



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Clonación, expresión y purificación de la
isoforma funcional del177 del transportador de
CMP-ácido siálico humano”**

T E S I S

QUE PRESENTA:

GABRIELA NAVARRETE CABRERA

**Para obtener el Grado de
LICENCIADO EN CIENCIAS
(Bioquímica y Biología Molecular)**

**Director de Tesis:
Dra. Roberta Salinas Marín**

CUERNAVACA, MORELOS.

FEBRERO 2023

COMITÉ SINODAL DE EXAMEN DE RESIDENCIA

- **PRESIDENTE:** Dra. Blanca Eda Domínguez Mendoza. CIQ-UAEM
- **SECRETARIO:** Dr. Rodrigo Said Razo Hernández. CIDC-UAEM
- **VOCAL:** Dra. Roberta Salinas Marín. CIDC-UAEM
- **SUPLENTE:** Dra. Magdalena Guerra Crespo. IFC-UNAM
- **SUPLENTE:** Dr. Nelson Avonce Vergara. CIDC-UAEM

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres y hermano quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos. Hoy cuando concluyo mis estudios, les dedico a ustedes este como una meta más conquistada.

A mi tutora de tesis la Dra. Roberta Salinas Marín, que sin su apoyo, paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Sus palabras y correcciones precisas fueron siempre útiles cuando no salían de mi mente las ideas para escribir lo que hoy he logrado, gracias por sus múltiples palabras de aliento.

A toda mi familia por sus palabras de aliento, apoyo y su interés en mi crecimiento personal y profesional.

A mis amigos y amigas que estuvieron en cada momento que los necesitaba.

A mis compañeros del Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular por compartir su conocimiento y darme consejos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto por el concepto de beca de licenciatura.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y el Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) por brindarme las herramientas en mi formación profesional.

Al Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez por aceptar mi reubicación en el CIDC y compartirme un espacio dentro de su laboratorio.

A los doctores miembros importantes de mi comité sinodal por participar en mis exámenes y haber dedicado tiempo a la revisión de mi tesis.

A todas y cada una de las personas que de alguna forma me apoyaron durante este logro.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

A la Bióloga Maricela Olvera Rodríguez de LAMMB, IBT, UNAM por el apoyo técnico en las electroforesis SDS-PAGE y Western blot para la realización de este proyecto.

Al Dr. Tomás David López Díaz por el apoyo técnico en el uso del equipo Typhoon para el revelado de las membranas.



El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular del Centro de Investigación y Dinámica Molecular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección de la Dra. Roberta Salinas Marín con soporte económico del proyecto C.B. CONACYT AA1-S-27518 y con CONACYT de licenciatura.

RESUMEN

La glicosilación es una modificación co- y postraduccional que consiste en la adición de glicanos o carbohidratos a lípidos, proteínas y algunos tipos de RNA. En este proceso, esencial para el correcto funcionamiento de las células, participan glicosiltransferasas, glicosidasas, nucleótidos-carbohidratos y proteínas transportadoras de nucleótidos-carbohidratos, como el transportador de CMP-ácido siálico (CST) codificado en el ser humano por el gen *SLC35A1*¹.

El CST es una proteína transmembranal de 10 TMD's que permite el paso del sustrato CMP-ácido siálico al lumen de Golgi, regulando la cantidad de sustrato necesaria para el proceso glicosilación denominado sialilación celular¹.

La adición o disminución excesiva de residuos de ácido siálico a glicoproteínas y glicolípidos está relacionada con ciertas enfermedades multiorgánicas, neurodegenerativas y neuromusculares². Un ejemplo es el cáncer donde normalmente las células presentan alteraciones en los patrones de expresión del ácido siálico como en el cáncer de mama o cáncer cervicouterino donde se presenta un incremento de residuos de ácido siálico en el enlace α -2,6 unido al disacárido Gal β -1,4-GlcNAc³.

Además, mutaciones en el gen *SLC35A1* originan la enfermedad conocida como desorden congénito de la glicosilación, denominado SLC35-CDG, que se caracteriza por neutropenia, infecciones oportunistas recurrentes, retraso en el desarrollo psicomotor, epilepsia, ataxia, microcefalia e hipotonía

El gen SLC35A1 humano presenta 4 isoformas de splicing alternativo generadas por mutaciones que eliminan algún exón total o parcialmente. Estas isoformas son la del130, del177, del244 y del 290, donde la isoforma del177 es funcional al igual que la isoforma silvestre a pesar de perder 59 aminoácidos correspondientes a 177 pb codificados por el exón 6^{3,4}.

Cabe señalar que nuestro grupo de trabajo comprobó la funcionalidad de la isoforma del177 por complementación genética en células Lec 2 (células de ovario de hámster chino) deficientes en el transporte de CMP-ácido siálico. Sin embargo, nunca se ha confirmado su secuencia peptídica ni comparado su actividad transportadora con la variante silvestre del CST⁵.

En este trabajo se logró subclonar el gen SLC35A1 del transportador de CMP-Sia y se expresó en un sistema bacteriano en la cepa de *Escherichia Coli* Mach One con la finalidad de incluir una etiqueta de polihistidina en la región carboxilo terminal del inserto que posteriormente pudiera permitir la purificación de la isoforma silvestre y del177 del CST.

Además, en este proyecto se establecieron las bases de extracción proteica utilizando protocolos de extracción con Sarkosyl y con lisozima se logró estandarizar el Western blot de la isoforma *wt*-SLC35A1.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ÍNDICE	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
2.0 HIPÓTESIS	19
3.0 JUSTIFICACIÓN	19
4.0 OBJETIVOS	19
4.1 <i>Objetivo general</i>	19
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
5.0 ANTECEDENTES	20
5.1 <i>Transportador de CMP-ácido siálico (CST)</i>	20
5.1.1 <i>sistemas de análisis y expresión del transportador deCMP-ácido siálico.</i>	22
5.2 <i>Isoformas de splicing del transportador de CMP-ácidosiálico</i>	23
5.3 <i>isoforma del177 del transportador de CMP-sia humano</i>	25
6.0 MARCO TEÓRICO	28
6.1 <i>Glicosilación</i>	28
6.2 <i>Ácido siálico</i>	31
6.3 <i>Sialilación celular</i>	34
6.4 <i>Familia de los SLC35</i>	35
7.0 METODOLOGÍA	37
7.1 <i>Diseño de oligonucleótidos</i>	38
7.2 <i>PCR convencional de las isoformas wt y del177 del slc35a1.</i>	40
7.3 <i>Purificación de banda</i>	41
7.4 <i>Clonación de las isoformas en el vector PCDNA™3.1DIRECTIONAL TOPO®</i>	42
7.5 <i>PCR de colonia</i>	44
7.6 <i>Purificación de plásmido</i>	44
7.7 <i>Ensayo de restricción de las construcciones de TOPO-HIS con AVA I</i>	45
7.8 <i>Secuenciación de Sanger para verificar la secuencia de plásmido</i>	48
7.9 <i>inducción de proteínas con IOTG</i>	48

7.10 Diálisis de extracto proteico	52
7.11 Concentración de proteína	53
7.12 Cuantificación de proteína con albúmina	53
8.0 WESTERN BLOT DE EXTRACCIONES	54
8.0.1 Preparación de geles.	54
9.0 RESULTADOS	56
9.1 Amplificación del gen del transportador de CMP-ácido siálico. por PCR convencional.	56
9.1.1 Amplificación de las isoformas wt y del177 del transportador de CMP-ácido siálico. (SLC35A1).	56
9.2 Análisis de la clonación de la isoforma wt del SLC35A1 en el vector de clonación pcDNA™3.1 topo.	57
9.3 Análisis de la clonación de la isoforma del177 del SLC35A1 en el vector de clonación pcDNA™3.1 topo.	57
9.4 Secuenciación de Sanger de las construcciones con las isoformas wt y del188 del SLC35A1	58
9.5. Protocolo de extracción con Sarkosyl/bugbuster.	60
9.5.1 Análisis de lisados extraídos con lisozima.	63
9.6 Análisis por PCR de los insertos de las isoformas wt y del177 del SLC35A1.	64
10.0 CONCLUSIONES	65
11.0 PERSPECTIVAS	66
12.0 ANEXOS	66
12.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA OBTENER CÉLULAS MACH ONE	66
12.2 PREPARACIÓN DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR GENERULER 1 KB PLUS DNA	66
12.3 PREPARACIÓN DE BUFFER TAE 50 X	66
12.4 PREPARACIÓN DE MEDIO LB SÓLIDO CON ANTIBIÓTICO	67
12.5 PREPARACIÓN DE MEDIO LB LÍQUIDO CON ANTIBIÓTICO	67
12.6 PREPARACIÓN DE MEDIO SOC	67
12.7 PREPARACIÓN DE GLICEROLES DE LAS CLONAS POSITIVAS	67
12.8 PREPARACIÓN DE BUFFER DE CORRIDA PARA WESTERN BLOT	68
12.9 PREPARACIÓN DE BUFFER DE TRANSFERENCIA PARA WESTERN BLOT	68
12.10 PREPARACIÓN DE ACRILAMIDA PARA GELES DE ELECTROFORESIS	68
13.0 REFERENCIAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
CDG	Defecto congénito de la glicosilación del inglés <i>Congenital Disorder Glycosylation</i>
CHO	Células de ovario de hámster chino del inglés <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CMP	Citidín monofosfato
CST	Transportador de CMP-ácido siálico
CTP	Citidín Trifosfato
HA	Hemaglutinina
HepG2	Línea celular de hepatocarcinoma celular
KDN	2-ceto-3-desoxi-D-gliceroD-galacto-nonulosónico
Lec2	Células mutantes derivadas de CHO deficientes de ácido siálico
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica del inglés <i>National Center of Biotechnology Information</i>
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
NSTs	Transportadores Nucleótido-Carbohidrato del inglés <i>Nucleotide Sugar Transporters</i>
ORF	Marco de lectura abierto del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE	Retículo endoplásmico
TMD	Dominio transmembranal
<i>wt</i>	Tipo silvestre del inglés <i>wild type</i>
CMV	Citomegalovirus
rpm	Revoluciones por minuto
APS	Persulfato de amonio
WGA	Aglutinina de germen de trigo del inglés <i>Wheat germ agglutinating</i>
PNA	Aglutinina de maní del inglés <i>Peanut agglutinin</i>
TA	Temperatura ambiente
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
HA	Hemaglutinina
CMV	Citomegalovirus
IFN γ	Interferón gamma

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas de expresión que han sido utilizados para analizar el transportador de CMP-ácido siálico.	22
Tabla 2. Isoformas de splicing del <i>SLC35A1</i> .	25
Tabla 3. Miembros seleccionados de la familia de transportadores de azúcar de	35
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del <i>SLC35A1</i> con la isoforma del177.	39
Tabla 5. Reactivos y cálculo para la amplificación de las isoformas.	40
Tabla 6. Cálculo para el reactivo binding Buffer.	41
Tabla 7. Reactivos de protocolo de clonación de la isoforma del177.	43
Tabla 8. Reactivos y volúmenes para PCR de colonia.	44
Tabla 9. Ensayo de restricción con templado del177.	46
Tabla 10. Ensayo de restricción con templado wt.	46
Tabla 11. Cortes con enzima de restricción <i>Ava I</i> con el DNA W5 como templado.	47
Tabla 12. Cortes con enzima de restricción <i>Ava I</i> con DNA D16 como templado.	47
Tabla 13. Protocolo para mandar a secuenciación de Sanger.	48
Tabla 14. Reactivos y cantidades para la preparación del gel separador.	49
Tabla 15. Reactivos y cantidades para la preparación del gel concentrador.	50
Tabla 16. Reactivos y cantidades para la preparación del Buffer A.	50
Tabla 17. Reactivos y cantidades para la preparación del Buffer B.	50
Tabla 18. Reativos y cantidades para la preparación del gel separador.	54
Tabla 19. Reactivos y cantidades para la preparación del gel concentrador.	55
Tabla 20. Resultados de la concentración de la isoforma wt.	60
Tabla 21. Resultados de la concentración de las isoformas wt y del177.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadenas de glicanos en diferentes moléculas orgánicas.	14
Figura 2. Modelo de la isoforma del177 humana propuesta por Salinas Marín y colaboradores.	21
Figura 3. Isoformas mutantes del SLC35A1 humano.	24
Figura 4. Isoformas wt y del177 del <i>SLC35A1</i> .	25
Figura 5. Estructura de los tres tipos de <i>N</i> -glicanos.	27
Figura 6. Estructura de los ácidos siálicos <i>N</i> -acetil y <i>N</i> -glicolilneuramínico.	30
Figura 7. Biosíntesis de Neu5Ac.	31
Figura 8. Esquema general de la metodología experimental.	33
Figura 9. Secuencia del gen W5 y D16 con oligonucleótidos marcados y secuencia del exón 6 señalada.	37
Figura 10. Termociclaje para la amplificación de las isoformas <i>wt</i> y del177.	39
Figura 11. Imagen del vector de clonación pcDNA™3.1 Directional TOPO®.	40
Figura 12. Imagen del vector de clonación pcDNA 3.1 Directional TOPO.	43
Figura 13. Representación gráfica del montaje de la diálisis.	52
Figura 14. Representación gráfica de la proteína concentrada.	53
Figura 15. PCR convencional con gradiente de isoforma <i>wt</i> .	56
Figura 16. Amplificación de las isoformas <i>wt</i> y del177.	57
Figura 17. Colonias positivas <i>wt</i> -SLC35A1 con vector pcDNA 3.1 Directional TOPO.	57
Figura 18. Colonias positivas del177-SLC35A1 con vector pcDNA 3.1 Directional TOPO.	58
Figura 19. Cromatogramas de las isoformas <i>wt</i> y del177.	59
Figura 20. Cromatogramas de las isoformas <i>wt</i> y del177.	59
Figura 21. Cuantificación por el método de BSA de la isoforma <i>wt</i> del transportador de CMP-ácido siálico.	60
Figura 22. Gel de electroforesis desnaturalizante teñido con azul de coomassie.	61
Figura 23. Membrana incubada con anticuerpo anti-His 6X.	62
Figura 24. Diluciones por el método de BSA con las isoformas <i>wt</i> y del177 del transportador de CMP-ácido siálico.	63
Figura 25. Membrana teñida con rojo ponceau.	64
Figura 26. PCR de colonias transformadas con la isoforma <i>wt</i> y del177 del SLC35A1	65

