distrofina provocan distintos tipos de distrofias musculares. Por ejemplo, mutaciones en la propia distrofina provocan la distrofia muscular de Duchenne y de Becker (DMB y BMD); mutaciones en diferentes sarcoglicanos dan lugar a varios tipos de distrofias musculares de cintura (“limb-girdle muscular dystrophy”, LGMD 2C-F) (Cohn and Campbell, 2000) y mutaciones en el gen de la *laminina- $\alpha 2$* (*merosina*) produce la distrofia muscular congénita 1A (“muscular congenital dystrophy”, MCD1A), revisadas todas ellas en (Sciandra et al., 2003).

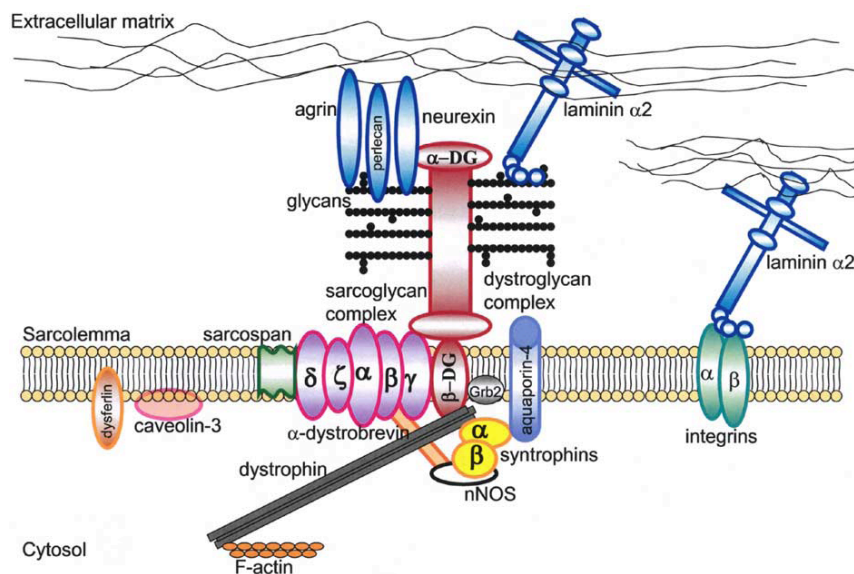


Figura 1. (Cohn, 2005). Complejo de glicoproteínas de unión a distrofina. Componentes integrales y periféricos.

2.1. Alfa-Distroglicanopatías

La ausencia de glicosilación del α -distroglicano da lugar a un grupo de distrofias musculares congénitas (CMD), que además presentan mayor o menor grado de afectación neuronal y ocular (Muntoni et al., 2004). Recientemente se les ha denominado alfa-distroglicanopatías, ya que todas ellas se caracterizan por la hipoglicosilación de α -distroglicano. Este grupo de enfermedades autosómicas recesivas incluye, entre otras, en orden de mayor a menor gravedad: el síndrome de Walker-Warburg (WWS), la enfermedad músculo-ojo-cerebro (“muscle-eye-brain”, MEB), la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD), las distrofias musculares congénitas 1D y 1C (“muscular congenital dystrophy”, MCD1D y MCD1C) y la distrofia muscular de cintura 2I (“limb-girdle muscular dystrophy”, LGMD2I); siendo estas dos últimas las que menor afectación neuronal muestran, ya que en la mayoría de los casos ni siquiera presentan retraso mental.

2.1.1. Síndrome de Walker-Warburg

La más grave de todas las alfa-distroglicanopatías es el síndrome de Walker-Warburg (WWS-OMIM#236670), cuyos principales defectos neuronales son lisencefalia tipo II (lisencefalia de empedrado), agenesia del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia y, algunas veces, encefalocele. La lisencefalia o ausencia de circunvoluciones cerebrales se debe a defectos en la migración neuronal. Los niveles de creatín quinasa sérica suelen estar muy elevados, indicativos de la degeneración muscular. Entre los defectos oculares se incluyen la catarata congénita, microftalmia y buftalmia. La esperanza de vida es menor de 3 años (van Reeuwijk et al., 2005a).

El primer gen que se describió como causante de WWS fue *POMT1*, pero tan sólo explicaba un 20 % de los casos estudiados (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2002). Este porcentaje ha ido variando según el número de casos analizado, ya que es muy difícil realizar una estadística correcta en este tipo de enfermedades raras en las que el número de pacientes es muy limitado. Actualmente, analizando todos los casos descritos, incluidos los aportados por nuestro laboratorio, el porcentaje se sitúa entorno al 25 %. También se han ido describiendo mutaciones en otros genes minoritarios: *POMT2* (van Reeuwijk et al., 2005b), *fukutina* (de Bernabe et al., 2003 y Cotarelo et al., 2008), *FKRP* (“*fukutin-related-protein*”) (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2004) y *LARGE* (“*acetylglucosaminyltransferase-like protein*”) (van Reeuwijk et al., 2007) lo que muestra el origen heterogéneo de esta enfermedad. Sin embargo, *POMT1* sigue

siendo el causante mayoritario, ya que todos estos otros genes dan explicación de un número pequeño de casos, entre un 5 % y un 10 %. Por lo tanto, existe un alto porcentaje de casos de WWS, aproximadamente un 70 %, en los que no se ha encontrado mutación en ninguno de estos genes (Godfrey et al., 2007).

El ratón “knock out” de *Pomt1*, generado anteriormente en nuestro laboratorio con el fin de utilizarlo como animal modelo para el estudio del WWS, resultó ser letal embrionario debido a la incorrecta formación de la membrana de Reichert (Willer et al., 2004). Esta membrana es exclusiva de roedores, por lo que en humanos sí que es viable la ausencia de POMT1. La membrana de Reichert es una de las primeras membranas basales que se originan en el embrión de roedores. La ausencia de *Pomt1* impide la adecuada glicosilación del α -dístroglicano y, por tanto, su unión a la laminina, la cual está presente en la mayoría de las membranas basales. La falta de laminina correctamente asociada al α -dístroglicano en la membrana de Reichert hace que ésta no sea funcional.

Estudios anteriores del laboratorio mostraron que el mRNA de *Pomt1* se expresa durante el desarrollo embrionario en los mismos tejidos que están afectados en los pacientes con WWS: en el tubo neural, en el ojo en desarrollo y en el mesénquima, en los estadios E7.5 hasta E9.5 (Willer et al., 2004); y en el cerebro, ojo y músculo en los estadios E8.5 hasta E11.5. En el ratón adulto POMT1 se expresa en el retículo sarcoplásmico del músculo y en el acrosoma de las espermátidas maduras (Prados et al., 2007).

2.1.2. Enfermedad músculo-ojo-cerebro

La enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB-OMIM#253280) está producida principalmente por mutaciones en el gen *POMGnT1* que codifica la proteína *O*-manosa β 1,2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 1. Esta enzima cataliza la transferencia de *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc) desde UDP-GlcNAc a la *O*-manosa previamente introducida por POMT1-POMT2 en las Ser/Thr del α -dístroglicano (Yoshida et al., 2001). Pero también se han descrito mutaciones en *POMT2* causantes de MEB (Mercuri et al., 2006). MEB es la dístroglicanopatía más frecuente en Finlandia debido a la presencia de una mutación fundadora en el gen *POMGnT1* en esta población con cierto grado de endogamia (Norio, 2003). La clínica de MEB es muy similar a la de WWS,

por lo que resulta difícil distinguirlas; la mayor diferencia entre ellas es la esperanza de vida, que en MEB aumenta hasta los 10-30 años (Cormand et al., 2001).

A diferencia del “knock out” de *Pomt1*, la interrupción génica de *Pomgn1* en ratones no resulta letal embrionaria, sino que da lugar a ratones con múltiples defectos musculares, neuronales y oculares, similares a los encontrados en pacientes con MEB (Liu et al., 2006).

2.1.3. Distrofia muscular congénita tipo Fukuyama

La distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (FCMD-OMIM#253800) es causada principalmente por mutaciones en el gen de la *fukutina* (Kobayashi et al., 1998). Su postulada función como glicosiltransferasa no ha sido demostrada hasta la fecha, pero sí se ha demostrado su interacción con POMGnT1 (Xiong et al., 2006) y α -dístroglicano (Yamamoto et al., 2006). La mayoría de enfermos con FCMD se han encontrado en Japón, debido a la existencia de una mutación fundadora en esta población. Esta mutación consiste en la inserción de un retrotransposón de 3 Kb en el extremo 3' UTR (Toda and Kobayashi, 1999), la cual provoca un descenso de los niveles del mRNA de *fukutina*. El fenotipo que produce esta inserción en homocigosis es más leve que cuando la mutación se encuentra en heterocigosis con otra mutación en la región codificante, ya sea puntual, cambio de pauta de lectura, etc. Sin embargo, cuando las dos mutaciones se encuentran en la zona codificante del gen de la *fukutina* el fenotipo que se produce es más grave, similar a WWS (Cotarelo et al., 2008 y de Bernabe et al., 2003). También se han descrito casos de pacientes con LGMD2I en los que se han encontrado mutaciones en *fukutina* (Godfrey et al., 2006 y Murakami et al., 2006). En estas mutaciones que producen distrofias musculares más leves no debe estar afectada completamente la función de la *fukutina*.

La interrupción génica de *fukutina* en el ratón también resulta ser letal embrionaria (Kurahashi et al., 2005). Estudios en ratones quiméricos deficientes en *fukutina* muestran además anomalías musculares, oculares y cerebrales. En concreto, se han observado defectos en la mielinización y en las uniones neuromusculares (Saito et al., 2007).

2.1.4. Distrofia muscular congénita 1C y distrofia muscular de cinturas 2I

Las distrofias musculares MDC1C (OMIM#606612) y LGMD2I (OMIM#607155) muestran menor grado de afectación neuronal a nivel estructural, aunque en muchos

casos sí presentan retraso mental. Estas distrofias tampoco presentan afectación ocular. La LGMD2I es más suave que MDC1C. Generalmente, en los pacientes con MDC1C, la debilidad muscular es más grave, apareciendo a edades muy tempranas, y normalmente no son capaces de mantenerse erguidos. Mientras que, muchos pacientes con LGMD2I sí son capaces de andar y mantenerse erguidos, y la debilidad muscular aparece más tarde, entre la infancia y la adolescencia o incluso en la edad adulta (Cohn, 2005).

En un primer momento se describieron mutaciones en *FKRP* como causantes de este tipo de distrofias musculares más leves, MDC1C (Brockington et al., 2001a) y LGMD2I (Brockington et al., 2001b), pero recientemente también se han encontrado mutaciones en este gen en pacientes con MEB y WWS (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2004). La función de esta proteína todavía no se ha identificado, aunque también se le ha propuesto una posible función glicosiltransferasa por su homología con fukutina. Sin embargo, recientes estudios de predicciones informáticas indican que ambas, fukutina y *FKRP*, contienen el dominio LicD (del inglés “Leukocyte-common antigen-related (LAR) intracellular domain”) implicado en el metabolismo de fosforilcolina.

2.1.5. Distrofia muscular congénita 1D

MDC1D (OMIM#608840) se caracteriza por la distrofia muscular, retraso mental grave, anomalías en la sustancia blanca y ligeros cambios estructurales en el cerebro, indicativos de defectos en la migración neuronal (Longman et al., 2003).

Se ha descrito mutación de *LARGE* en un paciente con MDC1D (Longman et al., 2003) y en otro paciente con WWS (van Reeuwijk et al., 2007), por lo que el número de casos con mutaciones en este gen es mucho menor que en el resto de genes.

LARGE es otra putativa glicosiltransferasa, en base a dos dominios glicosiltransferasa que se predicen de su secuencia de aa. La pérdida natural de función de esta proteína en ratones produce el ratón miodistrófico (*myd*), por una delección de 100 Kb que elimina los exones 5 al 7 (Grewal et al., 2001). Estos ratones también presentan distrofia muscular, cardiomiopatía leve, defectos oculares y anomalías en la migración neuronal.

También se ha demostrado la interacción de *LARGE* con el dominio N-terminal del α -dístroglicano y que esta interacción es un paso determinante en la correcta síntesis del dístroglicano (Kanagawa et al., 2004).

Barresi et al. (2004) demostraron que la sobreexpresión de LARGE en ratones *myd* y en células de pacientes con WWS, MEB y FCMD producía un aumento de la glicosilación del α -dístroglicano y, por tanto, éste recuperaba la capacidad de unión a laminina, agrina y perlecano. Por tanto, se piensa que LARGE podría ejercer un papel regulador en la ruta de glicosilación del dístroglicano, activando otras vías de glicosilación del mismo que compensen la ausencia del tetrasacárido que comienza por *O*-manosa.

En resumen, todas estas alfa-dístroglicanopatías presentan una gran heterogeneidad genética; y todavía restan muchos casos de enfermos en los que no se ha encontrado mutación en ninguno de estos genes, por lo que debe haber otros genes implicados en el proceso de glicosilación del α -dístroglicano. Sólo se ha demostrado bioquímicamente la actividad enzimática como glicosiltransferasas de las enzimas que catalizan los dos primeros pasos de la formación del tetrasacárido del α -dístroglicano: la unión de manosa y la de *N*-Acetilglucosamina. No se conocen las glicosiltransferasas que catalizan los dos siguientes pasos: la unión de galactosa y de ácido siálico. Parece que no son codificadas por ninguno de los otros genes descritos e implicados en estas alfa-dístroglicanopatías, cuya función no se ha demostrado todavía.

Se han intentado establecer relaciones entre el genotipo y el fenotipo, atendiendo al lugar donde se encuentra la mutación: si es un aminoácido conservado, si está en el dominio catalítico en el caso de aquellas enzimas en las que se conoce, en dominios o motivos conservados. También según el tipo de mutación: puntual, cambio de pauta de lectura, cambio que produce una proteína truncada. Pero es muy complicado establecer estas relaciones porque realmente se sabe muy poco acerca de la estructura de estas proteínas y de la relación de esta estructura con su función. Incluso, en algunos casos, la misma mutación da lugar a distinto fenotipo, por lo que podrían estar interviniendo pequeños cambios en zonas reguladoras o en otros genes, que cambien la expresión de estas putativas o demostradas glicosiltransferasas. Estas diferencias fenotípicas también podrían deberse a factores ambientales (Diesen et al., 2004).

3. Localización subcelular de las putativas o demostradas glicosiltransferasas

Todas estas proteínas se encuentran en el aparato de Golgi a excepción de POMT1 y POMT2, que simultáneamente a la realización de este trabajo se ha publicado su localización en el retículo endoplásmico (Akasaka-Manyá et al., 2006) (Fig. 2). Se ha

descrito que algunas mutaciones en FKRP provocan su retención en el RE (Esapa et al., 2005), impidiendo probablemente de esta forma que realice su función en AG. Pero este mecanismo no es común a todas las mutaciones de FKRP, ya que, en el caso de otras mutaciones, la proteína se localiza correctamente en el AG. Estas mutaciones también producen la distroglicanopatía, probablemente por ausencia de función de esta proteína (Torelli et al., 2005 y Dolatshad et al., 2005).

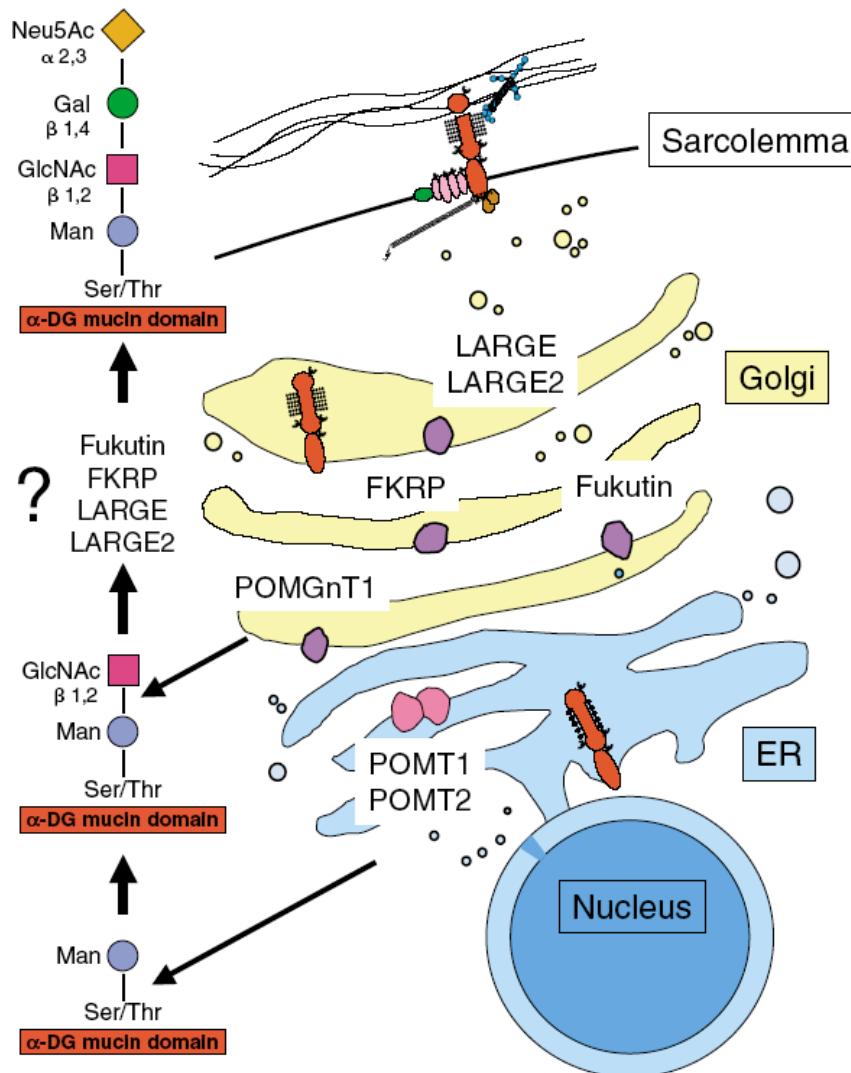


Figura 2. (Barresi and Campbell, 2006) Modelo de glicosilación del α -distroglicano a su paso por la vía de secreción. Localización en los orgánulos subcelulares de las putativas o demostradas glicosiltransferasas implicadas en la *O*-glicosilación. A la izquierda, los pasos de la *O*-glicosilación del α -distroglicano.

4. Síntesis de las proteínas de la vía de secreción

Las proteínas cuyo destino final sea el RE, el AG, la membrana plasmática, los lisosomas o ser secretadas, van a la vía de secreción, pasando por los sistemas de

vesículas: el RE, el AG y finalmente, aquellas proteínas que no están localizadas en el RE, en el AG, son exportadas mediante vesículas de secreción a la membrana plasmática o a los lisosomas (Fig. 3).

Como en el resto de las proteínas, la traducción del mRNA por el ribosoma comienza en el citoplasma. El péptido señal en el extremo N-terminal tiene de 16 a 30 aminoácidos hidrofóbicos. Cuando el péptido señal queda expuesto en el citoplasma saliendo fuera del ribosoma, se le une la partícula de reconocimiento de señal (SRP), la cual interrumpe la traducción. Esta SRP se une al receptor de dicha molécula, y todo este complejo se acopla al translocón del RE; así, el ribosoma queda unido al RE. Se continúa la traducción de la proteína que va entrando en el lumen del RE mientras se traduce. Generalmente, el péptido señal es eliminado por una peptidasa específica. En algunas proteínas integrales de membrana no existe péptido señal, y son los dominios transmembrana los que actúan como secuencia interna de parada de la transferencia, se detiene la traducción, permitiendo que el ribosoma se una al RE. Estos dominios transmembrana, además, actúan como secuencia de anclaje a la membrana del RE, quedando incluidos en ella mientras continúa la traducción. El ribosoma se separa del translocón para traducir los lazos citoplasmáticos de estas proteínas transmembrana. Revisado todo el proceso por (Rapoport, 2007).

Una vez que las proteínas han sido sintetizadas, éstas tienen que ser plegadas correctamente en el RE, en muchos casos con ayuda de chaperonas. Tras ser correctamente plegadas y con las modificaciones postraduccionales propias de cada proteína, como la glicosilación, miristilación... siguen por la vía de secreción, siendo transportadas al AG en vesículas. Generalmente, son vesículas cubiertas con COPII (complejo II de proteínas de revestimiento de vesículas), revisado por van Anken y Braakman, (2005). En las proteínas integrales suele existir algún tipo de señal en la región citoplasmática capaz de unirse a estas moléculas COPII, ya sea de forma directa o indirecta, para facilitar así su transporte. Esta señal suele ser una secuencia de dos aminoácidos, diacídica, si son ácidos (Nishimura and Balch, 1997), o diaromática, si son aromáticos (Kappeler et al., 1997). En el caso de proteínas solubles, éstas se unen a algún receptor que media su transporte.

Cuando las proteínas no se pliegan de forma correcta son degradadas mediante el sistema de degradación asociado al retículo endoplásmico (ERAD). Para ello, son retrotranslocadas del RE al citoplasma donde serán señaladas mediante ubiquitina y degradadas por el proteasoma (Brodsky and McCracken, 1999).

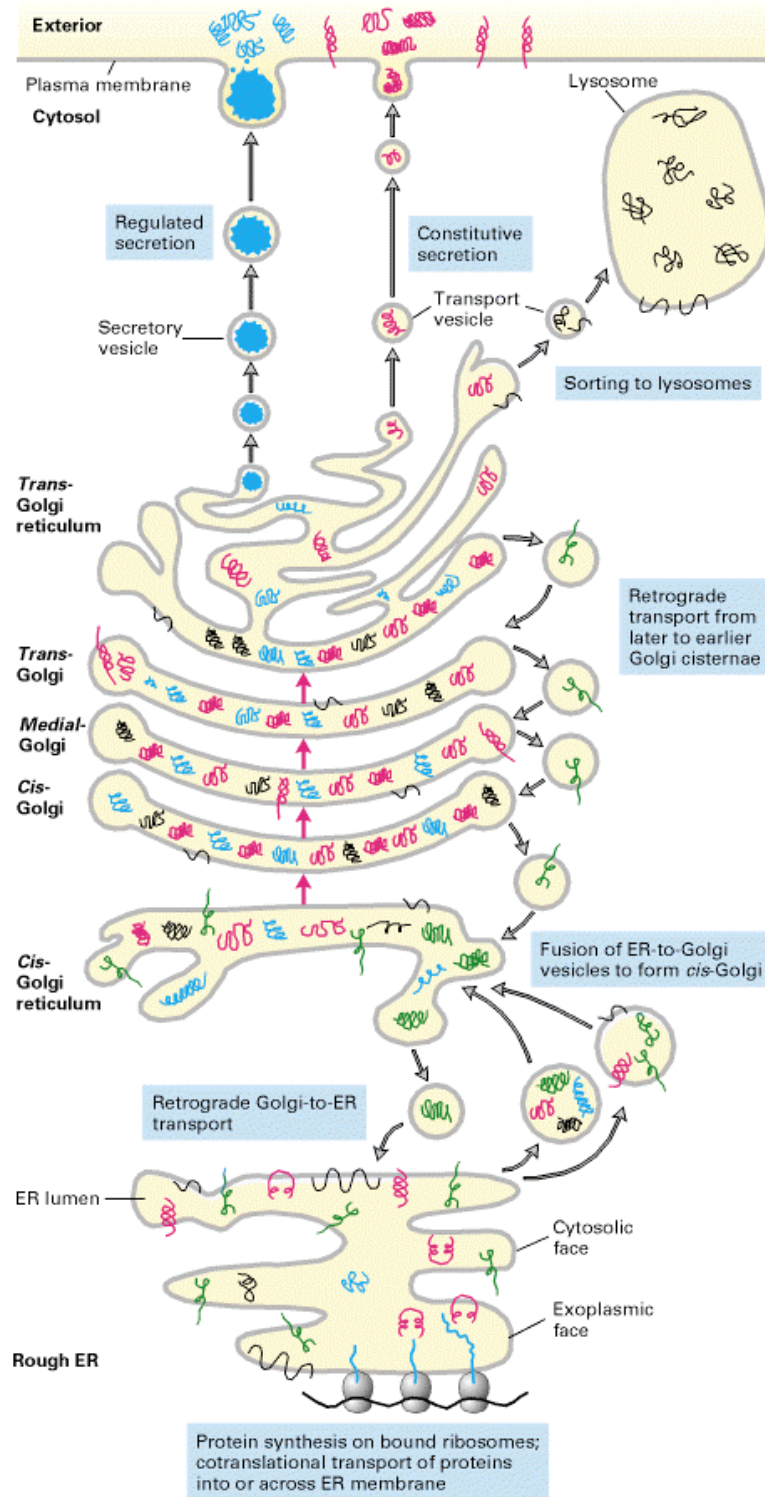


Figura 3. (Lodish et al., 1999) Vía de secreción: Síntesis de las proteínas de la vía de secreción en los ribosomas adosados al RE. Transporte anterógrado del RE al AG mediante vesículas COPII. Transporte retrógrado de las proteínas del RE desde el AG; y dentro del AG de las cisternas trans a las medias y de éstas a las cisternas cis (a la derecha). El transporte de las proteínas de membrana o de secreción en el sentido contrario (cisternas cis, medias y trans). En la red del AG serán empaquetadas en vesículas para formar lisosomas o ser transportadas a la membrana plasmática donde serán secretadas o quedarán ancladas.

5. Retención, salida, recuperación al retículo endoplásmico

Aquellas proteínas que son propias del RE o del AG tienen una o varias señales que las identifica para que sean retenidas en dichos orgánulos y no continúen avanzando en la vía de secreción. También pueden poseer señales que las devuelvan a su emplazamiento si son transportadas a otro orgánulo. Es decir, que pueden ser señales de retención propiamente dichas o señales de retención mediante recuperación desde otros orgánulos.

En el caso del RE, las proteínas solubles tienen una señal consenso de retención en su extremo C-terminal, más exactamente de recuperación, que es el tetrapéptido -KDEL (Pelham, 1990), o variaciones del mismo, como -HDEL en las levaduras. Esta secuencia permite que, cuando alguna de estas proteínas llega mediante una vesícula al AG, allí es reconocida por el receptor de KDEL, activando un mecanismo de transporte retrógrado hacia el RE (Lewis and Pelham, 1990).

