



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización funcional de la mutación c.303 G>C en la isoforma del177 del transportador de CMP-ácido Siálico”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Rebeca González Ortiz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez  
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera  
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Tomás David López Díaz  
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Resumen

Los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG) son un conjunto de síndromes multi-sistémicos, causados por mutaciones en los genes que participan en diversos procesos necesarios para realizar la glicosilación, un ejemplo de estos síndromes es el SLC35A1-CDG que deriva de mutaciones presentes en el *SLC35A1* que codifica para el transportador de CMP- Ácido siálico.

La mutación c.303 G>C (Gln101His) reportada por Mohamed et al. (2013) es una mutación puntual en un dominio indispensable (TM3) para el funcionamiento del transportador, lo que genera una reducción del 50% del transporte de CMP-Ácido siálico, sin embargo, permite el transporte, lo que demuestra que la mutación c.303 no es inactivante.

El gen *SLC35A1* presenta 5 isoformas (wt, del160, del244, del177 y del130). La isoforma del177 tiene una delección de 177 pb causada por pérdida total del exón 6. A pesar de ello, la isoforma tiene la capacidad de transportar CMP-Sia. En el presente trabajo se propuso que la mutación c.303 G>C (Gln101His) no reduce el transporte en la isoforma del177 debido a que su interacción podría ser distinta en dicha isoforma con respecto al transcrito wt. Para ello, se diseñaron construcciones de plásmidos que presentaran esta mutación, tanto en la wt como en las del177, evaluando así su efecto en un ensayo de resistencia a la lectina RCA, cuyo grado de toxicidad se reduce con base en el grado de sialilación que se obtiene en células Lec2, las cuales son deficientes en transporte de CMP-Sia.

La comparación entre el nivel de proliferación de las células transfectadas con el plásmido del177 y las células transfectadas con el plásmido del177c.303 demostró (a las 24h y 48h de la cinética), que el comportamiento de del177c.303 respecto a del177 es el mismo. Lo que demuestra que la isoforma del177 con el cambio de amino ácido Gln101His generado por la c.303G>C no muestra un cambio significativo en el transporte de ácido siálico, por lo que la mutación puntual c.303 G>C no afecta la función de la isoforma del177-SLC35A1 humana”.

A Josefina, por enseñarme que no importa la adversidad siempre hay que mostrar la mejor versión de nosotros, a René por enseñarme que lo inesperado puede ser lo mejor que te pase en el mundo y a Isabel por enseñarme a nunca rendirme.

## **Agradecimientos**

A Conacyt 820763 por la Beca otorgada y a Conacyt 279765, Red Temática Glicociencia en Salud.

A mis revisores y tutores por su tiempo y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez, Doc, gracias por los consejos y la orientación durante tantos años, lo admiro y aprecio mucho.

A la Dra. Roberta Salinas Marin, Rob gracias por la orientación y los consejos, así como cada revisión y repaso, sobretodo en mi primer semestre de maestría, te admiro, gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Diego, Lya, Sandra, Selena, Brenda, Anix, Ana Lau, Tania, Kathya y Alberto, gracias por cada canción, café y por el apoyo, sobre todo en tutorales.

A la Dra. Katerina Lira Ruan, Dra., mil gracias por cada duda existencial, y apoyo a lo largo de mi formación, tanto personal como profesional, la quiero.

A la Dra. Kathya Gutiérrez Huante, Kat, gracias por cada consejo, y sobre todo por escucharme en mis momentos de frustración, te quiero.

A la Dra. Tania María Villanueva Cabello, Tan, mil gracias por todo el apoyo, paciencia y cariño, por ser mi maestra a lo largo de mi formación pero también mi amiga, sabes que tanto a ti como a Romi las quiero mucho.

A la M. en C. Angélica Ortega García, Angie que te digo que no sepas, muchísimas gracias por siempre estar ahí para mí, resolviéndome dudas, asesorándome, jalándome la oreja cuando era necesario, eres y serás parte de cada etapa en mi formación y por eso estoy infinitamente agradecida; por el lado personal que te digo, sabes que eres mi mamá del lab y estoy totalmente agradecida por tenerte ahí para mí como amiga, por cada consejo y toda la paciencia, sabes que a mis niños y a ti los quiero muchísimo.

Al Lic. Luis Mendoza, Luis gracias por todo tu apoyo y cariño durante los años de este proyecto, te quiero y extraño.

A la Lic. Sara, M. en C. Linda y M. en C Nadia, chicas saben que las quiero con todo mi corazón y que después de 10 años de estar al lado una de la otra, tienen mi amor, confianza y lealtad hasta que seamos viejitas, gracias por el apoyo incondicional, cada año que hemos pasado ha sido maravilloso y los que nos faltan. Linda, gracias por cada plática de pasillo, por escucharme a pesar del estrés que tienes, por eso y más te quiero muchísimo. Sara, cada plática en el citómetro o en tu lab, o entre pasillos, sin importar que tan larga o corta, siempre motiva a seguir a pesar de cualquier cosa, por eso y más te quiero muchísimo. Nad, cada vez que te veo es un respiro, un cambio de aire, tienes esa capacidad de hacer que las personas se sientan reconfortadas, gracias por eso y sobre todo por tu honestidad, por eso y más te quiero muchísimo

A la Lic. Diana, sunny que te digo, llevamos 10 años de conocernos y enserio eres de esas amigas que van a durar para siempre a pesar de la distancia y el tiempo te admiro.

Gracias por estar ahí siempre, por los años que hemos pasado y por los que nos faltan, sabes que siempre estaré ahí sin importar la hora, o el lugar, te quiero muchísimo.

A la Lic. Paola, Pao que te digo que no sepas ya, van 10 años de amistad y confianzas, de apoyarnos mutuamente y estar ahí la una para la otra, la vida me dio una hermana biológica, pero me regaló dos hermanas de diferente mamá, y tú eres una de ellas, sabes que cuentas conmigo en lo que sea y cuando sea, te admiro y respeto muchísimo, a Luna bebé y a ti las quiero muchísimo.

A la M. en C. Mildred, Mili eres mi hermana de diferente mamá, después de 10 años que te digo que no sepas ya, literal eres mi confidente total, mi cómplice, y mi persona, sin importar la hora, o como te sientas siempre estás ahí, no importa la distancia física siempre te siento cerquita, así que le agradezco chorros a la vida porque formes parte de mi vida, muchas gracias, te quiero muchísimo.

A mi familia por el amor y apoyo incondicional, gracias Bran, Jenny, Tiuchis, Tía edy, Tío José Luis, Jopi, Juan, los amo.

A Josefina y Felipe, aunque no están aquí, gracias, los amo con toda mi alma, fueron, son y serán parte fundamental de cada momento en mi vida.

René, eres la mejor serendipia que me pudo pasar, te amo con toda mi alma y mi ser enano.

A la Psic. Diana Ortiz, gordita, carnal, hermana, sisterna, mejor amiga de sangre, Di, eres un regalo de vida, ese alguien que pase lo que pase estará ahí. Gracias por la paciencia y la fe incondicional en mí, te amo con toda mi alma.

A Isabel Ortiz, Isabelisima, mami, ma, mamá, gracias por aguantarme más allá de lo humano (esperar por mi dos 24 de diciembre porque tenía que sacar células y pasar parte del fin de año por lo mismo), haz sido, eres y serás mi compañera, mi apoyo incondicional y parte de mi motor de vida, soy la persona más afortunada por tenerte de guía y soporte. Sin ti este trabajo no hubiera existido, gracias por todo mamita te amo con toda el alma y con todo mi ser.

Lista de Tablas .....	9
Lista de abreviaturas .....	10
Índice de Figuras .....	11
1.0 Introducción.....	13
1.1 Glicosilación .....	13
1.2 Desordenes Congénitos de la Glicosilación .....	14
1.3 Sialilación Celular.....	15
1.4 Transportadores de Nucleótido-Carbohidrato.....	16
Tabla 2. Familia de transportadores humanos SLC35.....	19
Tabla 3. Transportadores en donde se han reportado CDG.....	20
2.0 Antecedentes.....	21
2.1 El transportador de CMP-Ácido Siálico.....	21
2.2 SLC35A1-CDG: Enfermedades asociadas a mutaciones en <i>SLC35A1</i> .....	25
Tabla 8. Pacientes reportados con SLC35A1-CDG.....	26
2.3 Modelo de Complementación CHO y Lec2.....	27
2.4 La isoforma funcional del177 del <i>SLC35A1</i> .....	27
3.0 Hipótesis.....	32
4.0 Objetivos .....	32
4.1 General.....	32
4.2 Particulares.....	32
5.0 Justificación .....	33
6.0 Estrategia experimental .....	34
7.0 Metodología.....	35
7.1 Células competentes .....	35
7.2 Mutagénesis sitio dirigida.....	35
7.2.1 Eficiencia del proceso de mutagénesis sitio Dirigida.....	35
7.2.3 Fosforilación de oligonucleótidos.....	36
7.2.4 Inducción de la mutación c.303 G>C.....	37
7.3 Transformación bacteriana.....	37
7.4 Purificación alcalina de plásmido .....	38
7.5 Identificación de la mutación por PCR-ARMS.....	38
7.6 Ensayo de restricción.....	39
7.7 Secuenciación.....	39
7.8 Complementación genética en el modelo CHO-Lec2.....	40
7.8.1 Cultivo y transfección de células CHO y Lec2.....	40

7.8.2	Análisis de las líneas celulares obtenidas.....	40
7.8.3	Ensayo con RCA I.....	41
7.8.4	actividad metabólica utilizando MTT.....	41
7.8.5	Análisis estadístico del MTT.....	41
8.0	Resultados.....	42
8.1	Mutagénesis sitio Dirigida de la c. 303 G>C en el <i>SLC35A1</i> .....	42
8.2	Verificación de la clona $\beta 5$ .....	43
8.3	Mutagénesis sitio dirigida de la c. 303 G>C en el <i>del177</i> .....	44
8.4	Verificación de la clona $\theta 1$ .....	45
8.5	Transfección de plásmidos mediante lipofectamina utilizando el sistema Lec2.....	46
8.6	Complementación genética.....	48
8.6.1	Transfección de plásmidos: PV, Wt, Wtc.303, del177 y del177c.303.....	48
8.6.2	Análisis de citotoxicidad con la lectina RCA-1.....	50
8.6.3	Ensayo de citotoxicidad utilizando MTT.....	50
9.0	Discusión y Conclusiones.....	56
9.1	Validación de antecedentes.....	56
9.3	Caracterización de la mutación puntual c.303g>c en la isoforma del177.....	56
10.0	Perspectivas.....	58
11.0	Apéndice.....	59
11.1	Glicoconjugados.....	59
11.2	Glicobiología.....	59
11.3	N-Glicosilación.....	59
11.4	O-Glicosilación.....	61
11.5	Gangliósidos y Anclas de GPI.....	63
11.5.1	Anclas de GPI.....	63
11.5.2	Glicolípidos.....	64
11.6	Nomenclatura empleada al nombrar un CDG.....	64
11.7	MTT.....	64
12.0	Bibliografía.....	66
13.0	Anexos.....	71
13.1	Tablas.....	71
	Tabla 1. Localización de los transportadores de nucleótido-carbohidrato presentes en mamíferos.....	71
	Tabla 5. Modificaciones que afectan el reconocimiento del CMP-ácido siálico.....	73
	Tabla 6. Modificaciones que afectan el transporte del CMP-ácido siálico.....	74

Tabla 7. Modificaciones que afectan la localización del CMP-ácido siálico .....	81
13.2 Medios y soluciones .....	84
13.2.1 Soluciones .....	84
13.2.2 Medios .....	86
13.3 Figuras suplementarias .....	87
13.4 Resultados suplementarios .....	94
13.4.1 Eficiencia de transformación-mutación .....	94
13.4.2 Selección de clona con c.303 G>C en el <i>SLC35A1</i> .....	96
13.4.3 Selección de clona con c.303G>C en la isoforma <i>del177</i> .....	98

## LISTA DE TABLAS

---

Tabla 1. Localización de los transportadores de nucleótido-carbohidrato presentes en mamíferos

Tabla 2. Familia de transportadores humanos SLC35

Tabla 3. Transportadores en donde se han reportado CDG

Tabla 4. Composición de aminoácidos presentes en cada región del SLC35A1

Tabla 5. Modificaciones que afectan el reconocimiento del CMP-Ácido Siálico

Tabla 6. Modificaciones que afectan el transporte del CMP-Ácido Siálico

Tabla 7. Modificaciones que afectan la localización del CMP-Ácido Siálico

Tabla 8. Pacientes reportados con SLC35A1-CDG

Tabla 9. Oligonucleótidos

Tabla 10. Fosforilación de oligonucleótidos

Tabla 11. Reacción de PCR para inducir la mutación c.303 G>C

Tabla 12. Termociclaje empleado en la reacción de mutagénesis c.303 G>C

Tabla 13. Ligación del plásmido producto de la mutagénesis c.303 G>C

Tabla 14 Reacción de PCR-ARMS

Tabla 15. Termociclaje empleado en PCR-ARMS

Tabla 16. Digestión del plásmido con la mutación c.303 utilizando Aval

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

CDG	Desorden Congénito de la Glicosilación
CHO	Células de ovario de hámster chino
Lec2	Células derivadas de CHO
Match 1	Cepa Bacteriana de <i>E. Coli</i>
Wt	Plásmido con el <i>SLC35A1</i>
del177	Plásmido con la isoforma del177
Wtc.303	Plásmido con el <i>SLC35A1</i> c.303 G>C
Ø1	Plásmido con la isoforma del177 c.303 G>C
RCA I	Lectina que reconoce galactosa
Lectina	Proteína que tiene un sitio de reconocimiento para carbohidratos
Sia	Ácido siálico
CMP-Sia	CMP- Ácido siálico
<i>slc35a1</i>	Gen que codifica para el trasportador de CMP-Sia de hámster
<i>SLC35A1</i>	Gen que codifica para el trasportador de CMP-Sia
<i>SLC35A1c.303C&gt;G</i>	Gen con la mutación c.303 C>G que codifica para el trasportador de CMP-Sia
SLC35A1 (CMP-Sia)	Transportador de CMP-Sia
del177	Isoforma del trasportador de CMP-Sia
<i>del177</i>	Isoforma del177 del trasportador de CMP-Sia
<i>del177c.303C&gt;G</i>	Gen con la mutación c.303 C>G que codifica para la isoforma del177 del trasportador de CMP-Sia
MTT	Sal de tetrazolio

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1. Glicoconjugados presentes en una célula humana
- Figura 2. Proceso de sialilación celular
- Figura 3. Transportadores de Nucleótido Carbohidratos, presentes en mamíferos
- Figura 4. Transporte de tipo anti porteen los NTS
- Figura 5. Modelo estructural del transportador de CMP-Ácido siálico
- Figura 6. Motivo que reconoce el CMP-Sia
- Figura 7. Mutaciones reportadas en pacientes con SLC35A1-CDG
- Figura 8. Validación de la funcionalidad de la isoforma del177 del SLC35A1
- Figura 9. Representación gráfica de la PCR-ARMS para detectar la mutación c.303 G>C
- Figura 10. Vector Topo 3.3 que contiene el inserto del *SLC35A1* y la isoforma del177
- Figura 11. Validación del kit: mutagénesis con el vector LacZ
- Figura 12. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*
- Figura 13. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*: producto de transformación
- Figura 14. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*: selección de clona
- Figura 15. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*: verificación de clona  $\beta 5$
- Figura 16. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*
- Figura 17. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*: producto de transformación
- Figura 18. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*: selección de clona
- Figura 19. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*: verificación de la clona  $\Theta 1$
- Figura 20. Transfección de los plásmidos *Wtc.303* y *del177c.303* lipofectamina
- Figura 21. Transfección de los plásmidos PV, Wt, *del177*, *Wtc.303* y *del177c.303*: análisis molecular
- Figura 22. Análisis de citotoxicidad utilizando la lectina RCA I en células CHO, Lec2 *Wtc.303* y *del177c.303*
- Figura 23. Ensayo de MTT: análisis de citotoxicidad utilizando la lectina RCA I en células CHO, Lec2, PV, Wt, *del177*, *Wtc.303* y *del177c.303* a 24h y 48h.

Figura 24. Ensayo de MTT: comparación de células CHO y Lec2; Wt y Wtc.303; del177 y del177c.303 a 24h y 48h.

Figura 25. Comparación de proliferación: en células del177 y del177c.303 a 24h y 48h con y sin RCA I.

Figura 26. Biosíntesis del glicano precursor

Figura 27. Maduración del *N*-Glicoconjugado

Figura 28. Tipos de *O*-glicoconjugados presentes en una célula humana

Figura 29. Glicoesfingolípidos

Figura 30. Gangliósidos

Figura 31. Estructura de la molécula MTT

Figura 32. Mecanismo de citotoxicidad mediado por RCA I

Figura 33. Comparación entre células control: CHO-PV y Lec2-PV

Figura 34. Comparación entre células control: CHO-Wt y CHO-del177

Figura 35. Comparación entre células control: Wt-del177 y Wtc.303-del177c.303

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 GLICOSILACIÓN

La glicosilación es una modificación co- y post traduccional mediante la cual un carbohidrato es unido covalentemente a una proteína, lípido o un carbohidrato (glicano), generando así macro moléculas conocidas como glicoconjugados (1). Para que dicho proceso se realice, se requiere la integralidad de dos elementos indispensables para la glicosilación, la síntesis y transporte de nucleótido-carbohidratos y la actividad enzimática secuencial y organizada de glicosiltransferasas y glicosidasas.

En los seres humanos, los tipos de glicoconjugados incluyen: *N*-glicoproteínas, *O*-glicoproteínas, anclas de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), glicolípidos y proteoglicanos (1), figura 1.

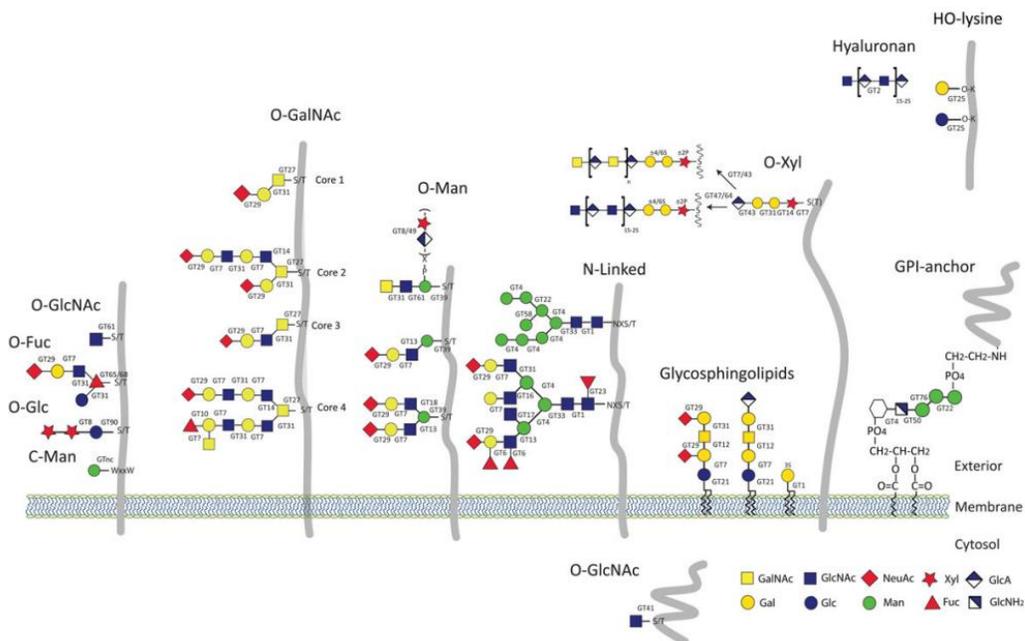


Figura 1. Glicoconjugados presentes en una célula humana. En esta figura se muestran todos los glicoconjugados que pueden estar presentes en la membrana de una célula humana. Lars Hansen (2015). *Glycobiology*, 211-224.

La glicosilación define múltiples procesos biológicos (fisiológicos y patológicos) mediante su participación en control de calidad de las proteínas, interacción entre ligando y su receptor (propios y extraños), estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas, etc. Algunas de las funciones celulares en las que participa de forma importante incluyen la defensa contra patógenos, en el desarrollo embrionario, en la migración celular, así como mecanismo de señalización celular, la adhesión celular, interacción célula-matriz extracelular, así como en funciones neurales e inmunes, en el proceso metastásico, en la formación de placas beta amiloides, por mencionar algunos ejemplos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Aunque este proceso tiene una regulación genética estricta, la glicosilación puede ser influida por el estado metabólico de la célula, incluyendo los efectos causados por la dieta (1). También puede verse afectada debido a alteraciones adquiridas que desencadenan anomalías en el patrón de glicosilación, dando origen a glicanos aberrantes como los que se encuentran presentes en patologías como el cáncer, pero también debido a anomalías congénitas como es el caso de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación.

## 1.2 DESORDENES CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN

---

Los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG) son un conjunto de síndromes multi-sistémicos, causados por mutaciones en los genes que participan en diversos procesos necesarios para realizar la glicosilación y que afectan: a) activación-transporte de glicosil-nucleótidos y síntesis de azúcares unidos a anclas lipídicas (dolicol); b) síntesis y modificación de glicanos y c) homeostasis del aparato de Golgi y tráfico celular (1, 11, 12, 13, 14, 39).

Los CDG pueden ocurrir de manera directa, es decir, cuando enzimas que participan en la adición o remoción de monosacáridos, así como los transportadores de nucleótido-carbohidrato se ven afectados; o de manera indirecta, cuando las condiciones que se necesitan para que este proceso ocurra de manera adecuada son alteradas, como es el caso del pH del Golgi (ej. ATP6V0A2-CDG) (9, 10)

La causa o efecto de estos síndromes ha sido estudiado en las vías de O-Fucosilación, O-Glucosilación, O-GalNAcilación, O-GlcNAcilación, N-glicosilación, síntesis de glicolípidos, anclas de GPI,  $\alpha$ -dístroglicanos y glicosaminoglicanos (15, 16). A su vez se clasifican en

tipo I y II; los de tipo I son aquellos en los que el proceso de glicosilación se ve afectado en el citosol o RE; en los desórdenes de tipo II el proceso de glicosilación está alterado exclusivamente en el aparato de Golgi (12, 13, 14, 15).

### 1.3 SIALILACIÓN CELULAR

---

La biosíntesis del ácido N-Acetil-neuramínico o ácido siálico (Sia) es un proceso metabólico que se lleva a cabo en el citosol partiendo de la activación de una molécula de glucosa, seguida de un conjunto de pasos secuenciales que llevan a la formación de *N*-Acetil-manosamina (ManNAc), molécula comprometida a la biosíntesis de *novo* del Sia. La biosíntesis concluye en cuanto el Sia es activado en el núcleo a través de hidrolizar una molécula de CTP, formando CMP- ácido siálico (CMP-Sia), el cuál regresa al citosol para poder ser transportado al aparato de Golgi. La adición de Sia en el extremo reductor de los glicanos, mediado por la actividad de las sialiltransferasas, se lleva a cabo en el lumen del aparato de Golgi; el proceso se asegura cuando el transportador de CMP-Sia transporta del citoplasma al lumen de la cisterna trans del aparato de Golgi a la molécula CMP-Sia. Una vez en el lumen, las sialiltransferasas transfieren ácido siálico en enlaces  $\alpha$ 2-3 y  $\alpha$ 2-6 a residuos de galactosa (Gal) y *N*-Acetil-galactosamina (GalNAc) y en enlace  $\alpha$ 2-8 a residuos de Sia.

El ácido siálico una vez transferido puede ser recuperado mediante reciclaje de los glicoconjugados, siendo liberado por enzimas reductoras conocidas como sialidasas, las cuales están capacitadas para la remoción de residuos de CMP-Sia. Este proceso inicia en la superficie celular y concluye en los lisosomas (1).

El proceso de sialilación celular puede resumirse entonces como una glicosilación terminal que requiere de varios subprocesos asociados: 1) Biosíntesis del CMP-Sia, 2) Transporte de CMP-Sia, 3) Adición del CMP-Sia a glicoconjugados, 4) Reciclaje y degradación del ácido siálico, pasos descritos en la figura 2.