Figura 26. Gel teñido con azul de coomassie acrgado con extractos celulares de bacterias transformadas e inducidas con las isoformas wt-SLC35A1 y del177-SLC35A1.	64
Figura 27. Colonias 2 y 3 correspondientes a cada una de las isoformas.	65
Figura 28. Gelde acrilamida teñido con azul de coomassie con muestras de extractos proteicos obtenidos de bacterias transformadas con la isoforma del177-SLC35A1 a diferentes concentraciones de IPTG.	66

1.0 INTRODUCCIÓN

La glicosilación es una modificación co- y postraduccional que es conocida por su papel en el plegamiento, maduración, tráfico, secreción y función de las proteínas. Este proceso inicia en el retículo endoplásmico mediante la incorporación de un precursor glicano a una proteína, lípido o RNA, formando glicoconjugados, figura 1.⁶

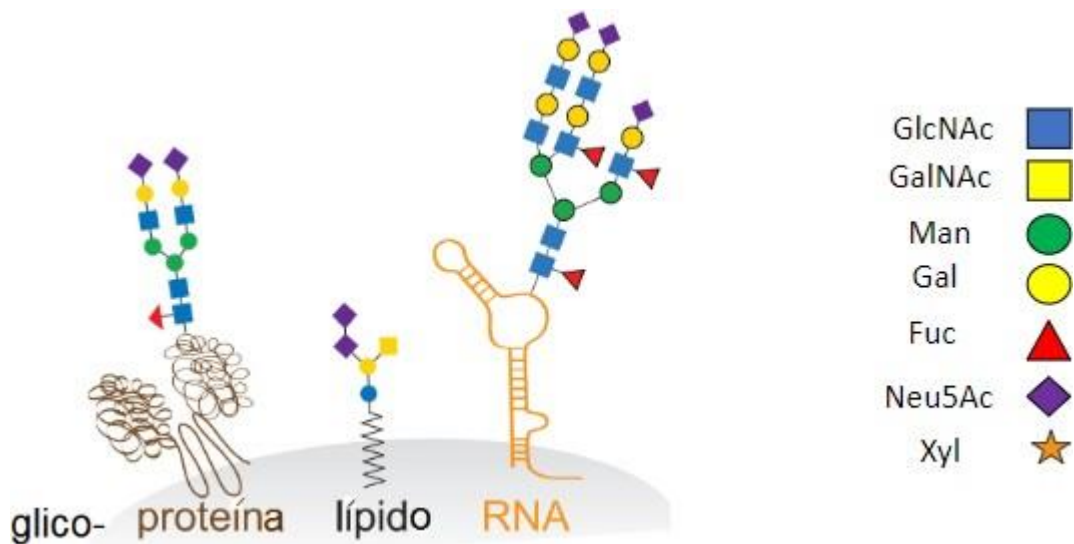


Figura 1. Cadenas de glicanos en diferentes moléculas orgánicas.

Las cadenas de glicanos están constituidas por distintos carbohidratos como: N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), Manosa (Man), Galactosa (Gal), Fucosa (Fuc), Ácido siálico (Neu5Ac) y Xilosa (Xyl), que forman parte esencial de diferentes moléculas las cuales pueden ser, glicoproteínas, glicolípidos y glicorRNAs.

La diversidad de carbohidratos o glicanos incrementa la heterogeneidad y complejidad de sus estructuras tanto en el sitio de glicosilación como a diferentes niveles de organización, ya sea organismo, célula o proteína⁷.

En estos niveles de organización están presentes el ácido siálico, que normalmente se encuentra como un monosacárido terminal de los glicanos presentes en glicoconjugados en las superficies celulares de vertebrados e invertebrados⁸.

Los ácidos siálicos particularmente el Neu5Ac desempeña un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos y patológicamente importantes incluida la embriogénesis del sistema nervioso, la metástasis el cáncer, la regulación inmunológica, la infección bacteriana y viral, entre otros⁹.

Los ácidos siálicos son una familia de α -cetoácidos con carga negativa, cuenta con un esqueleto de nueve carbonos que se encuentran en las superficies celulares de la mayoría de las proteínas secretadas de vertebrados e invertebrados superiores, modulando una variedad de procesos como: señalización celular, desarrollo neuronal, reconocimiento y entrada de patógenos, adhesión celular, dispersión de glóbulos rojos en sangre y regulación del sistema inmune¹⁰.

Existen más de 50 formas de ácido siálico en la naturaleza, incluido el ácido *N*-acetilneuramínico que es el más abundante (Neu5Ac), el ácido *N*-glicolilneuramínico el cual no se encuentra en humanos (Neu5Gc), el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (o ácido deaminoneuramínico) (Kdn), y sus derivados^{11,12}.

El proceso de sialilación celular está conformado por tres componentes importantes, el primero es la presencia del sustrato CMP-ácido siálico, el segundo son las enzimas sialiltransferasas, que se encuentran ancladas a la membrana *trans* de Golgi que se encargan de transferir residuos de ácido siálico a biomoléculas de forma terminal y en tercer lugar está el correcto funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico, proteína encargada de transportar CMP-ácido siálico del citoplasma al lumen de la cisterna *trans* Golgi¹³.

El transportador de CMP-ácido siálico (CST) es una proteína transmembranal de tipo III codificada por el gen SLC35A1. Esta proteína pertenece a la familia de transportadores nucleótido carbohidrato, denominados SLC35¹⁴. El transportador de CMP-ácido siálico es conocido como SLC35A1 donde el término A1 es referente al sustrato CMP-ácido siálico que transporta de manera específica¹⁵.

El CST presenta 337 aminoácidos (aa) y se expresa exclusivamente en medial- y *trans*-Golgi y transloca CMP-ácido siálico/CMP desde el citosol hasta el lumen de Golgi mediante un mecanismo antiportador¹⁶.

El CST de humano (hCST) presenta 4 isoformas adicionales a la isoforma tipo silvestre (*wt*) que se generan por mecanismos de empalmes alternativos (splicing), que son las isoformas del130, del177, del244 y del290¹⁷.

La isoforma del177 humana (hdel177) es una de estas variantes que presenta una pérdida de 177 pb correspondientes al exón 6 que codifican 59 residuos de aminoácidos. Esta isoforma es la única que conserva el motivo carboxilo terminal (IIVG) indispensable para la translocación funcional de la proteína a Golgi¹⁸.

La funcionalidad de esta isoforma se determinó mediante su expresión en una línea celular llamada Lec2 (células mutantes de hámster con un fenotipo asialo o sin transporte de CMP-ácido siálico) donde se observó la incorporación *de novo* de ácido siálico¹⁹.

La funcionalidad de la isoforma también se corroboró por la técnica de citometría de flujo utilizando lectinas biotiniladas como WGA que reconoce residuos de ácido siálico y quitobiosa además de PNA que reconoce residuos de galactosa y *N*-acetilgalactosamina. En este reporte se observó que las células transfectadas con construcciones de la isoforma del177 presentaban un patrón de unión similar a las células CHO (células de ovario de hámster chino) y a las células transfectadas con la isoforma *wt* del SLC35A1²⁰.

Investigaciones previas realizadas por Eckhardt y colaboradores determinaron la expresión de la isoforma del177 en la línea celular mutante de hámster denominada Lec2 y la reportaron como la causante del fenotipo asialo de estas células²¹.

La expresión de la isoforma del177 de hámster (hadel177) en células Lec2 no generó la expresión superficial de ácido siálico o polímeros de ácido siálico denominados ácido polisialico (PSA), indicando que dicha isoforma presente en hámster no es funcional²².

Existen dos modelos para explicar la funcionalidad de la isoforma hdel177 (278 aa) y la isoforma no funcional hadel177 (277aa). La propuesta del equipo de Salinas Marín explica que la diferencia de la funcionalidad podría residir en un cambio de configuración de los 10 a 8 TMD's, como resultado de la pérdida de 59 aa en la posición 192-251aa²³.

La pérdida de 59 aa genera una proteína fusionada entre los aminoácidos restantes del TMD6 y TMD8 formando un nuevo TMD6 con solo 31 aminoácidos. Dentro de los residuos de aa que se pierden se encuentran los aminoácidos Tyr214, Ser216 y 236KGFF239 que son reportados como indispensables para llevar a cabo el transporte. Esta teoría propone que entre los 23 aminoácidos que diferencian a las isoformas del177 de hámster y humano ocurre un reemplazo entre ellos para cumplir la función crítica de estos aminoácidos²⁴.

Una segunda teoría, fue propuesta por B. Hadley y colaboradores en el año 2019, basados en los hallazgos del equipo de Salinas Marín. Mediante el software SPARKSX realizaron alineamientos de las isoformas hadel177 y hdel177 utilizando como templado el cristal Vrg-4 (estructura cristalina del transportador de GDP-manosa de *Saccharomyces cerevisiae*) y generaron un modelo que resulta en una

proteína con 10 TMD representativo del *SLC35A1*, con una topología similar a la isoforma *wt*, pero con el dominio TMD7 y 9 α -hélices mucho más corta^{25,26}.

Además, se propuso que el residuo de Tyr207 reemplaza a la Tyr214 en la isoforma *hdel177*, residuo que se ha reportado esencial en el transporte.

Por otra parte, estos autores reportan que en el modelo de la isoforma *hdel177*, el residuo de Tyr207 no se orienta hacia el sitio activo, por lo que la orientación del aa Tyr207 sería el encargado de la funcionalidad de la *hdel177* y de la disfuncionalidad de la *hdel177*²⁷.

Para llevar a cabo la expresión y posterior purificación de la isoforma *del177*, se planea en primera instancia realizar una subclonación y expresión de la isoforma funcional *del177-SLC35A1* en un sistema bacteriano para posteriormente en caso que la expresión resulte exitosa, se corrobore mediante Western Blot y proceder a purificar la proteína del transportador. En etapas posteriores a este proyecto se pretende realizar su caracterización fisicoquímica y así contribuir al conocimiento de la isoforma *del177* del transportador de CMP-ácido siálico humano, la cual no ha sido reportada experimentalmente.

2.0 HIPÓTESIS

La isoforma funcional del177 del transportador CMP-ácido siálico humano puede ser expresada y purificada en un sistema de expresión bacteriano de manera similar a la isoforma *wt*.

3.0 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, no existen reportes experimentales sobre la caracterización estructural de la isoforma funcional del177 del transportador de CMP-ácido siálico humano. Por lo tanto, en este trabajo se determinará si la isoforma funcional del177 del transportador CMP-ácido siálico humano puede ser expresada y posteriormente purificada en un sistema de expresión bacteriano presentando propiedades fisicoquímicas similares a la isoforma silvestre.

Por lo que conocer y comprender su estructura y funcionamiento específico de esta proteína, al igual que su mecanismo de biosíntesis en comparación con la *wt* permitirá aportar información relevante que más adelante se podrá utilizar para proyectos posteriores ya que solo se tienen reportes de células transfectadas sin embargo no se ha conseguido obtener la proteína totalmente purificada para su análisis.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estandarizar la expresión de la isoforma del177 funcional del transportador CMP-ácido siálico humano utilizando un sistema bacteriano (*Escherichia Coli*).

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar la construcción de la isoforma silvestre y la isoforma funcional del177 del transportador de CMP-ácido siálico humano en el vector pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression Kit incluyendo una etiqueta de poli histidina en su secuencia.
- Determinar si es posible expresar la isoforma funcional wt y del177 del *SLC35A1* en la cepa *E. Coli* Mach One.
- Analizar la expresión de las isoformas mediante electroforesis SDS-PAGE y western blot.

5.0 ANTECEDENTES

5.1 Transportador de CMP-ácido siálico (CST)

El CST es uno de los transportadores nucleótido-carbohidrato mejor caracterizados de la familia SLC35 a través de mutagénesis sitio puntal inducidas y mutaciones identificadas en algunos pacientes con defectos congénitos de la glicosilación o SLC35A1-CDG, específicamente para este gen. En este síndrome se presentan alteraciones en el proceso de sialilación celular debido a mutaciones en el gen *SLCA35A1* que ocasionan la ausencia en Golgi del sustrato donador CMP-ácido siálico. Los pacientes con SLC35A1-CDG presentan neutropenia, infecciones oportunistas recurrentes, retraso en el desarrollo psicomotor, epilepsia, ataxia, microcefalia e hipotonía^{28,29,30}.

El CST es una proteína transmembranal que cuenta con 10 dominios transmembranales o TMD's codificados por 337 aminoácidos cuyos extremos son -NH₂ y -CO₂H terminal que se encuentran orientados hacia el citosol³¹.