En las proteínas integrales de membrana tipo I, aquellas que tienen una sola transmembrana y el extremo C-terminal hacia el citoplasma, la señal de retención para ser recuperadas desde el AG está en el C-terminal, y suele ser -KKXX o -KXXXX (Jackson et al., 1990). Esta secuencia sirve de anclaje para otras proteínas que actúan como ensamblaje de la maquinaria para el transporte retrógrado, mediante vesículas COPI (complejo I de proteínas de revestimiento de vesículas) (Cosson and Letourneur, 1994). Este es el caso del receptor KDEL que se encuentra entre el RE y la cara cis del AG. En el AG, el receptor se une a las proteínas solubles del RE que han llegado al AG y en cuyo extremo C-terminal se encuentra la señal -KDEL. El extremo citoplasmático del receptor (KKXX) es a su vez reconocido por la maquinaria de las vesículas COPI y transportado de esta forma al RE. Allí, el receptor se separa de la proteína soluble por el pH neutro del RE, ya que la interacción se produce en el lumen del AG donde la afinidad es mayor porque el pH es ligeramente más ácido (Wilson et al., 1993).

Pero a veces existen señales redundantes. Por ejemplo, en algunas de estas proteínas tipo I, además de la señal K(X)KXX en el C-terminal, también actúa como señal de retención su propio dominio transmembrana (Barre et al., 2005).

Algunas proteínas transmembranales tipo I, con el extremo N-terminal citoplasmático, tienen dos argininas (RXR) entre los primeros aminoácidos de este extremo como señal de retención (Schutze et al., 1994). Pero en este tipo de proteínas, la secuencia señal no es tan consenso como lo es la secuencia KDEL en las proteínas solubles. A diferencia de lo que sucede con la señal K(X)KXX en el extremo C-

terminal, en estas secuencias RXR no es tan importante la distancia respecto del extremo N-terminal, sino la distancia a su dominio transmembrana (Gassmann et al., 2005). Por tanto, aunque también son recuperadas desde el AG mediante vesículas COPI, el mecanismo de reconocimiento debe ser distinto del que se produce con las señales K(X)KXX. Además, estas secuencias RXR se han encontrado también en proteínas que forman oligómeros. En estos casos, la señal de retención puede estar en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal o incluso en los lazos citoplasmáticos. Los monómeros son retenidos o recuperados al RE mediante esta señal RXR hasta que se forme el oligómero de forma adecuada, siendo este proceso una forma de control de calidad del RE. Durante la oligomerización, estos aminoácidos quedan enmascarados: bien en la formación del oligómero, o bien por el reclutamiento de otras proteínas que se unen al oligómero, o bien por fosforilación de algún aminoácido cercano (Michelsen et al., 2005), permitiendo así la salida del RE.

En las proteínas con más de un dominio transmembrana, las señales de retención son mucho más variables. En algunas, son los propios dominios transmembrana los que producen la retención en el RE (Parker et al., 2004). Al igual que sucede con la señal K(X)KXX, cuando la señal es RXR también puede haber señales redundantes, como la presencia de dominios transmembranas que son capaces de retener a la proteína en el RE (Hardt et al., 2003).

6. Estructura de POMT1

POMT1 es una proteína de 725 aa, con siete putativos dominios transmembrana, deducidos del estudio de la estructura transmembranal realizado en su homóloga, PMT1 de *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999). Los programas informáticos predecían 11 dominios transmembrana por su estructura α -hélice, pero los análisis bioquímicos realizados en PMT1 demostraron que sólo siete de ellas son transmembranas. Las otras cuatro α -hélices deben ser citoplasmáticas (Fig. 4). Entre estas siete α -hélices transmembranas quedan cuatro grandes lazos: dos en la cara luminal (lazo 1 y lazo 5) y otros dos en la cara citoplasmática (lazo 4 y lazo 6). Estos dos últimos lazos contienen dos α -hélices cada uno, que son las cuatro α -hélices citoplasmáticas. En el lazo 1 y el lazo 5 está postulado que es donde se encuentran el centro activo y/o el lugar de unión a sustrato (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999).

El lazo 5 presenta 3 dominios MIR. Estos dominios se describieron así por ser comunes a las *O*-manosiltransferasas (PMTs), al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) y al receptor de rianodina (RyR) (Ponting, 2000). Más recientemente, también se han encontrado en SDF2 (“stromal cell-derived factor 2”) (Hamada et al., 1996) y en SDF2L (“stromal cell-derived factor 2 like”). El receptor de rianodina y el receptor de IP₃ presentan cuatro dominios MIR en el extremo N-terminal citoplasmático y contienen 6 transmembranas en su extremo C-terminal. Sin embargo, los tres dominios MIR de las proteínas *O*-manosiltransferasas están en el lumen del RE, lo mismo que sucede con los tres dominios MIR de las proteínas SDF2 y SDF2L, que se retienen en el RE por la secuencia KDEL de su extremo C-terminal.

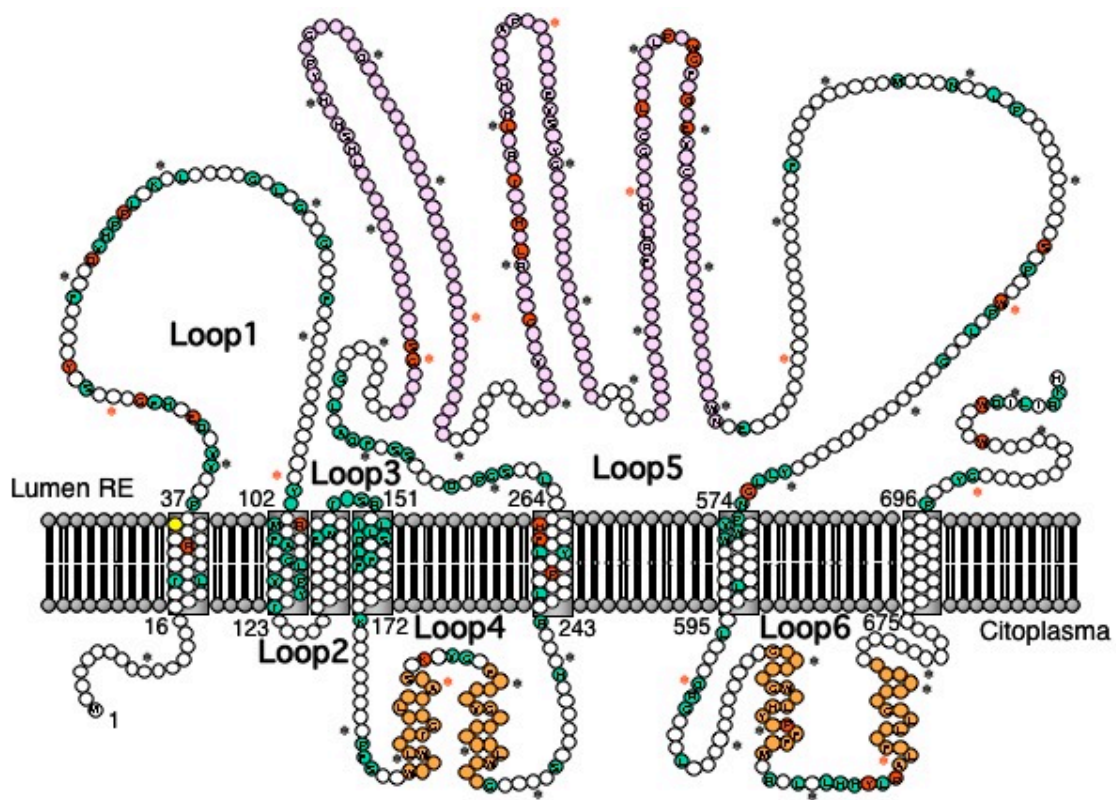


Figura 4. Estructura predicha para POMT1. En amarillo las α -hélices, en rosa los dominios MIR, en verde los aminoácidos conservados y en rojo los aminoácidos idénticos en base a la comparación de varias PMTs/POMTs.

7. Otras posibles dianas o proteínas de interacción con POMT1

Como ya hemos comentado, las mutaciones en *POMT1*, que son las más frecuentes en el WWS, junto con mutaciones en el resto de genes mencionados (*POMT2*, *fukutina*, *FKRP*, y *LARGE*) sólo explican un 30-35 % de los casos de WWS.

Con objeto de identificar tanto otras proteínas diana de la manosilación de POMT1, como proteínas que pudieran unirse a POMT1, que nos permitieran encontrar nuevos posibles genes responsables del WWS, se realizó anteriormente en el laboratorio el ensayo de doble híbrido.

Se encontraron varias proteínas que interactuaban con el lazo 1 de POMT1: DNAJB6, DNAJB11, FAM48A, CRYAB, Cox-11 y ceramidasa mitocondrial. Como decíamos anteriormente, en el lazo 1 y lazo 5 de POMT1 se ha postulado que podrían estar el centro catalítico y lugar de reconocimiento del sustrato (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999). Cuando se repitió el ensayo con el lazo 5 de POMT1 sólo dos de estas proteínas volvieron a resultar positivas para la interacción: FAM48A y DNAJB6, que además también demostraron producir interacción con el lazo 1 y 5 de POMT2.

DNAJB6 y DNAJB11 son dos chaperonas. DNAJB6 es una proteína de choque térmico homóloga de DNAJ específica de testículo (Hata and Ohtsuka, 2000); anteriormente también se le llamó HSJ2 o MRJ2. Y DNAJB11 es una chaperona específica de RE. Cox 11 (citocromo oxidasa 11, chaperona de cobre) (Banci et al., 2004) y la ceramidasa mitocondrial (El Bawab et al., 2000) se localizan en la mitocondria, por lo que se descartó continuar con su estudio, ya que la interacción encontrada en el ensayo de doble híbrido podría deberse a un artefacto del ensayo. De FAM48A, anteriormente denominada p38IP (proteína de interacción con p38), no se conoce apenas nada. Recientemente se le ha implicado en procesos tumorales (Schmidt et al., 2005), aunque parece existir cierta controversia sobre estos datos (Kunze et al., 2006). CRYAB (α B-cristalina) es una chaperona cuyas mutaciones pueden producir cataratas (Berry et al., 2001) o miopatía miofibrilar causada por mal plegamiento de la proteína muscular desmina (Vicart et al., 1998). Al igual que *POMT1*, el mRNA de *DNAJB6* se expresa altamente en testículo (Pei, 1999 y Hata and Ohtsuka, 2000) que es un tejido afectado en algunos pacientes con WWS (Hung et al., 1998). Estudios de inmunofluorescencia en tejidos de ratón adulto realizados por nuestro grupo (Prados et al., 2007) mostraron que POMT1 y POMT2 se expresan en el acrosoma de las espermátidas maduras, pero no el distroglicano.

En este trabajo hemos mostrado la localización subcelular de POMT1 en el RE. Hemos buscado la señal de retención en el retículo endoplásmico de esta proteína, primero mediante delecciones del extremo C-terminal y posteriormente fusionando pequeños fragmentos de POMT1 a CD44, una proteína de membrana plasmática con un

alto grado de glicosilación (Ponta et al., 2003). De esta forma, hemos comprobado que las señales de retención de POMT1 son redundantes, ya que tanto la mayoría de las transmembranas como los lazos son capaces de retener a POMT1 en el RE. Tan solo los extremos N- y C-terminal parecen no estar implicados en la retención en el RE.

También hemos intentado demostrar en sistemas celulares la interacción de POMT1 con DNAJB6, una de las proteínas seleccionadas del ensayo de doble híbrido realizado anteriormente en el laboratorio. Se escogió esta proteína ya que, como decíamos anteriormente, se expresa altamente en testículo, al igual que POMT1 (Willer et al., 2004). Además, en este tejido se expresan POMT1 y POMT2, pero no el distroglicano, por lo que podría existir otra diana de la manosilación por POMT1-POMT2. No hemos podido demostrar esta interacción mediante coimmunoprecipitación por la insolubilidad del extracto de proteína de membrana donde se encontraba POMT1. Y los ensayos de inmunofluorescencia mostraron la localización de DNAJB6 en el citoplasma, núcleo y, a veces, en el RE, no sirviendo para aclarar la posible interacción entre dichas proteínas.

La interacción entre POMT1 y su homóloga POMT2, no se puso de manifiesto en el ensayo de doble híbrido. Este ensayo sólo se realizó con las zonas no hidrofóbicas de los lazos 1 y 5 luminales. Quizá se necesiten ambos lazos para producir la interacción, o quizá el lugar de interacción entre ambas proteínas esté en otra zona, ya sean los dominios transmembrana o los lazos citoplasmáticos. Los estudios de interacción mediante inmunoprecipitación no se llegaron a realizar por los mencionados problemas de insolubilidad de los extractos de proteína de membrana. Los ensayos de inmunofluorescencia corroboraron la colocalización de estas proteínas en el RE.

Como ya hemos dicho, el ratón “knock out” de *Pomt1* resultó ser letal embrionario. Por esta razón, nuestro grupo se propuso generar ratones quimera a partir de células ES^{*Pomt1*^{-/-}} con el fin de obtener un animal modelo del WWS. Para ello, en las células ES^{*Pomt1*^{+/-}} producidas en la realización del “knock out”, se introdujo una construcción que eliminaba el alelo salvaje de *Pomt1*, interrumpiéndolo con el gen de resistencia a puromicina. En la primera electroporación de esta construcción, llevada a cabo anteriormente en el laboratorio, se obtuvo un único clon de células ES^{*Pomt1*^{-/-}}. Los tres ratones quimera obtenidos de la microinyección de este clon no presentaron cambios fenotípicos, debido a que el grado de quimerismo era menor del 50 % en la mayoría de sus tejidos. Esto probablemente se debe a que es necesaria la falta de más del 50 % de la proteína para que tenga consecuencias fenotípicas, ya que en humanos la herencia de la enfermedad es recesiva, siendo suficiente con un alelo normal para que la proteína sea

funcional. Tal es el caso de las quimeras del gen de la *fukutina*, desarrolladas con el objeto de permitir un mejor estudio de la FCMD (Kurahashi et al., 2005).

Para conseguir un número mayor de ratones quimera, se repitió la microinyección del clon de células ES^{Pom1^{-/-}} pero no se obtuvieron ratones quimera. Para obtener nuevos clones, se ha realizado de nuevo la electroporación de la construcción. En este trabajo hemos realizado el rastreo de los clones de células ES^{Pom1^{-/-}} resistentes a neomicina, puromicina y ganciclovir de la segunda electroporación de la construcción. Se han obtenido tres clones de células ES^{Pom1^{-/-}}, que se microinyectarán en blastocistos y se transferirán a hembras pseudogestantes para la obtención de ratones quimera.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudio de la localización subcelular de POMT1.
2. Estudio de la señal de retención en el RE de POMT1:
 - Realización de construcciones de POMT1 truncadas en el extremo C-terminal y estudio de su localización subcelular.
 - Generación de proteínas de fusión entre CD44, proteína de membrana plasmática, y fragmentos de POMT1, para el estudio de su localización subcelular.
3. Estudios de interacción de POMT1 con DNAJB6 y con POMT2, mediante ensayos de inmunofluorescencia y coimmunoprecipitación.
4. Generación de ratones quimera utilizando células ES^{Pomt1^{-/-}}
 - Rastreo de clones de células ES^{Pomt1^{-/-}}, obtenidos mediante recombinación homóloga a partir de células ES^{Pomt1^{+/-}}.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Todos los reactivos empleados en la preparación de las soluciones y tampones que se describen en el texto han sido de grado analítico o de grado apto para su uso en biología molecular.

1. Cepas bacterianas

Para realización de los clonajes se utilizó la cepa DH5- α de *E. coli*.

2. Líneas celulares

Las células HEK293T (células embrionarias de riñón humanas) y COS-7 (células embrionarias de riñón de mono verde africano) se usaron en la búsqueda de la señal de retención en el RE de POMT1 y en el estudio de interacción de POMT1 con DNAJB6 y POMT2.

3. Líneas celulares embrionarias pluripotentes de ratón

Para la generación de quimeras a partir de células ES^{Pomt1^{-/-}} se utilizaron células E14.1 derivadas de la cepa 129P2/Ola (Hooper et al., 1987)

4. Vectores de clonaje

pEF4/Myc-His para clonar *POMT1*.

pEGFP-N1 para clonar *DNAJB6*.

pCDNA3 con el epítipo Flag, añadido mediante corte con enzimas de restricción, para clonar *POMT2*.

pCDNA3 con el epítipo HA, añadido mediante corte con enzimas de restricción, para clonar las proteínas de fusión entre CD44 y fragmentos de POMT1 o de PFK.

5. Cebadores

Todos los cebadores utilizados fueron diseñados con el programa informático Oligo 6.8 (MacOsX) y sintetizados por Isogen o Invitrogen.

5.1. Cebadores utilizados para el clonaje de *POMT1* y deleciones del extremo 3'

En la tabla 1 se describen los cebadores utilizados para realizar el clonaje de *POMT1* completo y con deleciones en el extremo 3'.

Tabla 1. Cebadores para clonar *POMT1* completo y con deleciones en el extremo 3'

Nombre abreviado	Nombre	Secuencia
ATG	POMT1- <i>EcoRI</i> -ATG (D)	5' gcgaattc atgtggggattttgaag 3'
-TGA	POMT1-sinTGA- <i>XbaI</i> (R)	5' gctctagatg ttttcggatcaagatgtc 3'
W714	POMT1- <i>XbaI</i> -delecW714-fin (R)	5' gctctaga atgcgaagggccttgagttc 3'
L697	POMT1- <i>XbaI</i> -delecL697-fin (R)	5' gctctagagg cgcgagcgtgttgccac 3'
F676	POMT1- <i>XbaI</i> -delecF676-fin (R)	5' gctctaga aataactcctctggagctgggac 3'
R598	POMT1- <i>XbaI</i> -delecR598-fin (R)	5' gctctaga agcaggtaccacaaggacag 3'
G573	POMT1- <i>XbaI</i> -delecG573-fin (R)	5' gctctaga aggtggatctgagcctggt 3'

D: cebador directo, R: cebador reverso. En negrita, la secuencia diana de la enzima de restricción utilizada.

5.2. Cebadores utilizados para el clonaje de fragmentos de *POMT1* en pauta con *CD44*

En la tabla 2 se detallan los cebadores utilizados en estos clonajes.

Tabla 2. Cebadores para clonar fragmentos de *POMT1* en pauta con *CD44* humana.

Nombre abreviado	Nombre	Secuencia
M1	POMT1- <i>XhoI</i> -M1 (D)	5' ccg ctcgagatg ggggattttgaag 3'
N16	POMT1- <i>XhoI</i> -N16 (D)	5' ccg ctcgagg acatcaactgagccttgt 3'
L19	POMT1- <i>XhoI</i> -L19 (R)	5' ccg ctcgaga aggctcaagtgtatgctcag 3'
Y36	POMT1- <i>XhoI</i> -Y36 (D)	5' ccg ctcgagg ttagtgagtcgccacagc 3'
A39	POMT1- <i>XhoI</i> -A39 (D)	5' ccg ctcgagg ctgtgtttttgacgaagta 3'
V101	POMT1- <i>XhoI</i> -V101 (D)	5' ccg ctcgagg tgtgttcctgcgctgctg 3'
L104	POMT1- <i>XhoI</i> -L104 (R)	5' ccg ctcgagg gaccacacagggcagcttg 3'
L171	POMT1- <i>XhoI</i> -L171 (R)	5' ccg ctcgag caggtaggacaacacggccaat 3'
F182	POMT1- <i>XhoI</i> -F182 (D)	5' ccg ctcgagt tttctctgagctggtggttct 3'
I203	POMT1- <i>XhoI</i> -I203 (R)	5' ccg ctcgagg atgccactgcacaggaac 3'
G207	POMT1- <i>XhoI</i> -G207 (D)	5' ccg ctcgagg gtgtgttcacgtacgtgctc 3'
G227	POMT1- <i>XhoI</i> -G227 (R)	5' ccg ctcgagt ccaagcaggtgccagggcat 3'
A224	POMT1- <i>XhoI</i> -A224 (D)	5' ccg ctcgagg cagtggtttgctggtcctc 3'
V266	POMT1- <i>XhoI</i> -V266 (R)	5' ccg ctcgagg actagaatcaagtgacgta 3'
Q293	POMT1- <i>XhoI</i> -Q293 (D)	5' ccg ctcgag cagggtcagccactggaggt 3'
G494	POMT1- <i>XhoI</i> -G494 (R)	5' ccg ctcgagg ccgtatcgggtctctccac 3'

N487	POMT1- <i>Xho</i> I-N487 (D)	5' ccgctcgaga acgtggaggagcaccgata 3'
V576	POMT1- <i>Xho</i> I-V576 (R)	5' ccgctcgagc actatgtttccaagtagg 3'
A567	POMT1- <i>Xho</i> I-A567 (D)	5' ccgctcgagg ctcagatccacctactt 3'
L597	POMT1- <i>Xho</i> I-L597 (R)	5' ccgctcgagg agcaggtaccacaaggacag 3'
V615	POMT1- <i>Xho</i> I-V615 (D)	5' ccgctcgagg tgtgtggctggggcgctgtg 3'
A647	POMT1- <i>Xho</i> I-A647 (D)	5' ccgctcgagg cactcaccttccaatc 3'
K637	POMT1- <i>Xho</i> I-K637 (R)	5' ccgctcgag cttctccatcaggaagaacg 3'
S663	POMT1- <i>Xho</i> I-S663 (R)	5' ccgctcgagg ctgatgtgctgcaggaccac 3'
P696	POMT1- <i>Xho</i> I-P696 (D)	5' ccgctcgagg ccactcacctacggggacaa 3'
R673	POMT1- <i>Xho</i> I-R673 (D)	5' ccgctcgagg agcagcatcttcagcgccctggt 3'
T698	POMT1- <i>Xho</i> I-T698 (R)	5' ccgctcgagg gtgagtggggcgagcgtgtg 3'
-TGA	POMT1-sin TGA- <i>Xho</i> I (R)	5' ccgctcgagg tgttttcggatcaagatgt 3'

D: cebador directo, R: cebador reverso. En negrita, la secuencia que reconoce la enzima de restricción utilizada, *Xho*I.

5.3. Cebadores utilizados para el clonaje de fragmentos de *PKF* en pauta con *CD44*

Los cebadores utilizados para realizar estos clonajes se enumeran en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores para clonar fragmentos de *PKF* de músculo humana en pauta con *CD44* humana.

Nombre abreviado	Nombre	Secuencia
Y155	PFKm- <i>Xho</i> I-Y155 (D)	5' ccgctcgagt acctgaacattgtgggcctggt 3'
T175	PFKm- <i>Xho</i> I-T175 (R)	5' ccgctcgagg gtcatatcggtgccacag 3'
T178	PFKm- <i>Xho</i> I-T178 (D)	5' ccgctcgag actgactctgcctgcate 3'
H199	PFKm- <i>Xho</i> I-H199 (R)	5' ccgctcgagg tggtctctgggcagtggta 3'

D: cebador directo, R: cebador reverso. En negrita, la secuencia diana de restricción utilizada.

5.4. Cebadores utilizados para el clonaje de *DNAJB6* y *POMT2*

En la tabla 4 se describen los cebadores usados para clonar *DNAJB6* y *POMT2*.

Tabla 4. Cebadores para clonar *DNAJB6* y *POMT2*.

	Nombre	Secuencia
1	<i>DNAJB6-KpnI</i> -ATG (D)	5' cggggtac ctctcgtaaaacatggtggatta 3'
2	<i>DNAJB6</i> -sin TAA- <i>Bam</i> HI (R)	5' cgcgga tccttgttatccaagcgcagcagc 3'
3	<i>POMT2</i> -ATG- <i>Xho</i> I (D)	5' ccgctc gagatgccgcccggccacg 3'
4	<i>POMT2</i> -sin TGA- <i>Xho</i> I (R)	5' ccgctc gagaaagtcccatgagtccag 3'

D: cebador directo, R: cebador reverso. En negrita la diana de la enzima de restricción utilizada.

5.5. Cebadores utilizados para el rastreo de las células ES^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimera

En la tabla 5 se detallan los cebadores utilizados para amplificar la sonda de 383 pb del intrón 9 de *Pomt1*. Con esta sonda se comprobó mediante “Southern blot” que se había producido la recombinación homóloga en el brazo largo en 3'. Y en la tabla 6 se indican los cebadores que verifican que ha ocurrido la recombinación homóloga en el brazo corto de recombinación en 5', mediante amplificación por PCR, comprobando así la presencia del alelo de resistencia a neomicina y puromicina.

Tabla 5. Cebadores que amplifican la sonda de 383 pb del intrón 9 para el “Southern blot”.

mI9D-Pomt1	5' cccatgttggtgtttttaaag 3'
mI9R-Pomt1	5' ctacacacctcaccaccacac 3'

Tabla 6. Cebadores que amplifican en el brazo corto de recombinación en 5'.

m3'Dc	5' ggaagagtacggctggcgcaactg 3'
Puro 2a	5' cctgacgcccggcccacgac 3'
125 Neo b	5' cagctcattcctccactcat 3'

6. Anticuerpos

6.1. Anticuerpos utilizados para “western blot”

Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas:

- anti-HA monoclonal de rata (Roche) 1:1.000
- anti-c-myc monoclonal de ratón (Roche) 1:1.000
- anti-GFP policlonal de conejo (Molecular Probes) 1:1.000

Anticuerpos secundarios y diluciones utilizadas:

- anti-IgG de ratón producido en cabra acoplado a peroxidasa (Nordic) 1:10.000
- anti-IgG de ratón producido en cabra acoplado a peroxidasa (Nordic) 1:10.000
- anti-IgG de rata producido en cabra acoplado a peroxidasa (Southern Biotech) 1:5.000

6.2. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas:

- Anti-c-myc monoclonal de ratón (Roche) 1:100
- anti-calnexina policlonal de conejo (Stressgen) 1:200
- anti-manosidasa II policlonal de conejo (Chemicon) 1:200
- anti-HA monoclonal de ratón (ICN) 1:100
- anti-Flag monoclonal de ratón (Stratagene) 1:500
- anti-POMT2 policlonal de conejo (amablemente cedido por la Dra. Stralh) 1:100

Anticuerpos secundarios y diluciones utilizadas:

- anti-IgG de conejo producido en cabra y acoplados a fluorocromo 488 ó 594 (Invitrogen) 1:500
- anti-IgG de ratón producido en cabra y acoplados a fluorocromo 488 ó 594 (Invitrogen) 1:500

MÉTODOS

1. Clonajes en plásmidos de expresión

1.1. Clonaje de *POMT1* completo y deleciones del extremo 3'

El clonaje del cDNA completo de *POMT1* sin TGA se realizó en el plásmido pEF4/Myc-His-B entre las dianas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Se amplificó con la DNAPolimerasa Pfu-Ultra (Stratagene) del clon IMAGE 5573162 que contiene el cDNA completo de *POMT1*. Se usaron los dos primeros cebadores indicados en la tabla 1 (ATG y -TGA). Para buscar la señal de retención en retículo se realizaron varias deleciones en el extremo C-terminal (ver fig. 5) con el resto de cebadores de la tabla 1.