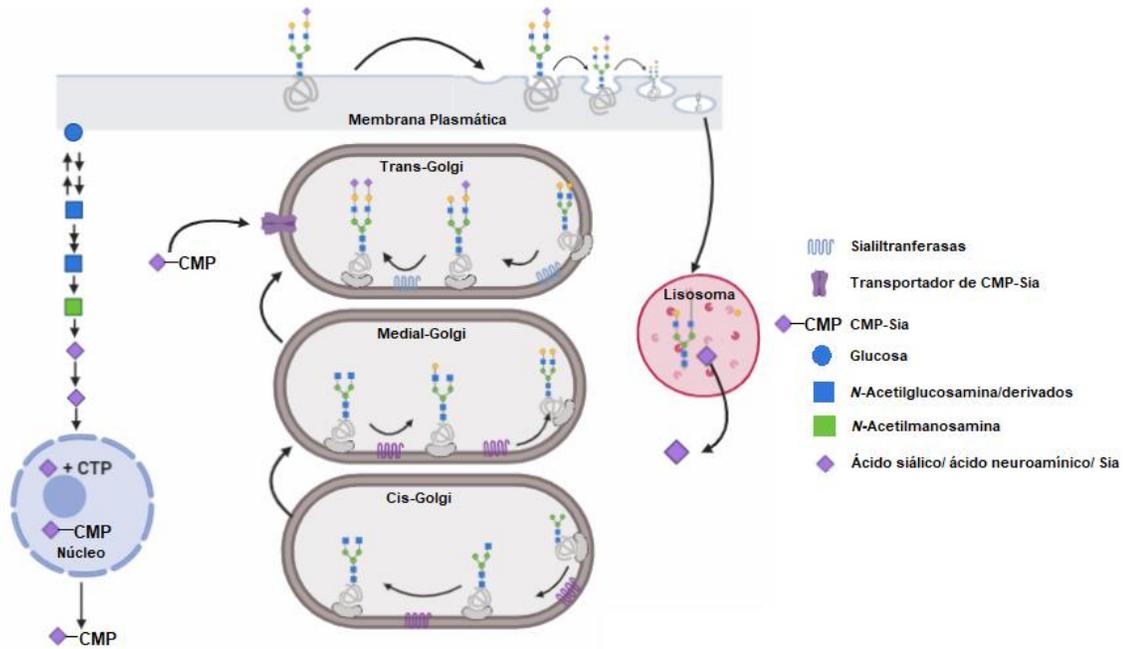


Figura 2. Proceso de sialilación celular. En esta figura se muestran los pasos correspondientes al proceso de sialilación: 1) Biosíntesis del ácido siálico, 2) Activación del ácido siálico, 3) Adición del CMP-Sia a glicoconjugados, 4) Reciclaje y degradación del ácido siálico.

#### 1.4 TRANSPORTADORES DE NUCLEÓTIIDO-CARBOHIDRATO

Los transportadores de nucleótido-carbohidrato (NST) son un conjunto de proteínas que pertenecen a la gran familia de transportadores ABC, este tipo de transportadores tienen una arquitectura general que consta de dominios transmembranales (TMD) y dominios de unión a nucleótidos (NBD), los cuales a su vez se subdividen en: 1) Dominio catalítico y 2) Dominio  $\alpha$ -hélice (17, 19). Este grupo de proteínas se caracterizan por tener un transporte de tipo anti porte (17, 18), son muy hidrofóbicas y contiene un intervalo de entre 320-400 aminoácidos (18, 19). En la figura 3 se resumen los NST presentes en mamíferos.

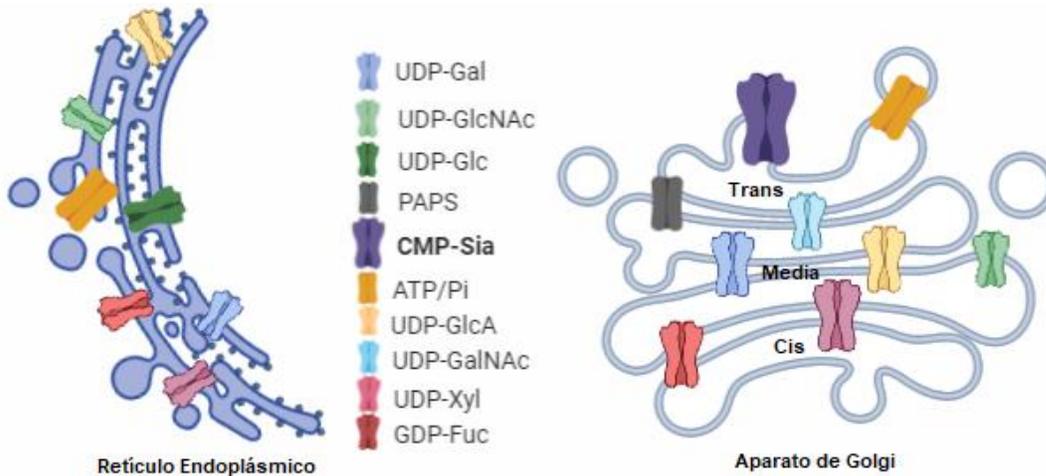


Figura 3. Transportadores de Nucleótido Carbohidratos, presentes en mamíferos. En esta figura podemos observar todos los transportados que están presentes en las células de mamíferos. UDP-Gal: transportador de UDP galactosa; UDP-GlcNAc: transportador de UDP *N*-Acetil glucosamina; UDP-Glc: transportador de UDP glucosa; PAPS-Donador de grupos sulfato; CMP-Sia transportador de CTP ácido siálico; ATP/Pi: intercambiador; UDP-GlcA: transportador de UDP ácido glucorónico; UDP-GalNAc: transportador de UDP *N*-Acetil galactosamina; UDP-Xyl: transportador de UDP xilosa; GDP-Fuc transportador de GDP fucosa. UDP: uridina di fosfato; GDP: guanosín di fosfato; CTP: citidina monofosfato.

Las características de transporte de los NST han sido determinadas mediante experimentos en vesículas de los organelos descritos en la Tabla 1 (Anexo). Algunos aspectos generales del transporte de estas proteínas son los siguientes:

- 1.- Transporte organelo-específico de los nucleótidos-carbohidratos (Tabla 1, Anexo).
- 2.- Las constantes de afinidad ( $K_m$ ) aparentes son de 1-10  $\mu\text{M}$ .
- 3.- El transporte es inhibido competitivamente por el correspondiente nucleosido mono y di fosfato.
- 4.- Transporte de tipo anti porte entre un nucleótido carbohidrato y su nucleosido correspondiente (Figura 4).

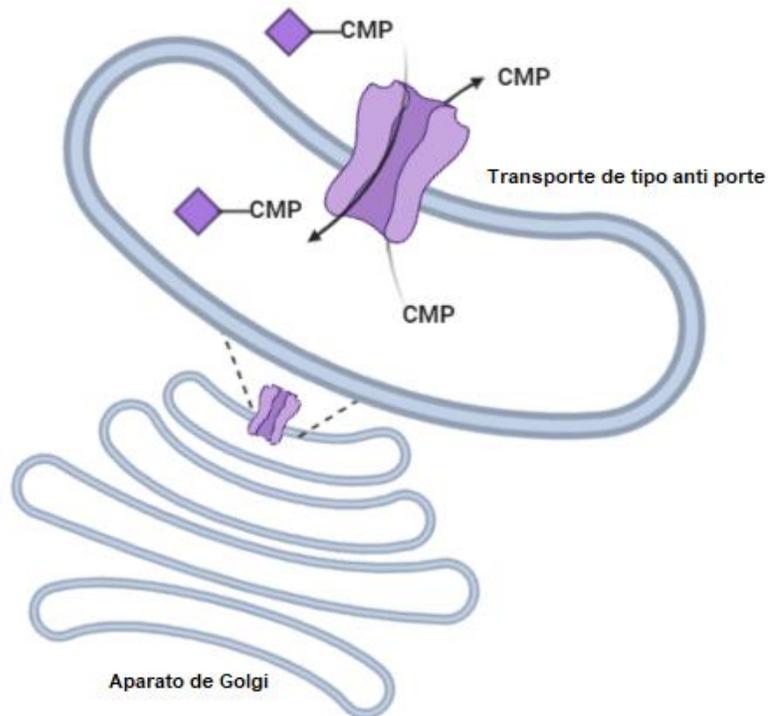


Figura 4. Transporte de tipo anti porte en los NTS. En esta figura podemos observar el transporte mediado por un NTS, que en este ejemplo es el SLC35A1. Los NTS median el transporte de CMP-Sia y CMP de manera anti porte. Esto quiere decir que el transportador reconoce al sustrato CMP-Sia de manera preferente en la cara citosólica de la cisterna *trans*-Golgi y que reconoce preferentemente al CMP en la cara luminal de la cisterna *trans*-Golgi.

La familia de transportadores humanos (NST) se designa como SLC35 (Tabla 2) y es una familia de transportadores altamente conservada, son proteínas transmembranales de tipo III que están subdivididas en 7 subfamilias (38).

<b>Tabla 2. Familia de transportadores humanos SLC35</b>					
<b>Gen</b>	<b>Proteína (Transportador)</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Localización</b>	<b>Longitud Proteína</b>	<b>Numero de acceso</b>
<b>SLC35A1</b>	CMP-Sia	CMP-Sia	GOLGI	337	P78382
<b>SLC35A2</b>	UDP-Gal	UDP— Gal/GlcNAc	GOLGI>RE	396	P78381
<b>SLC35A3</b>	UDP-GlcNAc	UDP- GlcNAc	GOLGI>RE	325	Q9Y2D2
<b>SLC35A4</b>	MGC2541	UDP-Gal		324	Q96G79
<b>SLC35A5</b>	UDG-GLICANO*	UDG- GLICANO		424	Q9BS91
<b>SLC35B1</b>	UGTrel1	ADP/ATP		322	P78383
<b>SLC35B2</b>	PAPS1	PAPS	GOLGI	432	Q8TB61
<b>SLC35B3</b>	PAPS2	PAPS	GOLGI	401	
<b>SLC35B4</b>	UDP-Xyl	UDP- Xyl/Gal	GOLGI y RE	331	Q9H1N7
<b>SLC35C1</b>		GDP-Fuc	GOLGI>RE	364	Q969S0
<b>SLC35C2</b>	GDP-Fuc	GDP-Fuc	GOLGI>RE	365	Q96A29
<b>SLC35D1</b>	UDP-Glucorónico	UDP-GlcA	RE	355	Q9NTN3
<b>SLC35D2</b>	UDP- Glc/Man/GlcNAc	UDP- Glc/GlcNAc	GOLGI	337	Q76EJ3
<b>SLC35D3</b>				416	Q5M8T2
<b>SLC35F2</b>	SLC35F2		MEMBRANA CELULAR	374	Q8IXU6

Se han descrito hasta la fecha CDG en seis NST (Tabla 3). Uno de ellos es el encargado de transportar CMP-Sia, molécula que pertenece a una familia de nonulosas que tienen como característica principal la presencia de una carga negativa en condiciones fisiológicas, lo cual le confiere propiedades particulares. Hasta la fecha han sido descritos tres CDG causados por impedimento en la disponibilidad de CMP-Sia para las reacciones de sialilación; dos relacionados a su biosíntesis (GNE-CDG y NANS-CDG) y uno relacionado al transporte del CMP-Sia (SLC35A1-CDG). La afectación en la biosíntesis y el transporte de CMP-Sia tienen como consecuencia una afectación al proceso de sialilación celular.

Tabla 3. Transportadores en donde se han reportado CDG

Transportador	CDG Reportado
CMP-Sia	+++
GDP-Fuc	+++
UDP-Gal	+++
PAPS	
UDP-GlcNAc	+++
UDP-GalNAc	+++
UDP-Xyl	
ATP	
UDP-GlcA	
UDP-Glc	+++

## 2.0 ANTECEDENTES

---

### 2.1 El transportador de CMP-Ácido Siálico

---

El transportador de CMP-Sia (SLC35A1) es una proteína que pertenece a la gran familia ABC de proteínas transmembranales, consta de 332 aminoácidos y está localizado en el compartimento *trans* del aparato de Golgi (20, 21). El modelo estructural de esta proteína está basado en un modelo murino donde se propone una conformación de 10 dominios transmembranales (TMD1-TMD10) determinados por las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que lo conforman (Tabla 4, anexo) y con ambos residuos -NH<sub>2</sub> y -COOH terminal orientados hacia la cara citosólica de la membrana de Golgi como se muestra en la figura 5 (22, 23, 24 y 25).

La figura 5 es un compendio de todos los experimentos que han permitido señalar las regiones importantes para el adecuado funcionamiento del SLC35A1. En la figura se señalan residuos en color rojo y naranja, esto indica que si una mutación puntual cambia ese amino ácido, la función se pierde o se ve menguada, esta pérdida se describe a mayor detalle más adelante. Todos los dominios marcados con color amarillo son indispensables para el correcto funcionamiento, esto fue elucidado utilizando quimeras entre transportadores de nucleótido carbohidrato (12, 17, 23, 28, 30, 32, 44, 45, 46, 47 y 48 y 49)



Las regiones dentro del transportador que intervienen en el reconocimiento del CMP-Sia recaen en los dominios TMD1 y TMD7, así como el loop 2 (citosólico) (12, 44 y 45); los TMD3, TMD5, TMD6 y TMD7, y los loops 3 y 8 (Golgi y citosol) son esenciales para el transporte del CMP-Sia (12, 17, 23, 28, 30, 32, 46, 47 y 48); la ubicación del transportador de CMP-Sia depende del -COOH terminal presente en la cara citosólica (28 y 49).

Entre estas regiones los dominios TMD2, TMD3, TMD7 señalados en amarillo (Figura 5), los loops 3 y 7 (Golgi) y 4 y 8 (citosol), los aminoácidos marcados en color rojo y naranja así como los residuos VGII del extremo carboxilo terminal remarcados en color morado se han reportado indispensables para el funcionamiento del SLC35A1 (9, 20, 24, 25).

La información descrita previamente, se complementa con el reporte de un modelo tridimensional basado en la estructura cristalográfica del transportador de GDP-Manosa de levadura (27) así como la estructura cristalográfica del SLC35A1 de ratón figura 6a (39, 41).

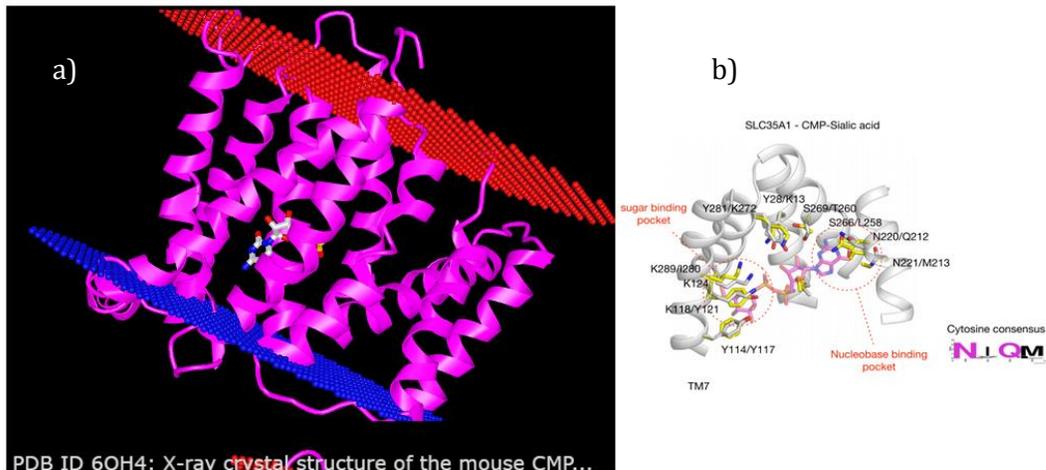


Figura 6. Motivo que reconoce el CMP-Sia. En esta figura se muestra la estructura cristalográfica del SLC35A1 murino. B) Se marca la interacción de los aminoácidos que participan en el reconocimiento del CMP-Sia. Parker, J. L., & Newstead, S. (2017). Letter Structural basis of nucleotide sugar transport across. *Nature Publishing Group*. NCBI

La elucidación del primer cristal de la familia de transportadores de nucleótido-carbohidrato (GDP-Manosa), mostró un 30% de identidad con el transportador de CMP-Sia; a partir de esta homología Parker y Newstead (2017) (27) realizaron un modelo del transportador de CMP-Sia, en el que resalta la presencia del motivo N, I, Q M, Y en el TMD7, dominio dividido en dos  $\alpha$  hélices TMD7a y TMD7b (18).

La estructura cristalográfica del SLC35A1 de ratón esclarecida por Ahuja y Whorton, (2019) (41) confirmó los residuos que interactúan con el nucleótido carbohidrato presentes en el motivo N, I, Q M, Y; este le brinda especificidad de reconocimiento al sustrato como se muestra en la figura 6b. Hasta la fecha la estructura cristalográfica del SLC35A1 (transportador de CMP-Sia humano) aún no ha sido elucidada.

El estudio estructural del SLC35A1 nos permite predecir las regiones indispensables para su funcionamiento adecuado. Un cambio puntual en el *SLC35A1*, gen que codifica para el SLC35A1 puede ser letal para el funcionamiento del mismo, provocando así, que el proceso de sialilación celular no se lleve a cabo adecuadamente o no se lleve a cabo.

La sialilación es indispensable para el desarrollo, crecimiento y homeostasis celular en humanos, afectaciones a este proceso debido a mutaciones en el *SLC35A1* desencadenan SLC35A1-CDG.

## 2.2 SLC35A1-CDG: ENFERMEDADES ASOCIADAS A MUTACIONES EN *SLC35A1*

Desde el 2005 hasta la fecha se han reportado diversas mutaciones (Figura 7) en el *SLC35A1*, gen que codifica para el transportador SLC35A1, el cual consta de 8 exones y 1854 pb.

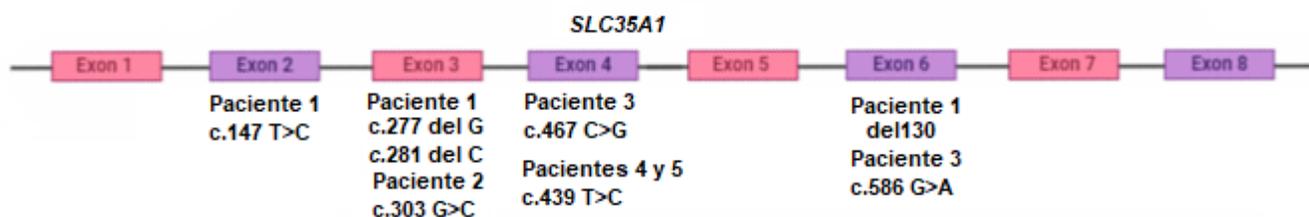


Figura 7. Mutaciones reportadas en pacientes con SLC35A1-CDG. En la imagen se muestra las mutaciones reportadas en cada paciente con SLC35A1-CDG: paciente 1 reportado por Duncker et al., (2005) (28). En este paciente se reportaron mutaciones diferentes para cada alelo: en el alelo uno el gen tiene dos microdeleciones en el exón 3 y una sustitución de base en el exón 2; el alelo dos muestra una deleción de 130pb en el exón 6. La sinergia de estas mutaciones genera pérdida total de función. Paciente 2 reportado por Mohamed et al., (2013) (29) con la c. 303 presente en el exón 3 de ambos alelos, lo que genera pérdida de función parcial del 50%. Paciente 3 reportado por Bobby G. et al., (2017) (30) con la c. 467 presente en el exón 4 y la c.586 localizada en el exón 6 que genera pérdida total de función. Pacientes 4 y 5 reportados por Alexander Kauskot et al, (2018) (31), hermanos que presentan la c.439 en ambos alelos del exón 4, mutación que generan pérdida total de función.

Estas mutaciones tienen un efecto directo en el funcionamiento del transportador de SLC35A1 que conducen a un proceso de sialilación erróneo, a la fecha se han descrito cinco pacientes con mutaciones en el *SLC35A1* (Tabla 8). Las enfermedades resultantes forman parte de los CDG y se clasifica como SLC35A1-CDG (13, 15, 28, 29, 30 y 31)

Tabla 8. Pacientes reportados con SLC35A1-CDG				
Características	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4 y 5
Mutación en el ADNc	c.277 delG c.280delG c.147T>C del130	c.330G>C c.330G>C	c.467C>G, c.586G>A	c.439T>C, c.439T>C
Cambio estructural	Inactivación total del transportador de CMP-Ácido Siálico	Reducción del 50% de transporte del CMP-Sia	Reducción de transporte del CMP-Sia	Pérdida de interacción con el sustrato
Cambio de amino ácido	p.Val93Cysfs*17 p.Val208Phefs*20	p.Gln101His, p.Gln101His	p.Thr156Arg, p.Glu196Lys	p.Ser147Pro p.Ser147Pro
Manifestaciones clínicas	Hemorragias, problemas de coagulación, retraso mental, infecciones oportunistas y hemorragias cutáneas asociadas a la deficiencia del antígeno SLe <sup>x</sup>	Retraso en el desarrollo, convulsiones, diastesis y hemorragias	Epilepsia, ataxia, hipotonía y retraso en el desarrollo	Ataques epilépticos, ataxia, hipotonía, retraso en el desarrollo y trombocitopenia

### 2.3 Modelo de Complementación CHO Y Lec2

---

El modelo de complementación CHO y Lec2 se basa en la deficiencia de transporte de ácido siálico en la línea celular Lec2, la cual es derivada de la línea celular CHO-K1 (37). Las células CHO-K1 (células de ovario de hámster chino) se han utilizado con mucho éxito como herramienta genética debido a que tienen un genoma de tipo hemicígoto, esto significa que el genoma tiene una mayor predisposición a adquirir mutaciones inactivantes, lo que promueve la obtención de mutantes con pérdida de función (36, 37). A partir de estas mutantes se ha facilitado el estudio de las vías de glicosilación identificando así los elementos afectados en cada vía. Las células Lec2 son deficientes en el transporte de CMP-Sia debido a una mutación inactivante en el ORF del *SLC35A1*, lo que las hace un modelo eficiente de complementación genética (37). Este modelo se ha empleado al reportar la funcionalidad de la isoforma del177 (28).

### 2.4 La isoforma funcional del177 del *SLC35A1*

---

La isoforma del177 fue descrita por vez primera por Duncker et al., (2005). Ellos reportaron la presencia de 4 isoformas (del160, del244, del177 y del130) del *SLC35A1* en personas sanas (28). Estas isoformas se generan debido a splicing alternativo, el nombre de cada una hace referencia al número de bases que pierden comparándolas con el gen Wt. Como lo indica su nombre, la isoforma del177 tiene una delección de 177 pb causada por la pérdida total del exón 7, este exón codifica para el TMD7 que previamente se describió como esencial para el funcionamiento del transportador, a pesar de esta pérdida la isoforma tiene la capacidad de transportar CMP-Sia. (18, 31). Esto se elucidó por Salinas Marin et al., (2015) a partir de la clonación del *SLC35A1* así como la isoforma del177, realizando una transfección de los plásmidos con el *SLC35A1* humano (Wt) y con la isoforma del177 del *SLC35A1* en la línea celular de hámster Lec2.

Utilizando el modelo de complementación CHO-Lec2 determinaron que la isoforma del177 del *SLC35A1* humano es funcional, esto se comprobó por varias metodologías, una de ellas fue realizar un estudio de citotoxicidad utilizando la lectina RCA I (proteína que reconoce residuos terminales de galactosa (enlazada  $\beta$  o  $\alpha$ ) así como residuos de *N*-Acetil galactosamina), esta lectina es citotóxica, lo que significa que al unirse a su sitio de reconocimiento desencadena una señal que concluye en el bloqueo de síntesis de proteínas lo que conduce a la muerte celular. Si las células son resistentes a la lectina RCA I, esta resistencia se debe a la presencia de ácido siálico presente en la superficie

celular, el cual brinda una barrera física debido a que este carbohidrato se enlaza a residuos de galactosa y de *N*- Acetil galactosamina (residuos diana de la lectina),

En este estudio se adicionó la lectina a una concentración de 5ng/mL a las células transfectadas con cada vector (Lec2- Wt y Lec2-del177), así como los controles CHO y Lec2. Una semana posterior al tratamiento se observaron por microscopia óptica (10X) y fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando yoduro de propidio como marcador de muerte celular, el resultado de este experimento se muestra en la figura 8a, las células CHO (células con transporte de ácido siálico), las células transfectadas con el *SLC35A1* (Lec2- Wt) y las células transfectadas con la isoforma del177 muestran un bajo porcentaje de muerte celular respecto a las células Lec2. Por lo que se concluye que la isoforma del177 tiene un comportamiento similar al transportador de *SLC35A1* (31, 18). Los autores proponen que la funcionalidad responde a un reacomodo estructural de la proteína, en donde la isoforma cuenta con TMD8 en vez de TMD10 como se muestra en la figura 8b. Este reacomodo permite la conservación de ciertas regiones indispensables para el *SLC35A1* como lo son: los residuos amino y carboxilo terminal, el canal de Gly, así como el TMD3; por otro lado la delección de 177pb genera la pérdida de regiones esenciales para el *SLC35A1* como lo son el TMD7, así como los amino ácidos K236 y G237 presentes en el loop 8, a pesar de estas pérdidas la isoforma del177 es funcional (18, 21).