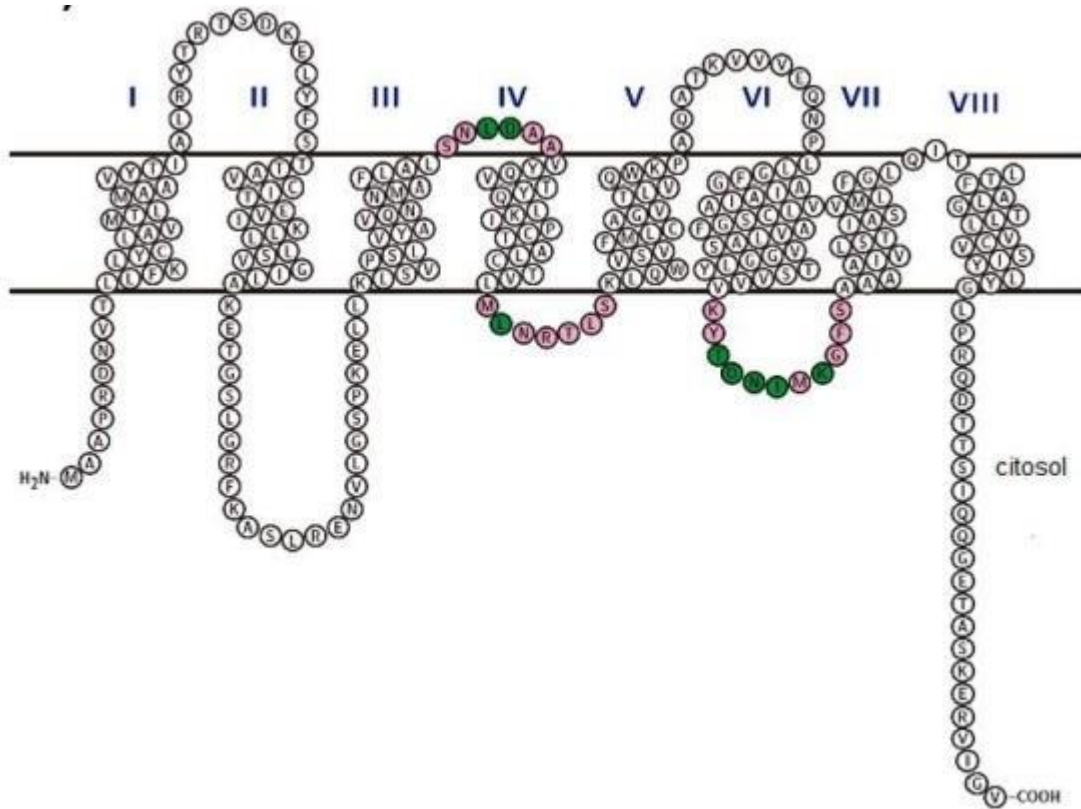


Figura 2. Modelo topológico teórico de la estructura de la isoforma del177. Modelo topológico de la isoforma del177 donde se muestran en color verde los aa: leucina (L), ácido aspártico (D), treonina (T), asparagina (N), isoleucina (I), lisina (K), y de rosa los residuos de aaesenciales para la actividad del CST: serina (S), asparagina (N), alanina (A), metionina (M), arginina (R), treonina (T), leucina (L), glicina (G), fenilalanina (F), lisina (K), tirosina (Y). Los números romanos indican los 8 dominios transmembranales por los que está formada la isoforma funcional del177-SLC35A1.

5.1.1 sistemas de análisis y expresión del transportador de CMP-ácido siálico.

El CST es uno de los transportadores nucleótido-carbohidrato cuya estructura ha sido más caracterizada dentro del grupo de los SLC35 de mamíferos. Existen reportes en donde se han utilizado distintos sistemas de expresión para estudios por UV, RMN y modelos de mutagénesis sitio puntual. En la tabla 1, se muestran los diferentes organismos que se han utilizado especificando los componentes involucrados para el análisis del transportador³².

Tabla 1. Sistemas de expresión que han sido utilizados para analizar el transportador de CMP-ácido siálico.

ORGANISMO	VECTOR DE CLONACIÓN	PROMOTOR	SISTEMA DE EXPRESIÓN	CLONA	ETIQUETA	RENDIMIENTO
Células de ovario de Hámster <i>Cric</i> ³³	pCMV-Tag	CMV	CHO-IFN γ	CHO-IFN γ	FLAG – N-terminal	50 μ g
Células de ovario de Hámster <i>Cric</i> ³⁴	pCDM8	CMV	Lec2	Lec2	HA	10 μ g
Células de <i>Macaca Mulatta</i> ³⁵	pcDNA3.1 D/V 5- His-TOPO	CMV	CMV	MA-104	HA	ND
<i>Cannis Lupus Familiaris</i> ³⁶	pcDNA3.1 D / V5-His-TOPO	CMV	CMV	CMV	HA	ND
<i>Pichia pastoris</i> ³⁷	pPICZ-pYES2/NT-CB-CST	AOX1	AOX1	KM71H	C-terminalHis6	50 μ g

<i>Escherichia coli</i> ³⁸	pYES2/N T-C	ND	LacZ	DH5α	HA	60 µg
<i>Spodoptera frugiperda</i> ³⁹	pIE1HR3	ND	ND	SfSWT-4	hEPO-HIS	100 µg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁴⁰	pPB11	ND	ND	INVSc1	HA	1 mg

5.2 Isoformas de splicing del transportador de CMP-ácidosiálico

En 2005, Duncker et. al, y colaboradores informaron de un nuevo trastorno congénito de la glicosilación (CDG) denominado CDG-IIF o SLC35A1-CDG, caracterizado por ciertas condiciones fisiológicas.

En este trabajo también se determinó que el *SLC35A1* genera isoformas adicionales a través de un empalme alternativo⁴¹.

Las isoformas de splicing que se reconocieron fueron: la isoforma silvestre (*wt*) del *SLC35A1* que se expresa en un 47% y codifica para 337aa, la isoforma del130 expresada un 29% codificante para 227aa, la isoforma del177 expresada en un 14% y codificante para 278aa, la isoforma del244 es expresada en un 9% y que codifica para 189aa y por último la isoforma del290 expresada en un 1% y codificante para 65aa⁴², figura 3.

Los estudios de subclonación permitieron determinar el porcentaje de aparición de las isoformas *SLC35A1*, las cuales se muestran en la tabla 2.

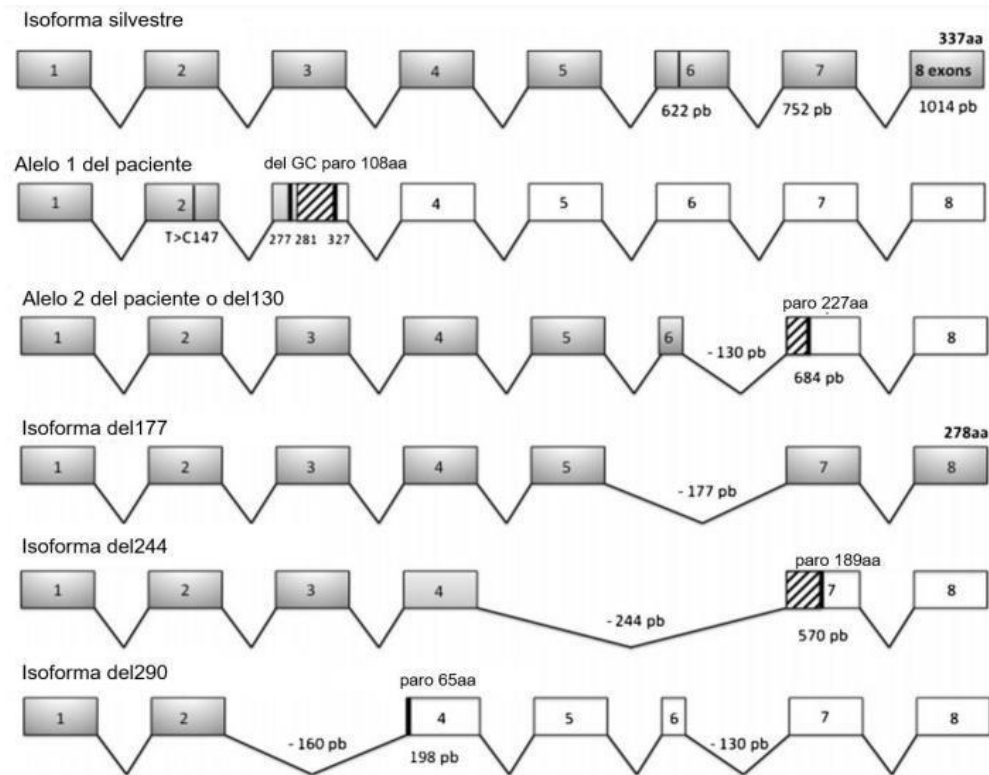


Figura 3. Isoformas mutantes del SLC35A1 humano.

El primer paciente descrito con SLC35A1-CDG por primera vez presentó una sustitución 147 T> C y 2 microdeleciones en el alelo 1 (G277 y C281) que generó un cambio en el marco de lectura abierto y la aparición de un codón de paro prematuro en la posición 327. El alelo A2 con deleción de 130 pb (del130) que cubre dos tercios del exón 6 también genera un cambio del marco de lectura y un codón de paro prematuro en la posición 684. Las isoformas del177 (278 aa) con eliminación completa del exón 6, la del244 (189 aa) con pérdida completa del exón 5 y 6, la isoforma del290 (65 aa) con escisión completa del exón 3 y deleción parcial de 130 pb del exón 6. La isoforma del177 es la única que conserva el exón 8 que codifica la región C-terminal de la proteína. Imagen modificada de (Salinas-Marín et. al “A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter”, 2016).

Tabla 2. Isoformas de splicing del SLC35A1.

ISOFORMA	PORCENTAJE DE EXPRESIÓN	EMPALMES ALTERNATIVOS
Isoforma <i>wt</i>	47%	8 exones
del130	29%	Eliminación parcial de 130 pb del exón 6
del177	14%	Eliminación parcial de 177 pb del exón 6
del244	9%	Eliminación parcial de 244 pb correspondiente a los exones 5 y 6
del290	1%	Eliminación parcial de 130 pb y 160 pb correspondientes a los exones 3 y 6

5.3 Isoforma del177 del transportador de CMP-sia humano

La isoforma del177 presenta la eliminación completa del exón 6, y aun así es capaz de restaurar la sialilación a los niveles normales en la línea celular de ovario de hámster chino Lec2 deficientes en el transporte de CMP-Sia⁴³. Cabe señalar que la isoforma del177 (277 aa) expresada en hámster no es funcional a pesar de ser muy similar a la isoforma del177 humana (278 aa)⁴⁴.

La isoforma del177 de hámster y humana es una de las isoformas que no presenta codones de paro prematuro⁴⁵, a pesar de su eliminación de 177 pb codificadas por el exón 6, figura 4.

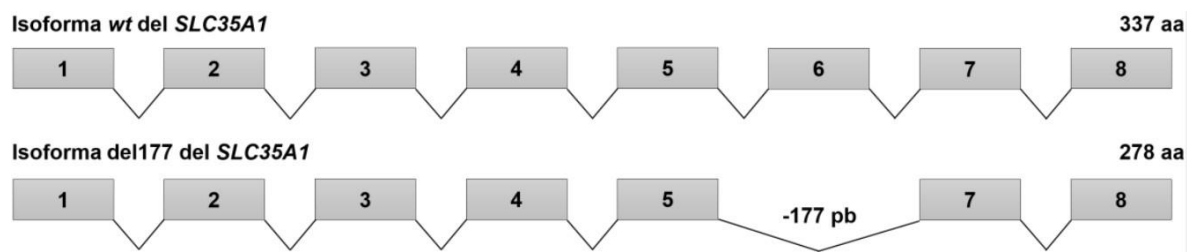


Figura 4. Isoformas wt y del177 del SLC35A1.

La isoforma wt del SLC35A1 presenta 8 exones que codifican para 337 aa, mientras que la isoforma del177 presenta eliminación total del exón 6 que codifican para 59 aa generando una proteína de 278 aa. Modificado de: A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter, Salinas et. al., 2016.

Esta isoforma es la de mayor interés porque es la única que conserva los últimos 4 aa, que son dos residuos de isoleucina, valina y glicina los cuales están presentes en el extremo carboxilo terminal y han sido reportados como indispensables para la retención de la proteína en Golgi⁴⁶.

Existen dos modelos para explicar la funcionalidad de la isoforma del177 de humano. La propuesta que el equipo propuso de Salinas Marín y colaboradores en el 2016 explica que la diferencia en la funcionalidad puede encontrarse en un cambio de configuración de 10 a 8 TMD's, como resultado de la pérdida de 59 aa en la posición 192-251aa, además esto se analizó mediante la expresión en la línea celular Lec2 (células mutantes de hámster con un fenotipo asialo o sin transporte de CMP-ácido siálico) donde se observó la incorporación *de novo* de ácido siálico^{47,48}.

La sialilación restaurada se demostró mediante ensayos de complementación de lectina utilizando WGA que se une al ácido siálico en todos los enlaces y PNA que se une a la secuencia de carbohidratos Gal- β (1-3)-GalNAc⁴⁹.

Los ensayos de lectina WGA y PNA mostraron que el clon celular Lec2 del177H restaura la unión de WGA y reduce la unión de PNA a niveles similares a los observados en la línea celular CHO y el clon celular Lec2 wtH, fig. 4 a y b.

La línea celular CHO y los clones celulares Lec2 wtH y Lec2 del177H redujeron la unión de WGA y aumentaron la unión de PNA después del tratamiento que se realizó con neuraminidasa, lo que confirmó la presencia de ácido siálico y la especificidad de WGA. Empleando la medición indirecta de la actividad de transporte a través del marcaje metabólico se estableció que el clon celular Lec2 del177H mostró una incorporación similar de SiaNAz con respecto a las líneas celulares CHO y el clon celular Lec2 wtH suplementado con Ac4ManNAz⁵⁰, figura 4c.