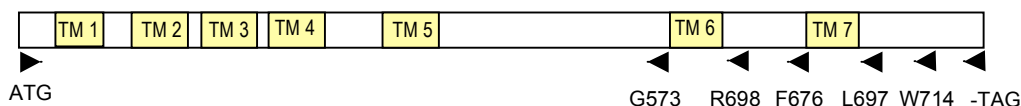


Figura 5. Construcciones de las distintas deleciones del extremo 3' de *POMT1*. Las puntas de flecha indican la posición y dirección de los cebadores y debajo su nombre abreviado. Los recuadros amarillos representan la situación de las siete transmembranas predichas para *POMT1*.

1.2. Clonaje de proteínas de fusión entre CD44 y *POMT1*

1.2.1. Clonaje de fragmentos de la región C-terminal de *POMT1* detrás de CD44

Para analizar la implicación de la región C-terminal en la retención en el RE se realizaron construcciones en pcDNA3-CD44-HA (amablemente cedido por Dr. M. Quintanilla) que codifica la proteína de membrana plasmática CD44 humana. Detrás de CD44 y por delante del epítipo HA, se clonaron varios fragmentos de la región C-terminal de *POMT1* sin el codón de parada en *XhoI*:

- i) desde la TM6 hasta el final (A567 hasta TGA),
- ii) desde la 3^a α -hélice situada en el lazo 6 hasta el final (V615 hasta TGA),
- iii) y desde la 4^a α -hélice situada en el lazo 6 hasta el final (A647 hasta TGA).

En la figura 6 se presenta el esquema de estos clonajes y los cebadores utilizados se detallan en la tabla 2.



Figura 6. Construcciones de CD44 con fragmentos de la región C-terminal de *POMT1*. El recuadro azul representa CD44, a continuación se indican las distintas partes de la región C-terminal de *POMT1*. Las transmembranas predichas para *POMT1* están indicadas con los recuadros amarillos y las α -hélices no transmembrana en naranja. Los aminoácidos comprendidos entre las transmembranas 6 y 7 forman el lazo 6. El recuadro morado representa el epítipo HA. Las cabezas de flecha muestran la posición de los cebadores utilizados para realizar estos clonajes.

Con el objeto de delimitar las zonas de la región C-terminal que son responsables de la retención en el RE, se realizaron los clonajes, en el extremo 3' de *CD44*, de varios fragmentos más pequeños de la región C-terminal de *POMT1* que comprenden:

- i) el lazo 6 citoplasmático completo (V615-S663),
- ii) la tercera α -hélice ubicada en el lazo 6 (V615-K637),
- iii) la cuarta α -hélice ubicada en el lazo 6 (A647-S663),
- iv) la TM7 y el extremo C-terminal juntos (R673 hasta TGA),
- v) la TM7 sola (R673-T698),
- vi) y finalmente el extremo C-terminal sin transmembranas (P696 hasta TGA).

En la figura 7 se muestra el esquema de estas construcciones y la secuencia de los cebadores se indica en la tabla 2.

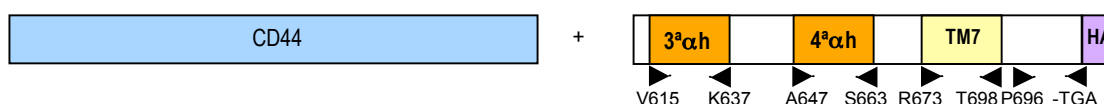


Figura 7. Construcciones de *CD44* con fragmentos del extremo 3' de *POMT1*. El recuadro azul representa la proteína *CD44*, a continuación los fragmentos de la región C-terminal de *POMT1*. Las α -hélices no transmembranas predichas para *POMT1* están indicadas con los recuadros naranja y la transmembrana 7 en amarillo. El recuadro morado representa el epítipo HA. Las cabezas de flecha muestran la posición y dirección de los cebadores de estos clonajes.

1.2.2. Clonaje de CD44 con fragmentos de la región N-terminal de POMT1

Para examinar si alguna otra región de *POMT1* es capaz de retener la proteína en el RE, se realizó el clonaje de *CD44* seguido de fragmentos pequeños de la región N-terminal de *POMT1*. Cada uno de estos fragmentos incluyen, por separado o juntos, dominios transmembranas, lazos u otros dominios de esta región.

Por tanto, de la región N-terminal se analizaron los siguientes fragmentos:

- i) el extremo N-terminal sin ninguna transmembrana ni α -hélice (M1-L19),
- ii) el extremo N-terminal y la TM1 (M1-Y36),
- iii) la TM1 sola (N16-Y36),
- iv) el extremo N-terminal, la TM1 y el lazo 1 (M1-L104)
- v) y finalmente el lazo 1 por separado (A39-L104).

En la figura 8 se observa el esquema de estos clonajes. Los cebadores están indicados en la tabla 2.

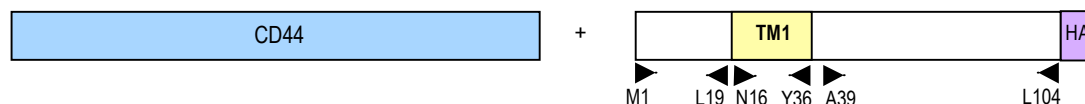


Figura 8. Construcciones de CD44 con fragmentos de la región N-terminal de POMT1. El recuadro azul representa la proteína CD44 y a continuación se indican distintas partes del N-terminal de POMT1. El recuadro amarillo indica la transmembrana 1, precedida del extremo N-terminal. Desde la TM1 hasta el HA se sitúa el lazo 1. El recuadro morado representa el epítipo HA. Las cabezas de flecha muestran la posición y la dirección de los cebadores utilizados.

1.2.3. Clonajes de CD44 con fragmentos de la zona central de POMT1

De la zona central de POMT1 se analizaron:

- i) las TM2, TM3 y TM4 juntas, debido a su proximidad (V101-L171),
- ii) el lazo 4 citoplasmático completo (F182-G227),
- iii) la primera α -hélice del lazo 4 (F182-I203)
- iv) y la segunda α -hélice del lazo 4 (G207-G227).

Estas construcciones se muestran en la figura 9A. Y en la figura 9B se muestran las construcciones que incluyen:

- i) TM5 (A244-V266),
- ii) los tres dominios MIR del lazo 5 (Q293-G494),
- iii) el resto del lazo 5 sin los dominios MIR (N487-V576)
- iv) y la TM6 (A567-L597).

Los cebadores usados para clonar todos estos fragmentos se describen en la tabla 2.

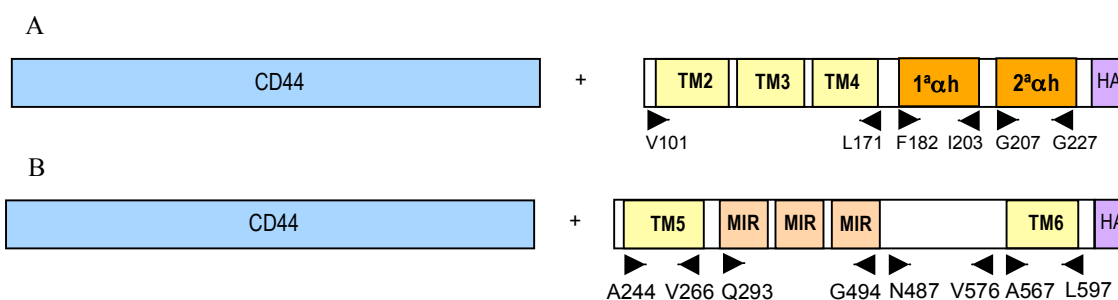


Figura 9. Construcciones de CD44 con fragmentos de la zona central de POMT1. El recuadro azul muestra la proteína CD44. A continuación se indican las distintas partes de POMT1 de la región central. Las transmembranas predichas de POMT1 están representadas en los recuadros amarillos, las α -hélices no transmembrana predichas se muestran en naranja y los recuadros color salmón simbolizan los tres dominios MIR. El epítipo HA se muestra en el recuadro morado. Las cabezas de flecha indican la posición de los cebadores utilizados. **A.** Esquema de los clonajes de TM2, TM3 y TM4 juntas; y α -hélices del lazo 4 juntas y cada una por separado. **B.** Clonajes de la TM5, los fragmentos del lazo 5 y la TM6.

1.3. Clonaje de *CD44* en pauta con fragmentos de *PFK*

La enzima fosfofructoquinasa humana muscular (PFK_m) citoplasmática se utilizó como control de los ensayos de inmunofluorescencia y de deglicosilación realizados para buscar la señal de retención. Se amplificaron, clonaron y analizaron dos fragmentos de PFK_m: una α -hélice (desde el aminoácido T178 hasta el H199) y un fragmento no α -hélice (Y155-T175), ambos de un tamaño similar a los utilizados de POMT1. En la tabla 3 se muestran los cebadores utilizados para este estudio.

1.4. Clonaje de *DNAJB6* y *POMT2*

El cDNA de *DNAJB6* humano se obtuvo mediante RT-PCR (SuperScript, Gibco) a partir de RNA total de células Jurkat (linfocitos T humanos). Se amplificó con los cebadores indicados en la tabla 4 (cebadores 1 y 2) para clonarlo en el plásmido pEF4/Myc-His y en pEGFP-N1 entre las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*.

El cDNA de *POMT2* se amplificó con los cebadores 3 y 4 (ver tabla 4) a partir del clon IMAGE 5169145, que contenía el cDNA completo. Se clonó en el plásmido pcDNA3-Flag en *XhoI*.

2. Cultivos celulares y transfecciones

Las células HEK293T y COS-7 se crecieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 4,5 g/L glucosa, 4 mM glutamina, 100 mg/L piruvato, 10 % suero fetal bovino (GIBCO) y 100 μ g/ml gentamicina.

Las transfecciones se realizaron con lipofectamina (LyoVec, InvivoGen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y con fosfato cálcico (Chen and Okayama, 1988).

2.1. Obtención de extractos de proteína e inmunodetección (“Western blot”)

2.1.1. Extracción de proteínas de células en cultivo

Los extractos de proteína total se obtuvieron mediante la lisis de las células con el tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,5 % SDS; 1 % NP-40; y 0,5 % deoxicolato), conteniendo un “cocktail” de inhibidores de proteasas (Roche) y otras antiproteasas (10 μ g/ml aprotinina, 0,5 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina y 1 mM PMSF). Para realizar los extractos de proteína de membrana se probaron distintos métodos, y el más eficaz resultó ser el fraccionamiento subcelular

(Wang et al., 1996), con el tampón hipotónico descrito (10 mM Tris-HCl pH7,5; 5mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 5mM EDTA; 250 mM sacarosa y 1 mM DTT). La concentración de proteínas obtenidas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.1.2. Transferencia de proteínas a membranas e inmunodetección (“Western blot”)

De 30 a 50 µg de estos extractos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, al 10 % (para DNAJB6-EGPF) y al 7 % (para POMT1-myc y CD44-fragmentos de POMT1-HA). Se transfirieron a una membrana de ImmobilonP (Millipore). Se bloqueó con 5 % de leche desnatada en PBS y 0,5 % Tween 20. Los anticuerpos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente; los primarios: anti-HA de rata 1:1.000 (Roche), anti-c-myc de ratón 1:1.000 (Roche), anti-GFP de conejo 1:1.000 (Molecular Probes); y el anticuerpo secundario de cabra contra ratón o conejo (1:10.000) o contra rata (1:5.000) acoplado a peroxidasa, detectándose con el sistema de ECL (Amershan Biosciences).

2.2. Ensayo de coinmunoprecipitación

La coinmunoprecipitación se realizó con el tampón hipotónico de membrana, pero sin DTT para evitar la ruptura de los puentes disulfuro. Los extractos se incubaron con anti-GFP o con anti-6His toda la noche a 4 °C y en agitación. Se precipitó con proteína G-Sepharosa. El precipitado se lavó tres veces, se resuspendió en tampón Laemmli y se analizó mediante “western-blot”.

2.3. Ensayos de deglicosilación de las cadenas N-glicosílicas

Los extractos de proteína total obtenidos de las células COS-7 transfectadas con las construcciones de *CD44* y los distintos fragmentos de *POMT1*, se digirieron con dos endoglicosilasas de distinta especificidad: N-glicosidasa F, de amplio espectro y que hidroliza cualquier enlace N-glicosílico, y endoglicosidasa H, específica de residuos N-glicosílicos con alto contenido en manosa. Los extractos proteicos se desnaturalizaron con 0,5 % de SDS y 1 % de β-mercaptoetanol, y se hirvieron 5 minutos. La reacción de deglicosilación se realizó con una unidad de N-glicosidasa F (PNGasa F, Roche), en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 y 1 % de Nonidet P-40. La digestión con endoglicosilasa H (Roche) también se realizó con una unidad de enzima y 1 % de Nonidet P-40, pero en

tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,2. Las deglicosilaciones se realizaron a 37 °C durante toda la noche. Las proteínas digeridas se analizaron mediante “western-blot”.

2.4. Inmunofluorescencia e imágenes de microscopía confocal

Las células transfectadas se crecieron sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro. A las 48-72 horas de la transfección, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 3,7 % de formaldehído durante 15 minutos. Se permeabilizaron con 0,2 % Tritón X-100. Se bloqueó con 3 % BSA. Los anticuerpos primarios se incubaron 1 hora a temperatura ambiente: anti-c-myc de ratón 1:100 (Roche), anti-calnexina de conejo 1:200 (Stressgen), anti-HA de ratón 1:100 (ICN), anti-Flag de ratón 1:500 (Stratagene), y anti-POMT2 policlonal de conejo 1:100 (cedido por la Dra. Stralh). Los anticuerpos secundarios se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente: anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón producidos en cabra y acoplados a Alexa Fluor 488 ó 594 (Invitrogen). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal (Leica Microsystems).

3. Rastreo de células ES ^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimera

Las células ES ^{Pomt1^{+/-}} generadas anteriormente para desarrollar el ratón “knock out” de *Pomt1* contienen un alelo interrumpido por el gen de resistencia a neomicina (Willer et al., 2004). En estas células se introdujo mediante electroporación otra construcción que elimina el alelo salvaje restante de *Pomt1* por recombinación homóloga, interrumpiéndolo con el gen de resistencia a puromicina.

3.1. Transferencia de DNA genómico a membranas e hibridación con sondas de DNA: “Southern Blot”

10-15 µg de DNA genómico de los clones de células ES, que habían sido capaces de crecer en medio de selección de puromicina, neomicina y ganciclovir, se digirieron con 40 U de la enzima de restricción *StuI* (Invitrogen), para comprobar mediante “Southern blot” que la recombinación homóloga había tenido lugar en el brazo largo de recombinación en 3’. Tras la electroforesis de estos DNAs en geles de agarosa del 0,6 %, se realizó la transferencia alcalina a una membrana de nitrocelulosa. Ésta se hibridó con una sonda de 383 pb del intrón 9 de *Pomt1* amplificada mediante PCR con la DNA polimerasa BioTaq (Bioline) y utilizando los cebadores de la tabla 5. La sonda de DNA genómico fue marcada con 50 µCi [α -³²P] dCTP, utilizando el kit *Rediprime*

TM II Random Prime Labeling Systems (Amersham Biosciences) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2. Amplificación del brazo corto de recombinación

Para comprobar que la recombinación homóloga ha sucedido en la región del brazo corto en el extremo 5' y que, por tanto, los dos alelos están interrumpidos por los genes de resistencia a neomicina y puromicina, respectivamente, se analizaron los clones resistentes a neomicina, puromicina y ganciclovir. El DNA genómico de las células ES se amplificó con la DNA polimerasa BioTaq (Bioline) con un cebador del gen de resistencia a puromicina o neomicina y otro de *Pomt1* (Puro 2a, 125 Neo b y m3'Db). La secuencia de los cebadores utilizados está indicada en la tabla 6.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Localización de POMT1 en el retículo endoplásmico

Para comprobar la localización de POMT1 en el RE de eucariotas superiores, de acuerdo con la localización en este compartimento de las PMTs de levadura, se transfectaron células HEK293T con POMT1. Los ensayos de inmunofluorescencia determinaron su localización en el RE (Fig. 10A), como se demuestra por su colocalización con la calnexina, marcador de este orgánulo. Sin embargo, puesto que el citoplasma de estas células es muy escaso, y el RE puede confundirse a veces con él, consideramos utilizar otras células en las que se pudiese distinguir claramente el RE del resto del citoplasma. Para ello, utilizamos células COS-7 (Fig. 10B), en las que se apreció más claramente la estructura de red del RE debido a su mayor tamaño, y no se confunde con el citoplasma como ocurre en las células HEK293T.

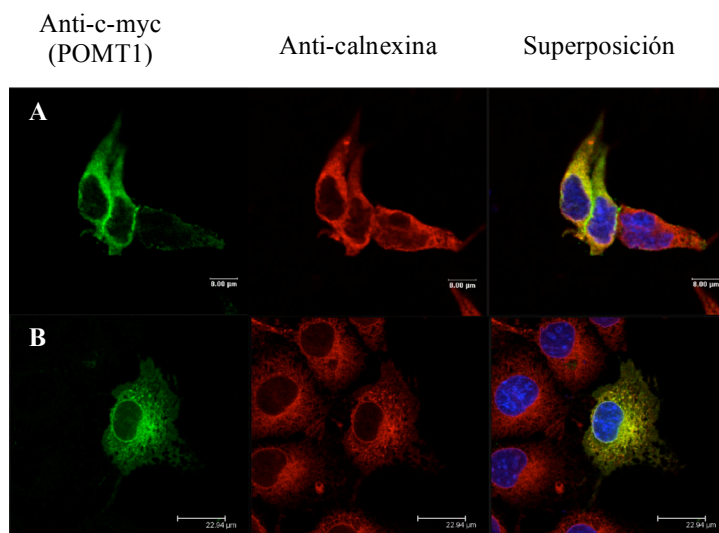


Figura 10. Localización subcelular de POMT1 en células HEK293T y COS-7. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-c-myc (POMT1) en verde, anti-calnexina (marcador de RE) en rojo y superposición de ambas con la tinción DAPI de núcleo. **A.** Células HEK293T transfectadas con pEF4-POMT1-myc-His. **B.** Células COS-7 transfectadas con pEF4-POMT1-myc-His.

2. Búsqueda de la señal de retención en el retículo endoplásmico de POMT1

2.1. Localización subcelular de las deleciones del extremo C-terminal de POMT1

Se transfectaron células COS-7 con las construcciones de las distintas deleciones de la región C-terminal de POMT1, cuyo esquema se mostró en la figura 5. La primera de las deleciones, desde W714 hasta el final (delec W714-fin), incluye aminoácidos cargados y conservados en vertebrados (DILIRKX) así como otra secuencia altamente

conservada en todas las PMTs/POMTs desde bacterias a humanos, tanto en POMT1 como en POMT2 (WXXXW). Estas secuencias se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Comparación de las secuencias del C-terminal de PMTs y POMTs de distintas especies.

POMT1	<i>H. sapiens</i> (hombre)	WKDSWDILIRKH
POMT1	<i>P. troglodytes</i> (chimpancé)	WKDSWDILIRKH
POMT1	<i>B. taurus</i> (vaca)	WKDSWDILIRKY
POMT1	<i>C. familiaris</i> (perro)	WKDSWDILIRKH
POMT1	<i>M. musculus</i> (ratón)	WKDSWDILIRK
POMT1	<i>R. norvegicus</i> (rata)	WKDSWDILIRKY
POMT1	<i>M. domestica</i> (zarigüeya)	WKSSWDILIRKH
POMT1	<i>G. gallus</i> (gallo)	WKDSWNILIRKQ
POMT1	<i>A. carolinensis</i> (camaleón)	WKDSWDLIRRQRP
POMT1	<i>S. tropicalis</i> (rana)	WKDNWDILIRKQ
POMT1	<i>D. rerio</i> (pez cebra)	WRESWDILLRKR
POMT1	<i>T. rubripes</i> (pez globo)	WKESWDILLRRH
POMT1	<i>B. floridae</i> (anfioxus)	WLDSWDLIIQVL
POMT1	<i>L. gigantea</i> (lapa)	WKENWDFLMQVRHK
POMT1	<i>S. purpuratus</i> (erizo mar)	WMESWGFLVQGMIA
POMT1	<i>N. vectensis</i> (anémona)	WLRTWDMLSHPN
POMT1	<i>D. melanogaster</i> (insecto)	WKDTWDFVLHKNHHL
POMT2	<i>H. sapiens</i> (hombre)	WLDSWDF
POMT2	<i>P. troglodytes</i> (chimpancé)	WLDSWDF
POMT2	<i>B. taurus</i> (vaca)	WLESWDF
POMT2	<i>C. familiaris</i> (perro)	WLESWDF
POMT2	<i>M. musculus</i> (ratón)	WLESWDF
POMT2	<i>R. norvegicus</i> (rata)	WLESWDF
POMT2	<i>M. domestica</i> (zarigüeya)	WLETWDF
POMT2	<i>G. gallus</i> (pollo)	WMDSWDF
POMT2	<i>A. carolinensis</i> (camaleón)	WLETWDF
POMT2	<i>S. tropicalis</i> (rana)	WMESWDF
POMT2	<i>D. rerio</i> (pez cebra)	WMESWDF
POMT2	<i>T. rubripes</i> (pez globo)	WMDSWDF
POMT2	<i>B. floridae</i> (anfioxus)	WMESWEI
POMT2	<i>S. purpuratus</i> (erizo mar)	WLSTWDF
POMT2	<i>N. vectensis</i> (anémona)	WMDSWDF
POMT2	<i>D. melanogaster</i> (insecto)	WLSTWDF
PMT1	<i>V. polyspora</i> (hongo)	WMDTWDF(X) ₂₇ TSAANVSS
PMT2	<i>V. polyspora</i> (hongo)	WLPTWDFQI
PMT4	<i>V. polyspora</i> (hongo)	WLNMEHFHAK
PMT	<i>C. thermocellum</i> (Firmicutes)	WFNTWYF
PMT	<i>M. leprae</i> (Actinobacteria)	WLPSWR
PMT	<i>T. erythraeum</i> (Cianobacteria)	WFRSW
PMT	<i>N. aromaticivorans</i> (alfa-proteobacteria)	WLDSWK
PMT	<i>Geobacter Sp</i> (delta-proteobacteria)	WLKSWIF

En verde los aminoácidos cargados conservados en mamíferos (DILIRKX) y en rojo la secuencia conservada en prácticamente todas las PMTs (WXXXW).

Sin embargo, no se obtuvo ningún cambio en la localización en el RE con esta deleción, como se observa en la figura 11A, ni en las siguientes en las que se eliminaba:

- i) todo el extremo C-terminal (L697-fin) (Fig. 11B)
- ii) desde el dominio transmembrana 7 (TM7) hasta el final (delec F676-fin) (Fig. 11C)
- iii) por detrás de la TM6 hasta el final (delec R598-fin) (Fig. 11D)
- iv) desde la TM6 hasta el final (delec G573-fin) (Fig. 11E)

En todas ellas, POMT1 siguió localizándose en el RE (Fig. 11) ya que colocalizaba con la calnexina (Fig. 11, superposición). Estos resultados parecen indicar que no existe una única secuencia específica de retención en el RE en la región C-terminal.

Para poder analizar la implicación del extremo C-terminal en la retención en el RE, independientemente de la presencia de otras posibles secuencias de POMT1 que también puedan ser importantes en la retención en RE, se realizó otro tipo de abordaje.

2.2. Búsqueda de la señal de retención en el retículo endoplásmico de POMT1, analizando proteínas de fusión de CD44 con fragmentos de POMT1

En el siguiente abordaje se transfectaron células COS-7 con proteínas de fusión entre CD44, que es una proteína de membrana plasmática (Ponta et al., 2003), y distintos fragmentos de POMT1, señalizadas con el epítipo HA, con el fin de analizar si dichos fragmentos estaban implicados en la retención en el RE. Si así fuera, CD44 se localizaría en el RE en lugar de en la membrana plasmática. Además, CD44 presenta *N*-glicosilación y *O*-glicosilación. La *N*-glicosilación comienza en el RE donde se une un oligosacárido con alto contenido en manosa [$\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$]; tras eliminar los 3 residuos de glucosa y uno de manosa, las proteínas son transportadas al aparato de Golgi (AG), donde este oligosacárido será modificado, perdiendo parte de las manosas y añadiendo otros azúcares, dependiendo de qué proteína se trate y de su destino. Por tanto, también podemos distinguir la localización subcelular de CD44 por su *N*-glicosilación: si se encuentra en el RE tendrá un mayor contenido en manosas y por tanto será sensible a la endoglicosidasa H; mientras que si está en la membrana plasmática, el oligosacárido habrá sido modificado a su paso por el AG y, por tanto, no será sustrato de dicha enzima. Como control de la eliminación total de la *N*-glicosilación se utilizó la PNGasa F (*N*-glicosidasa de amplio espectro).