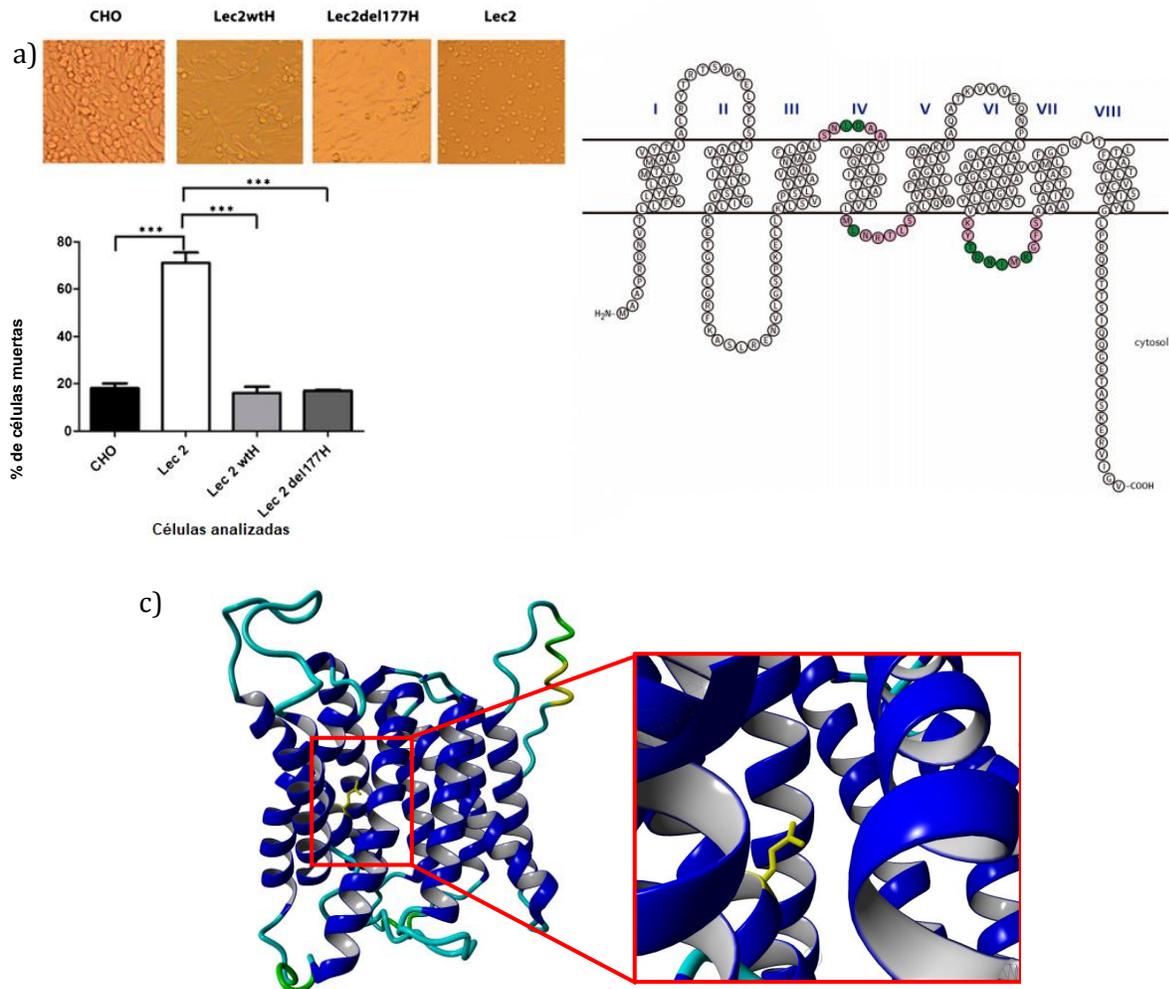


Figura 8. Validación de la funcionalidad de la isoforma del177 del SLC35A1. A) Células tratadas con la lectina RCA I, en la gráfica se muestra el porcentaje de células muertas (eje y) respecto a las células analizadas (eje x), concluyendo que las células CHO, Lec2 WtH (con el *SLC35A1*) y las células Lec del177H se comportan de manera similar, teniendo un bajo porcentaje (20%) de muerte celular. B) La figura propone la reorganización de la isoforma del177 sin los 177pb. C) Residuo101 (Gln) presente en el TM3 del SLC35A1. Modificado de Salinas-Marín, R., Mollicone, R., & Martínez-Duncker, I. (2016). A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter. *Glycoconjugate Journal*, 897–906.

A partir de la propuesta de TMD8 Hadley et al., (2019) (38) realizaron un modelo utilizando la estructura del transportador Vrg (transportador de GDP manosa de levadura) en donde se acepta este rearrreglo de TMD8. Con este modelo se explica que la conformación estructural cambia por la ausencia del TMD7, el cual es suplido por el TMD6. Lo que apoya esta predicción es que el canal de glicinas permanece en este rearrreglo, el extremo amino y carboxilo terminal permanecen en el lado citosólico, se plantea que la Tyr207 presente en el TMD6 interactúa con el CMP-Sia en la isoforma del177 promoviendo su reconocimiento y conservando un residuo del motivo N, I, Q M, Y. El conjunto de factores presentes en el rearrreglo permiten que la isoforma del177 logre el transporte del CMP-Sia adquiriendo un arreglo estructural diferente (38).

En el modelo estructural del SLC35A1, se describe el comportamiento de cada mutación reportada en el *SLC35A1* (5 pacientes, Tabla 7). La mutación c.303 G>C que corresponde al segundo paciente con SLC35A1-CDG reportado por Mohamed et al. (2013) (28) promueve un cambio en el amino ácido 101 Gln>His, residuo presente en el TMD3 (Figura 8c). Este residuo (Gln101His) es importante ya que está altamente conservado en todas las especies, el cambio de amino ácido reduce la actividad del transportador al 50%, sin embargo permite el transporte de CMP-Sia, esto demuestra que la mutación c.303 no es inactivante.

Cabe aclarar que el efecto de las mutaciones reportadas en los 5 pacientes con SLC35A1-CDG solo se realizó con el SLC35A1, lo que deja como incógnita el efecto de estas mutaciones en el rearrreglo de la isoforma del177.

En este trabajo se plantea analizar qué ocurre con la funcionalidad de la isoforma del177 cuando el residuo Gln101His es remplazado, debido a la mutación puntual c.303 G>C (paciente 2).

Como se describió previamente el TMD3 es indispensable para el funcionamiento del transportador, este dominio se conserva en el rearrreglo de la isoforma del177, sin embargo, aún no se describe si su función o interacción resulta ser la misma en el rearrreglo de TMD8 que resulta en la isoforma del177. Debido a que no se saben aún las regiones indispensables para el correcto funcionamiento de la isoforma del177 y que muchas de las descritas indispensables para el SLC35A1 se pierden, nosotros proponemos que la mutación c.303 G>C que origina un cambio en el residuo Gln101His

presente en el TMD3 dentro del SLC35A1, no reduce el transporte en la isoforma del177 debido a que su interacción es distinta.

### 3.0 Hipótesis

---

La mutación puntual c.303 G>C no afecta la función de la isoforma del177-SLC35A1 humana.

### 4.0 Objetivos

---

#### 4.1 General

---

Analizar la isoforma del177-*SLC35A1* (del177) con el cambio de aminoácido 101 de Gln>His

#### 4.2 Particulares

---

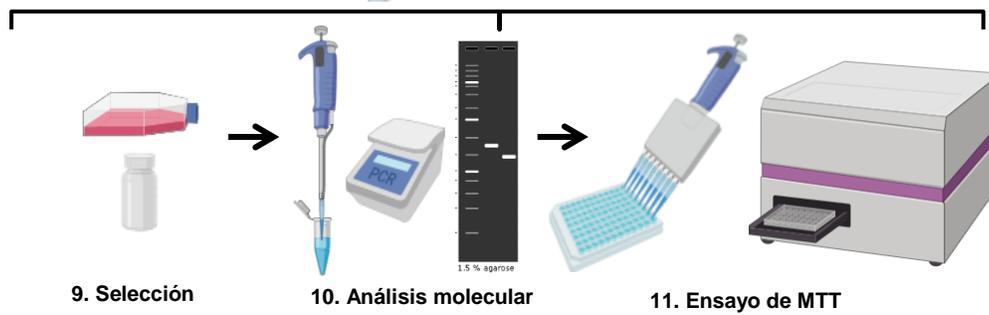
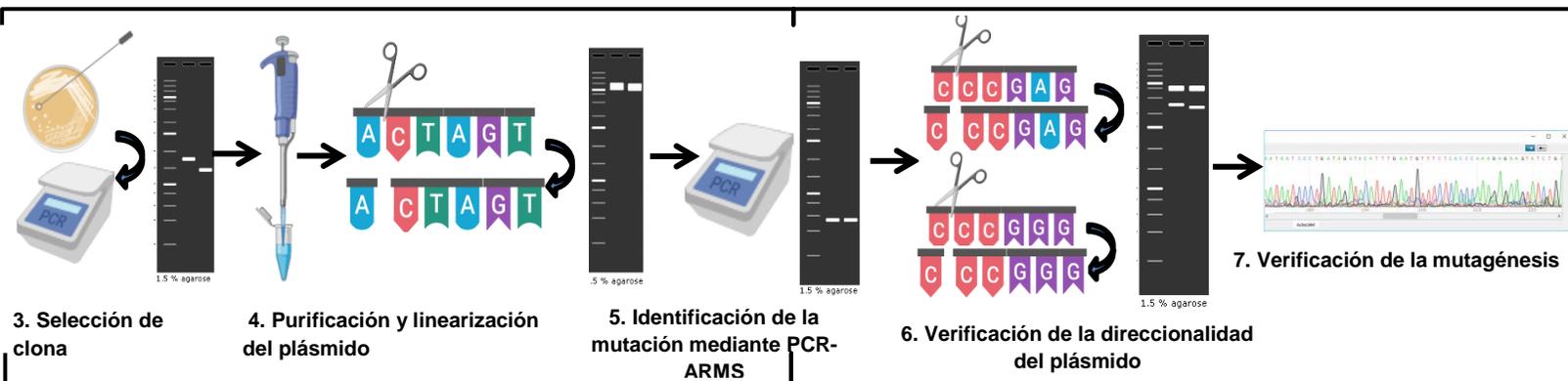
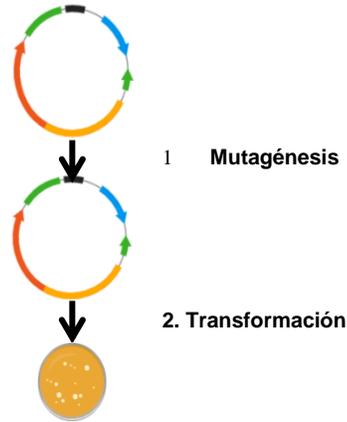
- Generar un vector que contenga el cambio c. 303 G>C de la isoforma *wt* humana del *SLC35A1* y la isoforma *del177* y expresarla en el modelo de complementación genética CHO-Lec2.
- Determinar y analizar los cambios en el nivel de sialilación celular que genera la complementación del c.303G>C *SLC35A1* y c.303G>C *del177* en el modelo CHO-Lec2, utilizando como controles el *SLC35A1* y la isoforma *del177*. El análisis de proliferación se realizará utilizando la molécula MTT en un ensayo de citotoxicidad utilizando lectinas.

## 5.0 Justificación

---

La sialilación celular es esencial para mantener el correcto funcionamiento celular ya que participa en diversos mecanismos como: la defensa contra patógenos durante un proceso infeccioso, en el desarrollo embrionario, en la migración celular, en el rodamiento celular, así como mecanismo de señalización celular, está presente en los factores de la cascada de coagulación, entre otros. Por lo anterior este proyecto, ayudaría a elucidar si el cambio c.303 G>C presente en el TM3 no afecta al re arreglo estructural de la isoforma del177-SLC35A1 provocando así una afectación en el transporte de CMP-Sia.

## 6.0 Estrategia Experimental



## 7.0 Metodología

---

### 7.1 Células competentes

---

Las transformaciones bacterianas se realizaron utilizando células *E. Coli* quimio competentes de la cepa Match One de la siguiente manera: en una caja Petri con medio LB-agar se inocularon 10  $\mu$ L de bacterias cepa Match 1 por 12 h a 37 °C, se tomó una colonia aislada y esta fue inoculada en un matraz de 250 mL con medio LB y fue incubada a 37 °C a 200 rpm. La densidad óptica (DO) del inóculo fue monitoreada hasta que el cultivo alcanzó una DO entre 0.4-0.6. Posteriormente, en un tubo falcón las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y la pastilla se re suspendió en 600  $\mu$ L de buffer TB frío por cada 2 mL de cultivo y se incubó durante 20 minutos a 4 °C. La pastilla se recuperó por centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm a 4°C. Por último se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue re suspendida en 150  $\mu$ L de buffer TB frío y 10  $\mu$ L de DMSO por cada 2 mL de medio de cultivo, se incubó durante 10 minutos a 4°C y congeló en N<sub>2</sub> (l). Las bacterias quimio competentes se almacenaron en tubos eppendorf 1.5 mL a -80°C hasta su uso.

### 7.2 Mutagénesis sitio dirigida.

---

#### 7.2.1 Eficiencia del proceso de mutagénesis sitio Dirigida

La mutagénesis sitio dirigida se realizó utilizando el protocolo descrito en el kit #F-541 (Thermo Scientific: Phusion Site-Directed). Este sistema contiene la construcción control pUC19 + *Lac Z* con un codón de paro (TAA) en la posición 8 que genera colonias blancas en bacterias transformadas e incubadas en medio LB-ampicilina suplementado con X-Gal e IPTG. La transformación del producto se realizó utilizando la cepa Match 1 de *E.coli*, ésta se llevó a cabo en cajas Petri con medio LB-agar suplementado con 40  $\mu$ L de X-Gal (40 mg/mL)/IPTG, esto con el fin de distinguir con una diferencia de coloración en las clonas (de blanco a índigo) si la mutagénesis se llevó a cabo adecuadamente, el reactivo X-gal será hidrolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa formando un compuesto insoluble que le dará una coloración índigo a las clonas presentes en el cultivo.

## 7.22 Diseño de oligonucleótidos para inducir la mutación c.303 G>C

Los oligonucleótidos empleados (Tabla 9) fueron diseñados de acuerdo a las condiciones establecidas en el kit E-541 (Thermo Scientific); considerando ubicar la mutación puntual entre 10-15 pb de cada extremo del oligonucleótido sentido, con una longitud de 25 a 30 pb, una T<sub>m</sub> de 65-72 ° C y un porcentaje de G-C entre 40-60%. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a las condiciones del manual del kit (E-541, Thermo Scientific); Los oligonucleótidos utilizados para realizar la mutación puntual c.303 G>C en los plásmidos con el *SLC35A1* (W5) y *del177* (D16).

Clave oligonucleótido 1: MUT-RSM5' (Sentido)

Longitud : 28 pb

Secuencia 1 : GTG TAT GCT GTT CAC AAC AAC ATG GCT T

Clave oligonucleótido 2: MUT-RSM3' (anti sentido)

Longitud : 30 pb

Secuencia 2 : TAA CGA TGG CAC ACT TAA CTT CAA CAG TTC

Todos los oligonucleótidos que se ocuparon en el presente trabajo se describen en la Tabla 9.

Oligonucleótido	Orientación	Secuencia	TM Experimental
Mut-RSM 5'	Sentido	5' GTGTATGCTGTTCAACAACATGGCTT 3'	68°
Mut-RSM 3'	Anti sentido	5' TAACGATGGCACACTTAACTTCAACAGTTC 3'	68°
TRN1S (1S)	Sentido	5' GGCTGTCGGGGAACCATGGCTGC 3'	65°
NTR4AS (4AS)	Anti sentido	5' GGAAAGGACAATGGCCGCTGCTGC 3'	65°
Mut HF	Sentido	5' CTTGGCAGTGATGACCCTG 3'	65°
Mut HN	Anti sentido	5' GCTAGGAAAGCCATGTTGTTT 3'	65°
Mut HM	Anti sentido	5' GCTAGGAAAGCCATGTTGTTT 3'	65°
HA-S	Sentido	5' CTCTGCACCATGGCTCAGGCGA 3'	55°
HA-as	Anti sentido	5' CACACACCAATGACTCTTTCT 3'	55°

## 7.2.3 Fosforilación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis sitio dirigida c.303 G>C, se fosforilaron utilizando la enzima poli nucleótido cinasa (#EK0031, Thermo Fisher Scientific). Se realizó una mezcla independiente por cada oligonucleotido (Mut-RSM 5' y Mut-RSM 3') en donde se adicionaron 50pmol de oligonucleotido, 10U de la enzima T4 poli nucleótido cinasa, Buffer A concentración final 1mM, ATP 1mM y agua libre de nucleasas llevando la reacción a un volumen final de 20 µL (Tabla 10, anexo).

La reacción descrita previamente se incubó durante 20 minutos a 37°C y se inactivó a 75°C por 10 minutos. La reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 7.2.4 Inducción de la mutación c.303 G>C

La construcción del *SCL35A1* (Topo 3.3 TA + *SLC35A1*, K8300-01, life Technologies) y de la *del177* (Topo 3.3 TA + *del177*, K8300-01, life Technologies) fueron realizados previamente por Salinas-Marin, et al. (2016).

La mutagénesis sitio dirigida c. 303 G>C se realizó mediante la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos Mut-RSM5' y MUT-RSM3' (Tabla 9). Este último oligonucleótido induce la mutación c. 303 G>C. La reacción se realizó de la siguiente manera: se adicionaron 5 µL de Buffer Phusion HF 5X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL del oligonucleotido Mut-RSM5' y MUT-RSM3' 50µM, 0.5 µL de la enzima Phusion Hot Start 2U/ µL, 0.5 µL de plásmido 50ng y agua libre de nucleasas llevando la reacción a un volumen final de 25 µL (Tabla 11, anexo). Las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y elongación que se utilizaron fueron 98°C, 65°C y 72°C respectivamente (Tabla 12, anexo).

El producto de PCR esperado utilizando como templado al vector Wt (*SLC35A1*) es de 6831 pb y para la *del177* (*del177*) es de 6653pb. La ligación se realizó con la enzima T4 ligasa (EL0012, Thermo Fisher Sientific). La reacción de ligación del producto de mutagénesis, utilizando la enzima T4 ligasa se realizó bajo las siguientes condiciones: se adicionaron 5 µL del producto de reacción 20ng, 2 µL de Buffer de ligación 5X, 0.5 µL de la enzima T4 ligasa 5U/ µL y agua libre de nucleasas llevando la reacción a un volumen final de 50 µL (Tabla 13, anexo). La reacción se incubó a 25°C durante 20min.

### 7. 3 Transformación bacteriana

---

La transformación de bacterias *E. Coli* (cepa Match1) quimio competentes se realizó adicionando 5 µL del producto de ligación a 150 µL de bacterias *E. Coli*. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se realizó un shock térmico a 42°C durante 1 minuto. Por último se añadieron 250 µL de medio SOC y se incubaron a 200

rpm durante 1 hora a 37°C. El inóculo o muestra de bacterias transformadas (50 µL) fue plaqueado en medio LB con 100 µg/mL de Ampicilina y se incubó 12 horas a 37°C.

Cada colonia obtenida, fue estriada e incubada por 12 horas a 37°C sin agitación, del estriado a partir de una pequeña muestra (punta de 0.5-10 µL) se realizó PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos sentido TNR-1s y anti sentido NTR-4as (Tabla 9), oligonucleótidos que amplifican el *SLC35A1* (Wt, 864 pb) o *del177* (del177, 687 pb) utilizando como templado el vector de clonación correspondiente. El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis de agarosa al 1.5%.

#### 7.4 Purificación alcalina de plásmido

---

Las colonias obtenidas de la transformación se estriaron en una nueva caja con medio LB suplementado con ampicilina (100µg/mL) y se marcaron con una letra específica por cada transformación (W, β, Θ, ψ, ω, φ, α, Υ, σ, μ, θ). Los plásmidos se purificaron a partir de un cultivo de 3 mL de medio LB-amp incubados a 37°C y 200 rpm por 12 h. La pastilla fue recuperada mediante centrifugación a 9000 rpm y se re suspendió en 150 µL de disolución de lisis I (Anexo II). La muestra fue incubada 5 minutos a temperatura ambiente (Ta). Posteriormente, se adicionaron 150 µL de disolución de lisis II invirtiendo el tubo tres veces e incubando por 5 minutos a Ta. Finalmente, se adicionaron 150 µL de la solución de lisis III mezclando por inversión durante 10 segundos e incubando 5 minutos a Ta. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 13 000 rpm durante 5 minutos y se adicionó 1 mL de etanol absoluto, mezclando por inversión e incubándolo a Ta durante 2 minutos. Las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13 000 rpm y el sobrenadante fue eliminado por aspiración. El ADN plasmídico (ADNp) se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos para eliminar etanol. Por último la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua (RNAasa 20 µg/mL) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

#### 7.5 Identificación de la mutación por PCR-ARMS

---

La técnica PCR-ARMS permite analizar la presencia de un cambio de base en una secuencia particular, esta metodología parte del diseño de tres oligonucleótidos, un oligonucleótido sentido y dos oligonucleótidos anti sentido que reconocen respectivamente el cambio de base generado a partir de la mutagénesis y la secuencia

sin mutar, ambos en el extremo 3' del oligonucleótido. Esta técnica se utilizó para identificar la mutación puntual c.303 G>C utilizando 3 oligonucleótidos: oligonucleótido sentido Mut-HF (5'->3'), anti sentido normal Mut-HN y anti sentido con la mutación c.303 G>C Mut-HM (5'->3') (Tabla 9, figura 8; anexo), esperando un fragmento de 275 pb. Se realizaron 2 reacciones independientes de la siguiente manera: La reacción se realizó de la siguiente manera: se adicionaron 2.5 µL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10X, 2.5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL del oligonucleotido Mut- HF y Mut-HN o MutHM 50µM, 0.5 µL de la enzima Taq DNA polimerasa 5U/ µL, 0.5 µL de plásmido 50ng y agua libre de nucleasas llevando la reacción a un volumen final de 25 µL (Tabla 14, anexo). Las temperaturas de desnaturalización y elongación que se utilizaron fueron 98°C, y 72°C respectivamente; para la fase de alineamiento se utilizó un gradiente de temperatura entre 65°C-72°C, tomando como temperatura media de reacción 65°C (Tabla 15, anexo).

## 7.6 Ensayo de restricción

---

Para verificar la orientación del inserto se realizó un ensayo de restricción con los plásmidos purificados utilizando la enzima Eco 881 (AVA I, 10 U/µL, ER0311, Thermo Fisher Scientific) que corta el inserto en 24 pb y el vector en 1824 pb, dando como resultado dos fragmentos de 4311 pb y 2520 pb en *SLC35A1* y 4310 pb y 2343 pb en *del177* (Figura 9, anexo). La reacción se realizó de la siguiente manera: se adicionaron 1 µL de plásmido 50ng, 2 µL de Buffer Tango 10X, 0.5 µL de la enzima Aval 10U/ µL y agua libre de nucleasas llevando la reacción a un volumen final de 20 µL (Tabla 16, anexo). Fue incubada 2 h a 37 °C y posteriormente inactivada a 65 °C durante 20 min.

## 7.7 Secuenciación

---

Los plásmidos que se desean analizar son purificados mediante el kit Gene JET (#K0502, Thermo Fisher Scientific), y la muestra se preparó según las indicaciones del proceso de secuenciación. La reacción debe tener 1µL de oligonucleótido (10 µM), 800ng de plásmido y llevar a un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasas. El análisis de secuenciación fue realizado por los programas BioEdit, FinchTV.