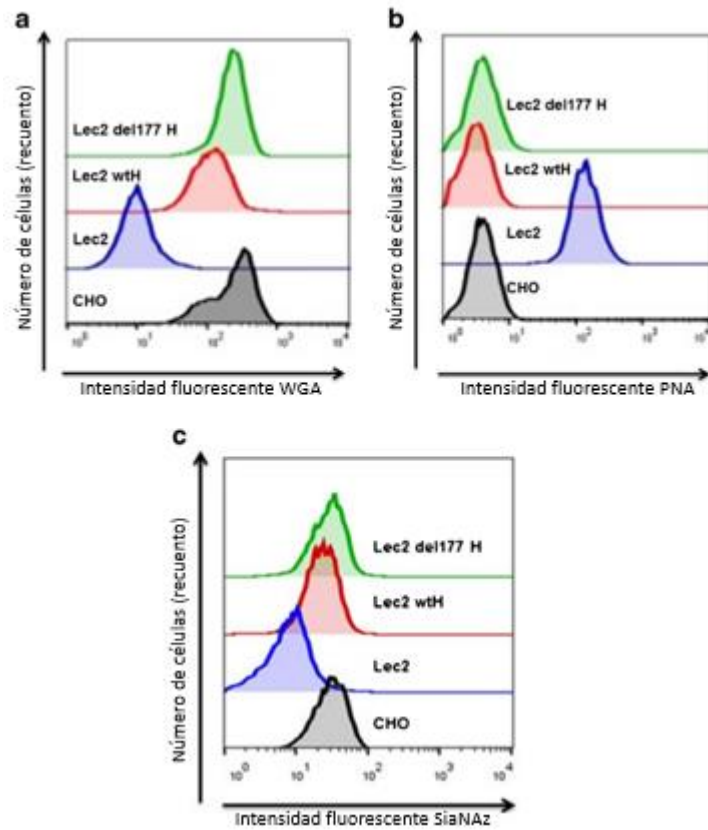


Figura 5. Cromatogramas de complementación utilizando líneas celulares CHO y Lec2

a. Histograma de citometría de flujo que muestra la unión de lectina WGA. b. La unión de PNA fue similar entre células CHO, clones celulares Lec2 wtH y Lec2 del177H y significativamente diferente de Lec2. C. Histograma de citometría de flujo de incorporación superficial de SiaNAz a las 24 h complementado con Ac4ManNAz.

La pérdida de 59 aa genera una proteína fusionada entre los aminoácidos restantes del TMD6 y TMD8 formando un nuevo TMD6 con solo 31 aminoácidos. Dentro de los residuos de aa que se pierden se encuentran los aminoácidos Tyr214, Ser216 y 236KGFF239 reportados como indispensables⁵¹ para llevar a cabo el transporte del sustrato.

Una segunda teoría, fue propuesta por B. Hadley y colaboradores en el año 2019 basados en los hallazgos del equipo de Salinas Marín. Mediante el software SPARKSX realizaron alineamientos de las isoformas hadel177 y hdel177 utilizando como templatado el cristal Vrg-4⁵² (estructura cristalina del transportador de GDP-manosa de *Saccharomyces cerevisiae*, generando un modelo que resulta en una proteína con 10 TMD típicos del SLC35A1, con una topología similar a la isoforma wt pero con el dominio TMD7 y 9 α hélices mucho más cortas.

En este trabajo se propone que el residuo Tyr207 reemplaza a la Tyr214 en la isoforma hdel177, residuo que se ha reportado esencial en el transporte de CMP-Sia. Por otra parte, estos autores reportan que en el modelo de la isoforma hadel177, el residuo Tyr207 no se orienta hacia el sitio activo, por lo que la orientación Tyr207 sería responsable de la funcionalidad de la hdel177 y de la no funcionalidad de la hadel177⁵³.

6.0 MARCO TEÓRICO

6.1 Glicosilación

La glicosilación es un mecanismo co- y postraduccional que se produce en los tres dominios, mediante el cual se añade un resto de carbohidrato a un lípido, proteína u otra molécula orgánica dentro o fuera de la célula⁵⁴.

El proceso de glicosilación está estrictamente regulado, ya que es una modificación enzimática que es específica del sitio y del sustrato, en el que se unen azúcares de forma covalente al extremo creciente de las cadenas de glicano en proteínas y/o lípidos nacientes, catalizado por glicosiltransferasas⁵⁵.

Los glicanos de las glicoproteínas secretadas afectan varias propiedades de las proteínas, como la solubilidad, mientras que las proteínas glicosiladas de la superficie celular están implicadas en varios procesos celulares, como la comunicación célula-célula.

Existen dos grupos principales de clasificación de los glicanos de glicoproteínas y se clasifican de acuerdo con sus enlaces glicanos-péptido, los *N*- y *O*-glicanos⁵⁶.

Los *N*-glicanos se distinguen por la presencia de uniones del tipo Asn-GlcNAc. Las *N*-glicoproteínas constituyen la clase principal de glicoproteínas, tanto circulantes como las unidas a membranas. La diferencia entre ellas está dada fundamentalmente por dos elementos, su biosíntesis y la naturaleza de los aminoácidos unidos a la cadena de oligosacáridos^{57,58}.

Todas las cadenas de *N*-glicanos comparten un pentasacárido nuclear común, el Man₃GlcNAc₂, sin embargo, difieren en sus ramas externas, las cuales pueden ser muy variadas y complejas⁵⁹.

Los *N*-glicanos se dividen en tres clases principales: altos en manosa, complejos e híbridos, los altos en manosa pueden tener entre 5-9 residuos de manosa, los híbridos presentan residuos de manosas en el enlace α 1-6 y una o dos antenas con diferente grado de extensión en α 1-3 y los complejos tienen entre dos o cuatro antenas con diferente grado de extensión, generalmente terminados en ácido siálico⁶⁰, figura 5.

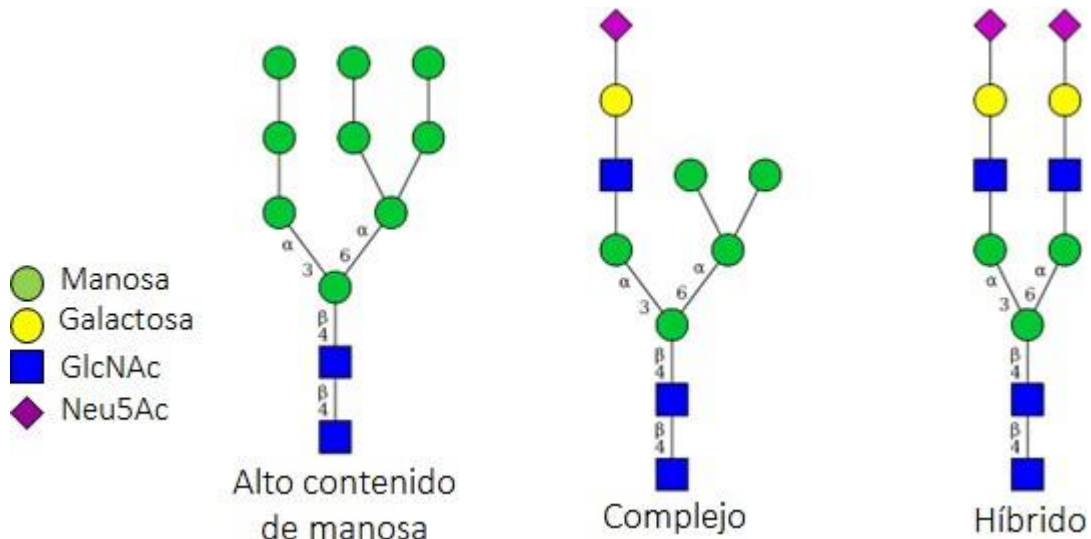


Figura 6. Estructura de los tres tipos de *N*-glicanos.

Ejemplo de cadenas de oligosacáridos que pueden unirse a las proteínas por glicosilación

Los *N*-glicanos se adhieren al residuo de Asn de la proteína, que forma parte del triplete Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, ácido aspártico o glutámico)⁶¹.

A diferencia de los *N*-glicanos, ligados por enlace *N*-glicosídico al átomo de nitrógeno (N) de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Asn), los *O*-glicanos están unidos por enlace *O*-glicosídico al átomo de oxígeno (O) de los aminoácidos Serina (Ser) o Treonina (Thr) de una cadena polipeptídica.

La *O*-glicosilación de proteínas comienza en el Golgi con la unión de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) o manosa (Man) a residuos de Serina (Ser) o Treonina (Thr) de la proteína⁶².

Los residuos de *N*-acetilglucosamina, galactosa, fucosa o ácido siálico son añadidos uno a uno de manera secuencial con diferentes tipos de enlaces, resultando por ello en diferentes *O*-oligosacáridos (*O*-glicanos) con estructura ramificada, compuesto por pocos residuos de monosacáridos⁶³.

6.2 Ácido siálico

El ácido siálico comprende una familia de más de 50 compuestos naturales que tienen en común un esqueleto de nueve carbonos con un grupo funcional “ceto” que les proporciona acidez y carga negativa⁶⁴.

El ácido siálico más común es el ácido N-acetilneuramínico, C₁₁H₁₉NO₉, abreviado habitualmente como Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc o NANA.

A pesar de la existencia de numerosos ácidos siálicos, la superficie de la mayoría de las células de mamíferos estudiadas hasta el momento presenta sólo dos de estos compuestos: el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), los cuales difieren en el radical que se encuentra unido al carbono de la posición 5⁶⁵, figura 6.

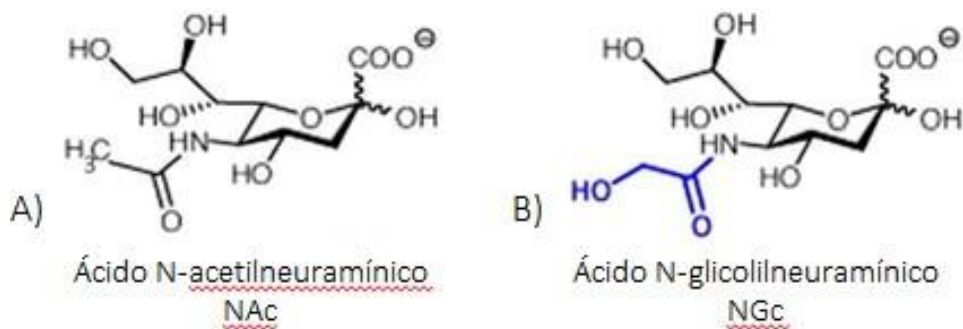


Figura 7. Estructura de los ácidos siálicos N-acetil y N-glicolilneuramínico.

- A) El Neu5Ac tiene grupo N- acetilo en el quinto átomo de carbono (C5). B) En azul se marca la diferencia estructural que mantiene con el Neu5Gc que radica en el grupo hidroxilo ubicado en el C2 del grupo N-acetilo.

La única diferencia entre ellos radica en el átomo de oxígeno agregado en el grupo N-acetilo de la posición C-5.

El grupo carboxílico les confiere una carga neta negativa a pH fisiológico, característica que modifica las propiedades fisicoquímicas de glicoconjugados individuales y de la superficie celular en general⁴⁶, permitiendo la interacción con otras moléculas⁶⁶.

Esta interacción es debido a la posición externa de los ácidos siálicos en glicoproteínas y gangliósidos de superficie tiene una gran importancia en biología celular. De esta manera, estos monosacáridos ácidos pueden interaccionar con los componentes de otras superficies celulares, sustancias extracelulares y efectoras⁶⁷.

La biosíntesis de Neu5Ac inicia con la formación de N-acetil-D-manosamina (ManNAc) desde UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) en el citosol, por acción de la enzima UDP-GlcNAc-2-epimerasa.

La ManNAc es fosforilada mediante ManNAc quinasa obteniéndose N-acetil-D-manosamina-6-fosfato (ManNAc-6P) que posteriormente se condensa con el fosfoenolpiruvato para generar ácido N-acetilneuramínico-9-fosfato (Neu5Ac-9P) mediante la Neu5Ac-9P sintasa⁶⁸. Este último compuesto (Neu5Ac-9P) es desfosforilado para obtener Neu5Ac por la enzima Neu5Ac-9P fosfatasa.

La forma activa de ácido siálico, CMP-ácido siálico, es generada a partir de citidín trifosfato (CTP) y Neu5Ac en el núcleo mediante la CMP-Neu5Ac sintetasa. En su itinerario, el CMP-Neu5Ac puede ser modificado a CMP-Neu5Gc por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa en el citosol⁶⁹.

El CMP-ácido siálico (CMPNeu5Ac y CMP-Neu5Gc) es el sustrato de las sialiltransferasas que incorporan los cetoácidos en cadenas nacientes de glicoproteínas y glicolípidos en el aparato de Golgi. Existe una familia numerosa de sialiltransferasas donde los distintos miembros de la misma difieren en su especificidad hacia el glicano aceptor y el ácido siálico unido a éste⁵⁰.