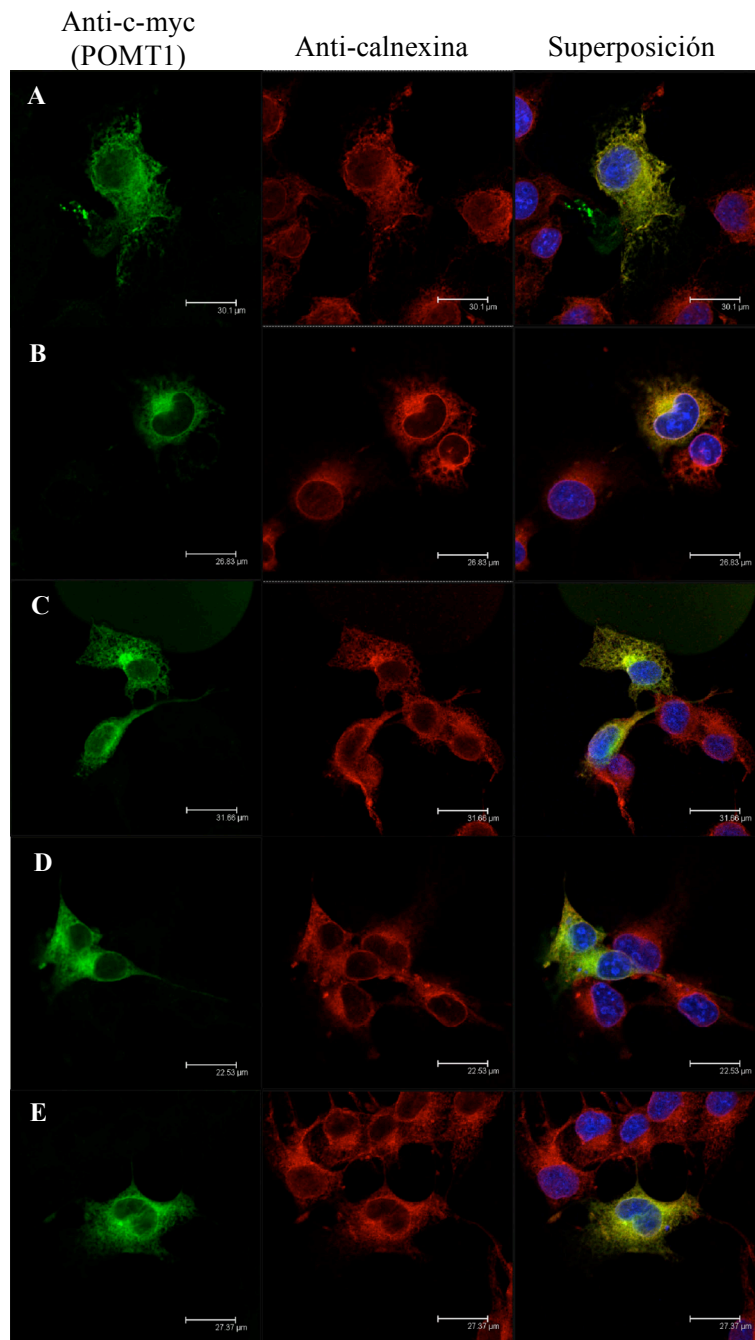


Figura 11. Localización subcelular de varios fragmentos de POMT1 truncados en el extremo C-terminal en células COS-7. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-c-myc (POMT1) en verde, anti-calnexina (marcador de RE) en rojo y superposición de ambas junto con la tinción de núcleos con DAPI. Células COS-7 transfectadas con: **A.** pEF4-POMT1(delec W714-fin)-myc-His (deleción aa conservados del extremo C-terminal-fin); **B.** pEF4-POMT1(delec L697-fin)-myc-His (deleción TM7-fin); **C.** pEF4-POMT1(delec F676-fin)-myc-His (deleción lazo 6-fin); **D.** pEF4-POMT1(delec R598-fin)-myc-His (deleción por detrás de TM6-fin) **E.** pEF4-POMT1(delec G573-fin)-myc-His (deleción de TM6-fin).

2.2.1. Análisis de la implicación de la región C-terminal de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico

En las transfecciones con las construcciones que codifican las proteínas de fusión de CD44 con distintos fragmentos de la región C-terminal de POMT1, que incluyen las TM6 y 7 y las α -hélices citoplasmáticas del lazo 6 (Fig. 6), se observó que estas proteínas de fusión ya no aparecían en la membrana plasmática, sino que quedaron ancladas en el RE (Fig. 12B-D).

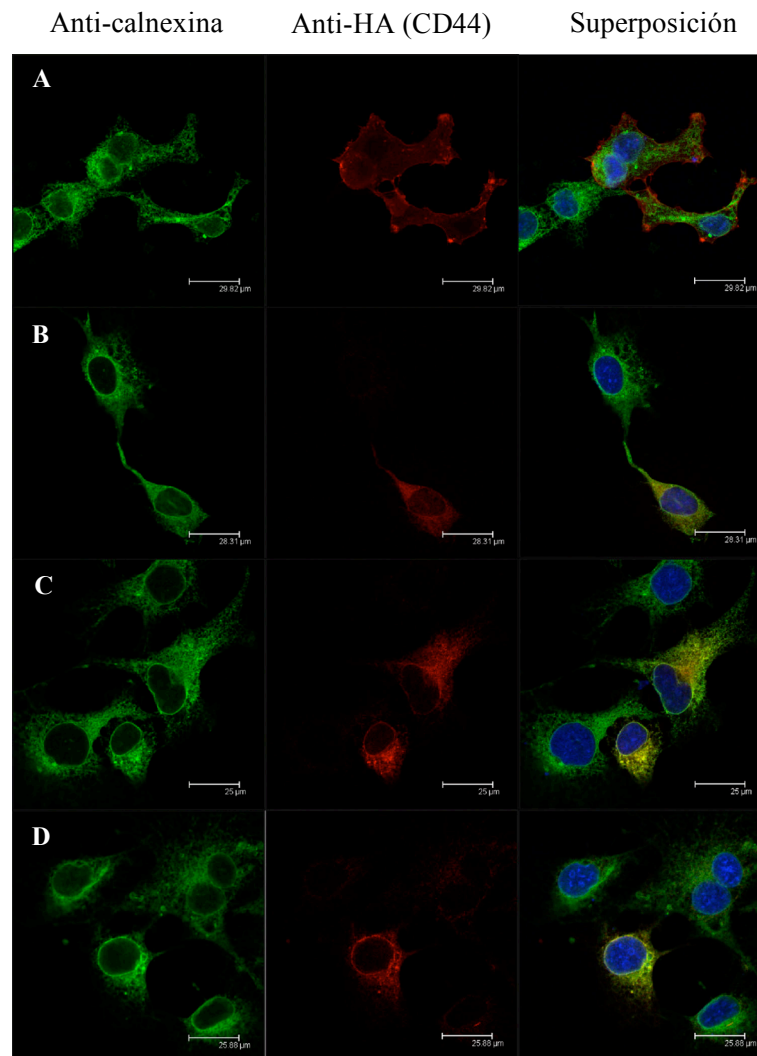


Figura 12. Localización subcelular de CD44 fusionada a varios fragmentos de la región C-terminal de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-calnexina (marcador RE) en verde, anti-HA (CD44) en rojo y superposición de ambas junto con la tinción DAPI de núcleos; células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44-HA; **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A567-fin)-HA (TM6 - final); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (V615-fin)-HA (3ª α -hélice en el lazo 6 - final); **D.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A647-fin)-HA (4ª α -hélice en el lazo 6 - final).

Los extractos de proteína total de las células transfectadas fueron digeridas con las endoglicosidasas mencionadas. En la figura 13, se observa que todas estas proteínas de fusión eran deglicosiladas por la endoglicosidasa H y también por la PNGasa F, a diferencia de CD44 que sólo era sensible a PNGasa F y no a endoglicosidasa H (Fig. 15, carriles 1, 2 y 3), ya que se encuentra en la membrana plasmática. Por tanto, la deglicosilación confirmó que estas proteínas de fusión se encuentran en el RE.

Es de resaltar, que todos estos fragmentos del extremo C-terminal de POMT1 tenían en común una o varias α -hélices transmembrana o solubles.

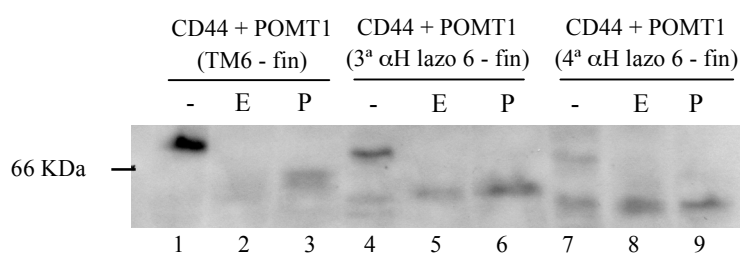


Figura 13. Análisis de la deglicosilación mediante “western blot” con anti-HA de CD44 fusionada a varios fragmentos de la región C-terminal de POMT1. Digestión con PNGasaF (P) o endoglicosidasa H (E) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: pcDNA3-CD44 + POMT1 (A567-fin)-HA (TM6 hasta el final) en los carriles 1, 2 y 3; pcDNA3-CD44 + POMT1 (V615-fin)-HA (3^a α -hélice del lazo 6 hasta el fin) en los carriles 4, 5 y 6; y pcDNA3-CD44 + POMT1 (A647-fin)-HA (4^a α -hélice del lazo 6 hasta el fin) en los carriles 7, 8 y 9. A la izquierda, el marcador de peso molecular.

2.2.2. Búsqueda de la señal de retención en el retículo endoplásmico: control con CD44 y fragmentos de PFK

Para comprobar que cualquier secuencia unida a CD44 no modificaba su localización de membrana plasmática al RE debido a los controles de calidad del RE, sino por secuencias específicas de retención, se utilizaron como control del experimento dos fragmentos de una enzima citoplasmática humana, la fosfofrutoquinasa muscular (PFK_m). Por un lado, una α -hélice (T178-H199), ya que, como se indicó anteriormente, parecía que cualquier α -hélice (transmembrana o soluble) producía la retención de CD44 en el RE; y por otro lado, un fragmento no α -hélice (Y155-T175) como control. Ambos fragmentos eran de un tamaño similar a los utilizados de POMT1.

Los ensayos de inmunofluorescencia de las proteínas de fusión de CD44 con los dos fragmentos de PFK, mostraron que ambas se encontraban en la membrana plasmática (Figura 14A y B). Este dato se corroboró con la deglicosilación con endoglicosidasa H y PNGasa F: sólo se digirieron con PNGasa F y no con endoglicosidasa H (Fig. 15, carril

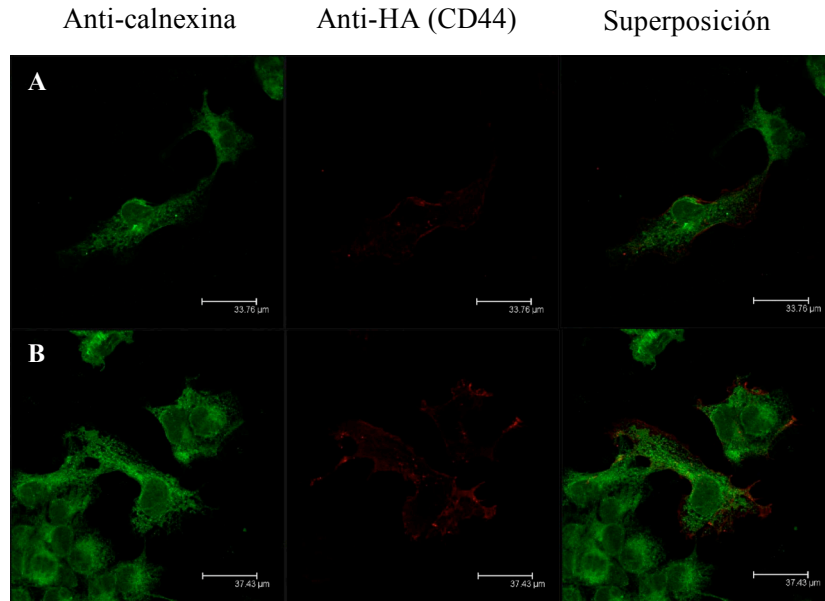


Figura 14. Localización subcelular de CD44 fusionada a fragmentos de PFKm. Imágenes de inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + PFK (Y155-T175)-HA (α -hélice); **B.** pcDNA3-CD44 + PFK (T177-H199)-HA (no α -hélice); en verde anti-calnexina (marcador RE), en rojo anti-HA (CD44) y superposición de ambas .

4-9). Por tanto, la retención de CD44 en el RE no se produce de forma inespecífica al añadirle cualquier secuencia de aminoácidos, sea o no α -hélice.

La única fracción de CD44 que se digirió con endoglicosidasa H, es una banda de menor peso molecular y de mucha menos intensidad (Fig. 15,*). Esta banda debe corresponder a una forma intermedia del proceso de glicosilación de CD44, que todavía está en el RE, ya que sí que se digirió con endoglicosidasa H (Fig. 15, carril 2); y que aún no ha completado la *N*- ni la *O*-glicosilación, de ahí la diferencia de peso molecular con la banda mayoritaria antes de ser digerida (Fig. 15, carril 1). Después de eliminar la *N*-glicosilación con la PNGasa F (Fig. 15, carril 3), esta banda seguía teniendo menor peso molecular que la banda más intensa. Esta diferencia de peso molecular sólo puede deberse a la *O*-glicosilación que debe sufrir CD44 a su paso por el AG, y de la cual carece esta fracción de CD44 al estar en el RE. En las proteínas de fusión con PFK, esta banda no apareció como una sola, sino como varias bandas de distinto peso molecular (Fig. 15, carriles 4 y 7, llaves rojas), que fueron digeridas por la endoglicosidasa H, confirmando que deben ser formas de CD44 con glicosilación incompleta. Incluso, en las proteínas de fusión apareció la forma del RE sin *N*-glicosilación (Fig. 15, carriles 4 y 7, banda que queda por debajo de la llave roja), del

mismo peso molecular que adquieren las restantes al ser deglicosiladas, aumentando la intensidad de esta banda.

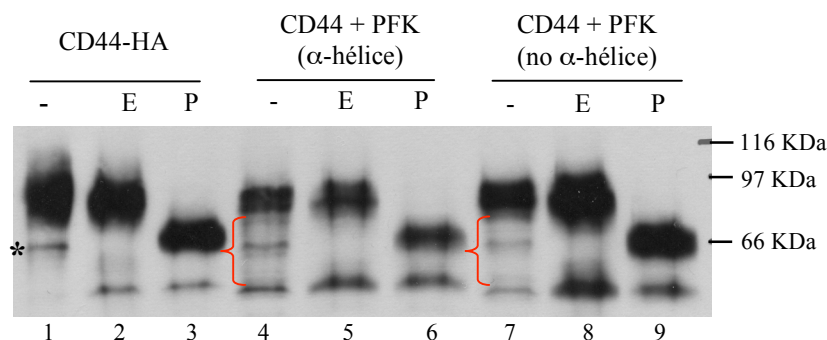


Figura 15. Análisis mediante “western blot” con anti-HA de la deglicosilación de CD44 fusionada a fragmentos de PFKm. Digestión con endoglicosidasa H (E) o PNGasaF (P) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: carriles 1, 2 y 3: pcDNA3-CD44 + HA; carriles 4, 5 y 6: pcDNA3-CD44 + PFK (Y155-T175)-HA (α -hélice); carriles 7, 8 y 9: pcDNA3-CD44 + PFK (T177-H199)-HA (no α -hélice). El asterisco (*) señala la forma de CD44 con glicosilación incompleta. Las llaves rojas muestran las formas de la proteína de fusión de CD44 con fragmentos de PKF con glicosilación incompleta. A la derecha, los marcadores de peso molecular.

2.2.3. Análisis de la implicación de fragmentos más pequeños de la región C-terminal de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico

Para analizar más concretamente qué fragmentos de la región C-terminal de POMT1 son las responsables de la retención en el RE, se generaron proteínas de fusión de CD44 con fragmentos más pequeños de esta región:

- i) la TM6 (A567-L597) (Fig. 9B),
- ii) la TM7 (R673-T698) (Fig. 7),
- iii) TM7-final (R673-fin) (Fig. 7)
- iv) y el extremo C-terminal (P696-final) (Fig. 7).

Como se muestra en la figura 16A, la proteína de fusión con la TM6 se encontró ubicada en el RE colocalizando con la calnexina. Cuando el extracto de proteínas se trató con ambas endoglicosidasas se corroboró la localización en el RE, ya que se digirió tanto con la PNGasa F como con la endoglicosidasa H (Fig. 18A, carriles 1-3).

A diferencia de lo que sucedió con la mayoría de las TMs, la TM7 no causó la retención total en el RE de CD44. Al realizar la deglicosilación, aproximadamente la mitad de la proteína de fusión no se digirió con la endoglicosidasa H y sí con la PNGasa F (Fig. 18A, carriles 4-6), mostrando que parte de la proteína de fusión no se encuentra en el RE. Además, esta fracción de proteína de fusión que no se digirió, presenta mayor

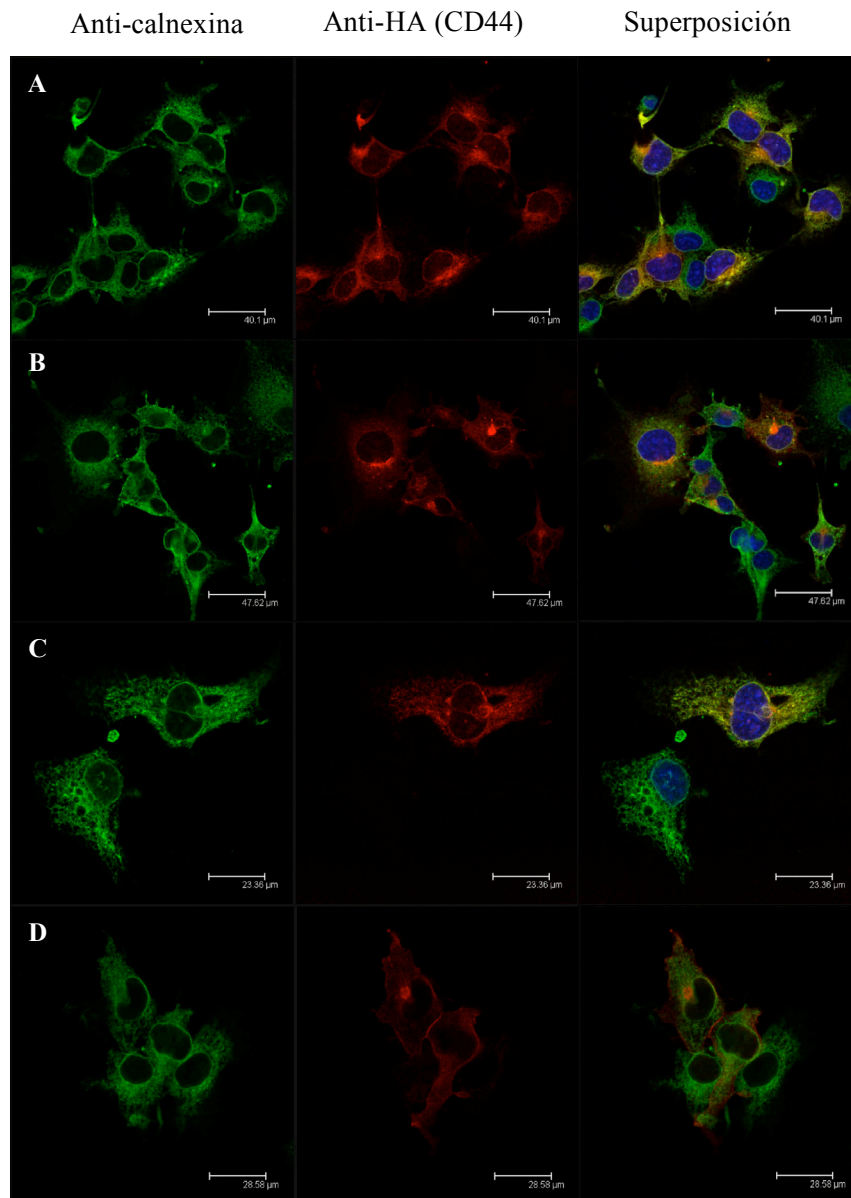


Figura 16. Localización subcelular de CD44 fusionada a fragmentos de la región C-terminal de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A567-L597)-HA (TM6); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (R673-T698)-HA (TM7); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (R673-fin)-HA (TM7-final); **D.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (P696-fin)-HA (C-terminal). En verde, anti-calnexina (marcador RE), en rojo anti-HA (CD44), superposición de ambas con tinción DAPI de los núcleos.

peso molecular por la glicosilación que se produce en el AG. Mientras que la otra mitad, que tiene menor peso molecular por la ausencia de esta glicosilación, es digerida por ambas enzimas (Fig. 18A carriles 4-6), y por tanto debe estar en el RE. Por otra parte, en los ensayos de inmunofluorescencia se observó su colocalización con la calnexina en el RE, pero con un mayor acúmulo de esta proteína de fusión en determinadas zonas de este orgánulo (Fig. 16B). Esta zona que era más pequeña que el RE y que solapaba

parcialmente con él, pensamos que podría ser del AG. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con una proteína marcadora de AG, la manosidasa II. Como se observa en la figura 17, la proteína de fusión de CD44 con la TM7 se encontró en el AG, colocalizando con la manosidasa II.

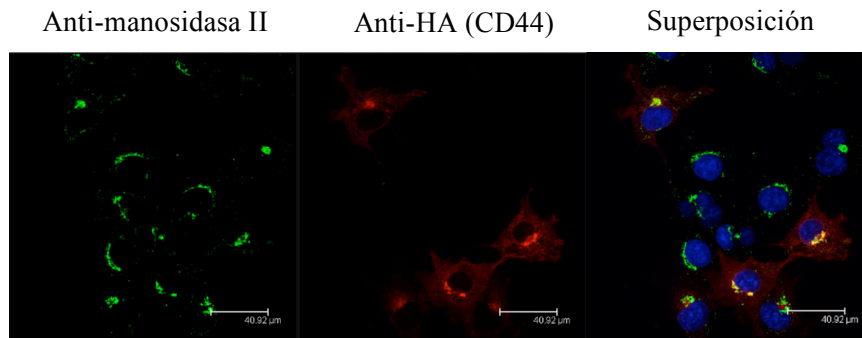


Figura 17. Localización subcelular de CD44 fusionada a la TM7 de POMT1. Células COS-7 transfectadas con pcDNA3-CD44 + POMT1 (R673-T698)-HA. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-manosidasa II (marcador AG) en verde, anti-HA (CD44) en rojo y superposición de ambas con la tinción DAPI de los núcleos.

Sin embargo, al fusionar a CD44 el fragmento que contiene la TM7 y el C-terminal de POMT1 se produce una retención casi total en el RE de la misma, como se observa en el ensayo de inmunofluorescencia mostrado en la figura 16C. Tan sólo en el estudio de deglicosilación se puso de manifiesto que una pequeña fracción de esta proteína de fusión no fue deglicosilada con endoglicosidasa H, y por tanto no estaba en el RE (Fig. 18A, carriles 7-9). Además, esta pequeña fracción tenía mayor peso molecular a causa de la *N*- y *O*-glicosilación que son llevadas a cabo en el AG.

El análisis de inmunofluorescencia de la proteína de fusión entre CD44 y el extremo C-terminal de POMT1, mostró que éste no parece estar implicado en la retención en el RE, ya que la proteína de fusión correspondiente se localizó en la membrana plasmática, como se observa en la figura 16D. El tratamiento con endoglicosidasas confirmó esta localización, ya que al igual que CD44, la proteína de fusión con el extremo C-terminal de POMT1 sólo fue deglicosilada por PNGasa F (Fig. 18B, carriles 1-3). De la misma manera que sucedió con CD44 sola (Fig. 18B, carriles 4-6), tan sólo una pequeña fracción de la proteína de fusión entre CD44 y el extremo C-terminal de POMT1 fue deglicosilada con endoglicosidasa H, que debe corresponder a la proteína de fusión que todavía no se ha terminado de procesar, encontrándose en el RE. Por esta razón no se han añadido todos los residuos de *N*-glicosilación y *O*-glicosilación del AG, lo que explica su menor peso molecular respecto de la banda más intensa.

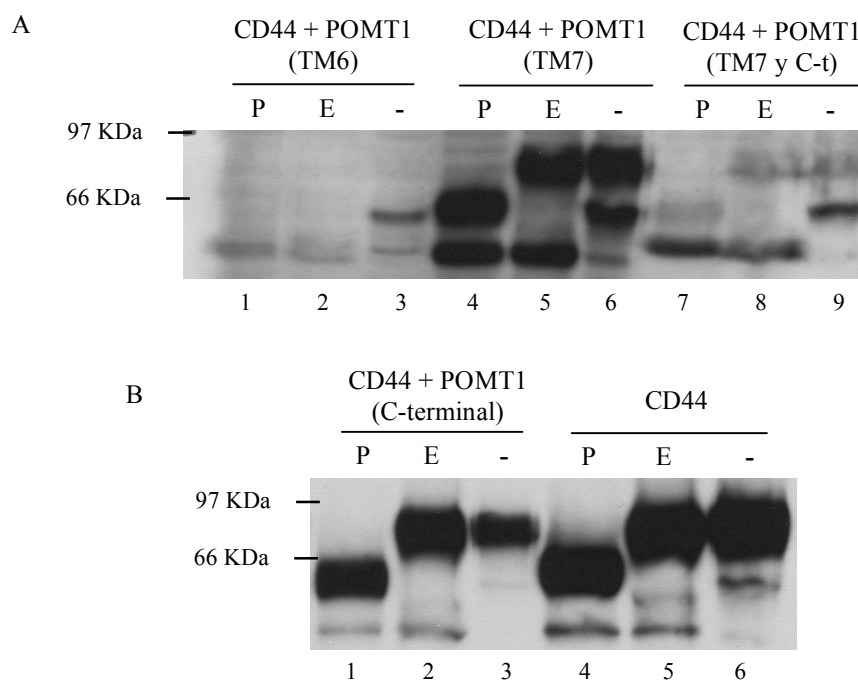


Figura 18. Análisis mediante “western blot” con anti-HA de la deglicosilación de CD44 fusionada a fragmentos de la región C-terminal de POMT1. Digestión con endoglicosidasa H (E) o PNGasaF (P) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: **A:** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A567-L597)-HA (TM6) en los carriles 1, 2 y 3; pcDNA3-CD44 + POMT1 (R673-T698)-HA (TM7) en los carriles 4, 5 y 6; y pcDNA3 -CD44 + POMT1 (R673-fin)-HA (TM7 + C-terminal) en los carriles 7, 8 y 9. **B:** pcDNA3-CD44 + POMT1 (P696-fin)-HA (C-terminal) en los carriles 1, 2 y 3; y pcDNA3-CD44-HA en los carriles 4, 5 y 6. A la izquierda los marcadores de peso molecular.

2.2.4. Análisis de la implicación de las α -hélices del lazo 6 de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico

Para estudiar su posible implicación en la retención en el RE de POMT1, se clonaron las dos α -hélices del lazo 6, tanto juntas (V615-S663), como por separado (3^a α -hélice: V615-K637, y 4^a α -hélice: A647-S663) (Fig. 7).

El análisis mediante inmunofluorescencia de las dos α -hélices del lazo 6, mostró que ambas, tanto juntas y como por separado, eran capaces de retener a CD44 en el RE, como mostró la colocalización con el marcador de RE, la calnexina (Fig. 19A-C).

La deglicosilación de estas tres proteínas de fusión: CD44 unida a las dos α -hélices del lazo 6 juntas, o por separado, confirmó esta localización subcelular al ser digeridas igualmente tanto por la endoglicosidasa H como por la PNGasa F (Fig. 20).