## 7.8 Complementación genética en el modelo CHO-LEC2

---

### 7.8.1 Cultivo y transfección de células CHO y Lec2.

Los estudios de complementación genética se realizaron en células CHO y Lec2 (células de ovario de hámster chino, con y sin transporte de ácido siálico respectivamente). Las células se sembraron en una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/mL en placas de 24 pozos. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB e incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio DMEM fue removido de las células al llegar a un 70-90 % de confluencia celular. Los plásmidos fueron transfectados utilizando como volumen final 100 µL de medio DMEM sin SFB ni antibióticos; suplementado con 4 µL Lipofectamina 2000 (Invitrogen) por cada 2µg de plásmido transfectado por pozo. Antes de adicionar el medio a las células, la mezcla fue incubada 20 min a temperatura ambiente. Posterior a la adición del medio, las células fueron incubadas durante 4 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, con movimiento de la caja c/h y finalmente se adicionaron 400 µL de medio DMEM 10 % de SFB por cada pozo.

### 7.8.2 Análisis de las líneas celulares obtenidas

Las líneas celulares seleccionadas con geneticina G418 (1 mg/ml, SIGMA ALDRICH) a las 72 h postransfección. De las células transfectadas ( $10^6 - 10^9$  células) se extrajo ARN a partir de células en cultivo utilizándose 1 mL de Trizol (#15596017; Life Technologies) y las muestras se almacenaron a -80°C por 24 horas. A las muestras descongeladas se les adicionaron 200 µL de cloroformo, se incubaron 2 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 13500 rpm a 4°C, durante 15 min. La fase acuosa fue trasvasada a nuevos tubos de 1.5 mL y se les añadieron 500 µL de isopropanol, se incubaron 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 13,500 rpm, a 4 °C durante 10 min. Se decantó el alcohol y se les adicionó 1 mL de etanol al 75 % por muestra. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm, 4°C durante 10 min. Se eliminó el alcohol completamente de las muestras y el pellet se respondió en 20 µL de agua libre de RNAsas (Sigma-Aldrich), el ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific). La síntesis de ADN codificante (ADNc) fue realizada partiendo de 1.4 µg de ARN total. La reacción de transcripción inversa se realizó en un termociclaje de 5 min a 65 °C, 60 min a 37 °C y 10 min a 75 °C utilizando 1 µL de oligo-dT, 1 µL de dNTPs 10 mM y 1 µL de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV Invitrogen).

### 7.8.3 Ensayo con RCA I

Las células CHO, Lec2 y las células transfectadas con el plásmido Wt (*SLC35A1*), *del177* (*del177*), así como las mutantes Wt.303 (*SLC35A1* con c.303 G>C) y *del177c.303* (*del177* con c.303 G>C) Las células se sembraron en una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/mL en placas de 24 pozos, se dejaron incubar con medio DMEM 10 % SFB, 1 % Penicilina y estreptomina durante 24 h, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al cumplir las 24h el medio fue removido y fueron suplementadas con RCA I (10ng/mL) en 500 µL de medio DMEM 10 % SFB, 1 % penicilina y estreptomina, tomando este como el tiempo cero. La resistencia a RCA-I y proliferación fueron observadas utilizando un microscopio óptico (Nikon ECLIPSETi-S) a 24 h y 48 h.

### 7.8.4 actividad metabólica utilizando MTT

Las células CHO, Lec2 y las células transfectadas con el plásmido Wt (*SLC35A1*), *del177* (*del177*), así como las mutantes Wt.303 (*SLC35A1* con c.303 G>C) y *del177c.303* (*del177* con c.303 G>C) fueron sembradas en placas de 96 pozos con una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células/mL, se dejaron incubar con medio DMEM 10 % SFB, 1 % Penicilina y estreptomina durante 24 h, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al cumplir las 24h el medio fue removido y fueron suplementadas con RCA I (10ng/mL) en 100 µL de medio DMEM 10 % SFB, 1 % penicilina y estreptomina, tomando este como el tiempo cero. A las 24h y 48h (en placas de 96 pozos separadas) se adicionó 2mg/mL de MTT, una vez adicionado el MTT, las células se incubaron 4h a 37°C y fueron analizadas en un lector de placas (BMG-OMEGA) a 550nm de absorbancia.

### 7.8.5 Análisis estadístico del MTT

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism8 utilizando ANOVA II (con dos variables), Prueba t student y utilizando la Prueba de Grubbs. El valor p considerado fue >0.05, cada experimento se realizó 3 veces por triplicado y los resultados están expresados en media ± desviación estándar.

## 8.0 Resultados

El objetivo principal de este trabajo fue analizar la isoforma del177-*SLC35A1* (del177) con el cambio de aminoácido 101 de Gln>His presente en el paciente descrito por Mohamed y col., Como se describió previamente, la mutación c.303 G>C promueve el cambio del aminoácido 101 de Gln>His, residuo que se localiza en el TMD3 y que genera una reducción del 50% de transporte en el *SLC35A1*. Esto demuestra que la mutación c.303 G>C no es inactivante. Debido a que la isoforma adquiere una estructura tridimensional diferente, proponemos que el cambio del aminoácido 101 de Gln>His en la isoforma del177 no reduce la funcionalidad del transportador de CMP-Sia.

### 8.1 Mutagénesis sitio Dirigida de la c. 303 G>C en el *SLC35A1*.

Una vez verificada la eficiencia de mutación-transformación del kit (Anexo, sección 13.4), se llevó a cabo la fosforilación de los oligonucleótidos MUT-RSM5' (sentido) y MUT-RSM3' (anti-sentido) como se describe en el apartado de metodología, se realizó la mutagénesis sitio dirigida c.303 G>C en el *SLC35A1* (W5) presente en el vector (Figura 12a). La reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos fosforilados a una concentración de 50 µg/µL sentido MUT-RSM 5' y anti sentido MUT-RSM 3'. En el producto de esta reacción corresponde a 6831 pb (Figura 12b).

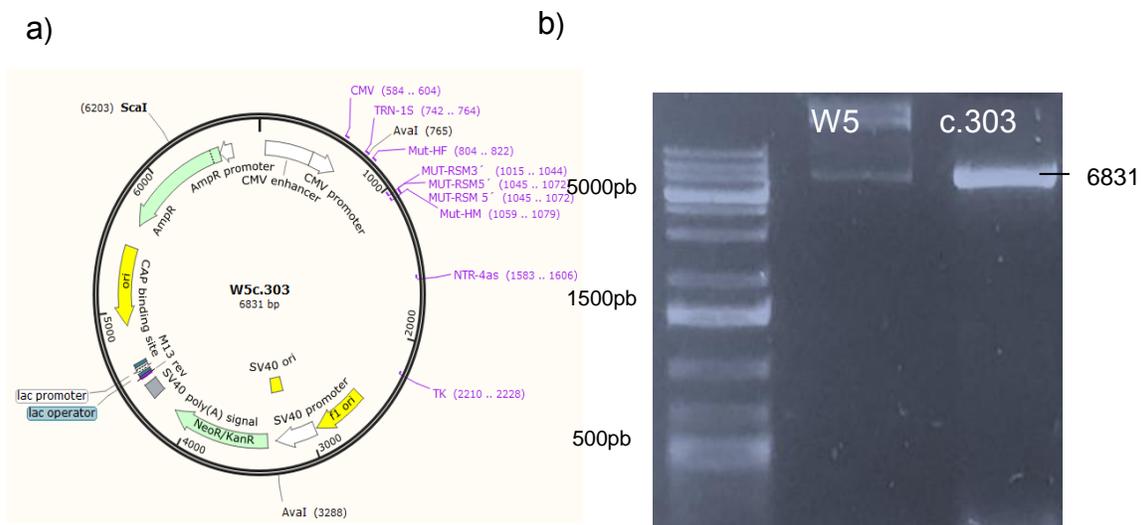


Figura 12. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*. A) Vector de clonación topo 3.3 TA + *SLC35A1*. B) Producto de PCR de la reacción de mutagénesis sitio puntual c.303 G>C del inserto *wt* del

*SLC35A1* clonado en un vector topo 3.3 TA (5407 pb +1431 pb), con oligonucleótidos sin fosforilación y con fosforilación. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h.

El producto de PCR fue ligado con la enzima T4 ligasa como se describe en la sección de metodología y se utilizó para transformar bacterias quimio competentes de la cepa Match 1 de *E.coli* (Figura 13, anexo)

## 8.2 Verificación de la clona B5.

Los plásmidos  $\beta 5$ , Y1 y  $\alpha 19$  fueron seleccionados (Anexo 13.4.2). A partir de esto se realizó un ensayo de restricción utilizando la enzima *Ava*I para cada uno de los plásmidos. El patrón de digestión esperado: dos fragmentos de 4311 pb y 2520 pb se obtuvo en los plásmidos  $\beta 5$ , Y1 y  $\alpha 19$  (Figura 15a).

Debido a que la concentración del plásmido  $\beta 5$  era mayor se decidió que fuera el primer plásmido analizado mediante secuenciación, se repitió la PCR-ARMS utilizando el plásmido control W5 (vector con el *SLC35A1*) como se muestra en el producto de PCR correspondiente a 275 pb (Figura 15b).

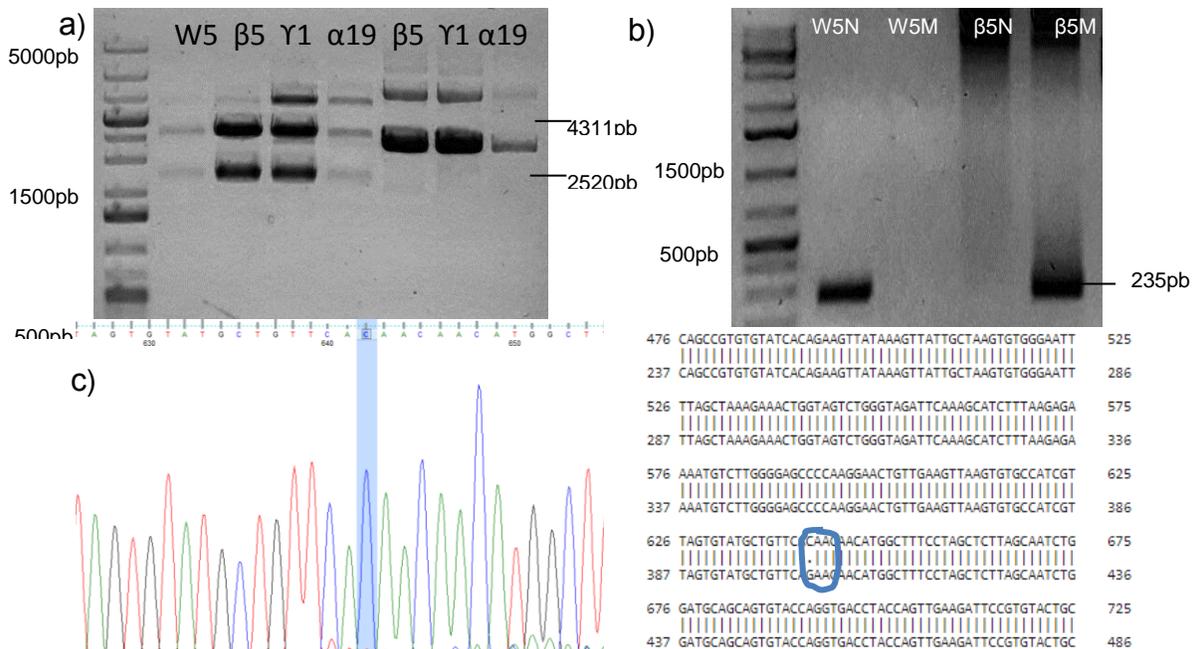


Figura 15. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*: verificación de clona  $\beta 5$ . A) Digestión con *Ava*I para determinar el sentido de ligación de los plásmidos obtenidos de las clonas  $\beta 5$ , Y1,  $\alpha 19$

positivas para la mutación tomando *SLC35A1* (W5) como control de reacción (plásmidos purificados por kit). B) PCR-ARMS utilizando los oligonucleótidos HF y HN/HM en la clona  $\beta 5$  tomando como control *SLC35A1* (W5), donde N marca sin mutación y M con mutación. C) Secuencia del plásmido  $\beta 5$  analizada con SnapGene y alineamiento de la secuencia *SLC35A1* sin mutación y del plásmido  $\beta 5$ , en la línea azul muestra el cambio de base c.303 G>C. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h.

El plásmido  $\beta 5$  se mandó a secuenciar con los oligonucleótidos 1s y 4as (10 $\mu$ M), el histograma se analizó utilizando los software SnapGene, BioEdit y FinchTV, identificando así el cambio puntual c.303 G>C (figura 15c). También se muestra un blast realizado con la plataforma clustal omega utilizando el algoritmo waters, en el que se marca la presencia de la mutación c.303 G>C (circulo azul).

### 8.3 Mutagénesis sitio dirigida de la c. 303 G>C en el *del177*

Utilizando los oligonucleótidos previamente fosforilados, se realizó la mutagénesis sitio dirigida c.303 G>C en la isoforma *del177* presente en el vector (Figura 16a). La reacción de PCR se preparó como se describió en el apartado 8.2.1. En la figura 16b se muestra el producto de esta reacción correspondiente a 6653 pb.

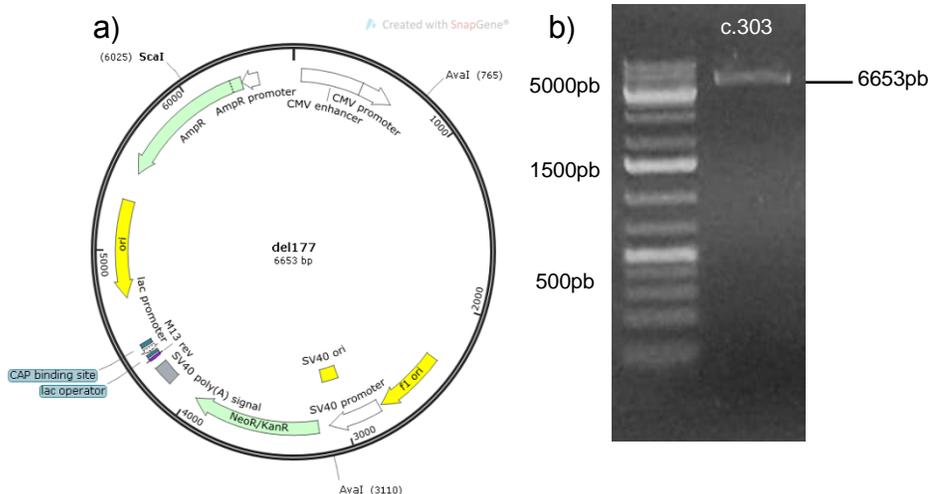


Figura 15. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*. A) Vector de clonación topo 3.3 TA + *del177*. B) Producto de PCR de la reacción de mutagénesis sitio puntual c.303G>C del inserto *del177* del *del177* clonado en un vector topo 3.3 TA (5407 pb +1254 pb), con oligonucleótidos sin

fosforilación y con fosforilación. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h.

El producto de PCR fue ligado con la enzima T4 ligasa como se describe en la sección de metodología y se utilizó para transformó la cepa Match 1 de *E.coli* (Figura 17, anexo).

#### 8.4 Verificación de la clona $\Theta 1$ .

Los  $\Theta 1$ ,  $\Theta 9$  y  $\psi 4$  fueron seleccionados (Anexo 13.4.3). A partir de esto se realizó un ensayo de restricción utilizando la enzima *Ava*1 para cada uno de los plásmidos, obteniendo el patrón de digestión esperado en los plásmidos  $\Theta 1$ ,  $\Theta 9$  y  $\psi 4$  de 4310 pb y 2343 pb (Figura 19a). Debido a que la concentración del plásmido  $\Theta 1$  era mayor, se decidió que fuera el primer plásmido analizado mediante secuenciación, se repitió la PCR-ARMS utilizando el plásmido control D16 (vector con el *del177*) como se muestra en el fragmento de amplificación de 275 pb (Figura 19b).

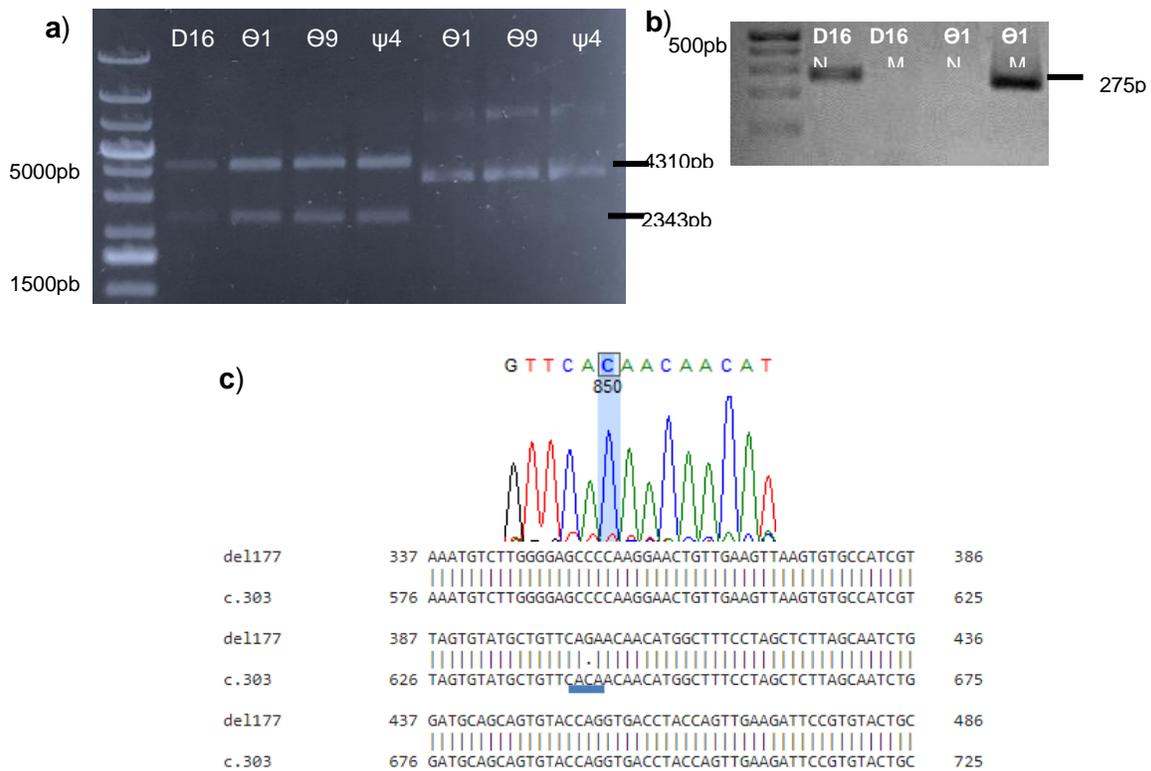


Figura 19. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*: verificación de clona  $\Theta 1$ . A) Digestión con *Ava*1 para determinar el sentido de ligación de los plásmidos obtenidos de las clonas  $\Theta 1$ ,  $\Theta 9$  y  $\psi 4$  positivas para la mutación tomando *del177* (D16) como control de reacción (purificados por kit). B) PCR-ARMS utilizando los oligonucleótidos HF y HN/HM en las clona  $\Theta 1$  tomando como

control *del177* (D16), donde N marca sin mutación y M con mutación. C) Secuencia del plásmido  $\Theta 1$  analizada con SnapGene y alineamiento de la secuencia *del177* sin mutación y del plásmido  $\Theta 1$ , en la línea azul muestra el cambio de base c.303 G>C que se obtuvo a partir de la mutagénesis. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h.

El plásmido  $\Theta 1$  se mandó a secuenciar con los oligonucleótidos 1s y 4as (10 $\mu$ M), el histograma se analizó utilizando los software SnapGene, BioEdit y FintchTV identificando así el cambio puntual c.303 G>C (Figura 19c), también se muestra un blast realizado con la plataforma clustal omega utilizando el algoritmo waters, en el que se marca la presencia de la mutación c.303 G>C (línea azul).

A partir de este punto, los plásmidos serán nombrados de la siguiente manera: PV (Topo 3.3 vacío), Wt (*SLC35A1*), *del177* (*del177*), Wtc.303 (c.303 G>C *SLC35A1*) y *del177c.303* (c.303 G>C *del177*).

## 8.5 Transfección de plásmidos mediante lipofectamina utilizando el sistema Lec2

---

Una vez verificados los plásmidos Wtc.303 ( $\beta 5$ ) y *del177c.303* ( $\Theta 1$ ), fueron transfectados en células Lec2 como se describe en la sección de metodología. Estas células sufrieron un proceso de selección utilizando Geneticina (G418) durante dos semanas (Figura 20a). Adicionalmente, mediante RT-PCR punto final se confirmó la presencia de la secuencia codificante del *SLC35A1* y la isoforma *del177* fragmentos de 863 pb y 687 pb para Wtc.303 y *del177 c.303* respectivamente (Figura 20b). Este resultado se corroboró mediante secuenciación, a la secuencia se le realizó un blast utilizando la plataforma clustal omega mediante el algoritmo Waters, en el que se marca la presencia de la mutación c.303 G>C (circulo azul, figura 20c).

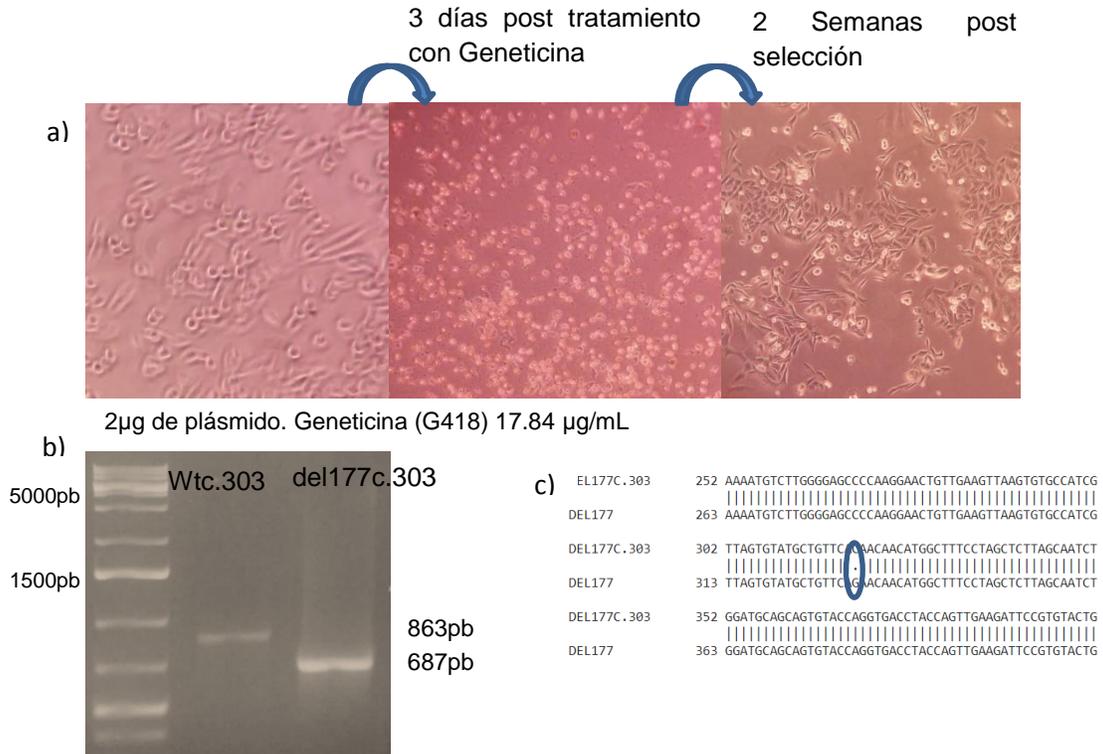


Figura 20. Transfección de los plásmidos Wtc.303 y del177 mediante lipofectamina.

a) Células seleccionadas con geneticina (objetivo 10X, microscopio óptico). b) Producto de RT-PCR del *SLC35A1* y *del177* de las células transfectadas con los plásmidos Wtc.303 (*SLC35A1* c.303 G>C) y del177c.303 (*del177* c.303 G>C). c) Blast de la secuencia del plásmido  $\Theta$ 1 analizada con ClustalOmega. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h.

## 8.6 Complementación genética

---

Una vez verificada la presencia del *SLC35A1* con c.303 G>C y la *del177* con c.303 G>C, descrito en el apartado 8.5 se realizó una segunda transfección, como se describe en el apartado 8.6.1.