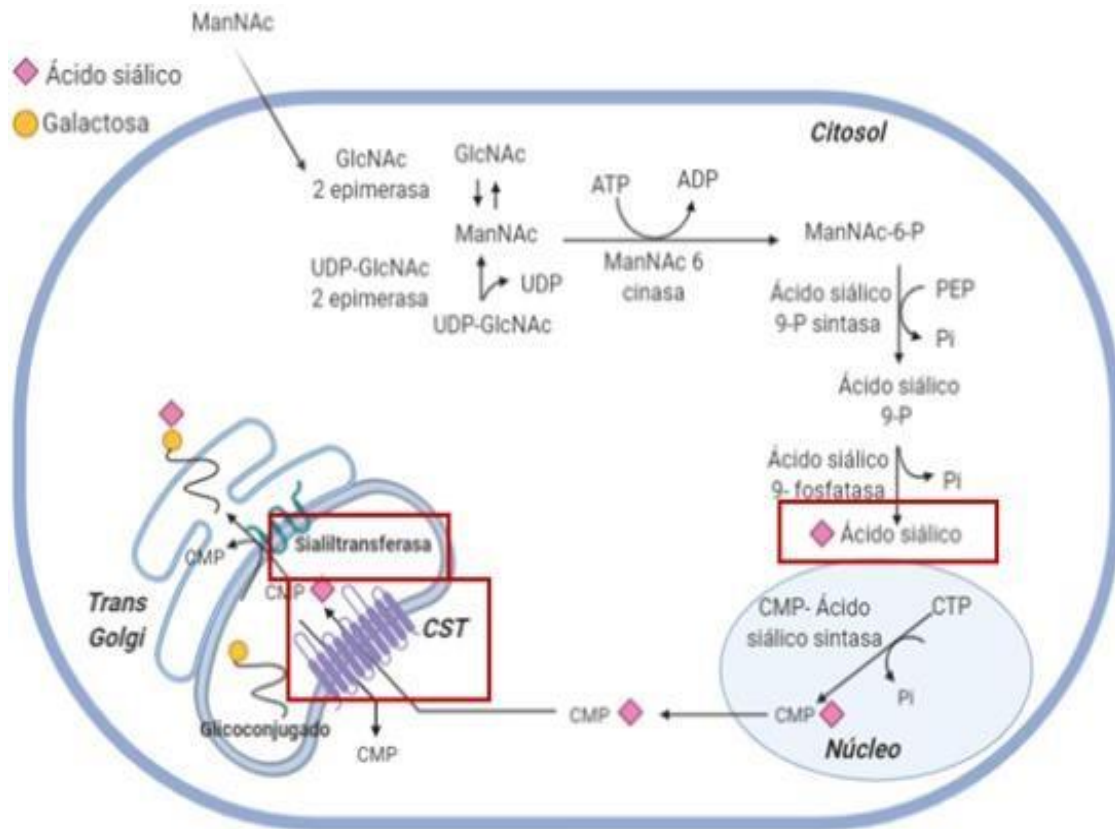


Figura 8. Biosíntesis de Neu5Ac.

La biosíntesis de Neu5Ac comienza con la formación de N-acetil-D-manosamina (ManNAc), esta es fosforilada por la ManNAc 6 cinasa, que posteriormente se condensa con el fosfoenolpiruvato para generar ácido N-acetilneuramínico-9-fosfato (Neu5Ac-9P) mediante la Neu5Ac-9P sintasa. Este último compuesto (Neu5Ac-9P) es desfosforilado para obtener Neu5Ac por la enzima Neu5Ac-9P fosfatasa. La forma activa de ácido siálico, CMP-ácido siálico, es generada a partir de citidín trifosfato (CTP) y Neu5Ac en el núcleo mediante la CMP-Neu5Ac sintetasa. En su itinerario, el CMP- Neu5Ac puede ser modificado a CMP-Neu5Gc por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa en el citosol. El CMP-ácido siálico (CMP- Neu5Ac y CMP-Neu5Gc) son el sustrato de las sialiltransferasas. Modificado de: Claudia, A.Z (2021) Clonación y expresión del transportador de CMP-ácido siálico de macaca mulatta [Licenciatura] UAEM

6.3 Sialilación celular

Entre las más de 50 formas diferentes de ácido siálico que se han identificado en la naturaleza, algunas son compartidas por bacterias y eucariontes⁷⁰.

En el caso de las células eucariotas el proceso metabólico de la sialilación celular del Neu5Ac comienza en el citosol y se efectúa en el compartimento del *trans*-Golgi, se sintetiza en el núcleo y finalmente es transportado al lumen de Golgi.

La activación del Neu5Ac se lleva a cabo mediante la reacción con el CTP (citidín trifosfato), dando origen al CMP-ácido siálico que retorna al citosol y continúa al Golgi^{71,72}.

Esta maquinaria de sialilación celular contiene tres puntos fundamentales que son: el CMP-ácido siálico, el transportador de CMP-ácido siálico y las sialiltransferasas que son las encargadas de mover el ácido siálico a los lugares correspondientes de las células.

A pesar de las diferencias en la biosíntesis de los ácidos siálicos en bacterias y eucariotas, los procesos de activación y transferencia del ácido siálico se conservan desde las bacterias hasta los seres humanos⁷³, aunque las ubicaciones de las enzimas difieren.

En las células eucariotas, el Neu5Ac sintetizado en el citosol se transfiere al núcleo y es activado por la citosina 5'-monofosfato N -acetilneuramínico ácido (CMP- Neu5Ac) sintetasa para formar CMP-Neu5Ac que luego va al Golgi para ser utilizado por sialiltransferasas para la formación de glicoconjugados que posteriormente son secretados a la superficie celular⁷⁴, figura 7.

En contraste, los humanos no sintetizan CMP-Neu5Gc debido a la inactivación de CMP-Neu5Ac hidroxilasa por una mutación de cambio de marco del gen CMAH.

Sin embargo, Neu5Gc no humano puede incorporarse metabólicamente a partir de fuentes dietéticas, principalmente de carne roja a tejidos humanos⁷⁵.

6.4 Familia de los SLC35

Los transportadores de nucleótido-carbohidrato desempeñan un papel fundamental para la síntesis de glicoconjugados ya que pueden transportar CMP-ácido siálico, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Glc, GDP-Fuc, GDP-Man y UDP-Xyl ⁷⁶, los cuales adquieren propiedades fisiológicas y fisicoquímicas debido a su unión con los nucleótidos-carbohidrato, y a su vez se clasifican en familias dependiendo del tipo de solutos que transportan.

En este caso, la familia correspondiente al transporte de nucleótidos-carbohidratos es la 35, y las subfamilias en las que se clasifican corresponden a la subfamilia A, la subfamilia G o dependiendo del ligando⁷⁷, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Miembros seleccionados de la familia de transportadores de azúcar de nucleótidos SLC35.

Nombre del gen	Nombre de la proteína	Sustrato(s)	Localización subcelular	Longitud (aa)
SLC35A1	Transportador CMP-Sia, (CST)	CMP-Sia	Exclusivamente de Golgi	337
SLC35A2 UGALT UGT UGTL	Translocador de UDP-galactosa, UGP-Gal Tr, (UGT).	UDP-Gal; UDP-GlcNAc	Golgi y/oRE	396
SLC35A3	Transportador de UDP- N - acetilglucosamina, UDP-GlcNAc, UDP-GlcNAc Tr de Golgi, (NGT)	UDP-GlcNAc	Predominantemente Golgi	325

SLC35A4	Probable UDP-MGC2541	UDP-Gal putativo	Predominantemente Golgi	324
SLC35A5 (ORF) UNQ164 (ORF) PRO190	Transportador probable de azúcarUDP	UDP-azúcar putativo	Principalmente Golgi	424
SLC35B1 UGTREL1	Proteína 1 relacionada con el transportador de UDP-galactosa, UGTrel1, hUGTrel1, HUT-1 (homólogo), AXER.	Intercambiador ADP/ATP	Golgi y RE	322
SLC35B2 PAPST1 PSEC0149	Transportador 1 de adenosina 3'-fosfo 5'-fosfosulfato, transportador 1 de PAPS.	PAPS	Exclusivamente de Golgi	432
SLC35B3 C6orf196 PAPST2 (ORF) CGI-19	Transportador 2 de adenosina 3'-fosfo5'-fosfosulfato, transportador 2 de PAPS.	PAPS	Exclusivamente de Golgi	401
SLC35B4 YEA4 PSEC0055	Transportador UDP-Xyl, homólogo YEA4	UDP-Xilo; UDP-GlcNAc	Golgi y/o ER (depende del etiquetado C-terminal) y sistema de expresión	331
SLC35C1 FUCT1	Transportador de PIB-Fucosa 1 (GFT)	PIB-Fuc	Predominantemente Golgi	364
SLC35C2 OVCOV1 C20orf5 (ORF) CGI-15	Proteína del gen 1 sobre expresada por cáncer de ovario	Transportador putativo PIB-Fuc	Golgi y/oRE	365
SLC35D1 KIAA0260 UGTREL7	Transportador dualde ácido UDP-glucurónico/UDP- N - acetilgalactosamina, UGTrel7.	UDP-GlcA; UDP-GalNAc	ND	355

SLC35D2 HFRC UGTREL8	Transportador UDP-GlcNAc/UDP- Glc/GDP-Man, HFRC1, SQV7L, UGTrel8	UDP-GlcNAc; UDP-Glc; PIB-Hombre (no humanos)	Exclusivamente de Golgi	337
SLC35F2	SLC35F2	Sustrato desconocido	Posiblemente membrana celular externa	374

7.0 METODOLOGÍA

La metodología general de todos los procesos experimentales realizados se describe en lasiguiente figura.

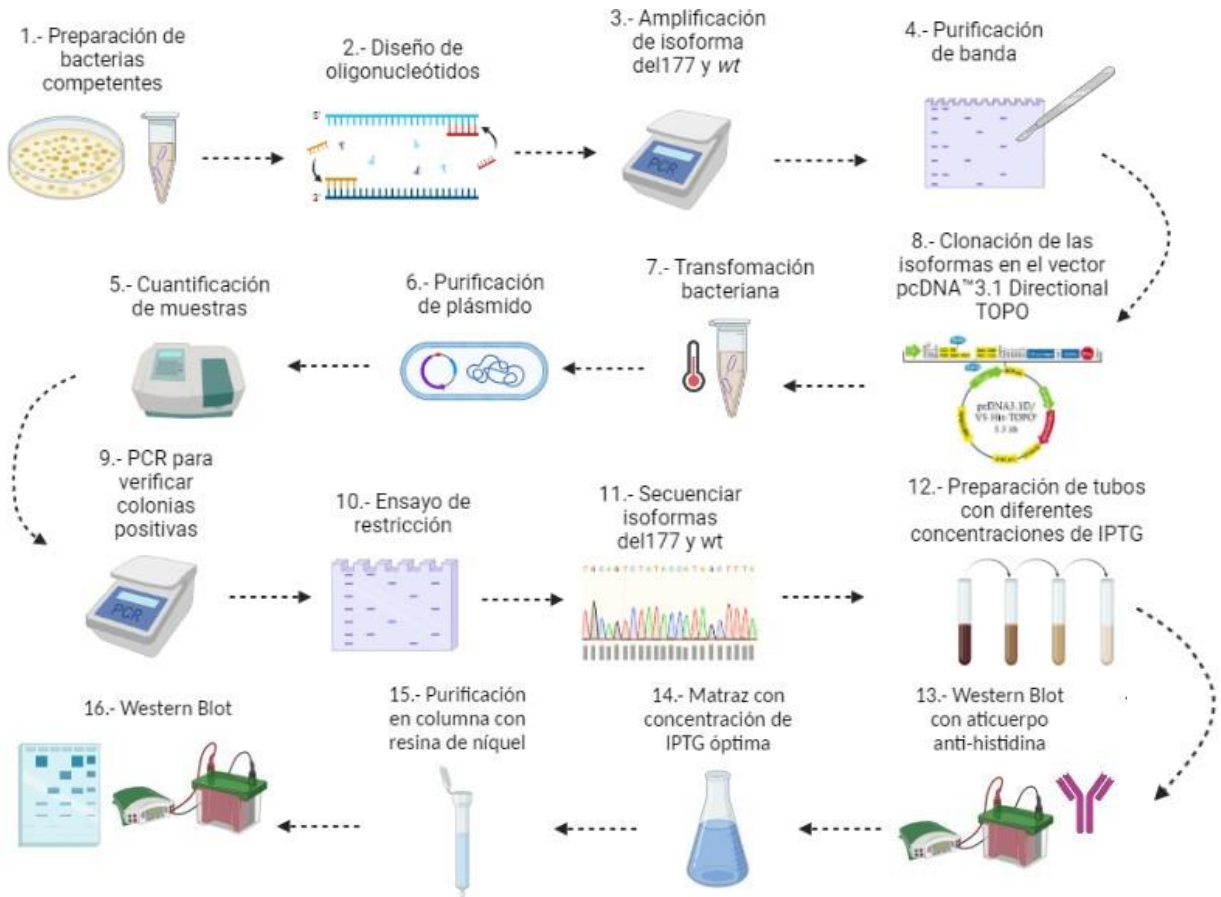


Figura 9. Esquema general de la metodología experimental.

1.- Preparación de bacterias quimiocompetentes, 2.- Diseño de oligonucleótidos, 3.- Amplificación de las isoformas *wt* y *del177* del transportador de CMP-ácido siálico humano., 4.- Purificación de banda por medio de un kit, 5.- Clonación de las isoformas *wt* y *del177-SLC35A1* en el vector pcDNA 3.1 Directional TOPO, 6.- Transformación bacteriana, 7.- Purificación de plásmido por medio de un kit, 8.- Cuantificación de muestras purificadas de las dos isoformas, 9.- PCR para verificar colonias positivas 10.- Ensayo de restricción con enzima *Ava I*, 11.- Secuenciación de isoformas, 12.- Preparación de tubos con diferentes concentraciones de IPTG, 13.- Western Blot con anticuerpo anti-histidina, 14.- Generación de matraces con la concentración óptima de IPTG, 15.- Purificación en columna con resina de níquel, 16.- Western Blot

7.1 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen *SLC35A1* se realizó utilizando secuencias descargadas del (NCBI) (NM_006416.5, NM_001168398.2) con ayuda de la herramienta para diseño de oligos OligoCalc.