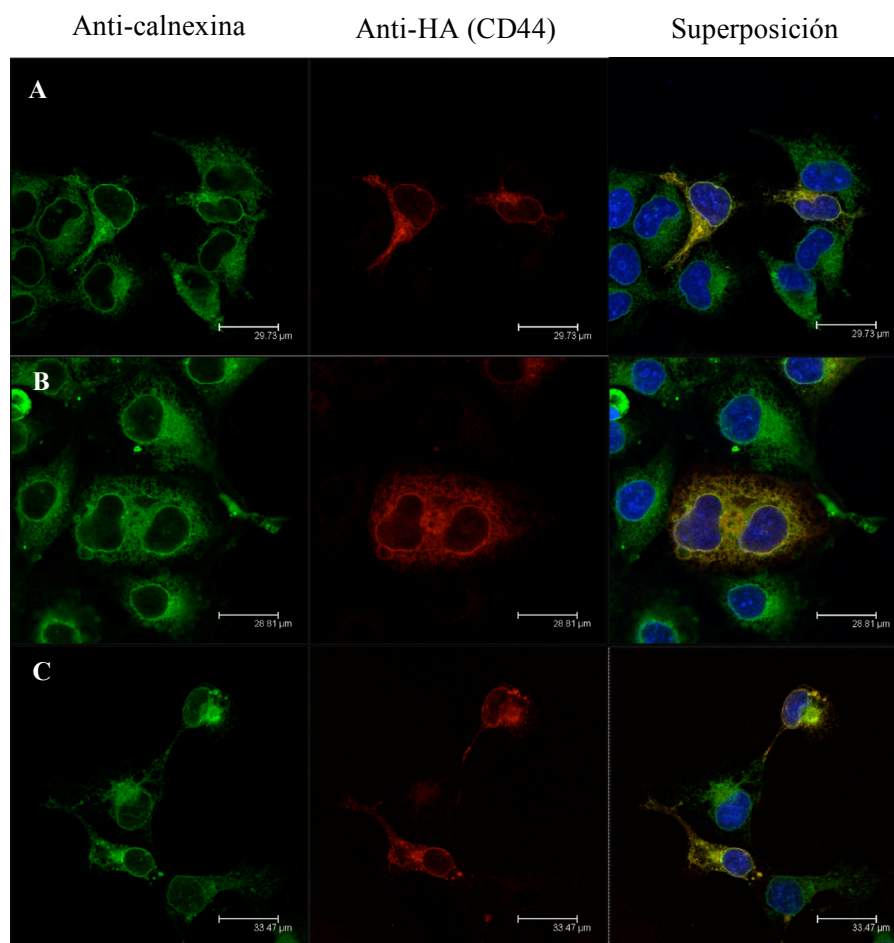


Figura 19. Localización subcelular de CD44 fusionada a las α -hélices del lazo 6 de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-calnexina (marcador RE) en verde, anti-HA (CD44) en rojo y superposición de ambas con tinción DAPI del núcleo. Células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (V615-S663)-HA (lazo 6); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (V615-K637)-HA (3^{a} α -hélice); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A647-S663)-HA (4^{a} α -hélice).

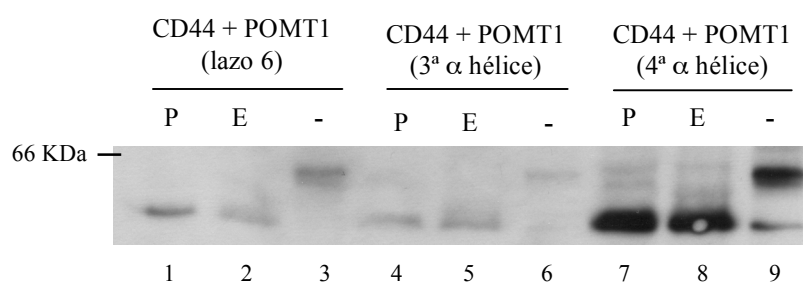


Figura 20. Análisis mediante “western blot” con anti-HA de la deglicosilación de CD44 fusionada a las α -hélices del lazo 6 de POMT1. Digestión con PNGasaF (P) o endoglicosidasa H (E) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: pcDNA3-CD44 + POMT1 (V615-S663)-HA (lazo 6) en los carriles 1, 2 y 3; pcDNA3-CD44 + POMT1 (V615-K637)-HA (3^{a} α -hélice lazo 6) en los carriles 4, 5 y 6; y pcDNA3-CD44 + POMT1 (A647-S663)-HA (4^{a} α -hélice lazo) en los carriles 7, 8 y 9. A la izquierda está indicado el marcador de peso molecular.

2.2.5. Análisis de la implicación de la región central de POMT1 en retención en RE

También se analizó la importancia de la región central de POMT1 en la retención en el RE, utilizando las construcciones indicadas en la figura 9B, en las que se incluyen:

- i) la TM5 (A244-V266),
- ii) los dominios MIR del lazo 5 (Q293-G494)
- iii) y el lazo 5 sin los dominios MIR (N487-V576).

En los ensayos de inmunofluorescencia se observó que estos fragmentos de POMT1 causaban la retención de CD44 en RE (Fig. 21A-C). En la figura 21A y B se aprecia una mayor concentración de ambas proteínas de fusión con CD44 en una zona determinada del RE que podría coincidir con el AG. Sin embargo, la inmunofluorescencia con un marcador de AG, la manosidasa II, no mostró una clara colocalización.

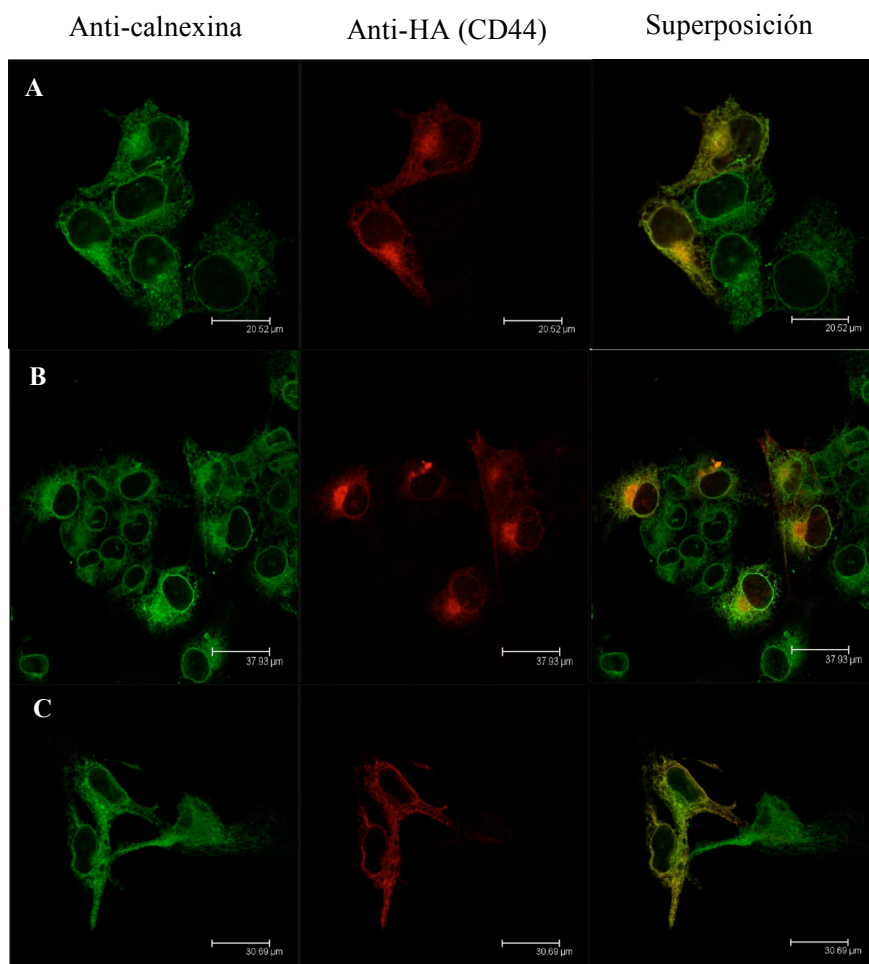


Figura 21. Localización subcelular de CD44 fusionada a regiones centrales de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (Q293-G494)-HA (dominios MIR del lazo 5); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (N487-V576)-HA (lazo 5 sin dominios MIR); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A244-V266)-HA (TM5). En verde anti-calnexina (marcador RE), en rojo anti-HA (CD44) y superposición de ambas.

Sin embargo, el tratamiento con las endoglicosidasas, analizado mediante “western blot”, reveló que había una pequeña fracción de CD44 fusionada al lazo 5, con y sin los dominios MIR, de mayor peso molecular y que sólo se digería con PNGasa F; a diferencia de la fracción mayoritaria que se digería con ambas enzimas y que, por tanto, debe estar en el RE. Del mismo modo que sucedía con CD44, al digerir con PNGasa F esta banda minoritaria sigue teniendo un peso molecular superior a la banda más intensa (Fig. 22, carriles 4 y 9, cabezas de flecha verdes), probablemente a causa de la diferencia en la *O*-glicosilación que se lleva a cabo en el AG. Lo que indica que esta fracción debía estar fuera del RE, probablemente en el AG, aunque en los estudios de inmunofluorescencia no hemos podido probarlo con claridad.

La deglicosilación de la proteína de fusión con la TM5, fue igualmente deglicosilada con endoglicosidasa H y PNGasa F (Fig. 22, carriles 1-3), confirmando la localización en RE.

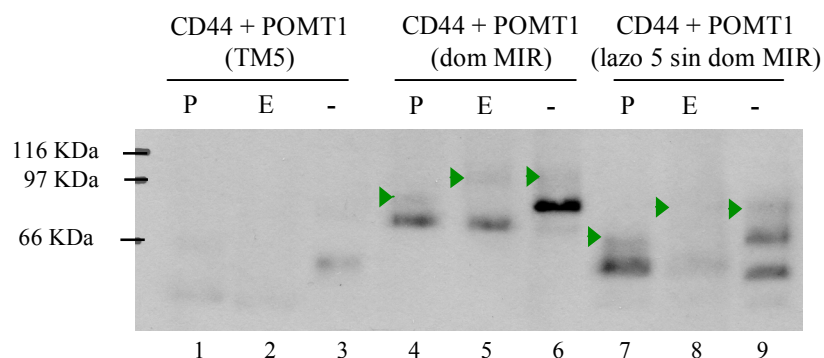


Figura 22. Análisis mediante “western blot” con anti-HA de la deglicosilación de CD44 fusionada a regiones centrales de POMT1. Digestión con PNGasaF (P) o endoglicosidasa H (E) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: pcDNA3-CD44 + POMT1 (A244-V266)-HA (TM5) en los carriles 1, 2 y 3; pcDNA3-CD44 + POMT1 (Q293-G494)-HA (dominios MIR del lazo 5) en los carriles 4, 5 y 6; y pcDNA3-CD44 +POMT1 (N487-V576)-HA (lazo 5 sin dominios MIR) en los carriles 7, 8 y 9. Cabezas de flechas verdes señalan la fracción de proteína que no se digirió con endoglicosidasa H. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular.

2.2.6. Análisis de la implicación de las α -hélices del lazo 4 de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico

Para determinar si el lazo 4 citoplasmático también estaba implicado en la retención en el RE se analizaron las dos α -hélices del lazo 4 tanto juntas (F182-G227), como cada una por separado: la primera α -hélice (F182-I203) y la segunda α -hélice (G207-G227) (Fig. 9A). Los estudios de inmunofluorescencia mostraron que CD44 fusionada a cualquiera de los tres fragmentos anteriores se encontraba en el RE (Fig. 23A-C). Por tanto, estos fragmentos también estarían implicados en la retención en RE.

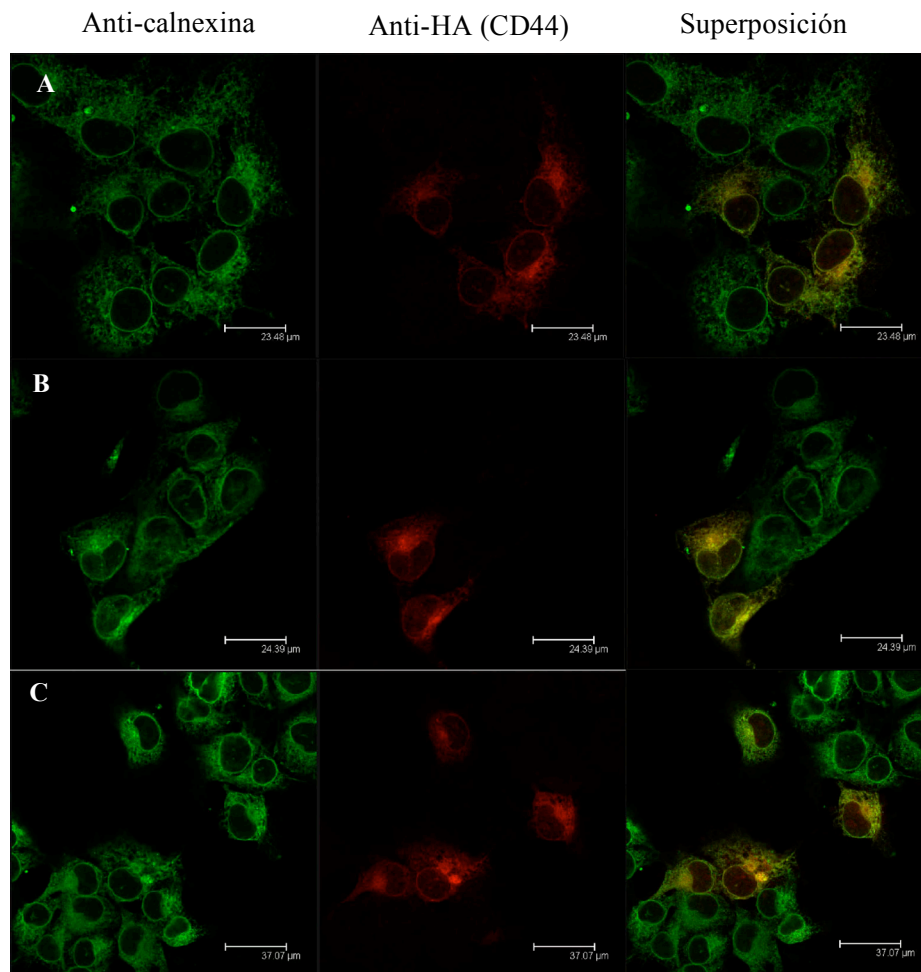


Figura 23. Localización subcelular de CD44 fusionada a las α -hélices del lazo 4 de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (F182-G227)-HA (lazo 4); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (F182-I203)-HA (1^a α -hélice lazo 4); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (G207-G227)-HA (2^a α -hélice lazo 4). En verde, anti-calnexina (marcador RE), en rojo anti-HA (CD44) y superposición de ambas.

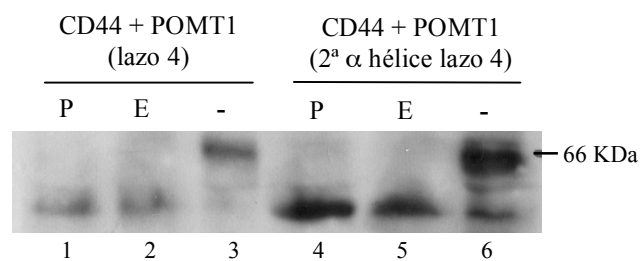


Figura 24. Análisis mediante “western blot” con anti-HA de la deglicosilación de CD44 fusionada a las α -hélices del lazo 4 de POMT1. Digestión con endoglicosidasa H (E) o PNGasaF (P) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: pcDNA3-CD44 + POMT1 (F182-G227)-HA (lazo 4) en los carriles 1, 2 y 3; y pcDNA3-CD44 + POMT1 (G207-G227)-HA (2^a α -hélice lazo 4) en los carriles 4, 5 y 6. A la derecha el marcador de peso molecular.

El tratamiento con las endoglicosidasas sólo se pudo realizar con dos de las tres proteínas de fusión: la que contenía ambas α -hélices (F182-G227) y la que contenía la

2ª α -hélice (G207- G227), pero no con la que contenía 1ª α -hélice (F182-I203), ya que de esta proteína de fusión no se obtuvo suficiente cantidad para ser observada en la detección mediante “western blot”. En ambas deglicosilaciones se comprobó que las dos proteínas fueron digeridas tanto con endoglicosidasa H como con PNGasa F, señalando la localización en el RE de estas proteínas (Fig. 24) y confirmando los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia.

2.2.7. Análisis de la implicación de la región N-terminal de POMT1 en la retención en el retículo endoplásmico

Para examinar si en la región N-terminal de POMT1 también existe alguna señal de retención en el RE, se realizaron los clonajes indicados en la figura 8. Éstos permitían analizar la respuesta de CD44 al añadirle:

- i) el extremo N-terminal citoplasmático solo (M1-L19),
- ii) el extremo N-terminal junto con la TM1 (M1-Y36),
- iii) la TM1 de forma independiente (N16-Y36),
- iv) el lazo 1 luminal por separado (A39-L104),
- v) y el lazo 1 junto con el extremo N-terminal y la TM1 (M1-L104).

En los ensayos de inmunofluorescencia se apreció de forma clara que, al fusionarle a CD44 el extremo N-terminal de POMT1 (M1-L19), éste no produjo la retención en el RE, ya que no hay colocación con la calnexina, sino que parece estar en la membrana plasmática (Fig. 25A). Pero como se observó en el ensayo de deglicosilación, la localización tampoco era totalmente en membrana plasmática, ya que aproximadamente el 50 % de la proteína de fusión no fue deglicosilada por la endoglicosidasa H. Este resultado indica que esta fracción de la proteína se debe encontrar en el RE, y tener menor peso molecular ya que no debe haber sufrido la parte de *N*- y *O*-glicosilación que se lleva a cabo en el AG (Fig. 27, carriles 1-3, cabezas de flechas naranjas). Por otra parte, en los ensayos de inmunofluorescencia se puso de manifiesto que, además de la presencia en la membrana plasmática, hay una mayor concentración de la proteína de fusión en una determinada zona del RE, más pequeña que éste, sin estructura de red y cercana al núcleo pero sin rodearle como el RE. De nuevo, se realizó la inmunofluorescencia utilizando esta vez un marcador de AG (manosidasa II), comprobándose que se trataba del AG por la colocación con la manosidasa II (Fig. 26A), además de presentarse en la membrana plasmática como mencionábamos anteriormente.

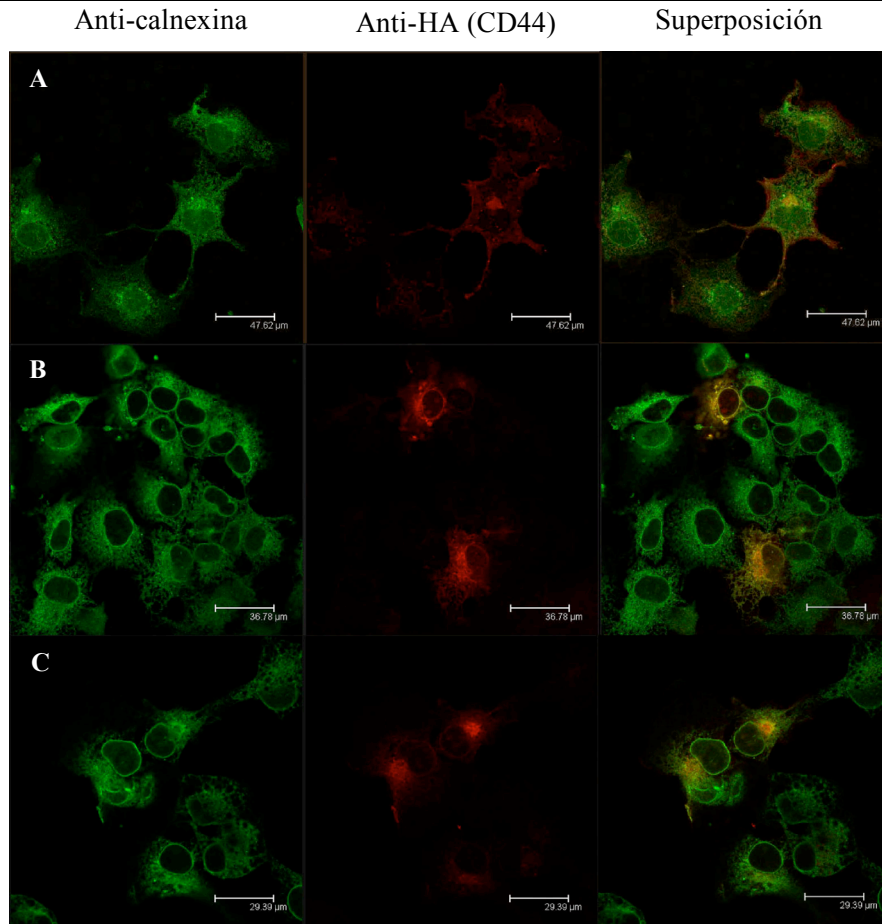


Figura 25. Localización subcelular de CD44 fusionada a fragmentos de la región N-terminal de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-calnexina (marcador RE) en verde, anti-HA (CD44) en rojo y superposición de ambas; en células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-L19)-HA (N-terminal); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-Y36)-HA (N-terminal + TM1); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (N16-Y36)-HA (TM1)

Sin embargo, la unión del extremo N-terminal y la TM1 (M1-Y36) produjo una retención casi total de CD44 en el RE, como puede observarse en la inmunofluorescencia (Fig. 25B), colocalizando perfectamente con la calnexina. En la deglicosilación también se puso de manifiesto que prácticamente la totalidad de esta proteína de fusión fue digerida por la endoglicosidasa H y que su peso molecular era similar a aquellas fracciones de CD44 con el extremo N-terminal o con la TM1 (Fig. 27, puntas de flechas naranjas) que estaban en el RE. El peso molecular de todas ellas era menor que el de aquellas proteínas que estaban en el AG o en la membrana plasmática por la ausencia de la *N*- y *O*-glicosilación que se produce en el AG (Fig. 27, puntas de flecha verdes).

Al analizar la localización de CD44 fusionada sólo con la TM1, los ensayos de inmunofluorescencia permitieron distinguir que la mayoría de CD44 fusionada a la TM1 de POMT1 se encontraba en el RE (Fig. 25C), pero había nuevamente un mayor acúmulo en el AG (Fig. 26B). A pesar de este acúmulo en el AG, se observó que la

proteína se seguía localizando en el RE, ya que se observaba su estructura de red y la continuidad con la membrana nuclear, rodeando al núcleo, como se detecta con la calnexina, pero no con la manosidasa II. Esto mismo se confirmó en la deglicosilación con endoglicosidasa H, con la que se digirió la gran parte de la proteína de fusión (Fig. 27, carril 8 flecha naranja) que debería ser la correspondiente a la que se encontraba en el RE. Sin embargo, quedó una pequeña fracción sin digerir con endoglicosidasa H que sí fue deglicosilada por la PNGasa F, y que tenía mayor peso molecular que la anterior por la glicosilación que sufre en el AG (Fig. 27, carril 7 y 8, flechas verdes).

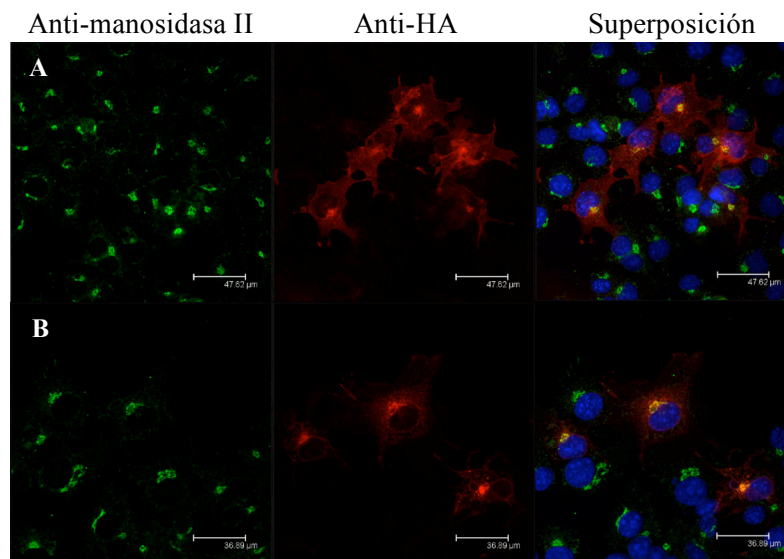


Figura 26. Localización subcelular de CD44 fusionada a fragmentos del extremo N-terminal de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia en células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-L19)-HA (N-terminal); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (N16-Y36)-HA (TM1). En verde anti-manosidasa II (marcador del AG), en rojo anti-HA (CD44) y superposición de ambas, con tinción DAPI para los núcleos.

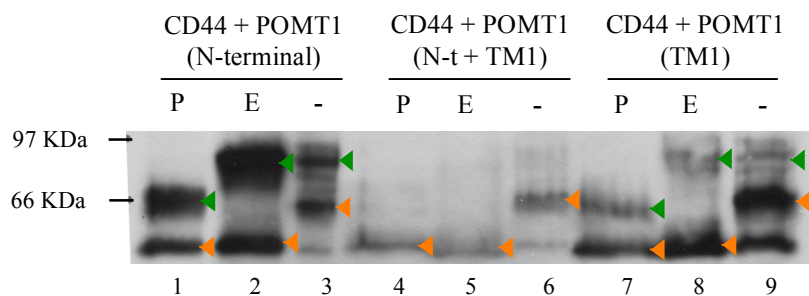


Figura 27. Análisis de la deglicosilación de CD44 con regiones del N-terminal de POMT1 mediante “western blot” Digestión con PNGasaF (P) o endoglicosidasa H (E) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-L19)-HA (N-terminal) en los carriles 1, 2 y 3; pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-Y36)-HA (N-terminal + TM1) en los carriles 4, 5 y 6; y pcDNA3-CD44 + POMT1 (N16-Y36)-HA (TM1) en los carriles 7, 8 y 9. Puntas de flecha verdes: fracción de proteína que está fuera del RE y sólo se digiere con PNGasaF. Puntas de flechas naranjas: fracción de proteína que está en el RE y se digiere con endoglicosidasa H y PNGasa F. A la izquierda los marcadores de peso molecular.