### 8.6.1 Transfección de plásmidos: PV, Wt, Wtc.303, del177 y del177c.303.

Antes del proceso de transfección cada plásmido se analizó molecularmente: se realizó una digestión para verificar su identidad mediante peso molecular PV (5407pb), Wt (6831pb), del177 (6653pb), Wtc.303 (6831pb) y del177c.303 (6653pb) e integridad (Figura 21a).

Para el proceso de transfección se utilizaron células Lec2 (células deficientes en la síntesis de proteínas con ácido siálico) con los plásmidos PV (Topo 3.3 vacío), Wt (*SLC35A1*), del177 (*del177*), Wtc.303 (c.303 *SLC35A1*) y del177c.303 (c.303 *del177*). Se siguió el protocolo descrito en la sección de metodología. Las células fueron seleccionadas con geneticina (1mg, 25uL/mL) durante dos semanas. Posterior a este proceso las células se resembraron en cajas de 24 pozos  $5 \times 10^5$ , obteniendo ARN de cada transfección 24h post sembrado. Los geles de integridad se muestran en la figura 21b, a partir del ARN se realizó ADNc el cual se ocupó como templado para verificar la expresión del mensajero *SLC35A1* y *del177*.

Para verificar que las células transfectadas con los plásmidos PV (Topo 3.3 vacío), Wt (*SLC35A1*), del177 (*del177*), Wtc.303 (c.303 *SLC35A1*) y del177c.303 (c.303 *del177*); seguían manteniendo un perfil molecular Lec2, se amplificó el *SLC35A1* de hámster mediante RT-PCR punto final. De izquierda a derecha vemos el producto de PCR obtenido a partir de células CHO de 1019 y 841 pb, los 6 carriles rotulados como PV, Wt, del177, Wtc.303 y del177c.303, muestran un perfil correspondiente a Lec2 de 842 y 664 pb, que es lo esperado (Figura 21c).

A partir de ADNc se realizó una RT-PCR punto final utilizando los oligonucleótidos 1s (sentido) y 4as (anti sentido) que amplifican el *wt* y *del177*. De izquierda a derecha la amplificación por cada transfección, como lo indica la teoría, el PV (que no contiene el *SLC35A1* o *del177*) no muestra ningún producto de amplificación, por otra parte Wt y del177 muestran un fragmento del tamaño esperado 864pb y 687 pb respectivamente, lo mismo ocurre para Wtc.303 y del177c.303, respectivamente (Figura 21d).

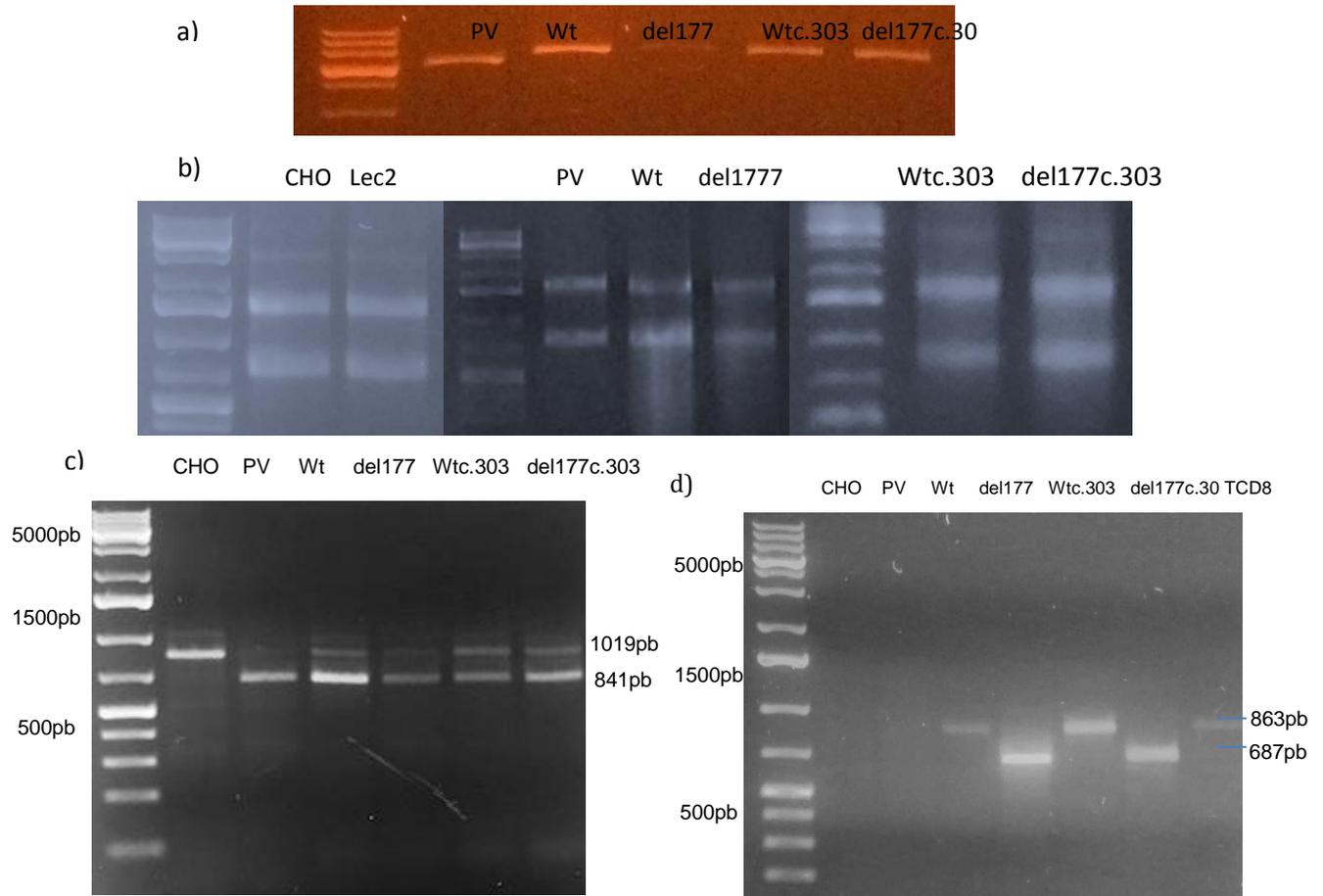


Figura 21. Transfección de los plásmidos PV, Wt, del177, Wtc.303 y del177c.303: análisis molecular. a) Linearización de los plásmidos. b) Purificación de RNA, a partir de las células transfectadas, se distinguen las sub unidades ribosomales 28s y 18s. c) RT-PCR punto final del *slc35A1* de hámster. d) PCR punto final del *SLC35A1*. CD8: linfocitos TCD8 humanos, células control para verificar la expresión del *SLC35A1*. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h

Con esto confirmamos que las células transfectadas Wt, del177, Wtc.303 y del177c.303, expresan el mensajero correspondiente.

Hasta este punto se tienen plásmidos que contiene el cambio c. 303 G>C de la isoforma *wt* humana del *SLC35A1* y la isoforma *del177*, y las células transfectadas expresan el *SLC35A1* y la *del177* en el modelo de complementación genética CHO-Lec2.

El último objetivo particular es determinar y analizar los cambios en el nivel de sialilación celular que genera la complementación del *SLC35A1* y *del177* en el modelo CHO-Lec2. Analizando la proliferación celular utilizando la molécula MTT, durante un ensayo de citotoxicidad ocupando la lectina RCA I.

#### 8.6.2 Análisis de citotoxicidad con la lectina RCA-1

A partir de las células transfectadas se realizó un ensayo de citotoxicidad utilizando la lectina RCA I; esta lectina reconoce residuos de galactosa cuando no hay presencia de ácido siálico (1,36), al ocurrir lo anterior, es endocitada promoviendo muerte celular. El mecanismo completo de acción se muestra en la Figura 32 (Anexo).

En cajas de 24 pozos se sembraron  $5 \times 10^5$  células/mL, esto por cada tipo celular, CHO como un control negativo a la citotoxicidad, Lec2 y PV como controles positivos a la citotoxicidad y por ultimo Wt y del177 que deberían ser negativos a la citotoxicidad. El objetivo de este experimento fue determinar la funcionalidad del transportador de CMP-Sia en las células transfectadas con PV, Wt y del177 durante una cinética de crecimiento celular a las 24h y 48h, verificando así el modelo de complementación genética (Figura 21).

#### 8.6.3 Ensayo de citotoxicidad utilizando MTT

Por último se realizó un ensayo de citotoxicidad ocupando la lectina RCA I, para determinar y analizar los cambios en el nivel de sialilación celular que genera la

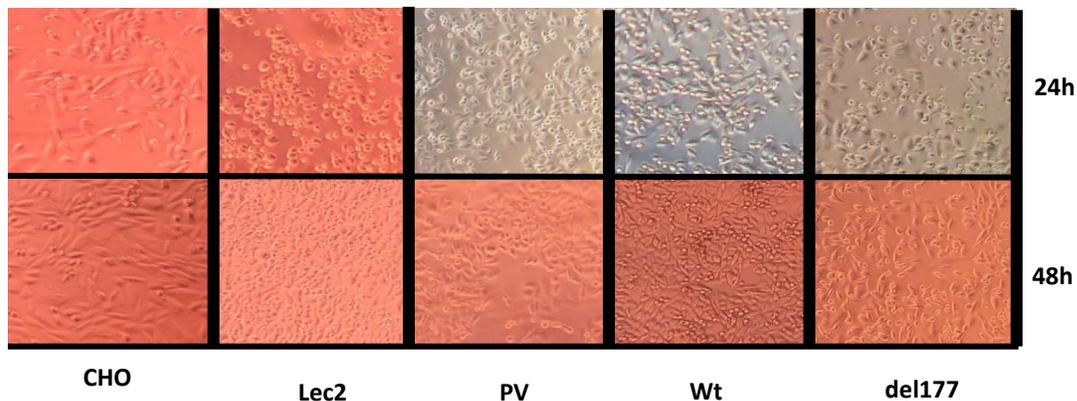


Figura 22. Análisis de citotoxicidad utilizando la lectina RCA I en células CHO, Lec2 Wtc.303 y del177c.303. La figura muestra el perfil fenotípico entre células transfectadas con PV (vector Topo 3.3 vacío), Wt (*SLC35A1*) y del177 (*del177*), al recibir un tratamiento con RCA I (10ng/uL), tomando como control positivo de supervivencia a las células CHO y como control negativo a las células Lec2.

complementación de las células Lec2 transfectadas con Wtc.303 (c.303 *SLC35A1*) y del177c.303 (c.303 *del177*) en el modelo de complementación genética CHO-Lec2. Como se describió previamente la lectina RCA I es citotóxica debido al reconocimiento de residuos de galactosa y *N*- Acetil galactosamina terminales, los cuales están expuestos en la superficie celular cuando no hay residuos terminales de ácido siálico.

Lo anterior nos permitió concluir sobre el comportamiento de la isoforma del177 con el cambio Gln1011His debido a la mutación c.303 G>C.

A partir de los resultados descritos en la sección 8.6.2 decidimos realizar tres experimentos independientes del mismo ensayo por triplicado. En placas de 96 pozos se sembraron a una densidad de  $10 \times 10^4$  células/mL, esto por cada célula transfectada, a cada pozo se le adicionó la lectina RCA I (10ng/mL). Este experimento se planteó como una cinética de 24h y 48h. Al término de cada tiempo se utilizó la molécula MTT (Apéndice 11.7, figura 31) como indicador de proliferación. En cada experimento se utilizaron las células CHO como control positivo; Lec2 y PV como controles negativos, así como con las células transfectadas con, Wt, del177, Wtc.303 y del177c.303.

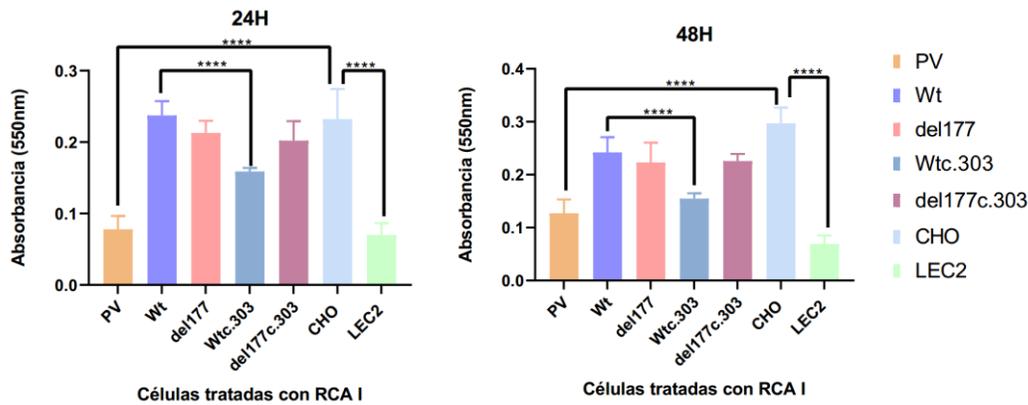


Figura 23. Ensayo de MTT: análisis de citotoxicidad utilizando la lectina RCA I en células CHO, Lec2, PV, Wt, del177, Wtc.303 y del177c.303 a 24h y 48h.. La figura muestra el comportamiento entre células transfectadas con el PV, Wt, del177, Wtc.303 y del177c.303, al recibir un tratamiento con RCA I (10ng/uL) y siendo analizadas post tratamiento con MTT a 24h y 48h, tomando como control positivo de proliferación a las células CHO y como control negativo a las células Lec2.

N=9, t student  $p < 0.05$ .

En la figura 23 podemos observar el resultado de la cinética a los dos tiempos analizados 24h y 48h. Lo primero que se comparó fue el comportamiento del modelo de complementación, mostrando una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre la proliferación de células CHO y células Lec2 (Figura 24a), así como la proliferación de células CHO respecto de células PV (Figura 33, anexo).

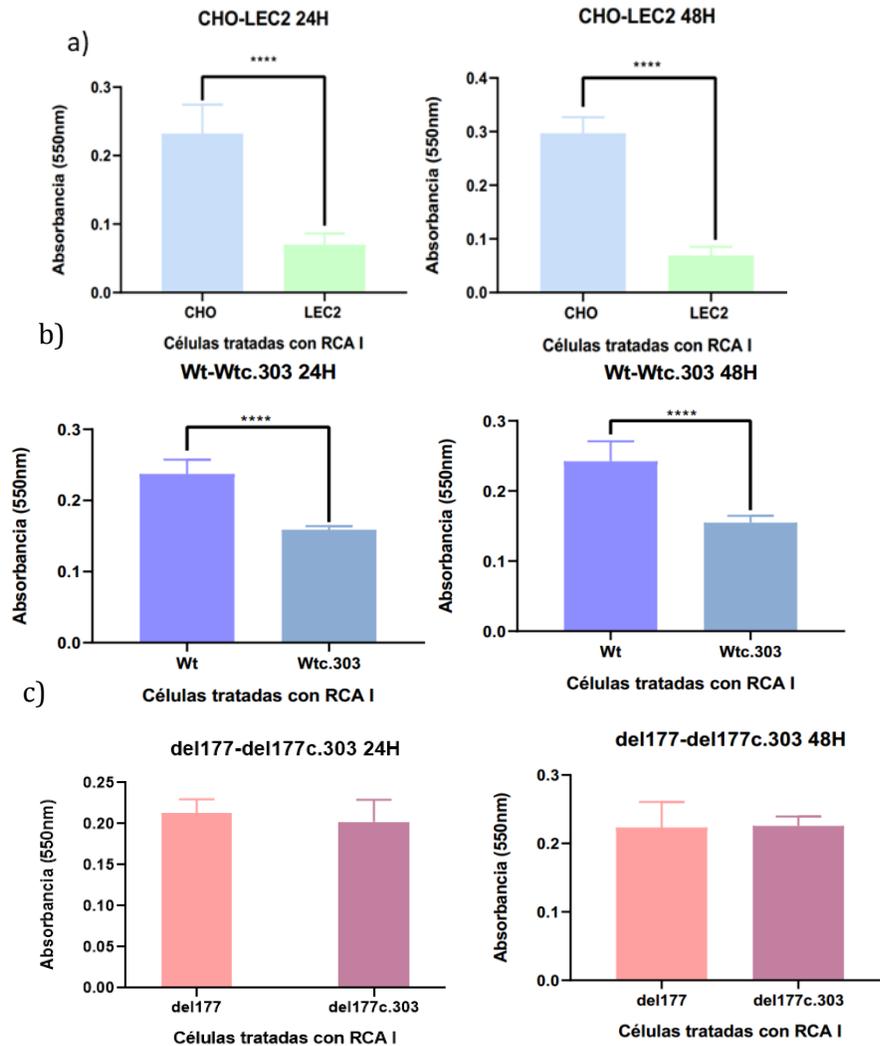


Figura 24. Ensayo de MTT: comparación de células CHO y Lec2; Wt y Wtc.303; del177 y del177c.303 a 24h y 48h. A) Este conjunto de gráficas muestra la comparación entre las células CHO y Lec2 a 24h y 48h. B) En este inciso se comparan las células Wt y Wtc.303 a 24h y 48h. C) Comparación de del177 y del177c.303, analizada post tratamiento con MTT a 24h y 48h. N=9, t student  $p < 0.05$ .

Las células CHO siendo el control positivo de proliferación, mantienen un grado de proliferación creciente conforme pasa el tiempo, indicando así que las células son viables (Figura 23). Al analizar a las células Lec2, siendo el control negativo de proliferación, vemos una disminución estadísticamente significativa de la proliferación, indicando que las células están muriendo. Lo anterior muestra que la lectina RCAI está actuando como un agente citotóxico debido a la ausencia de ácido siálico en la membrana plasmática. Como era esperado, el nivel de absorbancia que se observó en las células PV fue similar al descrito para las células Lec2 (Figura 33, anexo), indicando la ausencia de ácido siálico presente en la membrana plasmática.

Por su parte, las células Wt y del177 mostraron un nivel de absorbancia similar al de las células CHO como lo muestra la figura 23 (Figura 34, anexo), lo que indica que estas células presentan ácido siálico en su superficie celular, corroborando lo reportado por Salinas-Marín et al., (2016) acerca de la isoforma del177 y su funcionalidad comparable con la Wt.

Una vez verificados los controles de manera individual, se realizaron análisis de citotoxicidad comparativos entre las células Wt y Wtc.303 a las 24 y 48 h (Figura 24b) así como de las células del177 y del177c.303 (Figura 24c). La comparación entre las células transfectadas con el Wt y las células transfectadas con Wtc.303 mostró que en cada tiempo de la cinética el nivel de absorbancia indicativo de la proliferación celular no fue el mismo; Wtc.303 mostró una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en el nivel de proliferación, aproximadamente del 50% comparado con la proliferación de las células Wt, confirmando que la mutación c.303 G>C, reportada por Mohamed et al., (2013) (28), reduce la actividad del transportador de CMP-Sia (aproximadamente un 50%) y esto se traduce en reducción de ácido siálico presente en la membrana plasmática.

La comparación entre el nivel de proliferación de las células transfectadas con del177 tratadas con RCA I y sin tratamiento (Figura 25a) no mostró diferencia significativa. Realizando la misma comparación con las células del177c.303 con y sin tratamiento de RCA I, mostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa (Figura 25b). Por último, el nivel de absorbancia de las células transfectadas con del177 y del177c.303 (Figura 24c y figura 25) no muestra un cambio significativo. Este resultado se explica de la siguiente manera: las células transfectadas con del177c.303 son resistentes a la lectina RCA I, la resistencia únicamente puede generarse si las células muestran presencia de ácido siálico en la superficie celular, por lo tanto estas células tienen la capacidad de

transportar CMP-Sia a pesar del cambio de amino ácido Gln101His generado por la mutación c.303 G>C, lo que demuestra que la isoforma no muestra un cambio significativo en el transporte de ácido siálico, aceptando así la hipótesis de este trabajo “La mutación puntual c.303 G>C no afecta la función de la isoforma del177-SLC35A1 humana”. Además se puede observar que la del177c.303 se comporta exactamente igual que la del177 y el Wt, lo que remarca que el cambio Gln101His tiene un comportamiento totalmente diferente entre el SLC35A1 (reducción del 50%) y la isoforma del177 (sin cambio significativo). Esto nos insta a indagar, qué regiones son indispensables en la isoforma del177. Debido a que su conformación es independiente del SLC35A1, emancipándola así de las regiones preconcebidas como indispensables.

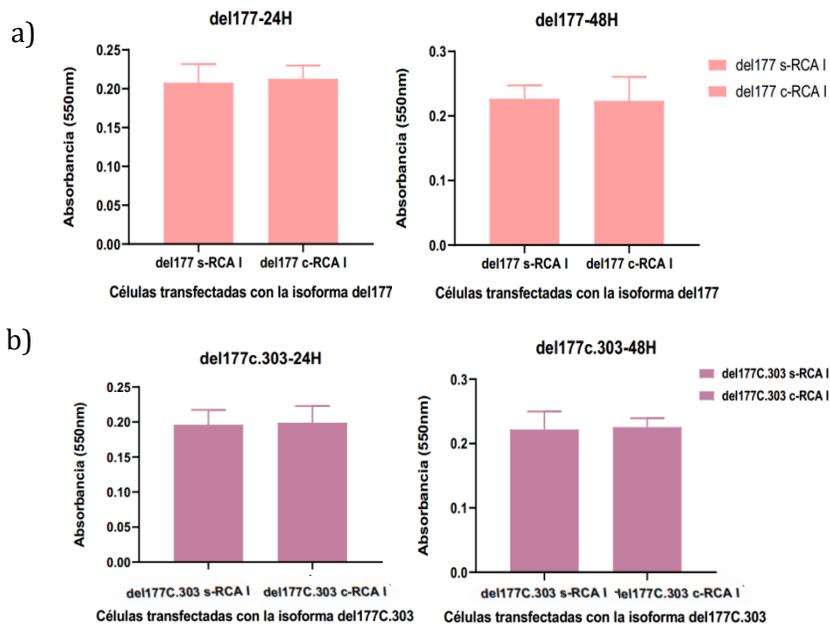


Figura 25. Comparación de proliferación: en células del177 y del177c.303 a 24h y 48h con y sin RCA I. a) Células del177 con y sin RCA I a 24h y 48h. b) Células del177c.303 con y sin RCA I a 24h y 48h. Análisis post tratamiento con MTT a 24h y 48h. N=9, t student  $p < 0.05$ .

## 9.0 Discusión y Conclusiones

---

### 9.1 Validación de antecedentes

---

Recordando nuestro objetivo general que fue analizar la isoforma *del177-SLC35A1* (*del177*) con el cambio de aminoácido 101 de Gln>His. A partir de este objetivo validamos que en efecto la isoforma *del177* tienen un comportamiento similar al *SLC35A1*, confirmando que la funcionalidad de la isoforma *del177*, reportado por Salinas-Marín et al., (2016) (18, 31). Dicha comparación nos permitió, además, contar con los controles necesarios para evaluar el efecto que genera la mutación puntual c.303 G>C, tanto en el *SLC35A1* como en la isoforma *del177*.

Al transfectar las células con el plásmido *Wtc.303*, estas mostraron una reducción significativa del 50% ( $p < 0.0001$ ) en la proliferación celular al compararlas con células transfectadas con el *Wt*. Dicho resultado concuerda con lo previamente reportado por Mohamed et al., (2013) (28) y confirma que la mutación puntual afecta la funcionalidad del transportador de CMP-Sia. Esta comparación nos ayudó a corroborar el cambio que genera la mutación puntual c.303 G>C en el *SLC35A1* y nos permitió evaluar y comparar el comportamiento de la isoforma c.303 G>C *del177*.

### 9.3 Caracterización de la mutación puntual c.303g>c en la isoforma *del177*

---

Las células transfectadas con el plásmido *del177c.303* no mostraron una disminución en la proliferación celular, lo que indicó que la mutación puntual c.303 no afecta al funcionamiento de la isoforma *del177*, es decir, no afecta el transporte de CMP-Ácido siálico. Al comparar la proliferación de las células transfectadas con el plásmido *Wtc.303*, con las células transfectadas con el plásmido *del177c.303*, se determinó una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ), una reducción del 50% en las células *Wtc.303* respecto de las células *del177c.303* a las 24h y 48h, lo cual confirma que la mutación c.303 G>C no afecta el funcionamiento de la isoforma *del177*, como si ocurre con el *wt SLC35A1*.

Con los resultados reportados en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

- El sistema de complementación genética CHO-Lec2 sirve para analizar presencia de ácido siálico en la membrana celular.