Dentro de los parámetros considerados en el oligo nucleótido sentido fue la secuencia CACC en el extremo 5' respetando la secuencia Kozak, figura 9, el codón de paro no se consideró como parte del oligo antisentido con el objetivo de lograrla fusión del ORF de las isoformas en vector más los residuos correspondientes a la secuencia de poli histidina (CATCATCACCATCACCAT) de acuerdo a las instrucciones del vector (K490001, Thermo Fisher Scientific).

Las características de los oligonucleótidos empleados para realizar la PCR se muestran en la tabla 4. El oligonucleótido sentido, hCST-His F (5'-CAC CAT GGC TGC CCC GAG A-3') posee una longitud de 19 pb, un porcentaje de G-C del 68% y una T_m teórica de 69°C. El oligonucleótido anti sentido, hCST-HISnvo R (5'-CAC ACC AAT AAC TCT CTCCTT TGA-3') cuenta con una longitud de 28 pb, un porcentaje de G-C del 36% y una t_m teórica de 65°C.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del SLC35A1 con la isoforma del177.

CLAVE	SECUENCIA	Longitud	%GC	ORIENTACIÓN 5' - 3'
hCST-His F	5' CAC CAT GGC TGC CCC GAG A 3'	19 pb	68%	Sentido
hCST-HISnvo R	5' CAC ACC AAT AAC TCT CTC CTT TGA 3'	28 pb	36%	Anti sentido



Figura 10. Secuencia del gen *wt* y *del177* con oligonucleótidos marcados y secuencia delexón 6 señalada.

A) Secuencia de la isoforma *wt* del *SLC35A1*. En color amarillo se encuentra marcado el oligonucleótido sentido y en color azul se encuentra marcado el oligonucleótido anti sentido, teniendo en letras rojas el codón de inicio y de paro, además de estar señalada la secuencia del exón 6 (177 pb) en la isoforma *wt*. B) Isoforma *del177* del *SLC35A1*. En color amarillo se encuentra marcado el oligonucleótido sentido y en color azul se encuentra marcado el oligonucleótido anti sentido, teniendo en letras rojas el codón de inicio y de paro.

7.2 PCR convencional de las isoformas wt y del177 del slc35a1.

La amplificación de la isoforma wt y del177 se realizó de manera independiente con la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (F530S, Thermo Fisher Scientific), utilizando los reactivos que se muestran en la tabla 5 y utilizando el termociclaje que se muestra en la Figura 10.

La tabla muestra el valor unitario que debe contener el tubo de PCR. En total por cada PCR realizada se sometieron a termociclaje dos tubos; el primero con la isoforma del177y el segundo con el control negativo, agregando 1 μL de templado para tener un volumen final de 25 μL .

Tabla 5. Reactivos y cálculo para la amplificación de las isoformas.

REACTIVOS	VOLUMEN UNITARIO (μL)	X 3.5 reacciones	VOLUMEN TOTAL (μL)
H ₂ O	17.5		60.37
dNTP's	0.5		17.5
hCST-His F	0.5l		1.75
hCST-HISnvo R	0.5		1.75
Phusion	0.25		1.75
Buffer HF 5x	5		0.87
TOTAL	24		84
Templado del 177 / wt (W5)			1 μL
TOTAL		25 μL en cada tubo	

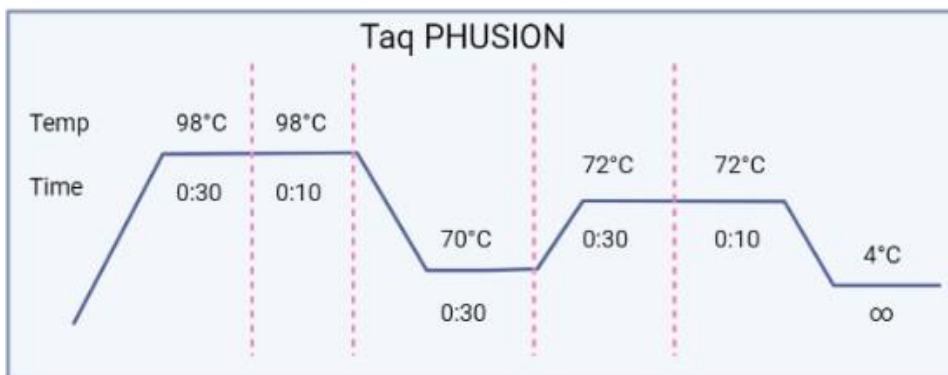


Figura 11. Termociclaje para la amplificación de las isoformas wt y del177.

Tabla de las cantidades de cada reactivo que se usaron para crear el mix con el templado de las isoformas wt y del177-SLC35A1, además se muestra el termociclaje que se utilizó junto con la enzima Taq PHUSION

7.3 Purificación de banda

La purificación del producto de PCR de las isoformas *wt* y del177 del *SLC35A1* se realizó utilizando el Gene Jet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific kit No. K0691).

La banda del gel que contenía el amplicón deseado se cortó sin excesos de residuos de agarosa y sin exponer tanto tiempo el gel a la luz ultravioleta.

Posteriormente, la banda cortada se añadió a un microtubo de 1.5 mL previamente pesado y se agregó en relación 1:1 el buffer denominado *binding*. Los cálculos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Cálculo para el reactivo binding Buffer.

Determinación del volume a utilizar del binding Buffer	
0.9925 g	Peso del tubo Eppendorf vacío
1.5291 g	Peso del tubo + peso de la banda cortada
537 g	Peso neto de la banda

Después el tubo se incubó a 55°C durante 10 minutos o hasta que la agarosa estuviera totalmente disuelta. Una vez disuelta se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm, verificando que el color de la solución sea amarillo lo que indica un pH óptimo para el DNA.

Terminando la centrifugación transfirieron un máximo de 800 µL de la solución amarilla a una columna de purificación y se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm, desechando el centrifugado de los tubos.

Posteriormente se añadieron 700 μ L de Buffer *wash* a la columna y se procedió a centrifugar por 1 minuto a 12,000 rpm, para después ser desechado, y volver a centrifugar la columna con la tapa abierta.

Finalmente, la columna se removió y se transfirió a un microtubo de 1.5 mL para añadirle 50 μ L de H₂O grado molecular en el centro de la misma para centrifugar por última vez durante 1 minuto a 12,000 rpm.

Una vez terminada la centrifugación se desechó la columna de purificación, se cuantificó y el material genético obtenido se guardó a -20°C.

7.4 Clonación de las isoformas en el vector *PCDNA*TM 3.1 *DIRECTIONAL TOPO*[®]

La clonación de las isoformas wt y del177 del gen *SLC35A1* se realizó utilizando el vector de clonación pcDNA3.1D/V5-HisTOPO (Thermo Fisher Scientific K490001) partiendo del templado obtenido por PCR convencional y purificado de acuerdo con las instrucciones anteriores.

El vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO[®] tiene como características sobresalientes un promotor CMV y la opción de una etiqueta C-terminal V5-His para una fácil detección de la proteína recombinante con un anticuerpo anti-V5 y una rápida purificación en resina de níquel⁵⁹.

El mapa del vector se muestra en la figura 11. señalando las enzimas de restricción que lo cortan. La mezcla utilizada para la reacción de clonación con la isoforma funcional del177 y la variante silvestre se realizó utilizando la relación 2:1 producto de PCR: vector.

Esta reacción de clonación se realizó con 10 ng de producto de PCR purificado y 10 ng de vector pcDNA TOPO 3.1, los reactivos y volúmenes utilizados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Reactivos de protocolo de clonación de la isoforma del177.

REACTIVOS	VOLUMEN
H ₂ O	3 µL
Solución salina	0.5 µL
Producto de PCR	2 µL
Vector pcDNA 3.1	0.5 µL
TOTAL	6 µL

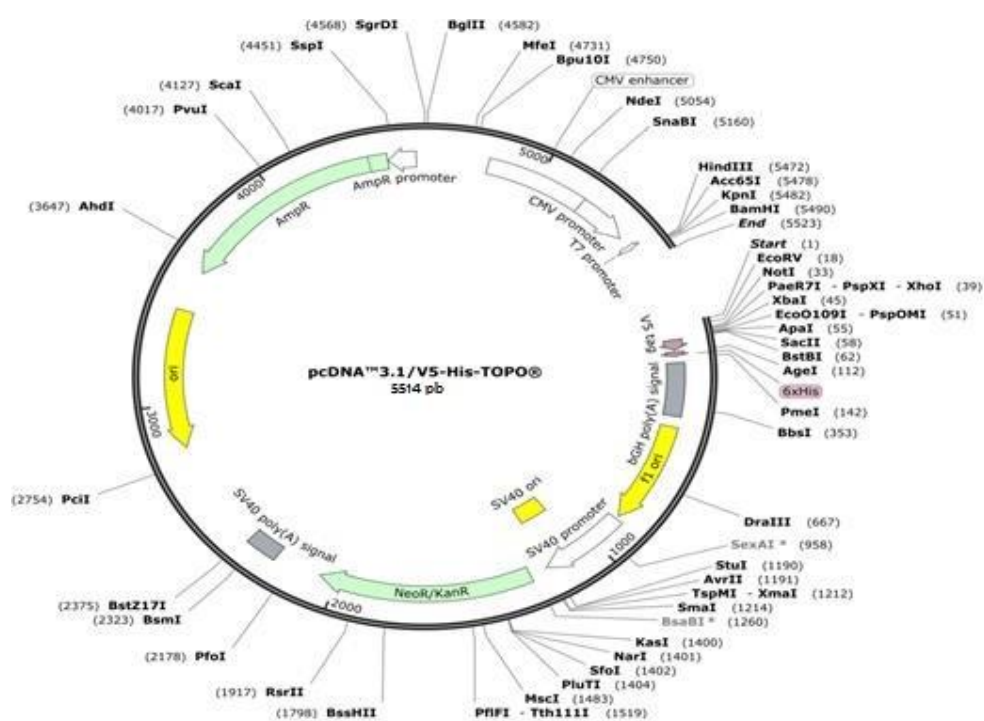


Figura 12. Imagen del vector de clonación pcDNA™ 3.1 Directional TOPO®.

Se muestra en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO vacío la región en donde ocurre la ligación con el inserto y los elementos importantes como el promotor, la etiqueta de poli histidina, sitios de corte de las enzimas de restricción, sitios de los oligonucleótidos T7 y BGH Reverse y el gen de resistencia a ampicilina.

7.5 PCR de colonia

Para la PCR de colonia se utilizaron 8 colonias crecidas en medio LB con antibiótico (ampicilina) y se realizó una PCR con los reactivos mencionados en la tabla 8.

Estos productos fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (MB14402, nzytech) en buffer TAE 1X utilizando como marcador de peso molecular la escalera Gene Ruler 1 kb plus (SM1333, Thermo Scientific™).

Posteriormente las colonias positivas fueron preparadas en glicerol al 15%, medio LB y se almacenaron a -80°C para su preservación.

Tabla 8. Reactivos y volúmenes para PCR de colonia.

REACTIVOS	VOLUMEN UNITARIO (μL)		VOLUMEN TOTAL (μL)
H ₂ O	17	X 9.5 reacciones	161.5
MgCl ₂	2.5		23.75
NH ₄ SO ₄	2.5		23.75
dNTP's	0.5		4.75
hCST-His F	0.5		4.75
hCST-HISnvo R	0.5		4.75
Taq	0.5		4.75
TOTAL	24		228

Más un microlitro de templado a cada tubo hace un total de 25uL.

7.6 Purificación de plásmido

La purificación de los plásmidos se hizo por kit utilizando el Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (K0502, Thermo Fisher Scientific).

La purificación del plásmido se realizó a partir del inóculo preparado previamente y el pellet se colectó mediante centrifugación a 8000 rpm durante 2 min. a TA.

El sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido se resuspendió en 250 μL de solución de resuspensión proporcionada por el Kit, suplementada con ARNasa A.

Posteriormente, se adicionaron 250 μL de solución de lisis mezclando por inversión e incubando por máximo 5 minutos a TA. Al terminar la reacción se adicionaron 350 μL de solución de neutralización mezclando por inversión.

El lisado de bacterias se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a una columna de purificación proporcionada por el kit y se centrifugó nuevamente a 13500 rpm durante 1 min. El sobrenadante fue descartado y la columna de purificación fue lavada con 500 μL de solución de lavado (diluido previamente con etanol 100%) y centrifugado a 13500 rpm durante 1 min.

El sobrenadante fue descartado y se añadieron nuevamente 500 μL de solución de lavado y se centrifugó a 13500 rpm durante 1 min. El sobrenadante se descartó y se centrifugó nuevamente a 13500 rpm para retirar los residuos de la solución de lavado.

Finalmente, se agregaron 50 μL de H_2O grado molecular a la columna y se incubó durante 2 min. a TA. Posteriormente, se centrifugó a 13500 rpm durante 2 min. El sobrenadante colectado corresponde el plásmido purificado, el cual fue cuantificado en el Nanofotómetro IMPLEN y almacenado a -20°C .

7.7 Ensayo de restricción de las construcciones de TOPO-HIS con AVA I

Para verificar que la direccionalidad del inserto fuera la correcta se realizó un ensayo de restricción de 2 colonias de cada isoforma utilizando la enzima Eco881 (AVA I) (No. ERO0381, Thermo Fisher Scientific).