Con el fin de estudiar la implicación del lazo 1 en la retención en el RE, analizamos la localización de la proteína de fusión formada por CD44 con este lazo 1 solo (A39-L104) o incluyendo también el N-terminal y la TM1 (M1-L104) (Fig. 8). En los estudios de inmunofluorescencia para ambas proteínas de fusión se observó que ambas quedaron retenidas en el RE (Fig. 28A y B). La deglicosilación mostró que ambas proteínas de fusión fueron digeridas con endoglicosidasa H, y por tanto confirmó su presencia en el RE (Fig. 29, carriles 2 y 5). Al igual que la inmunodetección de otros extractos, aparecía la proteína sin ningún tipo de *N*-glicosilación, con el mismo peso molecular que la banda superior al ser deglicosilada (Fig. 29, cabeza de flecha morada).

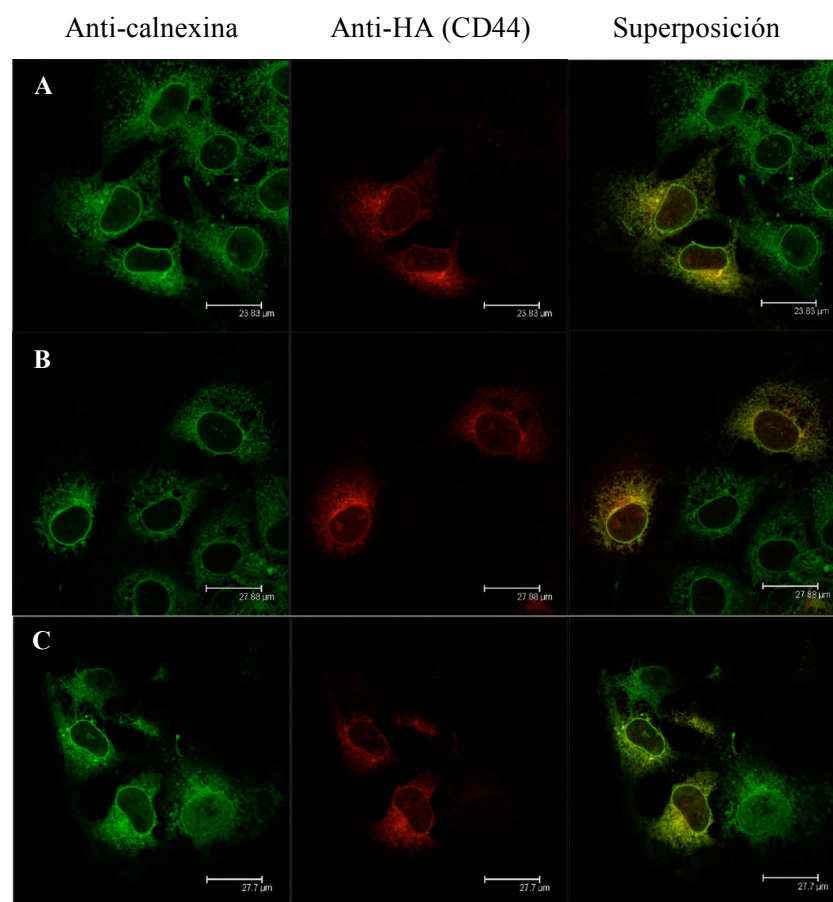


Figura 28. Localización subcelular de CD44 fusionada a distintos fragmentos de POMT1. Imágenes de inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con: **A.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-L104)-HA (N-terminal + TM1 + lazo 1); **B.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (A39-L104)-HA (lazo 1); **C.** pcDNA3-CD44 + POMT1 (V101-L171)-HA (TM2, TM3 y TM4). En verde, anti-calnexina (marcador RE); en rojo anti-HA (CD44) y superposición de ambas.

Finalmente se analizaron las TM2, TM3 y TM4 (V101-L171) todas juntas debido a su proximidad (Fig. 9A). Los estudios de inmunofluorescencia permitieron ver la retención en el RE de CD44 al fusionarle estas transmembranas (Fig. 28C). Con esta

proteína de fusión no se pudieron realizar los estudios de deglicosilación, debido a la falta de proteína suficiente para su inmunodetección en “western blot”.

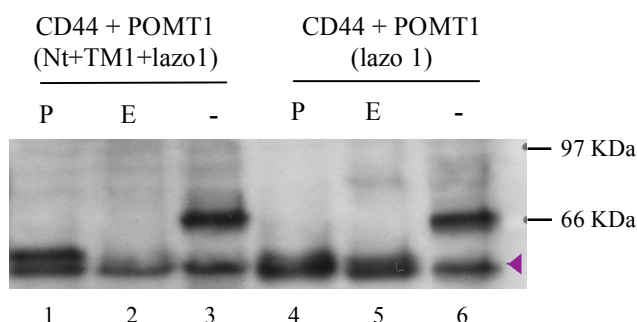


Figura 29. Análisis mediante “Western blot” con anti-HA de la deglicosilación de CD44 fusionada a distintos fragmentos que incluyen el lazo 1 de POMT1. Digestión con PNGasaF (P) o endoglicosidasa H (E) y sin digerir (-) de los extractos de proteína de células COS-7 transfectadas con: pcDNA3-CD44 + POMT1 (M1-L104)-HA (N-terminal + TM1 + lazo 1) en los carriles 1, 2 y 3; pcDNA3-CD44 + POMT1 (A19-L104)-HA (lazo 1) en los carriles 4, 5 y 6. La flecha morada señala la banda de la proteína de fusión sin *N*-glicosilación. A la derecha los marcadores de peso molecular.

3. Interacción de POMT1 con DNAJB6

Para comprobar la interacción de POMT1 con DNAJB6 detectada anteriormente en el laboratorio en los estudios de doble híbrido, se expresó DNAJB6-EGFP y POMT1-myc-His en células HEK293T. Se analizó la expresión en “western blot” de ambas proteínas: POMT1-myc-6His en el extracto de proteína de membrana y DNAJB6-EGFP en el extracto proteína total (Fig. 30).

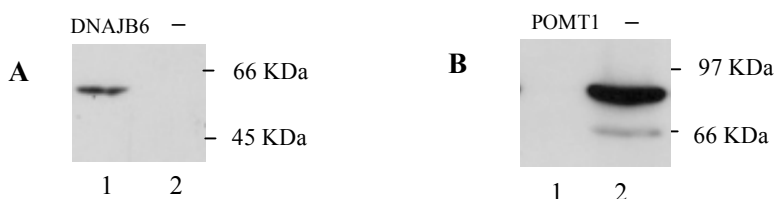


Figura 30. Expresión de DNAJB6-EGFP y POMT1-myc-6His. **A.** “Western blot” con anti-GFP (DNAJB6). Extracto de proteína total de células HEK293T transfectadas con pEGFP-DNAJB6 (carril 1) y sin transfectar (carril 2). **B.** “Western blot” con anti-myc (POMT1). Extracto de proteína de membrana de células HEK293T transfectadas con pEF4-POMT1-myc-6His (carril 1) y sin transfectar (carril 2). A la derecha los marcadores de peso molecular.

La inmunoprecipitación de DNAJB6-EGFP se realizó con el extracto de proteína total y con anti-GFP, pero no se observó coimmunoprecipitación de POMT1 en el “western blot” con anti-myc. Con el extracto de proteína de membrana tampoco se consiguió inmunoprecipitar POMT1 debido a que este extracto era muy insoluble, y

parte de las proteínas de membrana se agregaban durante la inmunoprecipitación, incluso en los controles negativos sin anti-6His.

También se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para ver la localización de DNAJB6, si se localizaba en el RE como POMT1. Se transfectaron células COS-7 con DNAJB6-myc-His o DNAJB6-EGFP. Mediante inmunofluorescencia se observó que DNAJB6 se localizaba en el citoplasma (Fig. 31A), en el núcleo (Fig. 31B) o en ambos; es más, en alguna ocasión parecía colocalizar con la calnexina en el RE (Fig. 31C).

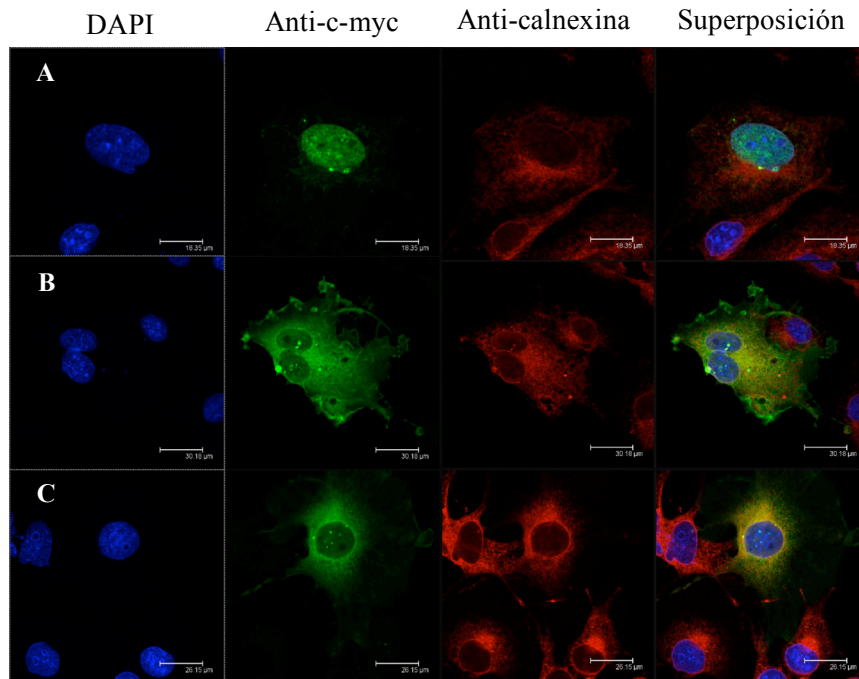


Figura 31. Localización subcelular de DNAJB6. Imágenes de inmunofluorescencia con tinción DAPI de núcleos, anti-c-myc (DNAJB6) en verde, anti-calnexina (RE) en rojo y superposición de todos ellos. A-C. Células COS-7 transfectadas con pEF4-DNAJB6/myc-His.

Para observar cada cuanto tiempo sucedía esa translocación de DNAJB6 del citoplasma al núcleo, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia *in vivo* con células COS-7 transfectadas con DNAJB6-EGFP que pudiesen aclarar si este fenómeno estaba relacionado con el ciclo celular o cualquier otro proceso celular. Pero en ninguno de los ensayos *in vivo* realizados se consiguió ver la translocación de DNAJB6-EGFP del citoplasma al núcleo o viceversa.

4. Colocalización de POMT1 y POMT2

Con objeto de analizar también la interacción entre POMT1 y POMT2, que no se había observado en el ensayo de doble híbrido realizado anteriormente en nuestro

laboratorio, se expresó POMT2 con el epítipo Flag en células COS-7. Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron su localización en el RE y su colocalización con la calnexina (Fig. 32). Esto coincide los datos publicados (Willer et al., 2002). En la figura 33 se muestra la inequívoca colocalización de POMT2 con POMT1 en células COS-7, también mostrado por otro grupo simultáneamente al desarrollo de este trabajo, pero en células HEK293T, que como ya se ha dicho anteriormente, el menor tamaño de estas células no permite distinguir claramente el citoplasma del RE (Akasaka-Manyá et al., 2006).

Los ensayos de inmunoprecipitación no se llegaron a realizar por los problemas de insolubilidad del extracto de membrana mencionados anteriormente.

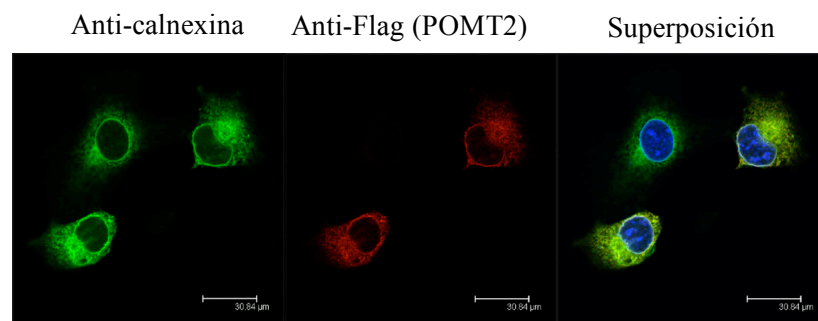


Figura 32. Localización subcelular de POMT2. Células COS-7 transfectadas con pcDNA3-POMT2-Flag. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-calnexina en verde, anti-Flag (POMT2) en rojo y, superposición de ambas y tinción de núcleos con DAPI.

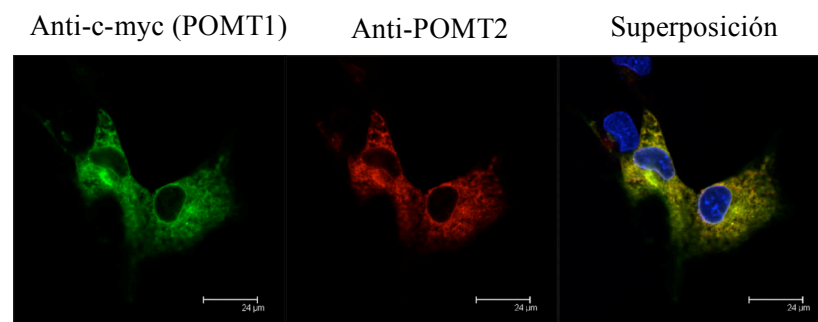


Figura 33. Colocalización de POMT1 y POMT2. Células COS-7 cotransfectadas con pEF4-POMT1-myc-His y pcDNA3-POMT2-Flag. Imágenes de inmunofluorescencia con anti-c-myc (POMT1) en verde, anti-POMT2 en rojo y superposición de ambas y tinción DAPI de núcleos.

5. Obtención de clones de células ES^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimera

El ratón “knock out” de *Pomt1* resultó ser letal embrionario por la ausencia de glicosilación del α -distinglicano, uno de los principales componentes de la membrana de Reichert, propia de roedores. La carencia de residuos glicosílicos impide la unión del

distroglicano a la laminina de la membrana basal (Willer et al., 2004). Uno de los abordajes utilizados para superar este problema es la generación de quimeras procedentes de células ES^{Pomtl^{-/-}}. En la figura 34 se muestra el esquema seguido para interrumpir el alelo salvaje de las células ES^{Pomtl^{+/-}} con el gen de resistencia a puromicina.

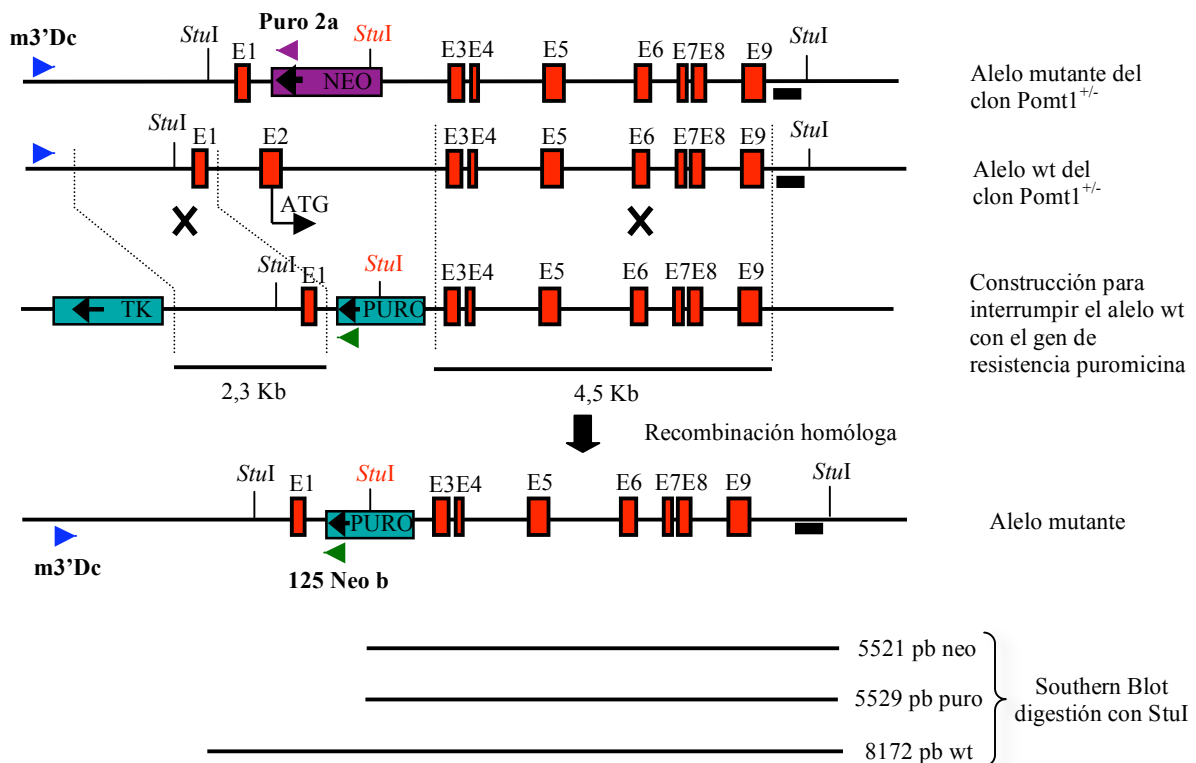


Figura 34. Esquema de la interrupción del alelo salvaje en células ES^{Pomtl^{+/-}} con el gen de resistencia a puromicina mediante recombinação homóloga. Los recuadros rojos representan los exones de *Pomtl*. El recuadro morado representa el gen de resistencia a neomicina (NEO), el verde el gen de resistencia a puromicina (PURO) y el azul el gen de la timidina kinasa del virus *Herpes simplex* (TK). Las líneas de 2,3 Kb y 4,5 Kb simbolizan los brazos corto y largo de la recombinação homóloga. Las cabezas de flecha muestran la posición de los cebadores con los que se amplificaron los brazos cortos de recombinação homóloga en 5' (m3'Dc común a ambos alelos, Puro 2a y Neo 125 b específicos del gen de resistencia a puromicina y a neomicina, respectivamente). El recuadro negro en la posición de la sonda utilizada en el "Southern blot" para analizar los brazos largos de recombinação homóloga en 3'. Se indican los puntos de corte de la enzima de restricción *StuI*; en rojo la diana *StuI* que se introduce con los genes de resistencia de neomicina o puromicina que permite distinguir los alelos mutados del salvaje en el "southern blot" por la diferencia de peso molecular.

Mediante electroporación, se introdujo la construcción con el gen de resistencia a puromicina en las células ES^{Pomt1^{+/-}}, producidas anteriormente en el laboratorio para obtener el “knock out” de *Pomt1*. Se analizaron 288 clones resistentes a neomicina, puromicina y ganciclovir para comprobar cuales de ellos habían introducido en la posición adecuada el gen de resistencia a puromicina por recombinación homóloga. En la figura 34 se muestra un esquema de la interrupción génica. De esta forma se elimina el alelo salvaje de las células ES^{Pomt1^{+/-}}, generando células ES^{Pomt1^{-/-}}, que se introducirán en un blastocisto normal para producir los ratones quimera.

Amplificando ambos brazos cortos de recombinación homóloga con los cebadores indicados en la tabla 6, se puso de manifiesto que cuatro de los 288 clones (el 98, 165, 182 y 219) parecían tener ambos alelos de *Pomt1* interrumpidos, uno por neomicina y otro por puromicina, ya que como se muestra en la figura 35, amplificaban ambos brazos cortos de recombinación homóloga.

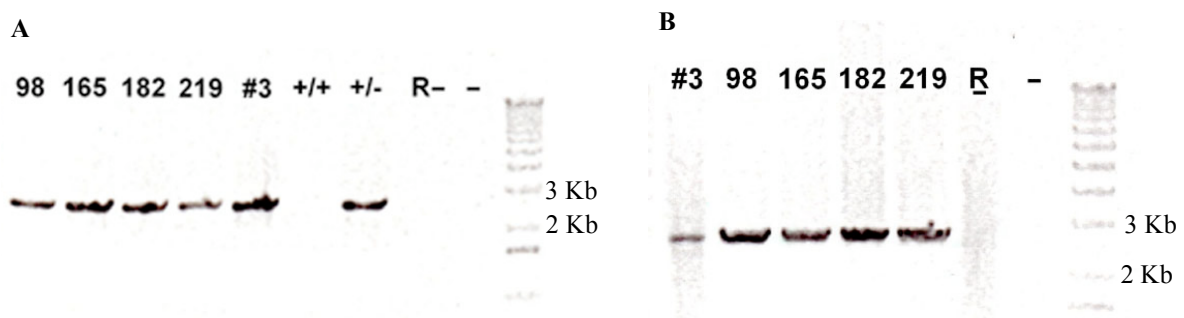
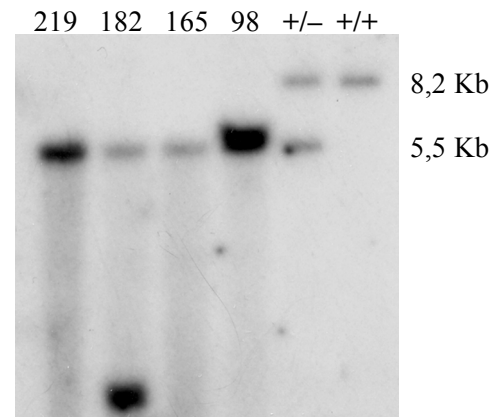


Figura 35. Análisis de los brazos cortos de recombinación en 5' de los clones positivos de células ES^{Pomt1^{-/-}}. **A.** Amplificación con el cebador m3'Dc y 125 Neob (2,5 kb) para confirmar la presencia del alelo de *Pomt1* interrumpido por el gen de resistencia a neomicina. **B.** Amplificación con el cebador m3'Dc y Puro 2a (2,9 Kb) para comprobar la recombinación homóloga en el otro alelo, interrumpido por el gen de resistencia a puromicina. +/+ control wt; +/- control heterocigoto; R- y - controles negativos de la amplificación. A la derecha los marcadores de peso molecular.

Los clones que resultaron positivos para la PCR se analizaron mediante “Southern blot” para comprobar si la recombinación homóloga también había ocurrido en el brazo largo, en el extremo 3'. Sin embargo, al realizar el “Southern blot” del DNA digerido con *StuI* y revelado con la sonda del intrón 9 (cebadores descritos en la tabla 5), se comprobó que uno de estos clones había realizado de forma incorrecta la recombinación homóloga, ya que aparecía una banda anómala de 1,5 Kb. En el resto de los clones positivos para *Pomt1^{-/-}* se observó únicamente la banda de 5,5 Kb correspondiente a los

dos alelos de *Pomt1* interrumpidos y todos carecen de la banda de 8,2 Kb proveniente del alelo salvaje de *Pomt1* (Fig. 36).

Figura 36. Análisis del brazo largo de recombinación mediante “southern blot”. DNAs digeridos con *StuI* e hibridados con la sonda del intrón 9. +/+ control wt, +/- control heterocigoto. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular.



El grupo con el que colaboramos, microinyectará estos clones de células ES con ambos alelos de *Pomt1* mutados en blastocistos para la obtención de los ratones quimera *Pomt1*^{-/-}.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Localización subcelular de POMT1

El WWS pertenece a un grupo de distrofias musculares congénitas con afectación neuronal y ocular muy grave, que tienen en común la hipoglicosilación del α -dístroglicano (Muntoni et al., 2004). El α -dístroglicano es un componente principal del DGC, ya que sirve de unión entre la MEC y el citoesqueleto. La ausencia de glicosilación del α -dístroglicano provoca la pérdida de esta unión, dando lugar a la distrofia muscular así como a defectos en la migración neuronal. Como se ha dicho en la introducción, el α -dístroglicano se encuentra en las membranas basales de muchos tipos celulares, entre ellos, las de la célula muscular y las de las neuronas. Alrededor de un 25 % de los casos de WWS son causados por mutaciones en el gen *POMT1*, siendo éste el principal causante de este síndrome (Cohn, 2005). La proteína POMT1 humana es la proteína homóloga en mamíferos de las PMTs de levaduras (Willer et al., 2003). Recientemente se ha demostrado la necesidad de la formación del heterodímero entre POMT1 y su proteína homóloga en eucariotas superiores, POMT2, para llevar a cabo la manosilación sobre el único sustrato demostrado hasta la fecha, el α -dístroglicano (Manya et al., 2004).

Existe mucha controversia debido al amplio número de genes implicados en el WWS: *POMT1* (de Bernabe et al., 2003), *POMT2* (van Reeuwijk et al., 2005b), *fukutina* (de Bernabe et al., 2003 y Cotarelo et al., 2008), *FKRP* (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2004) y *LARGE* (van Reeuwijk et al., 2007). Y viceversa, el amplio espectro de enfermedades que producen estos genes. Así, *POMT1*, motivo principal de esta tesis, puede producir desde distrofias musculares graves con gran afectación neuronal, como el WWS, hasta distrofias musculares más leves con retraso mental únicamente (D'Amico et al., 2006). En algunos trabajos se ha intentado buscar la relación entre mutaciones en determinados genes con una mayor gravedad de la enfermedad, como es el caso de POMT1 y POMT2 con el WWS (Godfrey et al., 2007); en otros se ha analizado correlación entre la gravedad de la enfermedad y la localización de las mutaciones en una determinada zona de la proteína: la putativa zona catalítica, la posible zona de unión con el sustrato en las glicosiltransferasas demostradas, aminoácidos conservados evolutivamente... Pero lo cierto es que se conoce poco sobre la relación entre la estructura y la función de estas proteínas.

En este trabajo hemos analizado la localización subcelular de POMT1 postulada en el RE pero no demostrada anteriormente al desarrollo de esta tesis (Akasaka-Manya et al., 2006). POMT1 se localiza en el RE y colocaliza con la calnexina (Fig. 10), proteína del RE que frecuentemente se utiliza como marcador del mismo.

2. Búsqueda de la señal de retención de POMT1

Además, hemos intentado saber de qué forma POMT1 permanece en el RE, si posee mecanismos de retención en el RE y/o de recuperación desde el aparato de Golgi. Como decíamos en la introducción, en las proteínas solubles del RE la señal de retención reside en el extremo C-terminal, y consta de cuatro aminoácidos con carga. La secuencia consenso es KDEL (Pelham, 1990), HDEL en el caso de las levaduras, o variaciones de la misma. En la mayoría de las proteínas transmembrana tipo I, que son proteínas con un único dominio transmembrana y cuyo extremo C-terminal se encuentra en el citoplasma, la señal de retención son dos lisinas en posición -5 y -3; o en -4 y -3 (KXXXX o KKXX) en este C-terminal citoplasmático (Jackson et al., 1990). En las proteínas de membrana tipo II, aquellas que tienen un único dominio transmembrana y cuyo extremo C-terminal se encuentra en el lumen, la señal de retención es más variable; la más frecuente son dos argininas situadas en el extremo N-terminal citoplasmático (Schutze et al., 1994). También se han descrito otro tipo de señales en estas proteínas transmembranales que generalmente incluyen aminoácidos con carga, pero no hay una señal consenso clara para todas ellas como la secuencia KDEL de las proteínas solubles del RE.