- Como reportó Salinas-Marín et al., la isoforma del177 es funcional y tiene un comportamiento similar al SLC35A1.
- La mutación c.303 G>C en el SLC35A1 reduce la proliferación en las células transfectadas con el plásmido Wtc.303, aproximadamente un 50 %.
- La mutación c.303 en la isoforma del177 no reduce la proliferación en las células transfectadas con el plásmido del1177c.303 (Figura 25), a pesar de estar presente justo en el TM3, un dominio importante en el transporte de CMP-Sia, por lo que nuestra hipótesis respecto a que la presencia de la mutación c.303 G>C en el TM3 no afecta el transporte se acepta. Ello podría deberse a que el residuo Gln101His interactúa con una región diferente o es sustituido por otro, como ocurre en el caso del TM7 y la Tyr22 en la isoforma del177. Lo anterior propone una reconsideración de los TM indispensables para que la isoforma del177 lleve a cabo el transporte de CMP-Sia.

## 10.0 Perspectivas

---

- Expresión y purificación de la proteína del177 para realizar estudios en vesículas mediante RMN 3D y confirmar posibles residuos involucrados en el transporte mediante el uso de CMP-Sia marcado isotópicamente.
- Realizar el modelo teórico estructural de la interacción del sustrato CMP-Sia y el SLC35A1, así como la isoforma del177.
- Realizar el modelo teórico estructural de la interacción del sustrato CMP-Sia y la isoforma del177, ambos con la mutación c.303G>C.
- Generar una línea estable del CMP-Sia y de la del177 mediante CRISPR RNA-guided genome editing.

## 11.0 Apéndice

---

### 11.1 Glicoconjugados

---

Los glicoconjugados son moléculas que tienen como estructura más de una macromolécula (carbohidrato, proteína, lípido) enlazada covalentemente a un carbohidrato. Constituyen una proporción significativa de la masa y variación estructural en los diferentes tipos celulares (3), el estudio de los glicoconjugados es determinado por la disciplina conocida como glicobiología (1).

### 11.2 Glicobiología

---

La glicobiología es la ciencia que se enfoca en el entendimiento de la estructura, bioquímica, biosíntesis, y evolución de los glicanos presentes en los glicoconjugados (1).

### 11.3 *N*-Glicosilación

---

La *N*-Glicosilación es un proceso co y post traduccional que parte de la unión covalente del grupo amida del residuo de Asn de una proteína presente en una secuencia consenso (Asn-X-Thr/Ser) al residuo de una GlcNAc, carbohidrato que forma parte de la macromolécula conocida como glicano precursor (1), molécula que consta de 2GlcNAc-9Man-3Glc (1).

La biosíntesis de los *N*-Glicanos inicia en la cara citosólica del retículo endoplásmico (RE) con la activación de la molécula dolicol, al añadirse dos grupos fosfato. El glicano precursor inicia su procesamiento en la cara citosólica del RE hasta la unión de la quinta manosa (GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>5</sub>), en este punto una proteína de tipo flipasa se encarga de internalizar el glicano al lumen del RE, donde son añadidas cuatro manosas y tres glucosas; al añadirse la última glucosa (GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub>) el complejo oligosil transferasa (OST), transfiere el glicano precursor del dolicol a la secuencia consenso (Asn-X-Ser/Thr) de una proteína como se muestra en la (Figura 26) (1).

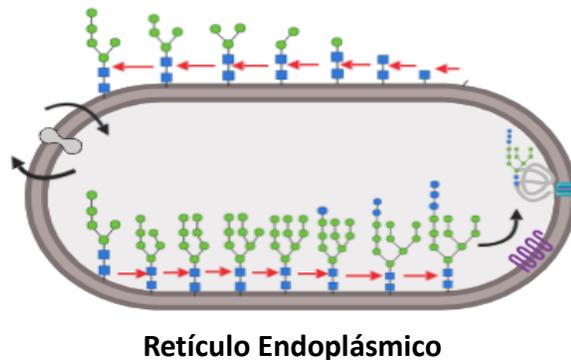


Figura 26. Biosíntesis del glicano precursor. La figura muestra la síntesis completa del glicano precursor el cual inicia en la cara citosólica del Retículo plasmático y continúa en el lumen del organelo.

Una vez que el glicano precursor es transferido a la proteína en el lumen del RE las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa I y II se encargan de remover las tres glucosas terminales, posterior a esta remoción la enzima  $\alpha$ -manosidasa se encarga de retirar la manosa terminal ( $\alpha$  1-2). Posterior a la remoción, el complejo EDEM se encarga de revisar el plegamiento del glicoconjugado, si la estructura tridimensional es adecuada la glicoproteína será transportada al aparato de Golgi (1).

El glicoconjugado concluye su maduración en el aparato de Golgi, partiendo de la remoción de tres manosas dejando el complejo de GlcNAc2-Man3 al cual se le adicionan dos GlcNAc en la cisterna media del complejo de Golgi, posterior a esto el glicano ya no sigue un patrón determinado de síntesis, existen tres tipos de *N*-glicanos que pueden generarse a partir de este precursor: 1) Oligo manosa, 2) Híbrido 3) Complejo (1). Los *N*-glicanos continúan su procesamiento hasta llegar a la cisterna trans del aparato de Golgi, en donde se adiciona el nucleótido carbohidrato ácido siálico como modificación final exclusivamente a los *N*-Glicoconjugados de tipo híbrido y complejo como se muestra en la (Figura 27) (1).

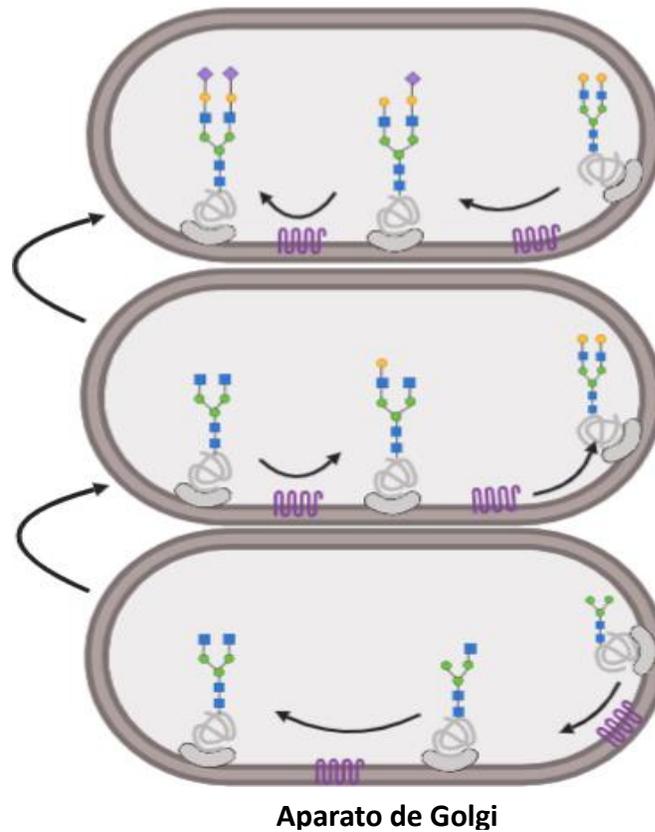


Figura 27. Maduración del *N*-Glicoconjugado. La figura muestra el proceso de maduración de un *N*-Glicoconjugado, proceso que se lleva a cabo en el lumen del aparato de Golgi.

#### 11.4 O-Glicosilación

La glicosilación de tipo O se genera mediante el enlace covalente del grupo OH de una Ser/Thr a un carbohidrato. Los O-glicanos (Figura 28) son un grupo complejo de moléculas que pueden clasificarse a partir del carbohidrato (Fuc, Xyl, Man, GlcNAc, Gal, Glc y GalNAc) al que se adiciona a la proteína (1, 31).

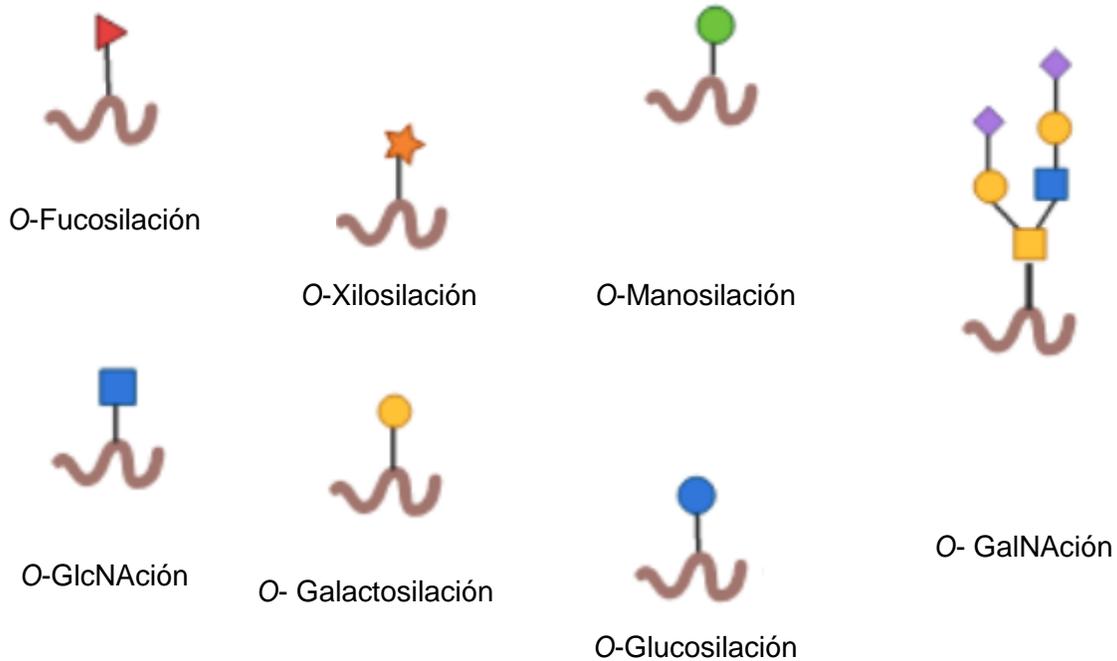


Figura 28. Tipos de O-glicoconjugados presentes en una célula humana. En esta figura se muestran todos los O-glicanos presentes en una célula, y como la diferencia principal es el glicano que se asocia a la misma secuencia consenso Ser/Thr.

Existen diferentes tipos de O-Glicanos, todos son generados como un proceso post traduccional, los tipos de O-Glicosilación se describen a continuación: la O-GlcNAción, parte de la unión covalente de una molécula de GlcNAc a residuos de Ser/Thr, esta modificación se lleva a cabo en el citosol, mitocondria y núcleo (1.); la O-Xilosilación, inicia al unir covalentemente una molécula de xilosa a un residuo de Ser, generando así proteoglicanos (1); la O-Fucosilación, se lleva a cabo al enlazar una molécula de fucosa a un residuo de Ser/Thr de la secuencia consenso Cys-X<sub>4</sub>-(Ser/Thr)-Cys, esta modificación puede tener solo una fucosa enlazada o alongarse al tetra sacárido Sia ( $\alpha$ 2-3/6)-Gal( $\beta$ 1-4)-GlcNAc( $\beta$ 1-3)-Fuc-O-Ser/Thr (1); la O-Manosilación, el proceso inicia con la adición de una manosa al residuo OH de una Ser/Thr, mediado por la proteína O-manosiltransferasa, este tipo de glicosilación tiene tres cores que difieren en el tipo de enlace entre la GlcNAc y la manosa (1); la O-Galactosilación, los disacáridos de galactosa se adicionan a los residuos de Hyp e Hyl, tienen un rol importante en la formación de fibrillas de colágeno; la O-Glucosilación, parte de la unión covalente de una glucosa a un residuo de Ser en la secuencia consenso Cys-X-Ser-X-(Pro/Ala)-Cys, la cual puede extenderse con residuos de xilosa unidos en enlaces  $\alpha$  1-3 (1); por último la O-GalNAción, es el tipo de O-

glicosilación más común en células de humano, este proceso inicia con la unión covalente de una GlcNAc a un residuo OH de los aminoácidos Ser/Thr, este proceso ocurre únicamente en el aparato de Golgi, dependiendo de los glicanos que se añaden después de enlazar la GalNAc se clasifica el tipo de core (núcleo) que se genera, esto ocurre a lo largo del aparato de Golgi y como en la *N*-glicosilación el resultado final es la maduración del glicoconjugado con la adición de ácido siálico terminal en la cisterna trans del aparato de Golgi (1).

## 11.5 Gangliósidos y Anclas de GPI

### 11.5.1 Anclas de GPI

Las anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) son glicoconjugados que están asociados a más de cien proteínas en las células humanas (1). Las anclas de GPI (Figura 29) están presentes mayoritariamente en balsas lipídicas, un componente clave en la membrana celular que brinda funciones específicas como transducción de señales, tráfico vesicular, conformación de proteínas de anclaje, dirección de las proteínas apicales que dirigen la polarización de la célula y la solubilización selectiva de proteínas asociadas a membrana.

La biosíntesis de las anclas de GPI, es un proceso que se divide en tres fases 1) La formación del glicolípido (GPI Man  $\alpha$  1-2- Man  $\alpha$  1-6-Man  $\alpha$  1-4-Glcacil-PI (1, 35); 2) La adición de la proteína y 3) La maduración y transporte a la membrana plasmática el cual comienza en el lado citosólico del RE y termina en el Aparato de Golgi (1, 33, 34)

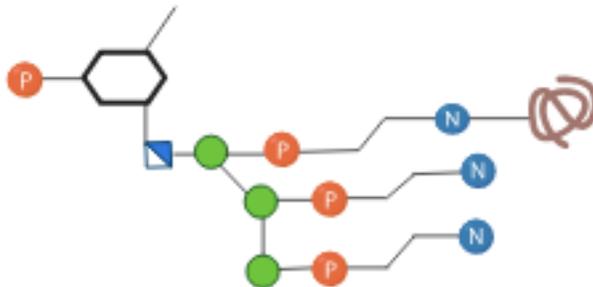


Figura 29 Glicosilfosfatidilinositol. En la figura se observa un ancla de GPI.

---

### 11.5.2 Glicolípidos

---

Los glicolípidos, son glicoconjugados que inician su biosíntesis en la cara citosólica del RE, partiendo de la formación de la molécula ceramida, a la cual el grupo hidroxilo de la Glc será enlazado. Existen diversos tipos de glicolípidos, los gangliósidos por ejemplo están presentes en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, en procesos de señalización así como en diferenciación celular, entre otros (gangliósidos). La biosíntesis de los gangliósidos es un proceso secuencial que inicia con la generación del precursor lactosil ceramida (Cer-Glc-Gal) y progresa de manera seriada, al cual se le adiciona una o más moléculas de ácido siálico (Figura 30) (1, 33, 34).

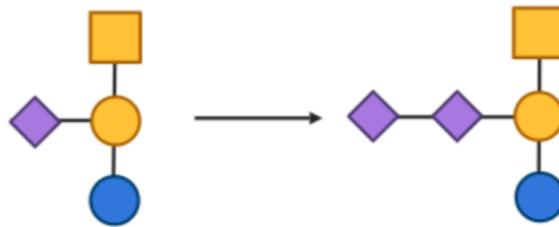


Figura 30. Gangliósidos. En la figura se muestra la síntesis del gangliósido GM2 al gangliósido GD2, ejemplo del proceso de síntesis.

---

### 11.6 Nomenclatura empleada al nombrar un CDG

---

La nomenclatura que se emplea para nombrar un CDG a partir del año 2013 es utilizar el nombre del gen que produce la afectación seguido del acrónimo CDG, un ejemplo es el SLC35A1-CDG, donde el gen afectado es el *SLC35A1* el cual codifica para el transportador de CMP-Ácido Siálico (1).

---

### 11.7 MTT

---

El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Este compuesto se utiliza para determinar la proliferación celular ya que sufre una reacción redox mediada por la NADH deshidrogenasa lo que genera un cambio estructural en la molécula que puede distinguirse a plena vista ya que cambia de un tono amarillo a un tono morado, la molécula absorbe a 550nm óptimamente por lo tanto los ensayos de absorbancia se recomienda realizarlos a 550nm (550-590nm).

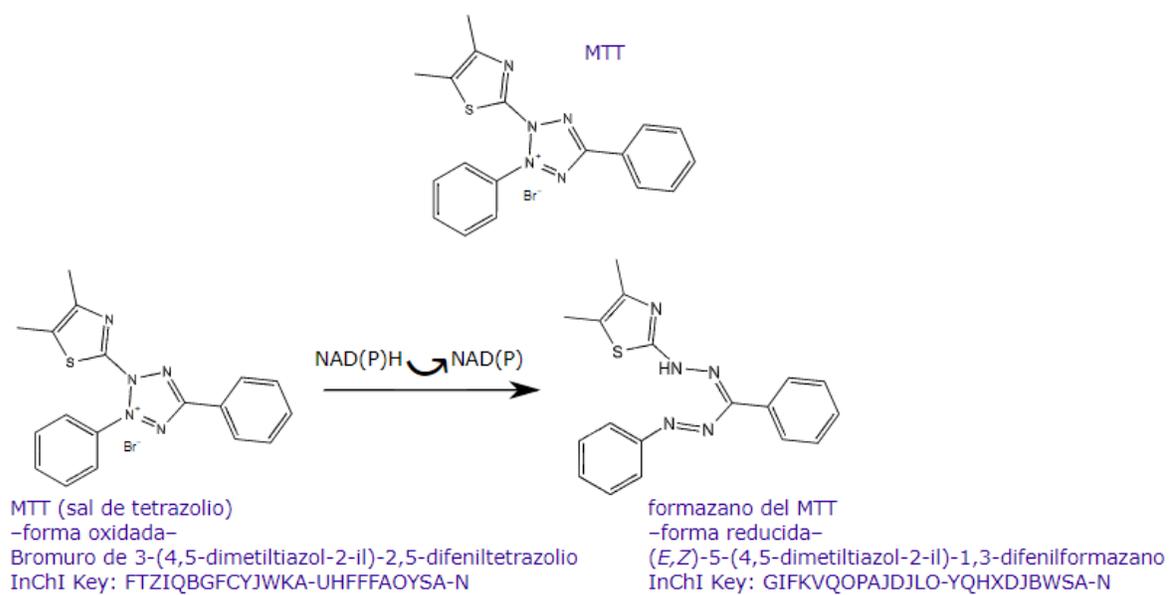


Figura 31. Estructura de la molécula MTT. Reacción redox mediada por la NADH deshidrogenasa.

## 12.0 Bibliografía

---

1. Ajit Varki, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Pamela Stanley, Gerald W. Hart, Markus Aebi, Alan G. Darvill, Taroh Kinoshita, Nicolle H. Packer, James H. Prestegard, Ronald L. Schnaar, Peter H. Seeberger. (2017). *Essentials of Glycobiology*. La Jolla, California: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Rudd, P. M., Wormald, M. R., & Dwek, R. A. (1998). Glycosylation and the immune system. *Journal of protein chemistry*, 17(6), 519.
3. Kiss, J. Z., & Rougon, G. (1997). Cell biology of polysialic acid. *Current opinion in neurobiology*, 7(5), 640–646. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(97\)80083-9](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(97)80083-9)
4. Zhang, L., & Ten Hagen, K. G. (2011). The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation. *Biochemical Society transactions*, 39(1), 378–382. <https://doi.org/10.1042/BST0390378>
5. Sperandio, M., Gleissner, C. A., & Ley, K. (2009). Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological reviews*, 230(1), 97–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x>
6. Ten Hagen, K. G., Zhang, L., Tian, E., & Zhang, Y. (2009). Glycobiology on the fly: developmental and mechanistic insights from *Drosophila*. *Glycobiology*, 19(2), 102–111. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn096>
7. Ruddock, L. W., & Molinari, M. (2006). N-glycan processing in ER quality control. *Journal of cell science*, 119(Pt 21), 4373–4380. <https://doi.org/10.1242/jcs.03225>
8. Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
9. Freeze, H. H., Chong, J. X., Bamshad, M. J., & Ng, B. G. (2014). Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *American journal of human genetics*, 94(2), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.024>
10. Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G., & Patterson, M. C. (2015). Neurological aspects of human glycosylation disorders. *Annual review of neuroscience*, 38, 105–125. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034019>
11. C. Pérez-Cerdá, M.<sup>a</sup>L. Girós, M. Serrano, B. Pérez Dueñas<sup>3</sup>, M.<sup>a</sup>J. Ecay<sup>1</sup>, C. Medrano, L. Gort, B. Pérez González<sup>1</sup>. (2015). Protocolo de diagnóstico y tratamiento de los defectos congénitos de glicosilación. Ediciones Mayo, S.A, ND, 13-27.
12. Eckhardt, M., Gotza, B., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the *Lec2* phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 273(32), 20189–20195. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20189>

13. Ana Rath, Samuel Demarest y Valérie Lanneau. Enero 2020. Prevalencia de las enfermedades raras: Datos bibliográfico. En Informes Periódicos de Orphanet (Serie Enfermedades Raras, 70) orphanet: orphanet. [https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia\\_de\\_las\\_enfermedades\\_raras\\_por\\_prevalencia\\_decreciente\\_o\\_casos.pdf](https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia_de_las_enfermedades_raras_por_prevalencia_decreciente_o_casos.pdf)
14. Guillard, M., Dimopoulou, A., Fischer, B., Morava, E., Lefeber, D. J., Kornak, U., & Wevers, R. A. (2009). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(9), 903–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.009>
15. Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T., & Morava, E. (2014). Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *Journal of inherited metabolic disease*, 37(4), 609–617. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9720-9v>
16. Hirschberg, C. B., Robbins, P. W., & Abeijon, C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annual review of biochemistry*, 67, 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.49>
17. Mohamed, M., Kouwenberg, D., Gardeitchik, T., Kornak, U., Wevers, R. A., & Morava, E. (2011). Metabolic cutis laxa syndromes. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), 907–916. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9305-9>
18. Nji, E., Gulati, A., Qureshi, A. A., Coincon, M., & Drew, D. (2019). Structural basis for the delivery of activated sialic acid into Golgi for sialylation. *Nature structural & molecular biology*, 26(6), 415–423. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0225-y>
19. Salinas Marín, R. (2015). Efecto del knock down del transportador de CMP-Ácido siálico sobre el perfil de sialilación celular de la línea de hepatocarcinoma (hepg2). (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en dinámica Celular.
20. Liu X. (2019). ABC Family Transporters. *Advances in experimental medicine and biology*, 1141, 13–100. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2)
21. Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7572–7576. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7572>
22. Rath, A., & Deber, C. M. (2012). Protein structure in membrane domains. *Annual review of biophysics*, 41, 135–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102310>
23. Eckhardt, M., Gotza, B., & Gerardy-Schahn, R. (1999). Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *The Journal of biological chemistry*, 274(13), 8779–8787. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8779>

24. Von Heijne G. (2006). Membrane-protein topology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(12), 909–918. <https://doi.org/10.1038/nrm2063>
25. Eckhardt, M., & Gerardy-Schahn, R. (1997). Molecular cloning of the hamster CMP-sialic acid transporter. *European journal of biochemistry*, 248(1), 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00187.x>
26. Deutscher, S. L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Briles, E. I., & Hirschberg, C. B. (1984). Translocation across Golgi vesicle membranes: a CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell*, 39(2 Pt 1), 295–299. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90007-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90007-2)
27. Parker, J. L., & Newstead, S. (2017). Structural basis of nucleotide sugar transport across the Golgi membrane. *Nature*, 551(7681), 521–524. <https://doi.org/10.1038/nature24464>
28. Martinez-Duncker, I., Dupré, T., Piller, V., Piller, F., Candelier, J. J., Trichet, C., Tchernia, G., Oriol, R., & Mollicone, R. (2005). Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood*, 105(7), 2671–2676. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3509>
29. Mohamed, M., Ashikov, A., Guillard, M., Robben, J. H., Schmidt, S., van den Heuvel, B., de Brouwer, A. P., Gerardy-Schahn, R., Deen, P. M., Wevers, R. A., Lefeber, D. J., & Morava, E. (2013). Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP--sialic acid transport. *Neurology*, 81(7), 681–687. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a08f53>
30. Ng, B. G., Asteggiano, C. G., Kircher, M., Buckingham, K. J., Raymond, K., Nickerson, D. A., Shendure, J., Bamshad, M. J., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Ensslen, M., & Freeze, H. H. (2017). Encephalopathy caused by novel mutations in the CMP-sialic acid transporter, SLC35A1. *American journal of medical genetics. Part A*, 173(11), 2906–2911. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38412>
31. Kauskot, A., Pascreau, T., Adam, F., Bruneel, A., Reperant, C., Lourenco-Rodrigues, M. D., Rosa, J. P., Petermann, R., Maurey, H., Auditeau, C., Lasne, D., Denis, C. V., Bryckaert, M., de Lonlay, P., Lavenu-Bombled, C., Melki, J., & Borgel, D. (2018). A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica*, 103(12), e613–e617. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.198028>
32. Salinas-Marín, R., Mollicone, R., & Martínez-Duncker, I. (2016). A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter. *Glycoconjugate journal*, 33(6), 897–906. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9697-8>
33. Zhang, L., & Ten Hagen, K. G. (2011). The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation. *Biochemical Society transactions*, 39(1), 378–382. <https://doi.org/10.1042/BST0390378>

34. Harlalka, G. V., Lehman, A., Chioza, B., Baple, E. L., Maroofian, R., Cross, H., Sreekantan-Nair, A., Priestman, D. A., Al-Turki, S., McEntagart, M. E., Proukakis, C., Royle, L., Kozak, R. P., Bastaki, L., Patton, M., Wagner, K., Coblenz, R., Price, J., Mezei, M., Schlade-Bartusiak, K., ... Crosby, A. H. (2013). Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis. *Brain : a journal of neurology*, *136*(Pt 12), 3618–3624. <https://doi.org/10.1093/brain/awt270>
35. Yamaguchi, T., Yamauchi, Y., Furukawa, K., Ohmi, Y., Ohkawa, Y., Zhang, Q., Okajima, T., & Furukawa, K. (2016). Expression of B4GALNT1, an essential glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing. *Scientific reports*, *6*, 34505. <https://doi.org/10.1038/srep34505>
36. Brasil, S., Pascoal, C., Francisco, R., Marques-da-Silva, D., Andreotti, G., Videira, P. A., Morava, E., Jaeken, J., & Dos Reis Ferreira, V. (2018). CDG Therapies: From Bench to Bedside. *International journal of molecular sciences*, *19*(5), 1304. <https://doi.org/10.3390/ijms19051304>
37. Micucci, Horacio Alejandro | Camps, Elena 1987 . (1987). Lectinas: obtención, estructura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacológicas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, vol. 06, no. 01, 35-54.
38. Patnaik, S. K., & Stanley, P. (2006). Lectin-resistant CHO glycosylation mutants. *Methods in enzymology*, *416*, 159–182. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)16011-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)16011-5)
39. Hadley, B., Litfin, T., Day, C. J., Haselhorst, T., Zhou, Y., & Tiralongo, J. (2019). Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. *Computational and structural biotechnology journal*, *17*, 1123–1134. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.002>
40. Thompson, A. J., Williams, R. J., Hakki, Z., Alonzi, D. S., Wennekes, T., Gloster, T. M., Songsrirote, K., Thomas-Oates, J. E., Wrodnigg, T. M., Spreitz, J., Stütz, A. E., Butters, T. D., Williams, S. J., & Davies, G. J. (2012). Structural and mechanistic insight into N-glycan processing by endo- $\alpha$ -mannosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(3), 781–786. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111482109>
41. Ahuja, S., & Whorton, M. R. (2019). Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport. *eLife*, *8*, e45221. <https://doi.org/10.7554/eLife.45221>
42. Ogino, S., Gulley, M. L., den Dunnen, J. T., Wilson, R. B., & Association for Molecular Pathology Training and Education Committee (2007). Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges. *The Journal of molecular diagnostic: JMD*, *9*(1), 1–6. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.060081>
43. Kelly Hughes. (27th February 2007). *Advanced Bacterial Genetics: Use of Transposons and Phage for Genomic Engineering*. Academic Press, 421, 1, 320.