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3 horas y la enzima se inactivó incubando la reacción a 65°C durante 20 minutos. La mezcla de reacción que se hicieron para cada isoforma se muestra en las tablas 9 y 10.

Los productos del ensayo de restricción fueron verificados mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1%. En las tablas 11 y 12 se muestran los cortes de la enzima en sentido 5'-3' del promotor y 3'-5' del mismo para cada uno de los templados que se utilizaron (*wt* y *del177*).

Tabla 9. Ensayo de restricción con templado *del177*.

Digestión con Ava I	
H ₂ O	3.5 µL
Buffer Tango 10X	2 µL
Ava I (10 U/µL)	1 µL
DNA (<i>del177</i>)	13.5 µL (0.2 µg/µL)
TOTAL	20 µL

Tabla 10. Ensayo de restricción con templado *wt*.

Digestión con Ava I	
H ₂ O	7 µL
Buffer Tango	2 µL
Ava I (10 U/µL)	1 µL
DNA (<i>wt</i>)	10 µL (2.7 µg/ µL)
TOTAL	20 µL

Tabla 11. Cortes con enzima de restricción Ava I con el DNA *wt* como templado.

Cortes con enzima Ava I (<i>wt</i>)			
Cortes en sentido 5'-3' al promotor		Cortes en sentido 3'-5' al promotor	
Corte 1	4301 pb	Corte 1	5293 pb
Corte 2	1173 pb	Corte 2	1173pb
Corte 3	1054 pb	Corte 3	62 pb

La enzima de restricción Aval crea dos cortes en el vector sin inserto, en 984 pb y 2157 pb y con el inserto se añade un corte más en la posición 39 pb en sentido 5'-3' al promotor y 794 pb en sentido 3'-5' al promotor.

Tabla 12. Cortes con enzima de restricción Ava I con DNA del177 como templado.

Cortes con enzima Ava I			
Cortes en sentido 5'-3' al promotor		Cortes en sentido 3'-5' al promotor	
Corte 1	4331 pb	Corte 1	5086 pb
Corte 2	1173 pb	Corte 2	1173 pb
Corte 3	847 pb	Corte 3	92 pb

7.8 Secuenciación de Sanger para verificar la secuencia de ~~plásmido~~

Los plásmidos verificados mediante PCR y ensayo de restricción se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM; siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 13.

Para las dos secuencias del transportador de CMP-Ácido siálico se enviaron con los oligos que proporcionó el kit pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression kit (K490001), el oligo forward T7 y el oligo reverse BGH Reverse.

Tabla 13. Protocolo para análisis de plásmidos por secuenciación de Sanger.

Protocolo para secuenciación	
Oligonucleótidos	10 pmoles
Plásmido purificado	300-500ng
Agua grado molecular	≈
Volumen final	16 µL

7.9 inducción de proteínas con IPTG

Para la realización de este experimento se elaboró primero una escalera a diferentes concentraciones de IPTG: 0.1mM, 0.5mM y 1M para saber la concentración óptima de IPTG en el inóculo con las isoformas

ejecutaron dos protocolos distintos para una inducción de la expresión de la proteína preliminar incubando las bacterias *E. Coli* transformadas con la isoforma ~~del~~ del 177 del SLC35A.

7.9.1 Protocolo de extracción de proteína con lisozima

Las bacterias transformadas con las isoformas wt-SLC35A1 y del177-SLC35A1 se inocularon en 25 mL de medio LB con 0.1 mg/mL ampicilina y se incubaron overnight a 37°C a 200 rpm. Este cultivo sirvió de inóculo y posteriormente se diluyó 1:10 en un matraz de 500 mL con 250mL de medio LB con ampicilina e IPTG 1mM (R0392, Thermo Scientific) y se incubó hasta alcanzar una D.O de 0.4 - 0.6.

Pasado ese tiempo se centrifugó a 3000 g por 15 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante para poder pesar el pellet húmedo. Después el pellet se lavó se lavó con 5 mL de buffer de lavado (Tris-HCl 200mM, glicerol20%, EDTA 5mM y H₂O estéril), se centrifugó a 3,000g durante 15 min. a 4°C y se decantó.

El pellet se resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl 200mM, glicerol al 20%, EDTA 5mM, SDS 20% y H₂O estéril) (3 mL por gramo de peso húmedo), se añadió lisozima al 0.1% w/v y se dejó incubando por 30 min. en agitación a 4°C. Posteriormente, se añadió NP-40 (Igepal) al 0.5%, MgCl₂ 5mM y se mezcló por 30 minutos a 4°C. El extracto se centrifugó a 23,000g por media hora a 4°C, se separó el sobrenadante y se congeló a -20°C.

Al pellet sobrante se le agregó 3 mL de buffer A, tabla 16 y se sonicó por 10 – 15 segundos cada 10 minutos durante 1 hora, posteriormente se centrifugó a 12,000g por 30 min. El sobrenadante se separó y se le añadieron 5mL del buffer B, tabla 17 con 10 µL de inhibidor de proteasas y 0.0192g de DTT, El sobrenadante se incubó overnight en agitación a 4°C y el pellet se congeló a -20°C.

Tabla 14. Reactivos y cantidades para la preparación del Buffer de lavado.

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 1M pH8.8	4 mL
Glicerol 20%	4 mL
EDTA 5mM	200 µL
H ₂ O estéril	11.8 mL
Volumen final	20 mL

Tabla 15. Reactivos y cantidades para la preparación del Buffer de lisis.

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 1M pH8.8	4 mL
Glicerol 20%	4 mL
EDTA 5mM	200 µL
H2O estéril	5.3 mL
SDS 20%	1.5mL
Volumen final	15 mL

Tabla 16. Reactivos y cantidades para la preparación del Buffer A

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 50 mM pH8.8	0.1514 g
Urea 8M	12 g
EDTA 5mM	0.0365 g
Volumen final	25 mL

Tabla 17. Reactivos y cantidades para la preparación del Buffer B.

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 50 mM pH8.8	0.1514 g
Glicerol 20%	5 mL
MgCl ₂ 10 mM hexahidratado	0.0508 g
Volumen final	25 mL

7.9.2 Protocolo alternativo de extracción de proteína con sarkosyl y bug buster

Dos inóculos de 25mL de bacterias transformadas con la isoforma *wt* y otro para la muestra no inducida en medio LB con ampicilina se incubaron overnight a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente el inóculo se diluyó 1:10 en matraces de 500 mL con 250mL de medio LB con 0.1 µg/mL de ampicilina y se incubaron hasta alcanzar una D.O de 0.4 - 0.6nm. Posteriormente, al cultivo se le adicionó IPTG 1mM y se incubaron durante 4 horas y 45 minutos a 37°C y 200 rpm.

Pasado este tiempo el cultivo se centrifugó a 3,000g durante 15 min. a 4°C, se desechó el medio LB, se pesó el pellet y se lavó con 5mL de buffer de lavado, después se centrifugó a 3000g por otros 15 minutos y se desechó el sobrenadante.

Al pellet se le añadieron 2 mL de Bug Buster (70584-4, Mili Pore) con 1 µL de inhibidor de proteasas y 0.03 g de Sarkosyl (L5125-5006, SIGMA). La mezcla se dejó incubando en agitación por 20 min. a TA a 80 rpm, seguido de eso se centrifugó a 16,000 g por 20 min. a 4°C.

El sobrenadante fue dializado y concentrado, y al pellet se le añadieron 0.025mg de lisozima 1 KU/mL de Bug Buster diluido 1:10 y se dejó incubando 5 min. a TA. Pasado el tiempo el sobrenadante se centrifugó a 5,000 g durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo de 15 mL nuevo y se congeló a -20°C.

El pellet fue resuspendido en 1mL del Bug Buster diluido 1:10, se mezcló por vórtex y se centrifugó a 5,000g durante 15 min. a 4°C (este paso se repitió una segunda vez).

Los sobrenadantes se desecharon y al pellet se le agregaron 200 µL de Bug Buster diluido 1:10 para congelarlo a -20°C.

Este último pellet de centrifugación y sobrenadantes de cada protocolo junto con la muestra no inducida se analizó mediante western blot como se indica más adelante.

7.10 Diálisis de extracto proteico

El primer sobrenadante del protocolo utilizando sarkosyl y Bug Buster se dializó cortando una membrana de celulosa a la longitud correcta y se sumergió en agua destilada para que se hidratara y se abriera de manera más fácil sin llegar a lastimarla, se procedió a atar un extremo y por el otro empezar a vaciar el sobrenadante con la proteína de interés y cerrarla con otro nudo.

Con un trozo de hilo se amarró la bolsa de diálisis de un extremo a un agitador magnético y se introdujo en un vaso de precipitados de 1L llenado previamente con agua destilada teniendo en el fondo otro agitado magnético de mayor tamaño que el primero.

El vaso de precipitados se colocó en una parrilla de agitación como se muestra en la figura 12 y se dejó dializando durante 5 días a 4°C teniendo un cambio de agua cada 12 horas.



Figura 13. Representación gráfica del montaje de la diálisis.

En la figura se observa la bolsa de diálisis que contiene el sobrenadante con la proteína amarrada a un agitador magnético el cual mediante por atracción magnética se mantiene en el fondo de vaso de precipitados para una mejor agitación.

7.11 Concentración de proteína

Para concentrar el primer sobrenadante del protocolo alternativo ya dializado se vació con una micropipeta con punta azul justo en el centro del filtro de centrífuga MWCO con un tamaño de poro de 10nm.

El tubo de concentración se centrifugó a 6,000g durante 1 hora a 4°C como se muestra en la figura 13 y desechó el sobrenadante, con otra punta azul se transfirió la proteína concentrada mezclando con la misma punta la parte interior del filtro para que no queden residuos a un tubo falcon nuevo de 15 mL.

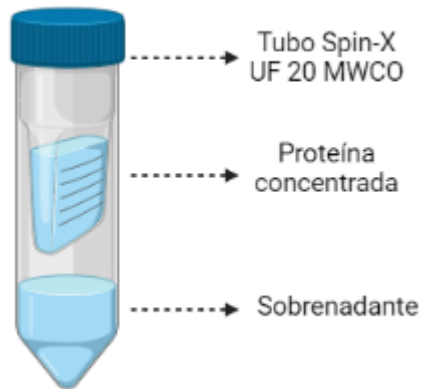


Figura 14. Representación gráfica de la proteína concentrada.

En la figura se muestra ya la proteína concentrada con el sobrenadante que se desecha.

7.12 Cuantificación de proteína con albúmina

La proteína dializada y concentrada se cuantificó por el método de BCA haciendo primero diluciones de la albúmina de suero bovino (Equitech-Bio-BAH62), en microtubos de 600 μ L, de 1mg/mL, 500 μ g/mL, 250 μ g/mL, 125 μ g/mL y 62.5 μ g/mL.

Posteriormente, se rotularon 4 microtubos más que se utilizaron para hacer dos diluciones (1:10 y 1:50) con la isoforma *wt* y del177 respectivamente.

A ese total de microtubos se les añadió 200 µL de la solución de ácido bicinconónico (Sigma-Aldrich-B9643-1L) y CuSO₄ (Sigma-Aldrich-C2284) en una relación 1:8, se mezcló por vórtex y se taparon con papel aluminio para dejarlos incubar en la incubado Incu-Shaker mini Benchmark por media hora a 37°C.

Finalmente, la densidad óptica se determinó en un nanofotómetro IMPLÉN.

8.0 WESTERN BLOT DE EXTRACCIONES

8.0.1 Preparación de geles.

La preparación del gel separador se realizó a una concentración del 13%, utilizando los reactivos de la tabla 18, hasta homogeneizarlo y vaciarlo entre los cristales de 1.5 mm de grosor.

Tabla 18. Reactivos y cantidades para la preparación del gel separador.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida al 30%/0.8 de bis acrilamida	1.67 mL al 30%.
Tampón tris 1.5 M pH 8.8	1.25 mL
SDS al 10%	50 µL
H ₂ O Destilada	2.03 mL
APS al 10%	25 µL
Temed	6 µL

Para eliminar las burbujas y mantener la tensión superficial del gel se añadió un poco de etanol al 70%. Al solidificar el gel se retiró el etanol con un papel absorbente.

Posteriormente se preparó el gel concentrador a la misma concentración del gel separador con los reactivos de acuerdo con las cantidades que se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Reactivos y cantidades para la preparación del gel concentrador.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida al 30%/0.8 de bis acrilamida	0.2 mL al 30%
Tampón tris 0.5M pH 6.8	0.5 mL
SDS al 10%	120 µL
H ₂ O destilada	1.3 mL
APS al 10%	10 µL
Temed	2.5 µL

Las muestras se cargaron en geles al 13% y se migraron durante aprox. 1 hora a 40mA. con 1.5mm de grosor. Utilizando los siguientes reactivos para el gel separador: H₂O miliQ, Tris (Calbiochem 9210), acrilamida al 30% con 8% de bisacrilamida, SDS al 10 % (Calbiochem 7910), persulfato de sodio al 10% y TEMED (BIORAD-161-0801). Para el gel concentrador: H₂O miliQ, Tris (Calbiochem 9210), acrilamida 30% con 8% de bisacrilamida, SDS 10% (Calbiochem 7910), persulfato de sodio 10% y TEMED (BIORAD-161-0801).

Las muestras proteicas de los geles se cargaron con buffer Laemmli 5X (Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8, SDS, glicerol, β-Mercaptoetanol y azul de bromofenol) y buffer SB. Previamente fueron colocadas en ebullición a 100°C durante 10 min. Posteriormente, se realizó la transferencia en forma semi-seca y las proteínas del gel se transfirieron por 30 min. a 400mA.