En el caso de POMT1 ninguna de estas señales aparecía en el extremo N-terminal ni en el C-terminal. Sin embargo, existe una serie de aminoácidos con carga conservados en mamíferos (DILIRKX) en el extremo C-terminal, precedidos por otra secuencia de aminoácidos: WXXXW, aún más conservados evolutivamente en todas las PMTs y POMTs desde bacterias a humanos (tabla 6). La delección del C-terminal que incluía estos aminoácidos (delecW714-fín; Fig. 5) no produjo la pérdida de la retención en el RE de POMT1 (Fig. 11A). Al deleccionar fragmentos más grandes de POMT1 (delec L697-fín, delec F696-fín, delec R697-fín y delec G573-fín; Fig. 5) tampoco se observaron cambios en su localización (Fig. 11B-E), mostrando que POMT1 no debe tener una única señal de retención en el RE en su extremo C-terminal, sino que deben ser varias las señales que favorecen la localización en el RE mediante retención y/o recuperación desde el AG. Tal es el caso de otras proteínas, como Sec12p de levaduras

en la que se ha comprobado que señales en el extremo N-terminal actúan como señales de retención en el RE y que los dominios transmembrana median la recuperación desde el AG (Sato et al., 1996).

Como ya se explicó en los resultados, para poder examinar qué regiones de POMT1 están implicadas en la retención en el RE de forma independiente unas de otras, se fusionaron varios fragmentos de POMT1 a una proteína de membrana plasmática, CD44, que además presenta *N*- y *O*-glicosilación (Ponta et al., 2003). Se analizó si estos fragmentos eran capaces de cambiar la localización de CD44 mediante estudios de inmunofluorescencia y *N*-deglicosilación. Al unir varios fragmentos de la región C-terminal de POMT1, todos ellos eran capaces de retener a CD44 en el RE (Fig. 12), ratificándolo el hecho de que todas estas proteínas de fusión resultaron ser sensibles a la endoglicosidasa H (Fig. 13). Estos fragmentos tenían en común la presencia de una o varias α -hélices solubles o transmembranas. Por esta razón se realizó un control del experimento, uniéndole a CD44 diferentes fragmentos de una proteína citoplasmática PFK. Así, una construcción contenía un fragmento α -hélice y otra construcción un fragmento no α -hélice. De esta forma se comprobaría si cualquier α -hélice o, incluso, cualquier secuencia de aminoácidos era capaz de retener a CD44 en el RE por algún mecanismo de control de calidad de este compartimento. Ninguno de estos dos fragmentos causaron la retención en el RE como se corrobora en el ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 14) y con el tratamiento con endoglicosidasas, ya que sólo fueron digeridos por la PNGasa F y no por la endoglicosidasa H (Fig. 15). Por tanto, cualquier secuencia de aminoácidos no es capaz de retener a CD44 en el RE, sino que la retención se produce por algún tipo de señal/es específica/s.

2.1. Implicación del extremo C-terminal en la retención en el retículo endoplásmico

Tras analizar más concretamente qué regiones eran responsables de la retención, se observó que al fusionar CD44 al extremo C-terminal (P696-fin, Fig. 7), este fragmento no alteraba la localización subcelular de CD44. Esta proteína de fusión se encontró en la membrana plasmática (Fig. 16D) y no era sensible a endoglicosidasa H (Fig. 18B), corroborando esta localización. Así, se puso de manifiesto que el extremo C-terminal no estaba implicado en la retención ni en la recuperación del AG al RE.

2.2. Implicación de la transmembrana 7 en la retención en el retículo endoplásmico

La TM7 (R673-T698, Fig. 7) sólo fue capaz de retener a CD44 en el RE de forma parcial, ya que sólo una fracción de la proteína de fusión era deglicosilada por la endoglicosidasa H que, además, tenía menor peso molecular por la ausencia de la glicosilación que se produce en el AG (Fig. 18A). En los ensayos de inmunofluorescencia se corroboró que parte de la proteína de fusión estaba en el AG, colocalizando con la manosidasa II, marcador de dicho orgánulo (Fig. 17). El resto de la proteína es retenida en el RE, ya que seguía colocalizando con la calnexina (Fig. 16B), mantiene la estructura de red y rodea el núcleo, presentando continuidad con la membrana nuclear. Por tanto, este dominio transmembrana podría estar implicado en la recuperación de la proteína desde el AG al RE; o en la retención propiamente dicha. Sin embargo, parece que este mecanismo no es completamente efectivo por sí solo, necesitando la presencia de otras secuencias para producir la retención completa en el RE. Esta transmembrana no se encuentra muy conservada evolutivamente, lo que podría explicar que no tenga un papel importante en la retención.

Sin embargo, la proteína de fusión de CD44 con la suma de la TM7 más el extremo C-terminal (R673-fin, Fig. 7) de POMT1 juntos, sí que era retenida en el RE como se comprobó en los ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 16C). Pero, esta retención no fue completa, ya que en el análisis de deglicosilación se observó que quedaba una pequeña fracción que no era sensible a la endoglicosidasa H y que tenía mayor peso molecular por la glicosilación llevada a cabo en el AG (Fig. 18A).

2.3. Implicación de las transmembranas centrales (TM2-TM6) en la retención en el retículo endoplásmico

A diferencia de lo que sucede con la TM7, en los estudios de inmunofluorescencia con la TM 5 y la TM 6 se observó que éstas sí fueron capaces de retener completamente a CD44 en el RE (Fig. 21C y Fig. 16A, respectivamente), donde colocalizan con la calnexina. Además, ambas proteínas de fusión se digirieron con la endoglicosidasa H (Fig. 22 y Fig. 18A). Estos datos indican la implicación de estas dos transmembranas en la retención en el RE, ya que cada una de ellas por sí sola y de forma independiente del resto de la proteína, es capaz de retener a una proteína de membrana plasmática en el RE.

Las transmembranas 2, 3 y 4 (V101-L171) se analizaron en conjunto debido a su proximidad. En los estudios de inmunofluorescencia se observó que al fusionar estas tres transmembranas a CD44 también cambian su localización, reteniéndola en el RE (Fig. 28C). El análisis de deglicosilación de la proteína de fusión no se pudo realizar porque no se obtuvo suficiente cantidad de la misma para poderla inmunodetectar. Del mismo modo, en los ensayos de inmunofluorescencia tampoco se observaron un gran número de células transfectadas, lo que explica que no se viese la proteína de fusión en el ensayo de “western blot”. Esto puede deberse a que esta proteína de fusión resulte tóxica a la célula o bien la reconozca como una proteína extraña o mal plegada y sea degradada por la vía ERAD (Brodsky and McCracken, 1999).

Por tanto, parece que las transmembranas centrales: TM2, TM3, TM4, TM5 y TM6 podrían estar implicadas en la retención en el RE, como ya se ha visto que sucede con algunas transmembranas de otras proteínas (Parker et al., 2004). Otra posible explicación es que las transmembranas causen retención por su unión con POMT2. Como ya se ha dicho, POMT1 y POMT2 forman heterodímeros para llevar a cabo la *O*-manosilación. En los estudios de doble híbrido realizados anteriormente en el laboratorio con los lazos luminales 1 y 5 de POMT1 y de POMT2, no se demostró que estas proteínas interaccionasen entre sí mediante estas regiones. Por tanto, POMT1 y POMT2 podrían interaccionar a través de los mencionados dominios transmembrana, explicando así el resultado negativo de la interacción entre ambas de los experimentos de doble híbrido.

2.4. Implicación de la transmembrana 1 en la retención en el retículo endoplásmico

Los estudios de inmunofluorescencia con la TM1 (N16-Y36) (Fig. 8) de POMT1 fusionada a CD44 mostraron que esta transmembrana también provoca la retención en el RE, ya que mantiene la estructura de red y rodea al núcleo, además de colocalizar con la calnexina (Fig. 25C). Sin embargo, también se observó que, igual que con la TM7, parte de la proteína se concentra en una zona más pequeña y próxima al núcleo pero sin rodearlo. Al realizar la inmunofluorescencia con la manosidasa II, se demostró la colocalización con ésta (Fig. 26B), confirmando que aunque la TM1 retiene a CD44 en el RE, parte de la proteína llega al AG.

El tratamiento con las endoglicosidasas confirma los datos de la inmunofluorescencia: gran parte de la proteína de fusión se encuentra en el RE, por lo

que es digerida por la endoglicosidasa H, y tiene menor peso molecular ya que carece de la glicosilación del AG. Sin embargo, una pequeña fracción de la proteína de fusión no es digerida por la endoglicosidasa H y tiene mayor peso molecular, incluso después de ser deglicosilada, por la *N*- y *O*-glicosilación que sucede en el AG (Fig. 27). Todo esto indica que la TM1 podría estar implicada en la recuperación de la proteína al RE o que esta transmembrana por sí sola no sea capaz de producir la retención completa en el RE. Al igual que el extremo N-terminal de POMT1, la TM1 no está muy conservada en las distintas especies, por ejemplo, en algunas POMTs la metionina iniciadora se encuentra muy cerca (1-4 aminoácidos) de lo que se ha predicho como TM1, poniendo en duda la existencia de dicha transmembrana. La ausencia de conservación de secuencia en esta transmembrana podría señalar que su implicación en la retención en el RE no debe ser determinante.

2.5. Implicación del extremo N-terminal en la retención en el retículo endoplásmico

Al examinar el comportamiento de CD44 unido al extremo N-terminal de POMT1 (M1-L19, Fig. 8), en los ensayos de inmunofluorescencia se observó que esta proteína de fusión se localizaba en la membrana plasmática. Pero además, parecía que también se concentraba en lo que podría ser el AG, ya que lo hacía en una zona más pequeña que el RE y cercana al núcleo, aunque sin rodearle como lo hace la calnexina, con la que no colocaliza (Fig. 25A). Para confirmar este emplazamiento se realizó la inmunofluorescencia con la manosidasa II, marcador de AG, con el que efectivamente colocaliza en esta zona (Fig. 26A). Sin embargo, el tratamiento con las endoglicosidasas muestra que una parte de la proteína de fusión es digerida por la endoglicosidasa H y tiene menor peso molecular porque no ha tenido lugar la *N*- y *O*-glicosilación del AG, e indicando que parte de la proteína de fusión está en el RE (Fig. 27).

Aunque los resultados del ensayo de inmunofluorescencia y de la deglicosilación no coinciden, cabría pensar que la adición de los aminoácidos del extremo N-terminal de POMT1 podrían variar el plegamiento de la proteína de fusión y, por tanto, alterar el reconocimiento de la misma por las glicosiltransferasas y glicosidasas del RE y del AG. Esto podría dificultar la eliminación las manosas que hacen que la proteína sea sensible a la endoglicosidasa H, pudiendo ser digerida la proteína con esta enzima aunque se encuentre en el AG o la membrana plasmática, como se observa en la inmunofluorescencia.

De cualquier modo, la localización total o parcial fuera del RE, indica que el extremo N-terminal de POMT1 no está implicado en la retención en el RE, y en tal caso podría ser responsable de la recuperación desde el AG al RE de la proteína. El extremo N-terminal de POMT1 se ubica en el citoplasma, al igual que muchas señales de retención en el RE de proteínas transmembranales tipo II, es decir, aquellas que tienen el extremo N-terminal en el citoplasma. En muchos casos la señal de retención está formada por dos argininas en el N-terminal (Michelsen et al., 2005). Como ya se dijo en la introducción, parece que en este tipo de señal no es tan importante su posición respecto de dicho extremo, y sí quizá más, su distancia respecto de la transmembrana. En el caso de POMT1, existen una lisina y una arginina en la posición 6 y 7, respectivamente, que también son dos aminoácidos con carga positiva, y que podrían estar realizando esta función. Sin embargo, el extremo N-terminal de POMT1 no está muy conservado en las distintas especies, teniendo distinta secuencia y distinta longitud, por lo que estos aminoácidos ya no estarían en la misma posición respecto de la TM1 de POMT1 en algunas especies. En otras, cuya metionina iniciadora se encuentra más adelante en la secuencia, estos aa básicos no existen en su extremo N-terminal citoplasmático. Parece que esta lisina y arginina sólo están conservadas en la mayoría de POMT1 de mamíferos. Por tanto, con los datos que tenemos no podemos afirmar con certeza que el N-terminal y más concretamente esa lisina y arginina sean responsables de la retención en el RE mediante la recuperación desde el AG.

La proteína de fusión de CD44 con el extremo N-terminal y la TM1 juntos (M1-Y36, Fig. 8), también aparece retenida en el RE y, en este caso, colocaliza perfectamente con la calnexina (Fig. 25B), a diferencia de lo que sucede con la proteína de fusión CD44 con TM1 o con el N-terminal por separado, los cuales aparecían de forma parcial en el AG. La deglicosilación corrobora los resultados del ensayo de inmunofluorescencia, ya que la proteína de fusión es digerida tanto con la endoglicosidasa H como por la PNGasa F (Fig. 27). El peso molecular de la proteína, tanto digerida como sin digerir, es similar al que tiene la fracción de la proteína de fusión de CD44 con el extremo N-terminal o CD44 con la TM1, que en ambos casos se encuentran en el RE. Por ello, esta proteína de fusión de CD44 con el extremo N-terminal y la TM1 tiene menor peso molecular, ya que carece de los azúcares que se modifican y añaden en el AG, siendo sensibles a la endoglicosidasa H (Fig. 27, cabezas de flecha naranjas).

2.6. Implicación de los lazos citoplasmáticos en la retención en el retículo endoplásmico

Al examinar los dos lazos citoplasmáticos de POMT1, el lazo 4 (Fig. 9A) y el lazo 6 (Fig. 7) con sus dos α -hélices citoplásmicas cada uno, comprobamos que todas ellas, tanto juntas como por separado, producen la retención en el RE de CD44. En los ensayos de inmunofluorescencia se pone de manifiesto la localización en el RE por su perfecta colocalización con la calnexina (lazo 6 ver fig. 19A-C; lazo 4 ver fig. 23A-C). El tratamiento con las endoglicosidasas ratifica los resultados de los estudios de inmunofluorescencia, ya que todas las proteínas de fusión son sensibles a la endoglicosidasa H (lazo 6 ver fig. 20 y lazo 4 ver fig. 24). Únicamente no se pudo realizar el ensayo de deglicosilación con la primera α -hélice situada en el lazo 4, por no haber obtenido suficiente cantidad de esta proteína de fusión como para inmunodetectarla. Al igual que sucedía con la proteína de fusión entre CD44 y las transmembranas 2, 3 y 4, en los ensayos de inmunofluorescencia no se observó un gran número de células que expresaran dicha proteína de fusión. Como se decía más arriba, podría deberse al control de calidad del RE que reconozca la proteína como mal plegada y por ello sea degradada por la vía del ERAD (Brodsky and McCracken, 1999), no permitiendo obtener suficiente cantidad para su detección mediante “western blot”.

La capacidad de los lazos citoplasmáticos de POMT1 para retener a CD44 puede deberse a la unión a través de estas α -hélices citoplasmáticas con otras proteínas del citoplasma, y de esta forma producir la retención en el RE. Además, estos lazos citoplasmáticos podrían ser el lugar, o uno de los lugares de interacción junto con las transmembranas, implicados en la heterodimerización entre POMT1 y POMT2, ya que estos lazos citoplasmáticos tampoco se han estudiado en el ensayo de doble híbrido. De esta forma la proteína de fusión podría quedar retenida en el RE por la interacción de sus α -hélices con las de POMT2.

2.7. Implicación de los lazos luminales en la retención en el retículo endoplásmico

El lazo 1 (A39-L104, Fig. 8), ubicado en el lumen, también produce la retención en el RE de CD44. En el ensayo de inmunofluorescencia se observa que CD44 fusionada al lazo 1 se localiza en el RE, colocalizando con la calnexina, marcador específico de este orgánulo, (Fig. 28B). El ensayo de deglicosilación confirma la presencia de la proteína

de fusión en el RE, ya que se digiere con ambas deglicosilasas, tanto con PNGasa F como con endoglicosidasa H (Fig. 29). No se observó ninguna diferencia en el comportamiento de la proteína de fusión con el lazo 1 solo, respecto de lo observado con la proteína de fusión con el extremo N-terminal, la TM1 y el lazo 1 (M1-L104, Fig. 8) (Fig. 28B y fig. 29).

Del mismo modo, los dos fragmentos en los que se dividió el lazo 5, por un lado los dominios MIR (Q293-G494) y por otro, el resto del lazo 5 (N487-V576) (Fig. 9B), también producen la retención en el RE de CD44 (ver fig. 21A y B). Sin embargo, parece que en este caso no es de forma completa, ya que, como se observó mediante “western blot”, hay una pequeña fracción que no es sensible a la endoglicosidasa H y que tiene mayor peso molecular debido a la glicosilación del AG (ver fig. 22). En el estudio de inmunofluorescencia también se aprecia la proteína de fusión más concentrada en una zona determinada del RE más pequeña que ésta y cercana al núcleo, que podría ser el AG. Sin embargo, los ensayos de inmunofluorescencia con la manosidasa II (marcador de AG) no permitieron ver de forma clara la colocalización con las proteínas de fusión en estas zonas de las que hablamos.

Como ya se mencionó en la introducción, los dominios MIR se describieron en las *O*-manosiltransferasas, en el receptor de rianodina (RyR) y en el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) (Ponting, 2000); posteriormente también se han encontrado en SDF2 (“stromal cell-derived factor 2”) y SDF2L (“stromal cell derived factor 2 like”). Aunque todas ellas son proteínas del RE, no quiere decir que estos dominios MIR estén implicados en la retención en el RE. Por ejemplo, SDF2 y SDF2L son proteínas solubles del RE, que presentan en el C-terminal la señal consenso de retención en el RE para este tipo de proteínas: KDEL. Además, como ya se decía en la introducción, los dominios MIR de las proteínas *O*-manosil transferasas, así como los de SDF2 y de SDF2L están en lumen, a diferencia de los dominios MIR de RyR y IP₃R que están en el citoplasma. Esta diferente localización de los dominios MIR para estas proteínas, indica que estos dominios no deberían ser responsables de la retención en el RE o de la recuperación desde AG. Cabría pensar que estos dominios MIR pueden estar implicados en metabolismo intracelular del calcio, ya que, el IP₃ es un mensajero secundario que media la liberación de calcio de los almacenes intracelulares mediante la unión a receptores acoplados a canales específicos de calcio (Morton-Jones et al., 2007). Los receptores de rianodina están implicados en la comunicación entre los túbulos transversos y el retículo sarcoplásmico del corazón y también del músculo esquelético.

Estos receptores de rianodina funcionan como un canal liberador de calcio que produce la despolarización de los túmulos transversos, modulado por calcio, magnesio, ATP y calmodulina.

Otra posibilidad es que el lazo 5 se encuentre unido a otras proteínas del RE y sea esto lo que produzca la retención en el RE, más que por su implicación directa en la retención. En algunos casos la formación de complejos proteicos del RE, que incluyen chaperonas, es lo que produce, o ayuda, a la retención en el RE (Meunier et al., 2002). Se había postulado que en el lazo 5 podría estar la zona de unión a sustrato de POMT1 (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999), por lo que podría unirse al sustrato mediante al lazo 5 y sea esta unión la que produzca la retención en el RE.

En resumen, todas las transmembranas de POMT1 (TM2-6), excepto las de los extremos (TM1 y TM7), son capaces de retener a una proteína de membrana plasmática, CD44, en el RE. Por tanto, estas α -hélices transmembranas son responsables de la retención en el RE, como sucede en otras proteínas que presentan varios dominios transmembrana. A diferencia de éstas, las TM1 y TM7 sólo son capaces de retener a CD44 en el RE de forma parcial, por lo que estas transmembranas no deben estar implicadas en la retención, o al menos, no por sí solas, necesitando los extremos N-terminal o C-terminal para producir una retención mayor. Sin embargo, *in vivo* deben ser el extremo N-terminal y la TM1 juntos los que anclen a la proteína en el RE, ya que son las primeras en traducirse.

Así mismo, las cuatro α -hélices citoplasmáticas de POMT1 ubicadas, dos en el lazo 4 y dos en el lazo 6, también son capaces de retener a CD44 en el RE. En este caso, quizás por la unión con otras proteínas del citoplasma.

En cuanto a los lazos luminales, el lazo 1 y el lazo 5 también son capaces de retener a CD44 en el RE. Esta retención puede ser el resultado de la interacción de estos dominios de POMT1 con las proteínas sustrato de la *O*-manosilación, ya que estos lazos han sido postulados como los lugares de interacción con el sustrato y de actividad, respectivamente.

También cabría pensar, que la unión a CD44 de fragmentos grandes hace que quede retenida en el RE. Tal es el caso de los primeros fragmentos que se utilizaron de la región C-terminal (Fig. 6, de 158 aa, 110 aa y 78 aa), los dominios MIR (Fig. 9B, 202 aa), lazo 5 sin los dominios MIR (Fig. 9B, 90 aa) y el lazo 1 (Fig. 8, 66 aa). Mientras que el resto de los fragmentos analizados, incluidos los de PKF que hemos utilizado

como control, tienen una longitud de 20-30 aa; o alrededor de 50 aa, en el caso de las dos α -hélices de los lazos 4 ó 6, aunque éstas también se han estudiado por separado en fragmentos más pequeños. Tan solo en el estudio de las 3 transmembranas (TM2, TM3 y TM4), el fragmento fusionado era mayor, 70 aa (Fig. 9A). Podría suceder que al añadirle a CD44 un número mayor de aa, esta proteína de fusión quede retenida en el RE porque sea reconocida como una proteína extraña o no sea capaz de plegarse, por lo que podría no superar los controles de calidad del RE (Ellgaard and Helenius, 2003). Esto podría explicar el hecho de que la TM1 y el extremo N-terminal, así como la TM7 y el extremo C-terminal por separado, no sean capaces de producir la retención en el RE por sí solos, pero juntos sí.

En conclusión, son múltiples las regiones de POMT1 implicadas en la retención en el RE, señalando la importancia y la regulación de esta proteína mediante la interacción para formar heterodímeros POMT1-POMT2, o con otras proteínas que estén implicadas en la manosilación y el plegamiento de la proteína diana a su paso por el RE.

3. Interacción de POMT1 con DNAJB6

Las mutaciones en el gen *POMT1* son las más frecuentes en el WWS (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2002), aproximadamente un 25 % de los casos, si bien, también se han descrito mutaciones en otros genes minoritarios, causantes de WWS, desde *POMT2* (van Reeuwijk et al., 2005b), *fukutina* (de Bernabe et al., 2003) y (Cotarelo et al., 2008), *FKPR* (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2004), hasta *LARGE* (van Reeuwijk et al., 2007). Por ello, sigue existiendo un gran número de casos de enfermos con WWS en los que no se ha encontrado el gen responsable.

Anteriormente en nuestro laboratorio se realizó el ensayo de doble híbrido con objeto de buscar, tanto nuevas dianas de POMT1, como proteínas que interaccionasen con ella. Mutaciones en estos nuevos genes podrían ser causantes de los casos WWS aún sin determinar. Como ya se decía en la introducción, de entre todas las proteínas seleccionadas decidimos comprobar en un sistema celular la interacción de POMT1 y la chaperona DNAJB6, ya que esta última proteína producía interacción tanto con el lazo 1 como con el lazo 5 de POMT1, y también con los mismos lazos de POMT2. Ambas proteínas, POMT1 y DNAJB6, se expresan a altos niveles en testículo, tejido afectado en algunos pacientes de WWS (Hung et al., 1998). Además, POMT1 y POMT2 se detectan en el acrosoma de las espermátidas pero no el distroglicano, por lo que estas

enzimas podrían tener otra diana distinta del α -dístroglicano en estas células (Prados et al., 2007). Por todas estas razones, intentamos corroborar dicha interacción de POMT1 y DNAJB6 en un sistema celular mediante coimmunoprecipitación, pero el resultado no fue positivo debido a la insolubilidad de POMT1.

También hemos analizado si ambas proteínas colocalizaban en el RE, pero DNAJB6 sólo lo hacía en algunos casos, mientras que otras veces se encontraba en el núcleo o distribuida por todo el citoplasma. En estudios anteriores realizados por (Hanai and Mashima, 2003) se postulaba la existencia de dos isoformas de DNAJB6, una citoplasmática y otra nuclear, producidas por un procesamiento alternativo de mRNA en el que se pierde la posible secuencia de señalización nuclear. Sin embargo, en este trabajo de tesis se muestra que la supuesta isoforma citoplasmática (sin señalización nuclear) tiene ambas localizaciones: nuclear y citoplasmática. En los ensayos de inmunofluorescencia *in vivo* realizados, no conseguimos ver esa translocación para poder analizar si estaba relacionada con la división celular o algún otro proceso celular.

Esta translocación del citoplasma al núcleo también se ha descrito en otras chaperonas (Mandell and Feldherr, 1990). Y, recientemente, también se ha mostrado que la proteína Vpx (proteína viral x) del VIH-2 (virus de la inmunodeficiencia adquirida-2) interacciona con DNAJB6 (Cheng et al., 2008). Vpx es una proteína de 16 KDa del complejo de preintegración viral (PIC), implicada en el transporte nuclear y en el empaquetamiento y salida del virus de la célula. La sobreexpresión de DNAJB6 provoca un aumento en el transporte nuclear de Vpx y, al contrario, su silenciamiento reduce el importe de Vpx al núcleo. Esto demuestra que DNAJB6 debe estar implicada en el transporte al núcleo de determinadas proteínas. Todavía queda por elucidar si esta proteína realmente interacciona con POMT1, y su función como sustrato para el plegamiento de la misma, o como chaperona en el RE de proteínas que podrían ser manosiladas y posteriormente conducidas al núcleo.

4. Localización de POMT2 en el retículo endoplásmico y colocalización con POMT1

Hemos comprobado que POMT2 se localiza en el retículo endoplásmico, colocalizando con la calnexina y POMT1. Como ya hemos dicho, no hemos podido comprobar la interacción de POMT1 y POMT2 mediante coimmunoprecipitación por la insolubilidad de estas proteínas de membrana.