44. Maggioni, A., von Itzstein, M., Rodríguez Guzmán, I. B., Ashikov, A., Stephens, A. S., Haselhorst, T., & Tiralongo, J. (2013). Characterisation of CMP-sialic acid transporter substrate recognition. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 14(15), 1936–1942. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300298>
45. Aoki, K., Ishida, N., & Kawakita, M. (2003). Substrate recognition by nucleotide sugar transporters: further characterization of substrate recognition regions by analyses of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras and biochemical analysis of the substrate specificity of parental and chimeric transporters. *The Journal of biological chemistry*, 278(25), 22887–22893. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302620200>
46. Lim, S. F., Lee, M. M., Zhang, P., & Song, Z. (2008). The Golgi CMP-sialic acid transporter: A new CHO mutant provides functional insights. *Glycobiology*, 18(11), 851–860. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn080>
47. Chan, K. F., Zhang, P., & Song, Z. (2010). Identification of essential amino acid residues in the hydrophilic loop regions of the CMP-sialic acid transporter and UDP-galactose transporter. *Glycobiology*, 20(6), 689–701. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq016>
48. Takeshima-Futagami, T., Sakaguchi, M., Uehara, E., Aoki, K., Ishida, N., Sanai, Y., Sugahara, Y., & Kawakita, M. (2012). Amino acid residues important for CMP-sialic acid recognition by the CMP-sialic acid transporter: analysis of the substrate specificity of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras. *Glycobiology*, 22(12), 1731–1740. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws116>
49. Zhao, W., Chen, T. L., Vertel, B. M., & Colley, K. J. (2006). The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail. *The Journal of biological chemistry*, 281(41), 31106–31118. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605564200>

## 13.0 Anexos

---

### 13.1 Tablas

---

Tabla 1. Localización de los transportadores de nucleótido-carbohidrato presentes en mamíferos.			
Transportador	Retículo Endoplásmico	Aparato de Golgi	Ambos
CMP-Sia		+++	
GDP-Fuc	+	+++	
UDP-Gal		+++	
PAPS		+++	
GDP-Man*		+++	
UDP-GlcNAc			+++
UDP-GalNAc			+++
UDP-Xyl			+++
ATP			+++
UDP-GlcA			+++
UDP-Glc	+++	+	

Tabla 4. Composición de aminoácidos presentes en cada región del SLC35A1			
Región SLC35A1	% de Amino ácidos	Región SLC35A1	% de Amino ácidos
NH+	56% Alifáticos, 22% Cargados, 22% Sin carga	TM6	75% Alifáticos, 15% Aromáticos, 10% Sin carga
TM1	63% Alifáticos, 16% Aromáticos, 16% Sin carga, 5% Cargado	3°	31% Cargados, 31% Cargados, 23% Alifáticos, 15% Aromáticos
1°	33% Cargados, 27% Alifáticos, 27% Sin carga, 13% Aromáticos	TM7	65% Alifáticos, 20% Sin carga, 10% Aromáticos, 5% Cargado
TM2	65% Alifáticos, 25% Sin carga, 10% Cargados	4°	29% Alifáticos, 29% Aromáticos, 29% Cargados, 13% Sin carga
1°	46% Alifáticos, 29% Cargados, 21% Sin carga, 4% Aromáticos	TM8	60% Alifáticos, 25% Aromáticos, 15% Sin carga
TM3	60% Alifáticos 25% Sin carga 10% Aromáticos 5% Cargados	4°	27% Alifáticos, 27% Sin carga, 27% Cargados, 19% Aromáticos
2°	50% Alifáticos, 33% Sin carga, 17% Cargado	TM9	78% Alifáticos, 17% Sin carga, 5% Aromáticos
TM4	53% Alifáticos, 37% Sin carga, 5% Cargado, 5% Aromático	5°	67% Sin carga, 33% Alifático
2°	57% Alifáticos, 28% Sin carga, 15% Cargado	TM10	66% Alifáticos, 32% Aromáticos, 32% Sin carga
TM5	52% Alifáticos, 24% Sin carga, 14% Aromáticos, 10% Cargado	COO-	39% Alifáticos, 35% Sin carga, 26% Cargados
3°	50% Alifáticos, 33% Sin carga, 17% Cargado		

Tabla 5. Modificaciones que afectan el reconocimiento del CMP-ácido siálico					
Residuos	Región del SLC35A1	Modelo u organismo	Experimento	Efecto	Referencia
C16A	TMD1	<i>P.pastoris</i>	Mutagénesis sitio-dirigida del <i>slc35a1</i> (ratón) STD NMR espectroscopia	Pérdida del reconocimiento del carbohidrato	Maggioni 2013
K65A	2do LOOP	<i>P.pastoris</i>	Mutagénesis sitio-dirigida del <i>slc35a1</i> (ratón) STD NMR espectroscopia	Pérdida del reconocimiento del carbohidrato	Maggioni 2013
Y214A	TMD7	<i>P.pastoris</i>	Mutagénesis sitio-dirigida del <i>slc35a1</i> (ratón) STD NMR espectroscopia	Pérdida del reconocimiento del carbohidrato	Maggioni 2013, Eckhardt 1998
TMD 7	TMD7	<i>S. Cerevisiae</i>	Quimera hUGT1-SLC35A1, analizada en modelo Lec2 STD NMR espectroscopia	Pérdida del reconocimiento del CMP-Ácido Siálico	Aoki 2003

Tabla 6. Modificaciones que afectan el transporte del CMP-ácido siálico					
Residuos	Región del SLC35A1	Modelo u organismo	Experimento	Efecto	Referencia
del277, del281 y del130	exón 3 y exón 6	Mutación natural en paciente (no sobrevive)	ND	Inactivación total del transportador de CMP-Ácido Siálico	Martínez-Duncker 2005
Q101H	TMD3	Mutación natural en paciente con discapacidad intelectual (no sobrevive)	ND	Reducción del 50% de transporte	Mohamed 2013
L112G & D113G	3er LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12). Co Transfección en células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP-Ácido Siálico	Chan KF 2010
L136G	4to LOOP	En células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Esencial para la actividad del transportador	Chan KF 2010

G153A & G154A	TMD5	En células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Ligera reducció n de la actividad del transport ador	Lim SF 2008
G153I & G15AI	TMD5	En células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Reducció n de la actividad	Lim SF 2008
G177A & G179A	TMD6	En células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Ligera reducció n de la actividad del transport ador	Lim SF 2008
G177I & G179I	TMD6	En células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Reducció n de la actividad	Lim SF 2008
G189A & G192A	TMD6	En células CHO-WT y Lec2	Co- Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Reducció n de la actividad	Lim SF 2008
Continúa					

G189E	TMD6	En células CHO-WT y Lec2	Mutagénesis sitio-dirigida. Expresada en células CHO-WT y Lec2	Reducción de la actividad	Eckhardt 1998
G189Q	TMD6	Mutagénesis sitio-dirigida. Expresada En células CHO-WT y Lec2	Mutagénesis sitio-dirigida. Expresada en células CHO-WT y Lec2	Reducción de la actividad	Eckhardt 1998
G189I	TMD6	En células CHO-WT y Lec2	Mutagénesis sitio-dirigida. Expresada en células CHO-WT y Lec2	Reducción de la actividad	Eckhardt 1998
G256A & G257A	TMD8	En células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Reducción de la actividad transportadora	Lim SF 2008
<sup>267</sup> TDNI <sup>270</sup> a <sup>267</sup> GGGG <sup>270</sup>	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP-Ácido Siálico	Chan KF 2010
Continúa					

I270G	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Actividad de transporte parcialmente reducida	Chan KF 2010
I270W	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Actividad de transporte parcialmente reducida	Chan KF 2010
K272A	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP- Ácido Siálico	Chan KF 2010
K272G	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP- Ácido Siálico	Chan KF 2010
Continua					

K272H	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP- Ácido Siálico	Chan KF 2010
TMD 2 y 3	TMD 2 Y 3	Quimera hUGT1- <i>SLC35A1</i>	??	Afecta la eficiencia del <i>SLC35A1</i>	Aoki 2003
CST-GFP4	3er LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP- Ácido Siálico	Eckhardt 1998, Chan KF 2010
<i>SLC35A1</i> - GFP8	7mo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP- Ácido Siálico	Eckhardt 1998, Chan KF 2010
Continúa					

SLC35A1-GFP10	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12). Co Transfección en células CHO MAR-11	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP-Ácido Siálico	Eckhardt 1998, Chan KF 2010
T156R y E196K	TMD5 y TMD6	Mutación natural en paciente con severo déficit cognitivo		Reducción del transporte de CMP-Ácido siálico	Bobby G.Ng 2017
del177 SLC35A1	Exón 6	En células CHO-Lec2	Splicing alternativo mediante el uso de Morfolino MO-CMPTR6,complementación en Lec2	Delección del exón 6, no afecta el transporte	Salinas-Marín 2015
Continua					

Y214G	TMD7	Quimera hUGT1- <i>SLC35A1</i>	Complementación génica	Pérdida de actividad <i>SLC35A1</i> , tiene actividad en transportar UDP-Gal	Takeshima-Futagami 2012
S216F	TMD7	Quimera hUGT1- <i>SLC35A1</i>	Complementación génica	Pérdida de actividad <i>SLC35A1</i> , tiene actividad en transportar UDP-Gal	Takeshima-Futagami 2012
<sup>236</sup> KGFF <sup>239</sup> a <sup>236</sup> GGGG <sup>239</sup>	8vo LOOP	Mutante <i>SLC35A1</i> (GFP12).	Co Transfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Inactivación total del transportador de CMP-Ácido Siálico	Chan KF 2010
G256I & G257I	TMD8	En células CHO MAR-11	CoTransfección en células CHO MAR-11 EPO/IEF	Reducción de la actividad	Lim SF 2008

Tabla 7. Modificaciones que afectan la localización del CMP-ácido siálico					
Residuos	Sitio del SLC35A1	Organismo	Experimento	Efecto	Autor
IIGV-COOH	C-Terminal	Células HeLa	Mutagénesis	Perdida de localización en la cisterna <i>trans</i> -Golgi	Zaho 2004
del130 SLC35A1	Exón 6	Humano	Edición natural del ARNm en personas sanas	ND	Martínez-Duncker 2005
del160 SLC35A1	Exón 7	Humano	Edición natural del ARNm en personas sanas	ND	Martínez-Duncker 2005
del108 SLC35A1	Exón 2	Humano	Mutación natural que genera un codón de paro prematuro	ND	Martínez-Duncker 2005

Reactivos	Volumen (µL) recomendado	Mut-RSM 5´	Mut-RSM 3´
Agua (libre de nucleasas)	Llevar a un volumen final de 20 µL	10.5 µL	3 µL
Buffer A 10X	2 µL	2 µL	2 µL
ATP 10Mm	2 µL	2 µL	2 µL
Oligonucleótido	10 pm/ µL	4.5 µL	12 µL
T4PK	1 µL	1 µL	1 µL

Reactivo	Concentración	Concentración de reacción	Volumen utilizado (µL)
Agua (DNase/RNase free)	-	-	17 µL
Buffer Phusion HF	5X	1X	5 µL
Mix dNTP´s	10 mM	100 µM	0.5 µL
Oligonucleótido sentido (Extremo 5´fosforilado)	50 µM	1 µM	0.5 µL
Oligonucleótido Anti sentido (Extremo 5´fosforilado)	50 µM	1 µM	0.5 µL
Phusion Hot Start Polymerase	2 U/µL	0.02 U/µL	0.5 µL
Plásmido <i>SLC35A1/del177</i>	-	10 ng	1 µL

\*El kit describe la reacción para un volumen final de 50 µL, esta tabla muestra los datos para una reacción con volumen final de 25 µL.

25 Ciclos					
	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elongación
Indicaciones del kit (E-541, Thermo Scientific)	30 seg	5-10 seg	10-30 seg	15-30 seg/kb	5-10 min
	98 °C	98 °C	65 °C-72 °C	72 °C	72 °C
Termociclaje utilizado para la mutagénesis c.303	30 seg	10 seg	30 seg	5 min	10 min
	98 °C	98 °C	65 °C	72 °C	72 °C

Tabla 13. Ligación del plásmido producto de la mutagénesis c.303 G&gt;C

Reactivo	Concentración	Concentración de reacción	Volumen
Producto de PCR	-	10-20 ng	5 µL(máximo)
Buffer ligation faster	5X	0.2X	2 µL
T4 ligase	5 U/µL	2.5 U/µL	0.5 µL
Agua (Sigma W4S02-DNase/RNase free)	-	-	Llevar a un volumen final de 50 µL

Tabla 14. Reacción de PCR-ARMS

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen utilizado (µL)
Agua (Sigma W4S02-DNase/RNase free)	-	-	17.75µL
Buffer(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10X	1X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5mM	2.5 µL
Mix dNTP's	10 mM	100 µM	0.5 µL
Oligonucleótido sentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µL
Oligonucleotido Anti sentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µL
Taq DNA pol (#EPO402)	5 U/µL	0.05 U/µL	0.25 µL
Plásmido	-	-	0.5 µL

Tabla 15. Termociclaje empleado en PCR-ARMS

35 Ciclos				
Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elongación
4 minutos	1 min	1 min	1 min	10 min
94°C	94 °C	65-72 °C (Gradiente)	72 °C	72 °C

Tabla 16. Digestión del plásmido con la mutación c.303 utilizando Aval

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Plásmido	-	-	1 µL
Buffer Tango	10X	1X	2 µL
Aval	10 U/ µL	0.125 U/ µL	0.25 µL
Agua (DNase/RNase free)	-	-	16.75 µL

## 13.2 Medios y Soluciones

---

### 13.2.1 Soluciones

PBS 10X	Componentes	(200mL)	Función
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.288g	Estabiliza el pH de la solución.
	NaCl	8.000g	Imita la osmolaridad fisiológica de las células
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.590g	Estabiliza el pH de la solución.
	H <sub>2</sub> O destilada	200mL	Agua libre de microorganismos, solvente de pH neutro.

\*Solución salina que provee de ciertos iones y que además sirve como factor estabilizador de pH.

Tae 50X	Componentes	200mL	Función
	Ácido acético	11.4mL	
	Tris base	49.8g	
	EDTA 0.5 M, pH8	20mL	

\*Solución salina que provee de ciertos iones y que además sirve como factor estabilizador de pH.

VERSENE	Componentes	(200mL)	Función
	PBS 1X	200mL	Solución salina que se utiliza como solvente.
	EDTA	0.0292g	Quelante que permite la asociación de metales pesados, formando compuestos cíclicos soluble en agua y virtualmente no disociables.

\*Solución que actúa como amortiguador de la tripsina al momento de la digestión celular.

EDTA (0.5 M, pH8)	Componentes	(200mL)	Función
	EDTA	29.224 g	
	Agua destilada	Aforar hasta 200mL	Agua libre de microorganismos, solvente de pH neutro.

Solución I de lisis (pH=8)	Componentes	(200mL)	Función
	Glucosa 50mM	0.9g	
EDTA 10mM	0.29g		
Tris 25mM	0.3028 g		

Solución 2 de lisis alcalina	Componentes	(5mL)	Función
	NaOH 10N	500 $\mu$ L	Brinda estabilidad al ADN
	SDS 10%	2500 $\mu$ L	Detergente que permite la desnaturalización de proteínas
	Agua miliQ	2000 $\mu$ L	

Solución 3 de lisis alcalina (pH=4.5)	Componentes	(100mL)	Función
	Acetato de Potasio 5M	60 mL	
	Ácido acético	11.5 mL	
	Agua miliQ	28.5 mL	Agua libre de microorganismos, solvente de pH neutro.

Solución TB	PIPES	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	55 mM
	CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O	15 mM
	KCl	250 mM
	dH <sub>2</sub> O	20 mL

## 13.2.2 Medios

DMEM	Componentes	(50mL)
	DMEM	aforar a 50mL
	SFB	10%
	Str-Pen	1%

LB	Componentes	(50mL)
	Peptona	0.5g
	Extracto de levadura	0.25g
	NaCl	0.5g

## 13.3 Figuras suplementarias



Figura 9. Representación gráfica de la PCR-ARMS para detectar la mutación c.303 G>C. MUT-HF es el oligonucleótido sentido (flecha azul), MUT-HN es el oligonucleótido anti sentido sin mutar (flecha morada), MUT-HM es el oligonucleótido anti sentido que se alinea en presencia de la mutación c.303 G>C (flecha morada).

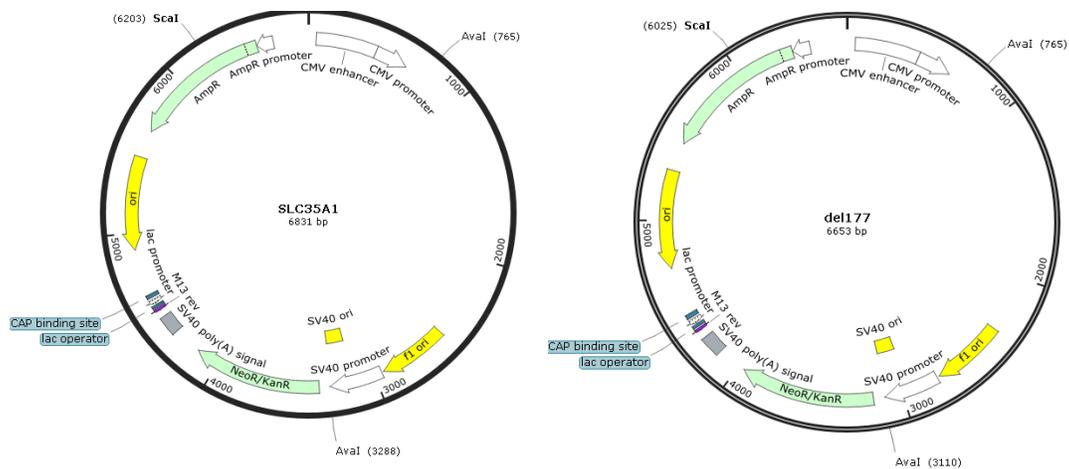
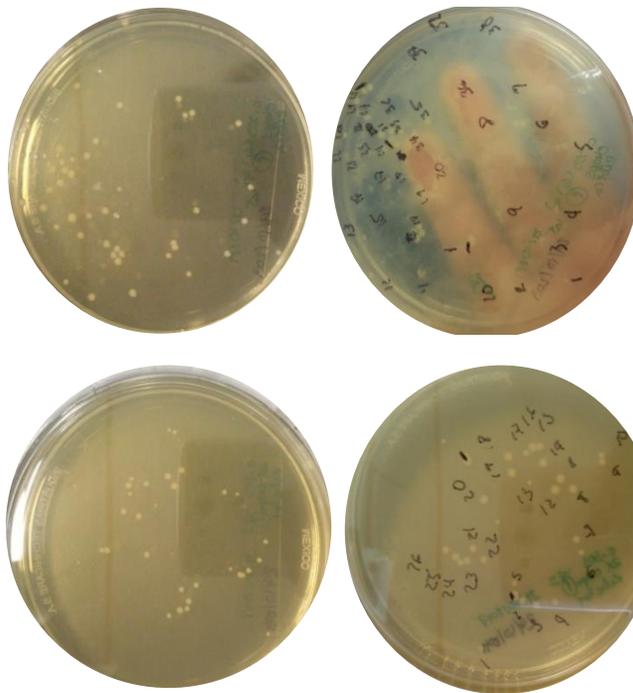


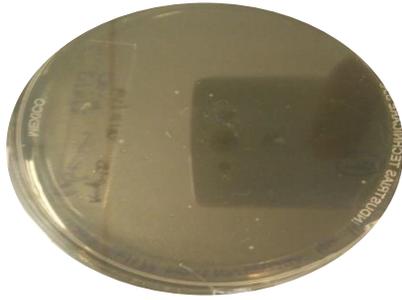
Figura 10. Vector Topo 3.3 que contiene el inserto del *SLC35A1* y la isoforma del177, marcando los sitios de restricción generados por *Aval* y *Sac1*. Utilizando el software Snap gene.



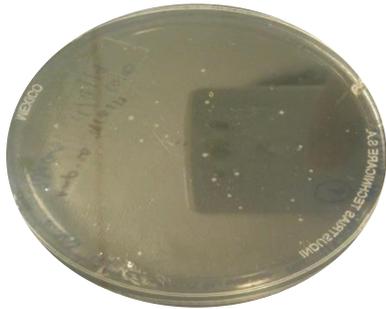
Transformación del producto de ligación utilizando una concentración de 1X de la dilución 1:10 (61.7 ng/uL) de oligonucleótidos fosforilados, clonas B.

Transformación del producto de ligación utilizando una concentración de 2X de la dilución 1:10 (61.7 ng/uL) de oligonucleótidos fosforilados,  $\sigma$ .

Figura 13. Mutagénesis c.303 G>C SLC35A1: producto de transformación. En esta figura se muestra cada una de las colonias obtenidas a partir de cada transformación realizada, las colonias se nombraron por cada transformación así como el número de colonia presente en la caja Petri.