5. Obtención de clones de células ES^{Pomt1^{-/-}} para la generación de ratones quimeras

Otro abordaje muy usual para profundizar en el conocimiento de una enfermedad es su estudio en animales modelo como el ratón. Éstos permiten estudiar todos los tejidos afectados; además, podrían ayudar a clarificar la función de la proteína implicada en la patología en diversos tejidos y en distintos momentos del desarrollo, o en el caso del WWS mostrar indicios de otras proteínas que puedan ser también causantes de la enfermedad. El ratón “knock out” de *Pomt1*, realizado anteriormente en nuestro laboratorio, resultó ser letal embrionario debido a la incorrecta formación de la membrana de Reichert, que es una de las primeras membranas que se forman en el embrión y que es exclusiva de roedores (Willer et al., 2004). La ausencia de glicosilación del α -dístroglicano no permitía la unión de la laminina y por tanto la movilización de la misma en la formación de la membrana de Reichert.

Con el objeto de evitar este problema, en el laboratorio se llevó a cabo otra estrategia: la generación de ratones quimera mediante la implantación de blastocistos normales a los que previamente se les hayan introducido células ES^{Pomt1^{-/-}}. Estos ratones poseerán los dos alelos de *Pomt1* mutados en parte de sus células. En aquellos ratones en los que la membrana de Reichert se forme principalmente o únicamente a partir de las células ES con ambos alelos salvajes, el desarrollo embrionario podrá continuar, y sólo en aquellos tejidos donde la contribución de las células ES^{Pomt1^{-/-}} sea mayoritaria se verá su afectación, y podrá ser estudiada la función del gen *Pomt1*.

Para poder estudiar un mayor número de ratones quimera que los obtenidos en la primera microinyección realizada, y entre ellos, algunos con mayor grado de quimerismo, se repitió la microinyección del clon obtenido anteriormente. Pero no se consiguieron resultados positivos, probablemente por haber perdido su capacidad totipotente como células ES. Por esta razón, se realizó de nuevo la electroporación de la construcción para obtener un nuevo clon de células ES^{Pomt1^{-/-}}.

Como se indicó en resultados, en este trabajo de tesis se ha realizado el rastreo de la segunda electroporación de la construcción, en la que se han obtenido tres nuevos clones de células ES^{Pomt1^{-/-}}. La microinyección de estos tres clones en blastocistos y su posterior transferencia a hembras pseudogestantes, permitirá la obtención de un mayor número de ratones quimera, habiendo mayor probabilidad de obtener entre ellos algunos con mayor grado de quimerismo que presenten cambios fenotípicos. Estamos a la espera de obtener los ratones quimera de la microinyección de estos clones, ya que el

laboratorio con el que colaboramos para la realización de estas quimeras, ha tenido problemas de contaminación en las células ES con el virus de la hepatitis de ratón. En los ratones quimera que se obtengan se realizarán nuevamente ensayos de capacidad motora en Rota-rod, los estudios de ABR (“auditory brain response”) y de RMN (resonancia magnética nuclear), técnicas con las que se analizarán el estado de los principales tejidos afectados en el WWS: cerebro, músculo y ojo. También se realizarán estudios de inmunohistoquímica de estos tejidos y de aquéllos que muestren mayor grado de quimerismo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. POMT1 se localiza en el retículo endoplásmico en células HEK293T y COS-7, corroborando lo predicho en función de la localización de sus homólogas en levadura.
2. La interacción de POMT1 con DNAJB6, así como la interacción de POMT1 con POMT2, no se ha podido demostrar mediante los ensayos de coimmunoprecipitación realizados en este trabajo. Los estudios de inmunofluorescencia han permitido mostrar la colocalización subcelular de POMT1 y POMT2 en el retículo endoplásmico; mientras que DNAJB6 se localiza en el citoplasma, retículo endoplásmico y núcleo.
3. La retención en el retículo endoplásmico de POMT1 no se debe a una única señal en el extremo C-terminal, sino que son redundantes a lo largo de la proteína.
4. Todos los dominios transmembrana de POMT1, excepto el primero y el último, son capaces de producir retención en el retículo endoplásmico.
5. Los lazos citoplasmáticos de POMT1, lazo 4 y lazo 6, también provocan la retención en el retículo endoplásmico. Esta retención se debe probablemente a la asociación con proteínas del citoplasma u otras proteínas integrales del retículo endoplásmico, para la formación de complejos multiproteicos.
6. Los lazos luminales de POMT1, lazo 1 y lazo 5, también ocasionan la retención en el retículo endoplásmico, probablemente por la asociación con otras proteínas del retículo endoplásmico, como POMT2, para la formación de complejos multiproteicos.
7. El extremo C-terminal de POMT1 es el único fragmento que no produce retención en el retículo endoplásmico. Tanto los dominios transmembrana 1 y 7 como el extremo N-terminal, producen una retención parcial, por lo que podrían necesitar la presencia de otras secuencias para producir la retención completa; o bien, estar implicados en la recuperación de POMT1 desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico mediante un transporte retrógrado.

8. Se han obtenido tres clones de células ES^{Pomt1^{-/-}} con los que se realizará la microinyección en blastocistos para la obtención de quimeras *Pomt1^{-/-}*. Estas quimeras permitirán estudiar en aquellos tejidos que presenten un alto grado de quimerismo, cómo afecta la carencia de Pomt1 a los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AKASAKA-MANYA, K., MANYA, H., NAKAJIMA, A., KAWAKITA, M. & ENDO, T. (2006) Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem*, 281, 19339-45.
- BANCI, L., BERTINI, I., CANTINI, F., CIOFI-BAFFONI, S., GONNELLI, L. & MANGANI, S. (2004) Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*, 279, 34833-9.
- BARRE, L., MAGDALOU, J., NETTER, P., FOURNEL-GIGLEUX, S. & OUZZINE, M. (2005) The stop transfer sequence of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A determines localization to the endoplasmic reticulum by both static retention and retrieval mechanisms. *FEBS J*, 272, 1063-71.
- BARRESI, R. & CAMPBELL, K. P. (2006) Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*, 119, 199-207.
- BARRESI, R., MICHELE, D. E., KANAGAWA, M., HARPER, H. A., DOVICO, S. A., SATZ, J. S., MOORE, S. A., ZHANG, W., SCHACHTER, H., DUMANSKI, J. P., COHN, R. D., NISHINO, I. & CAMPBELL, K. P. (2004) LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med*, 10, 696-703.
- BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., CURRIER, S., STEINBRECHER, A., CELLI, J., VAN BEUSEKOM, E., VAN DER ZWAAG, B., KAYSERILI, H., MERLINI, L., CHITAYAT, D., DOBYNS, W. B., CORMAND, B., LEHESJOKI, A. E., CRUCES, J., VOIT, T., WALSH, C. A., VAN BOKHOVEN, H. & BRUNNER, H. G. (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*, 71, 1033-43.
- BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., VOIT, T., LONGMAN, C., STEINBRECHER, A., STRAUB, V., YUVA, Y., HERRMANN, R., SPERNER, J., KORENKE, C., DIESEN, C., DOBYNS, W. B., BRUNNER, H. G., VAN BOKHOVEN, H., BROCKINGTON, M. & MUNTONI, F. (2004) Mutations in the FKR1 gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*, 41, e61.
- BERRY, V., FRANCIS, P., REDDY, M. A., COLLYER, D., VITHANA, E., MACKAY, I., DAWSON, G., CAREY, A. H., MOORE, A., BHATTACHARYA, S. S. & QUINLAN, R. A. (2001) Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet*, 69, 1141-5.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BROCKINGTON, M., BLAKE, D. J., PRANDINI, P., BROWN, S. C., TORELLI, S., BENSON, M. A., PONTING, C. P., ESTOURNET, B., ROMERO, N. B., MERCURI, E., VOIT, T., SEWRY, C. A., GUICHENEY, P. & MUNTONI, F. (2001a) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*, 69, 1198-209.
- BROCKINGTON, M., YUVA, Y., PRANDINI, P., BROWN, S. C., TORELLI, S., BENSON, M. A., HERRMANN, R., ANDERSON, L. V., BASHIR, R., BURGUNDER, J. M., FALLET, S., ROMERO, N., FARDEAU, M., STRAUB, V., STOREY, G., POLLITT, C., RICHARD, I., SEWRY, C. A., BUSHBY, K., VOIT, T., BLAKE, D. J. & MUNTONI, F. (2001b) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*, 10, 2851-9.
- BRODSKY, J. L. & MCCRACKEN, A. A. (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 507-13.

- CHEN, C. A. & OKAYAMA, H. (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques*, 6, 632-8.
- CHENG, X., BELSHAN, M. & RATNER, L. (2008) Hsp40 facilitates nuclear import of the human immunodeficiency virus type 2 Vpx-mediated preintegration complex. *J Virol*, 82, 1229-37.
- CHIBA, A., MATSUMURA, K., YAMADA, H., INAZU, T., SHIMIZU, T., KUSUNOKI, S., KANAZAWA, I., KOBATA, A. & ENDO, T. (1997) Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem*, 272, 2156-62.
- COHN, R. D. (2005) Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord*, 15, 207-17.
- COHN, R. D. & CAMPBELL, K. P. (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 23, 1456-71.
- CORMAND, B., PIHKO, H., BAYES, M., VALANNE, L., SANTAVUORI, P., TALIM, B., GERSHONI-BARUCH, R., AHMAD, A., VAN BOKHOVEN, H., BRUNNER, H. G., VOIT, T., TOPALOGLU, H., DOBYNS, W. B. & LEHESJOKI, A. E. (2001) Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology*, 56, 1059-69.
- COSSON, P. & LETOURNEUR, F. (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, 263, 1629-31.
- COTARELO, R. P., VALERO, M. C., PRADOS, B., PENA, A., RODRIGUEZ, L., FANO, O., MARCO, J. J., MARTINEZ-FRIAS, M. L. & CRUCES, J. (2008) Two new patients bearing mutations in the fukutin gene confirm the relevance of this gene in Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet*, 73, 139-45.
- D'AMICO, A., TESSA, A., BRUNO, C., PETRINI, S., BIANCHERI, R., PANE, M., PEDEMONTE, M., RICCI, E., FALACE, A., ROSSI, A., MERCURI, E., SANTORELLI, F. M. & BERTINI, E. (2006) Expanding the clinical spectrum of POMT1 phenotype. *Neurology*, 66, 1564-7; discussion 1461.
- DE BERNABE, D. B., VAN BOKHOVEN, H., VAN BEUSEKOM, E., VAN DEN AKKER, W., KANT, S., DOBYNS, W. B., CORMAND, B., CURRIER, S., HAMEL, B., TALIM, B., TOPALOGLU, H. & BRUNNER, H. G. (2003) A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet*, 40, 845-8.
- DIESEN, C., SAARINEN, A., PIHKO, H., ROSENLEW, C., CORMAND, B., DOBYNS, W. B., DIEGUEZ, J., VALANNE, L., JOENSUU, T. & LEHESJOKI, A. E. (2004) POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet*, 41, e115.
- DOLATSHAD, N. F., BROCKINGTON, M., TORELLI, S., SKORDIS, L., WEVER, U., WELLS, D. J., MUNTONI, F. & BROWN, S. C. (2005) Mutated fukutin-related protein (FKRP) localises as wild type in differentiated muscle cells. *Exp Cell Res*, 309, 370-8.
- EL BAWAB, S., RODDY, P., QIAN, T., BIELAWSKA, A., LEMASTERS, J. J. & HANNUN, Y. A. (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem*, 275, 21508-13.
- ELLGAARD, L. & HELENIUS, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-91.
- ERVASTI, J. M. & CAMPBELL, K. P. (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, 122, 809-23.
- ESAPA, C. T., MCILHINNEY, R. A. & BLAKE, D. J. (2005) Fukutin-related protein mutations that cause congenital muscular dystrophy result in ER-retention of the mutant protein in cultured cells. *Hum Mol Genet*, 14, 295-305.

- FINNE, J., KRUSIUS, T., MARGOLIS, R. K. & MARGOLIS, R. U. (1979) Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J Biol Chem*, 254, 10295-300.
- GASSMANN, M., HALLER, C., STOLL, Y., AZIZ, S. A., BIERMANN, B., MOSBACHER, J., KAUPMANN, K. & BETTLER, B. (2005) The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol Pharmacol*, 68, 137-44.
- GEE, S. H., MONTANARO, F., LINDENBAUM, M. H. & CARBONETTO, S. (1994) Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell*, 77, 675-86.
- GENTZSCH, M. & TANNER, W. (1997) Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology*, 7, 481-6.
- GIRRBACH, V. & STRAHL, S. (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem*, 278, 12554-62.
- GIRRBACH, V., ZELLER, T., PRIESMEIER, M. & STRAHL-BOLSINGER, S. (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem*, 275, 19288-96.
- GODFREY, C., CLEMENT, E., MEIN, R., BROCKINGTON, M., SMITH, J., TALIM, B., STRAUB, V., ROBB, S., QUINLIVAN, R., FENG, L., JIMENEZ-MALLEBRERA, C., MERCURI, E., MANZUR, A. Y., KINALI, M., TORELLI, S., BROWN, S. C., SEWRY, C. A., BUSHBY, K., TOPALOGLU, H., NORTH, K., ABBS, S. & MUNTONI, F. (2007) Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*, 130, 2725-35.
- GODFREY, C., ESCOLAR, D., BROCKINGTON, M., CLEMENT, E. M., MEIN, R., JIMENEZ-MALLEBRERA, C., TORELLI, S., FENG, L., BROWN, S. C., SEWRY, C. A., RUTHERFORD, M., SHAPIRA, Y., ABBS, S. & MUNTONI, F. (2006) Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 60, 603-10.
- GREWAL, P. K., HOLZFEIND, P. J., BITTNER, R. E. & HEWITT, J. E. (2001) Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of alpha-dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat Genet*, 28, 151-4.
- HAMADA, T., TASHIRO, K., TADA, H., INAZAWA, J., SHIROZU, M., SHIBAHARA, K., NAKAMURA, T., MARTINA, N., NAKANO, T. & HONJO, T. (1996) Isolation and characterization of a novel secretory protein, stromal cell-derived factor-2 (SDF-2) using the signal sequence trap method. *Gene*, 176, 211-4.
- HANAI, R. & MASHIMA, K. (2003) Characterization of two isoforms of a human DnaJ homologue, HSJ2. *Mol Biol Rep*, 30, 149-53.
- HARDT, B., KALZ-FULLER, B., APARICIO, R., VOLKER, C. & BAUSE, E. (2003) (Arg)3 within the N-terminal domain of glucosidase I contains ER targeting information but is not required absolutely for ER localization. *Glycobiology*, 13, 159-68.
- HATA, M. & OHTSUKA, K. (2000) Murine cDNA encoding a novel type I HSP40/DNAJ homolog, mmDjA4(1). *Biochim Biophys Acta*, 1493, 208-10.
- HOOPER, M., HARDY, K., HANDYSIDE, A., HUNTER, S. & MONK, M. (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326, 292-5.
- HUNG, N. A., SILVER, M. M., CHITAYAT, D., PROVIAS, J., TOI, A., JAY, V. & BECKER, L. E. (1998) Gonadoblastoid testicular dysplasia in Walker-Warburg syndrome. *Pediatr Dev Pathol*, 1, 393-404.
- HUTZLER, J., SCHMID, M., BERNARD, T., HENRISSAT, B. & STRAHL, S. (2007) Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7827-32.
- IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., ERVASTI, J. M., LEVEILLE, C. J., SLAUGHTER, C. A., SERNETT, S. W. & CAMPBELL, K. P. (1992) Primary structure of dystrophin-

- associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355, 696-702.
- ICHIMIYA, T., MANYA, H., OHMAE, Y., YOSHIDA, H., TAKAHASHI, K., UEDA, R., ENDO, T. & NISHIHARA, S. (2004) The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity. *J Biol Chem*, 279, 42638-47.
- JACKSON, M. R., NILSSON, T. & PETERSON, P. A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 9, 3153-62.
- KANAGAWA, M., SAITO, F., KUNZ, S., YOSHIDA-MORIGUCHI, T., BARRESI, R., KOBAYASHI, Y. M., MUSCHLER, J., DUMANSKI, J. P., MICHELE, D. E., OLDSTONE, M. B. & CAMPBELL, K. P. (2004) Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*, 117, 953-64.
- KAPPELER, F., KLOPFENSTEIN, D. R., FOGUET, M., PACCAUD, J. P. & HAURI, H. P. (1997) The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J Biol Chem*, 272, 31801-8.
- KOBAYASHI, K., NAKAHORI, Y., MIYAKE, M., MATSUMURA, K., KONDO-IIDA, E., NOMURA, Y., SEGAWA, M., YOSHIOKA, M., SAITO, K., OSAWA, M., HAMANO, K., SAKAKIHARA, Y., NONAKA, I., NAKAGOME, Y., KANAZAWA, I., NAKAMURA, Y., TOKUNAGA, K. & TODA, T. (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 394, 388-92.
- KUNZE, D., FUESSEL, S., MEYE, A., WIRTH, M. P. & SCHMIDT, U. (2006) Functional analyses of C13orf19/P38IP in prostate cell lines. *Oncol Rep*, 15, 1599-604.
- KURAHASHI, H., TANIGUCHI, M., MENO, C., TANIGUCHI, Y., TAKEDA, S., HORIE, M., OTANI, H. & TODA, T. (2005) Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis*, 19, 208-17.
- LEWIS, M. J. & PELHAM, H. R. (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature*, 348, 162-3.
- LIU, J., BALL, S. L., YANG, Y., MEI, P., ZHANG, L., SHI, H., KAMINSKI, H. J., LEMMON, V. P. & HU, H. (2006) A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech Dev*, 123, 228-40.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, L., MASUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL, J. (1999) *Molecular Cell Biology*.
- LONGMAN, C., BROCKINGTON, M., TORELLI, S., JIMENEZ-MALLEBRERA, C., KENNEDY, C., KHALIL, N., FENG, L., SARAN, R. K., VOIT, T., MERLINI, L., SEWRY, C. A., BROWN, S. C. & MUNTONI, F. (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet*, 12, 2853-61.
- MANDELL, R. B. & FELDHERR, C. M. (1990) Identification of two HSP70-related *Xenopus* oocyte proteins that are capable of recycling across the nuclear envelope. *J Cell Biol*, 111, 1775-83.
- MANYA, H., CHIBA, A., YOSHIDA, A., WANG, X., CHIBA, Y., JIGAMI, Y., MARGOLIS, R. U. & ENDO, T. (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 500-5.
- MARTIN-BLANCO, E. & GARCIA-BELLIDO, A. (1996) Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6048-52.
- MERCURI, E., D'AMICO, A., TESSA, A., BERARDINELLI, A., PANE, M., MESSINA, S., VAN REEUWIJK, J., BERTINI, E., MUNTONI, F. & SANTORELLI, F. M. (2006) POMT2 mutation in a patient with 'MEB-like' phenotype. *Neuromuscul Disord*, 16, 446-8.

- MEUNIER, L., USHERWOOD, Y. K., CHUNG, K. T. & HENDERSHOT, L. M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell*, 13, 4456-69.
- MICHELSSEN, K., YUAN, H. & SCHWAPPACH, B. (2005) Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep*, 6, 717-22.
- MORTON-JONES, R. T., CANNELL, M. B. & HOUSLEY, G. D. (2007) Ca(2+) entry via AMPA-type glutamate receptors triggers Ca(2+)-induced Ca(2+) release from ryanodine receptors in rat spiral ganglion neurons. *Cell Calcium*.
- MUNTONI, F., BROCKINGTON, M., TORELLI, S. & BROWN, S. C. (2004) Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*, 17, 205-9.
- MURAKAMI, T., HAYASHI, Y. K., NOGUCHI, S., OGAWA, M., NONAKA, I., TANABE, Y., OGINO, M., TAKADA, F., ERIGUCHI, M., KOTOOKA, N., CAMPBELL, K. P., OSAWA, M. & NISHINO, I. (2006) Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol*, 60, 597-602.
- NISHIMURA, N. & BALCH, W. E. (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*, 277, 556-8.
- NORIO, R. (2003) Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum Genet*, 112, 441-56.
- PARKER, A. K., GERGELY, F. V. & TAYLOR, C. W. (2004) Targeting of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to the endoplasmic reticulum by multiple signals within their transmembrane domains. *J Biol Chem*, 279, 23797-805.
- PEI, L. (1999) Pituitary tumor-transforming gene protein associates with ribosomal protein S10 and a novel human homologue of DnaJ in testicular cells. *J Biol Chem*, 274, 3151-8.
- PELHAM, H. R. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 15, 483-6.
- PENG, H. B., ALI, A. A., DAGGETT, D. F., RAUVALA, H., HASSELL, J. R. & SMALHEISER, N. R. (1998) The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun*, 5, 475-89.
- PONTA, H., SHERMAN, L. & HERRLICH, P. A. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 33-45.
- PONTING, C. P. (2000) Novel repeats in ryanodine and IP3 receptors and protein O-mannosyltransferases. *Trends Biochem Sci*, 25, 48-50.
- PRADOS, B., PENA, A., COTARELO, R. P., VALERO, M. C. & CRUCES, J. (2007) Expression of the murine Pomt1 gene in both the developing brain and adult muscle tissues and its relationship with clinical aspects of Walker-Warburg syndrome. *Am J Pathol*, 170, 1659-68.
- RAPOPORT, T. A. (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450, 663-9.
- SAITO, F., MASAKI, T., SAITO, Y., NAKAMURA, A., TAKEDA, S., SHIMIZU, T., TODA, T. & MATSUMURA, K. (2007) Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation in fukutin-deficient chimeric mice. *J Neurochem*, 101, 1712-22.
- SATO, M., SATO, K. & NAKANO, A. (1996) Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, 134, 279-93.
- SCHMIDT, U., FUESSEL, S., HAASE, M., KRAEMER, K., MEYE, A. & WIRTH, M. P. (2005) Quantification of C13orf19/P38IP mRNA expression by quantitative real-time PCR in patients with urological malignancies. *Cancer Lett*, 225, 253-60.
- SCHUTZE, M. P., PETERSON, P. A. & JACKSON, M. R. (1994) An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 13, 1696-705.

- SCIANDRA, F., BOZZI, M., BIANCHI, M., PAVONI, E., GIARDINA, B. & BRANCACCIO, A. (2003) Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita*, 39, 173-81.
- STRAHL-BOLSINGER, S., GENTZSCH, M. & TANNER, W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1426, 297-307.
- STRAHL-BOLSINGER, S., IMMERVOLL, T., DEUTZMANN, R. & TANNER, W. (1993) PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8164-8.
- STRAHL-BOLSINGER, S. & SCHEINOST, A. (1999) Transmembrane topology of pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem*, 274, 9068-75.
- SUGITA, S., SAITO, F., TANG, J., SATZ, J., CAMPBELL, K. & SUDHOF, T. C. (2001) A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, 154, 435-45.
- TODA, T. & KOBAYASHI, K. (1999) Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: the first human disease to be caused by an ancient retrotransposal integration. *J Mol Med*, 77, 816-23.
- TORELLI, S., BROWN, S. C., BROCKINGTON, M., DOLATSHAD, N. F., JIMENEZ, C., SKORDIS, L., FENG, L. H., MERLINI, L., JONES, D. H., ROMERO, N., WEWER, U., VOIT, T., SEWRY, C. A., NOGUCHI, S., NISHINO, I. & MUNTONI, F. (2005) Sub-cellular localisation of fukutin related protein in different cell lines and in the muscle of patients with MDC1C and LGMD2I. *Neuromuscul Disord*, 15, 836-43.
- VAN ANKEN, E. & BRAAKMAN, I. (2005) Endoplasmic reticulum stress and the making of a professional secretory cell. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40, 269-83.
- VAN REEUWIJK, J., BRUNNER, H. G. & VAN BOKHOVEN, H. (2005a) Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet*, 67, 281-9.
- VAN REEUWIJK, J., GREWAL, P. K., SALIH, M. A., BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., MCLAUGHLAN, J. M., MICHELSE, C. B., HERRMANN, R., HEWITT, J. E., STEINBRECHER, A., SEIDAHMED, M. Z., SHAHEED, M. M., ABOMELHA, A., BRUNNER, H. G., VAN BOKHOVEN, H. & VOIT, T. (2007) Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet*, 121, 685-90.
- VAN REEUWIJK, J., JANSSEN, M., VAN DEN ELZEN, C., BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., SABATELLI, P., MERLINI, L., BOON, M., SCHEFFER, H., BROCKINGTON, M., MUNTONI, F., HUYNEN, M. A., VERRIPS, A., WALSH, C. A., BARTH, P. G., BRUNNER, H. G. & VAN BOKHOVEN, H. (2005b) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*, 42, 907-12.
- VICART, P., CARON, A., GUICHENEY, P., LI, Z., PREVOST, M. C., FAURE, A., CHATEAU, D., CHAPON, F., TOME, F., DUPRET, J. M., PAULIN, D. & FARDEAU, M. (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 20, 92-5.
- WANG, H. G., RAPP, U. R. & REED, J. C. (1996) Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, 87, 629-38.
- WILLER, T., AMSELGRUBER, W., DEUTZMANN, R. & STRAHL, S. (2002) Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology*, 12, 771-83.
- WILLER, T., PRADOS, B., FALCON-PEREZ, J. M., RENNER-MULLER, I., PRZEMECK, G. K., LOMMEL, M., COLOMA, A., VALERO, M. C., DE ANGELIS, M. H., TANNER, W., WOLF, E., STRAHL, S. & CRUCES, J. (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene Pomt1 in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14126-31.
- WILLER, T., VALERO, M. C., TANNER, W., CRUCES, J. & STRAHL, S. (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 621-30.

- WILSON, D. W., LEWIS, M. J. & PELHAM, H. R. (1993) pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem*, 268, 7465-8.
- XIONG, H., KOBAYASHI, K., TACHIKAWA, M., MANYA, H., TAKEDA, S., CHIYONOBU, T., FUJIKAKE, N., WANG, F., NISHIMOTO, A., MORRIS, G. E., NAGAI, Y., KANAGAWA, M., ENDO, T. & TODA, T. (2006) Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 935-41.
- YAMAMOTO, T., KAWAGUCHI, M., SAKAYORI, N., MURAMATSU, F., MORIKAWA, S., KATO, Y., SHIBATA, N. & KOBAYASHI, M. (2006) Intracellular binding of fukutin and alpha-dystroglycan: relation to glycosylation of alpha-dystroglycan. *Neurosci Res*, 56, 391-9.
- YOSHIDA, A., KOBAYASHI, K., MANYA, H., TANIGUCHI, K., KANO, H., MIZUNO, M., INAZU, T., MITSUHASHI, H., TAKAHASHI, S., TAKEUCHI, M., HERRMANN, R., STRAUB, V., TALIM, B., VOIT, T., TOPALOGLU, H., TODA, T. & ENDO, T. (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*, 1, 717-24.