Transformación del producto de ligación utilizando una concentración de 1X de la dilución 1:10 de oligonucleótidos fosforilados, clonas  $\psi$



Transformación del producto de ligación utilizando una concentración de 1X de la dilución 1:10 de oligonucleótidos fosforilados, clonas  $\Theta$

Figura 17. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*: producto de transformación. En esta figura se muestra cada una de las colonias obtenidas a partir de cada transformación realizada, las colonias se nombraron por cada transformación así como el número de colonia presente en la caja Petri.

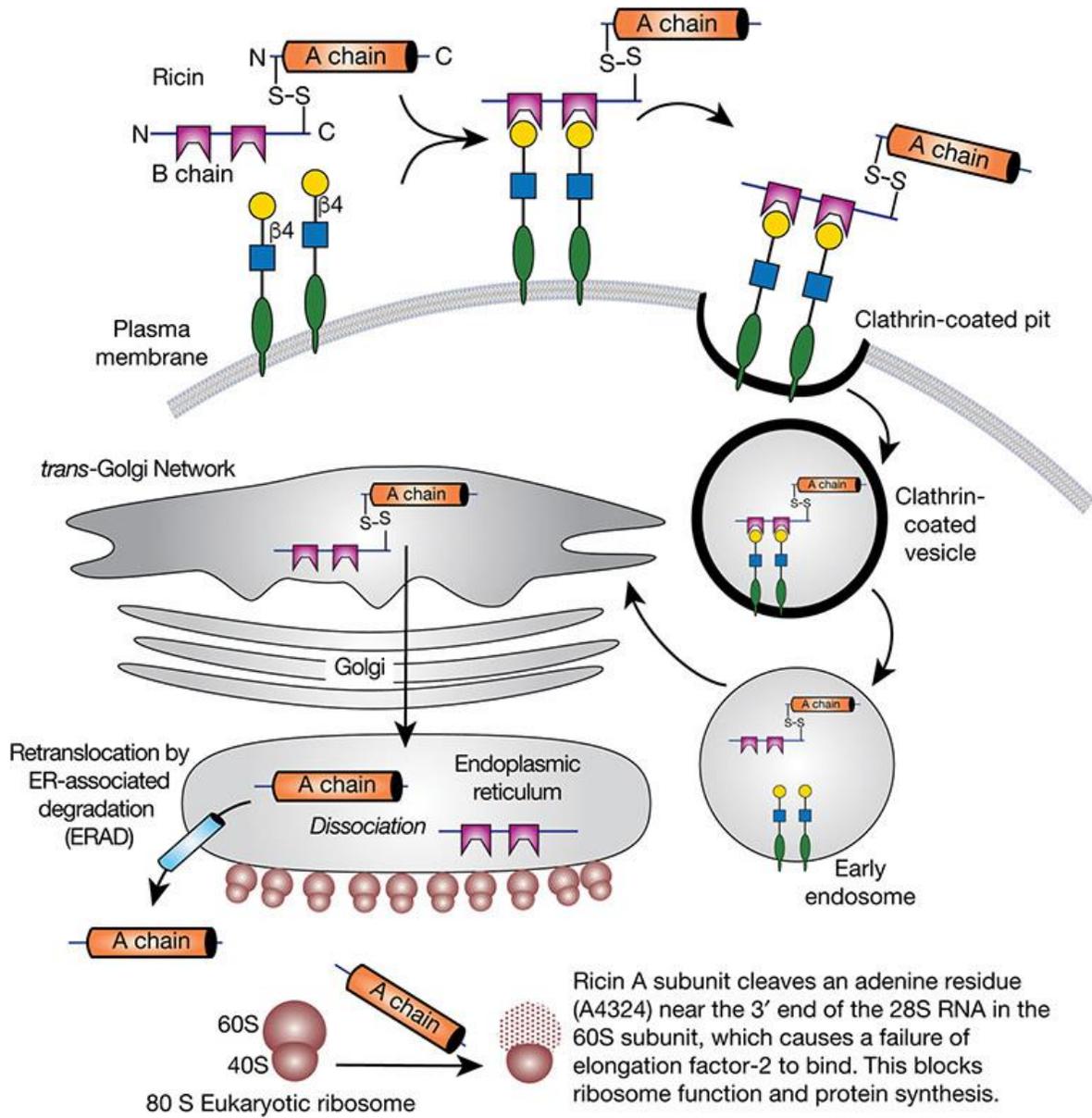


Figura 32. Mecanismo de citotoxicidad mediado por RCA I. En esta figura se muestra el mecanismo de acción que se desencadena una vez que la lectina RCA I se une a un glicoconjugado con galactosa.

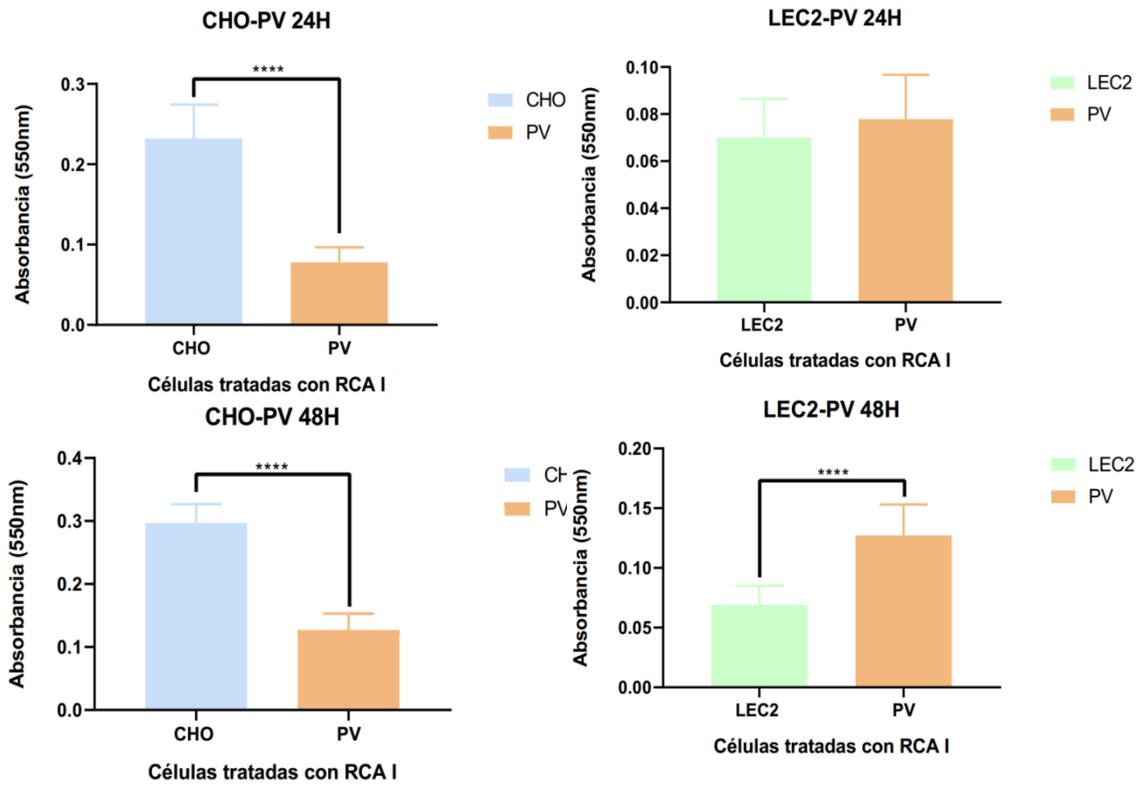


Figura 33. Comparación entre células control: CHO-PV y Lec2-PV. En esta figura se muestra la comparación entre células CHO-PV y Lec2-PV a 24h y 48h.

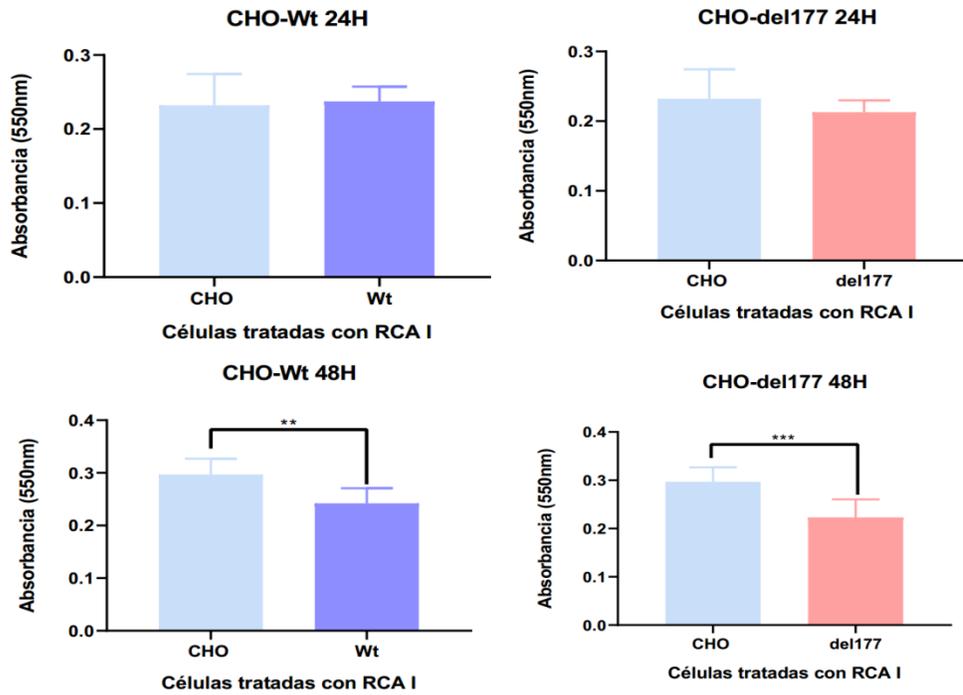


Figura 34. Comparación entre células control: CHO-Wt y CHO-del177. Comparando las células CHO con las células Wt y del177 a las 24h y 48h, se comprueba que tanto Wt como del177 se comportan prácticamente igual a CHO.

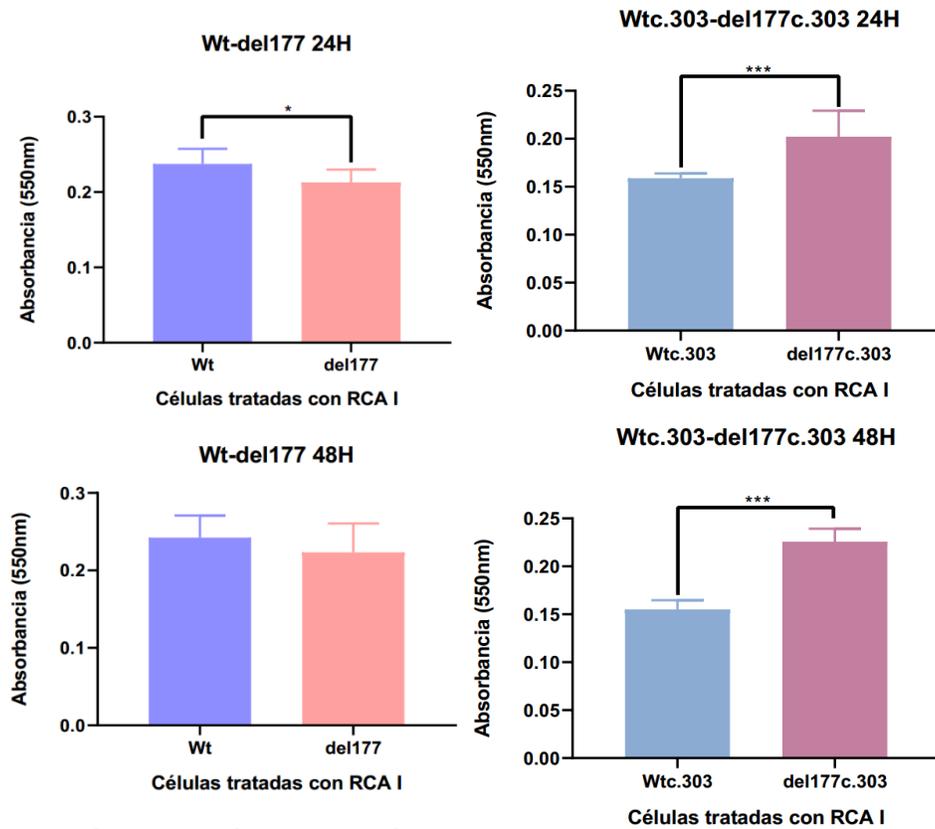


Figura 35. Comparación entre células control: *wt-del177* y *wtc.303-del177c.303*. Comparando las células Wt y del177 y las células Wtc.303 y del177 a las 24h y 48h, se distingue que Wt y del177 muestran un perfil de proliferación similar, sin embargo las células Wtc.303 tienen una reducción aproximadamente del 50% respecto a del177c.303.

## 13.4 Resultados suplementarios

---

### 13.4.1 Eficiencia de transformación-mutación

---

La eficiencia de transformación-mutación del kit E-541 (Thermoscientific), se determinó utilizando el plásmido control  $\Delta$  (lacZ) M15 (codón de paro en la posición 8), el cual lleva dentro el gen que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la enzima encargada de la hidrólisis del disacárido lactosa en sus monosacáridos galactosa y la glucosa (Figura 11a). El plásmido está diseñado para que la traducción del gen no pueda llevarse a cabo debido a la presencia de un codón de paro prematuro que puede revertirse utilizando un oligonucleótido que induce una mutación puntual, restableciendo así el gen. Siguiendo la metodología descrita en el kit E-541 (Thermoscientific), se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos control que restauran la mutación. El producto de PCR se muestra en la figura 11b, corresponde al tamaño esperado 8.4 kb, como se muestra en la figura 11c, obteniendo el 98 % de eficiencia de transformación.

Con esto concluimos que el kit, así como el proceso de ligación y el de transformación son adecuados para llevar a cabo la mutagénesis c.303. G>C.

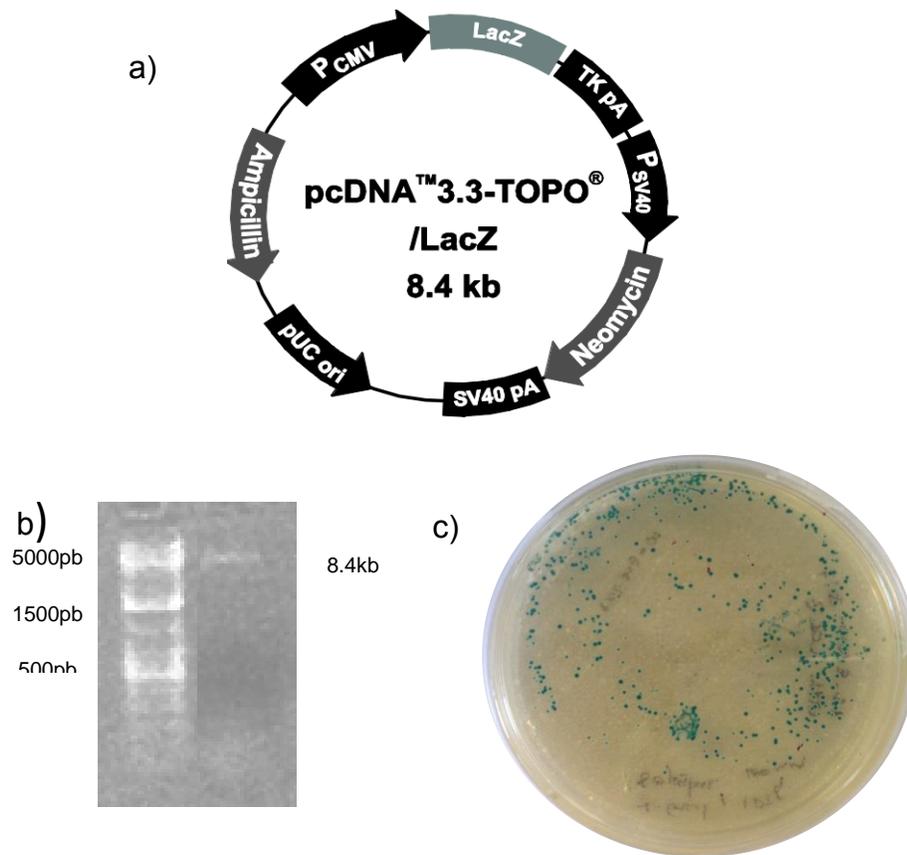


Figura 10. Validación del kit: mutagénesis con el vector LacZ. a) En esta figura podemos observar el vector control que expresa el gen LacZ. b) En este inciso se muestra el fragmento de amplificación que corresponde al peso molecular del plásmido LacZ. El inciso c muestra la caja Petri con colonias transformadas con el plásmido control Lac Z (puntos color índigo) obteniendo un 98% de eficiencia de transformación.

---

#### 13.4.2 Selección de clona con c.303 G>C en el *SLC35A1*

---

Cada clona obtenida (series  $\alpha$  y  $\beta$ ) posterior al proceso de transformación se resembró. A partir de cada una se realizaron PCR de colonia lo que permitió ir descartando clonas, como podemos ver en la figura 14a, el producto de amplificación corresponde a 864 pb. De cada clona positiva se realizaron gliceroles al 80% los cuales fueron almacenados a  $-80^{\circ}$  así como purificación de plásmido.

Con los plásmidos purificados se realizaron reacciones PCR-ARMS con el fin de verificar si cada plásmido presentaba la mutación c.303 G>C. Esta metodología nos permitió distinguir entre dos secuencias prácticamente iguales, para realizarla se utilizan tres oligonucleótidos: uno sentido Mut-HF, y dos anti sentido, uno de ellos complementario a la secuencia sin mutación Mut-HN y el otro complementario a la secuencia con la mutación Mut-HM, con estos oligonucleótidos se realizan dos reacciones de PCR, reacciones que comparten la misma TM experimental y se corren en un gel al mismo tiempo. Lo que se espera observar en los dos carriles es que solo uno de ellos muestre un producto de amplificación, en este caso los oligonucleótidos Mut-HF y Mut-HN o Mut-HF y Mut-HM amplifican un fragmento de 275 pb, el producto de esta reacción se muestra en la figura 14b.

Los plásmidos con la mutación fueron linearizados con la enzima de restricción Sac1, esto con el fin de corroborar el tamaño del vector con el *SLC35A1* mutado, el producto de digestión corresponde a 6831 pb, esta reacción se muestra en la figura 14c. Este análisis se llevó a cabo por cada transformación realizada. Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h.

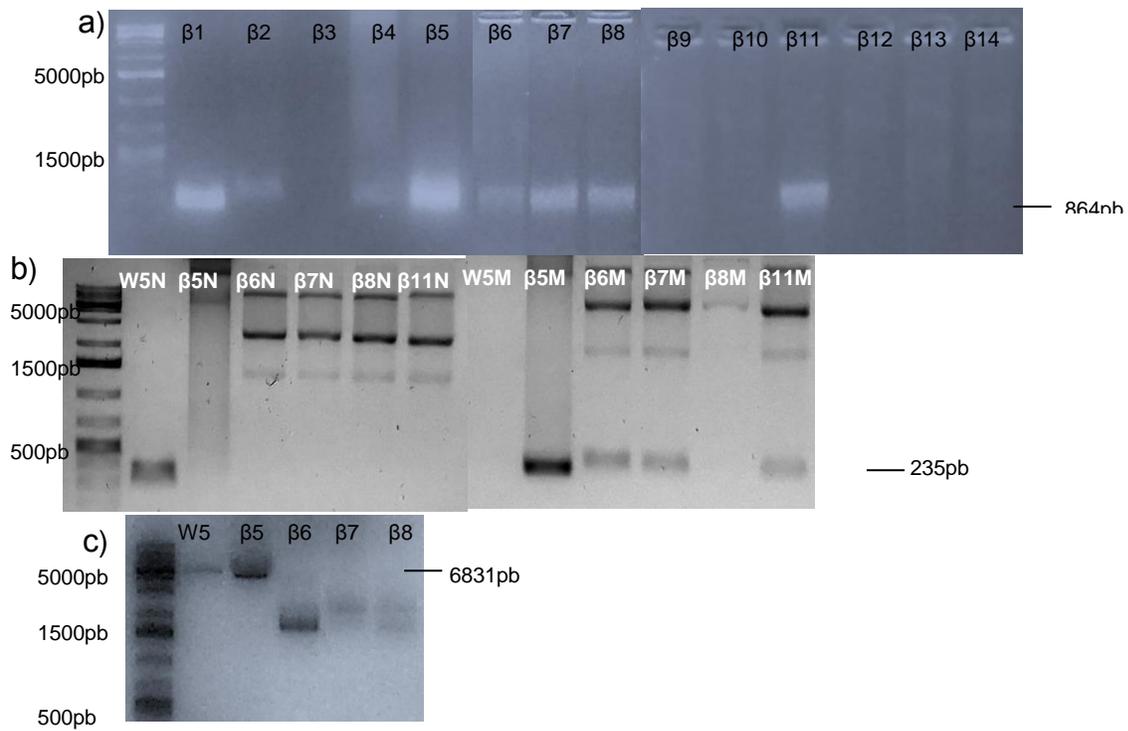


Figura 14. Mutagénesis c.303 G>C *SLC35A1*: selección de clona. A) En esta figura se muestra el producto de PCR de colonia de las clonas  $\beta$ , correspondiente a 864 pb. B) PCR-ARMS de las clonas con *SLC35A1* c.303 G>C, producto de 275 pb. C) Ensayo de restricción utilizando la enzima *Sac1*, producto de 6831 pb.

### 13.4.3 Selección de clona con c.303G>C en la isoforma *del177*

Cada clona obtenida (series  $\psi$  y  $\Theta$ ) posterior al proceso de transformación se resembró. A partir de cada una se realizaron PCR de colonia lo que permitió ir seleccionando solo a las clonas que presentarán un producto de 687 pb (Figura 18a). De cada clona positiva se realizaron gliceroles al 80%, los cuales fueron almacenados a  $-80^\circ$ , además de obtener una purificación de plásmido.

Con los plásmidos purificados se realizaron reacciones PCR-ARMS con el fin de verificar si cada plásmido presentaba la mutación c.303 G>C (Figura 18b).

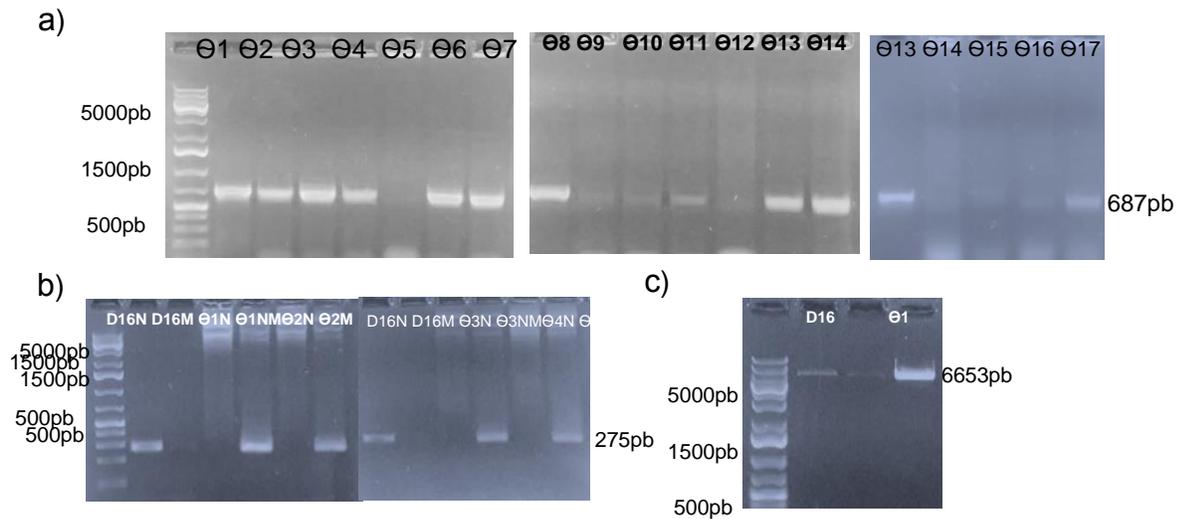


Figura 18. Mutagénesis c.303 G>C de la isoforma *del177*: selección de clona. A) En esta figura se muestra el producto de PCR de colonia de las clonas  $\beta$ . B) PCR-ARMS de las clonas con *del177* c.303. C) Ensayo de restricción utilizando la enzima Sac1.

Gel de 1.5 % de agarosa, 70 Volts/ 1h. Este análisis se llevó a cabo por cada transformación realizada ( $\phi$ ,  $\omega$  y  $\psi$ ).