Finalmente, se bloquea la membrana sumergiéndola en un tampón de bloqueo (PBS con 5% de leche descremada en polvo) y se deja en agitación durante 1 hora. Pasado el tiempo se retira el tampón, se añade un anticuerpo diluido en este caso un anti-His 6X (MA1-21315, Thermo Fisher Scientific) en una concentración de 1:5000 y la membrana se incubó durante 12 horas en agitación overnight a 4°C. Pasado ese tiempo se lavó con TBS-T al 0.1%, 5 lavados de 10 min a 80 rpm durante 50 min

La membrana se lava con TBS-Tween al 0.1% en cinco ocasiones colocando la membrana en agitación con una duración de 10 min cada lavado⁶⁰.

9.0 RESULTADOS

9.1 Amplificación del gen del transportador de CMP-ácido siálico. por PCR convencional.

La temperatura de alineamiento de los oligos (Forward hCST 5' CAC ACT GGC TGC CCC GAG A3' Y Reverse hCST-HISnoR 5' CAC ACC AAT TCT CTG CTT TGA3') se determinó utilizando un gradiente de tm. La isoforma *wt* amplificó a tres temperaturas diferentes (60°C, 65°C y 70°C) utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion y a 70 °C se obtuvo una banda mejor definida de 1014 pb, figura 14.

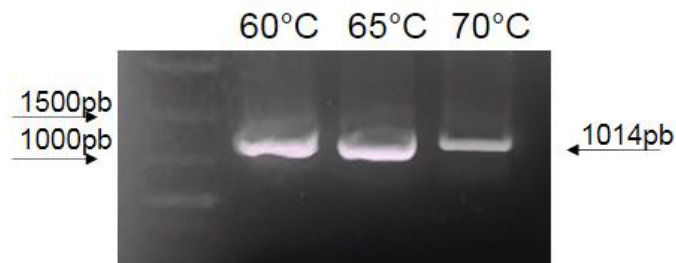


Figura 15. PCR convencional con gradiente de isoforma *wt*

En la imagen del gel se muestra la amplificación del *SLC35A1* a 3 temperaturas diferentes 60, 65 y 70 °C.

9.1.1 Amplificación de las isoformas *wt* y *del177* del transportador de CMP-ácido siálico. (*SLC35A1*).

Después de determinar la temperatura óptima de alineamiento se amplificó la isoforma *wt* y *del177* del *SLC35A1* para corroborar el tamaño de cada isoforma, obteniendo 1014 pb de la isoforma *wt* y 837 pb de la isoforma *del177*, figura 15.

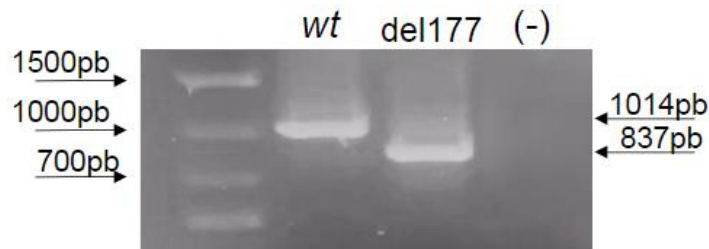


Figura 16. Amplificación de las isoformas wt y del177.

Imagen en la que se señala con las flechas de lado derecho el peso correspondiente de la banda de cada una de las isoformas y de lado izquierdo el peso del marcador molecular.

9.2 Análisis de la clonación de la isoforma wt del SLC35A1 en el vector de clonación pcDNA™3.1 topo.

La isoforma wt se clonó utilizando el vector pcDNA™3.1 Topo y se obtuvieron 37 colonias, de las cuales se purificaron 4 plásmidos. Los plásmidos se utilizaron como templado en una PCR convencional con los oligos hCST-His F y hCST- HISnvo R. Dos amplificaciones de los plásmidos coincidieron con el tamaño del inserto wt (1014 pb) y no presentaron especificidades como las bandas 1 y 4. Los plásmidos se numeraron como 2 y 3 respectivamente, figura 16.

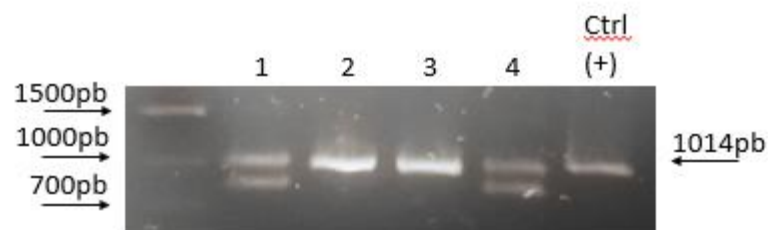


Figura 17. PCR de la isoforma wt del SLC35A1 clonada en el vector pcDNA 3.1 Topo.

9.3 Análisis de la clonación de la isoforma del177 del SLC35A1 en el vector de clonación pcDNA™3.1 topo.

La isoforma del177 del SLC35A1 se clonó utilizando el vector pcDNA™3.1 Directional Topo y se obtuvieron 44 colonias, de las cuales se purificaron cuatro plásmidos y se procedió a realizar una PCR convencional utilizando los oligos hCST-His F y hCST- HISnvo R. Se identificaron 2 plásmidos con el tamaño esperado (837 pb) y se numeraron como 1 y 3, figura 17.



Figura 18. PCR de la isoforma del177 del *SLC35A1* en el vector pcDNA 3.1 Topo.

En la imagen se muestra el producto de PCR utilizando como templado las purificaciones plasmídicas de las colonias (1-4) siendo el último carril el control positivo para asegurar que las bandas se encuentren en el peso correcto.

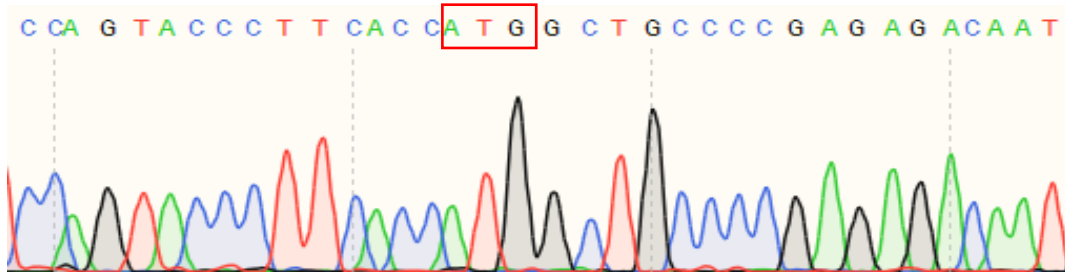
En los resultados preliminares obtenidos se lograron obtener colonias positivas con el plásmido en la dirección 3' a 5' con respecto al promotor.

*9.4 Secuenciación de Sanger de las construcciones con las isoformas wt y del188 del *SLC35A1**

Las secuencias obtenidas del proceso de secuenciación de las construcciones wt-*SLC35A1* y del177-*SLC35A1* se alinearon con las isoformas wt (NM_006416.5) y del177 (NM_001168398.2) del *SLC35A1* obtenidas de la plataforma NCBI. Se verificó que ambas secuencias presentaran el codón de inicio, codón de paro y la secuencia correspondiente a la cola de polihistidina CAT CAT CAC CAT CAC CAT (6 aa).

Los cromatogramas correspondientes a las secuencias wt y del177 se muestran en las figuras 19 y 20, ambas secuencias se analizaron con los oligos T7 y BGH los cuales sirven para leer las secuencias de manera completa, e indicaron que la secuencia de polihistidina se encuentra incorporada en el inserto y ambas secuencias no presentaron cambios mutaciones puntuales.

wt



del177

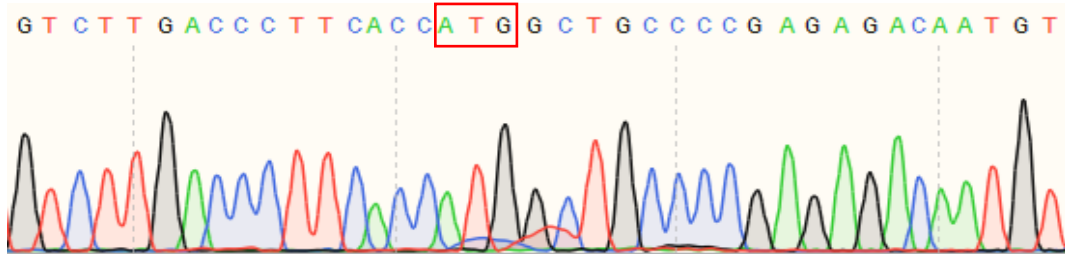
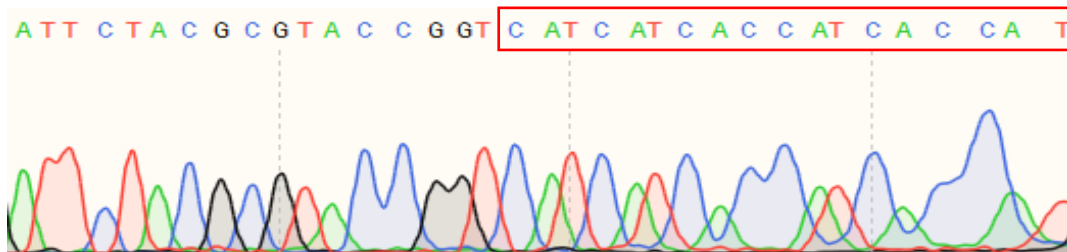


Figura 19. Cromatogramas de las isoformas *wt* y *del177*

Alineamiento correspondiente a la isoforma *wt* y *del 177*. El cuadro rojo indica el codón de inicio.

wt



del177

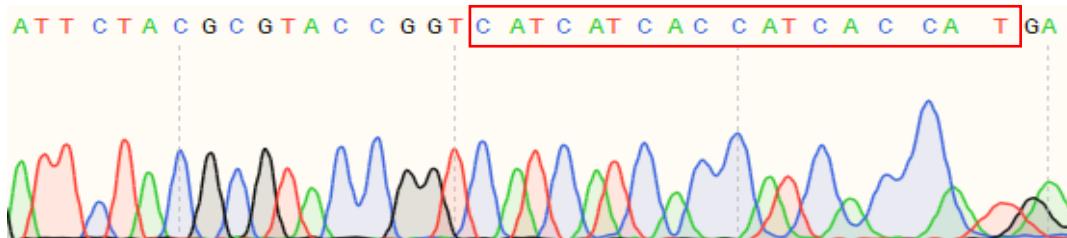


Figura 20. Cromatogramas de las isoformas *wt* y *del177*

El cuadro rojo indica la secuencia correspondiente a la secuencia de poli histidina.

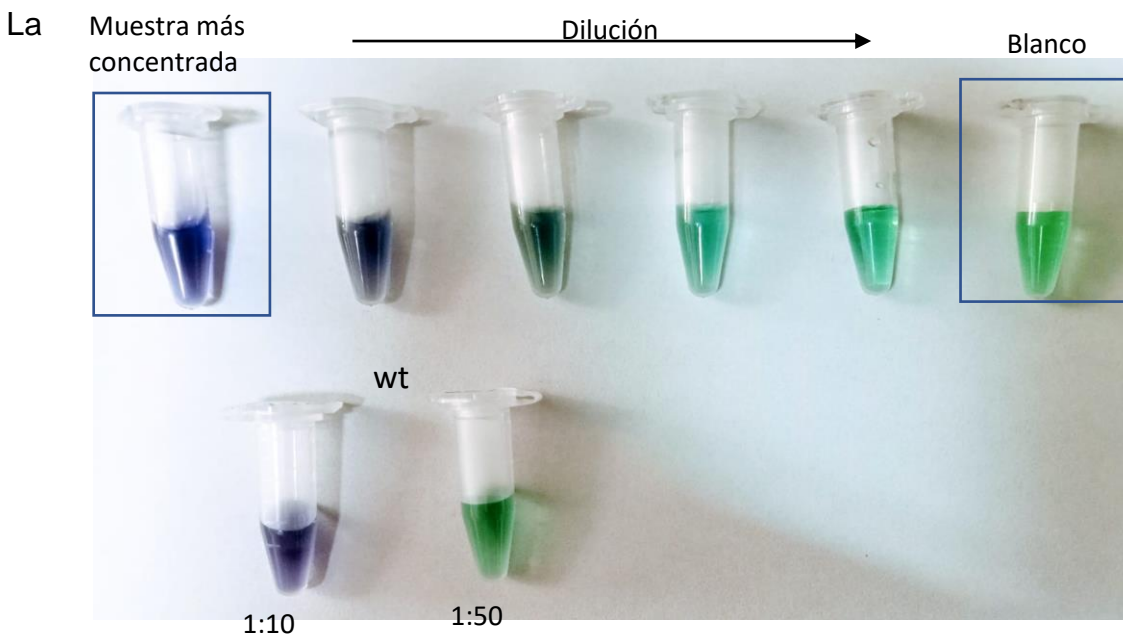
En los resultados preliminares obtenidos se lograron obtener colonias positivas con el plásmido en la dirección 3' a 5' con respecto al promotor.

9.5. Protocolo de extracción con Sarkosyl/bugbuster.

Las bacterias transformadas con las construcciones wt y del177 del *SLC35A1* se cultivaron en 150 mL de medio LB líquido matraz de 250 mL de cultivo suplementado con IPTG. El peso húmedo obtenido fue de 10 g de bacterias. Utilizando el procedimiento de extracción con Sarkosyl y Bugbuster se obtuvieron 4 fracciones. La concentración del lisado proteico obtenido con el protocolo con Sarkosyl y BugBuster se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la concentración de la isoforma wt.

Dilución	Cuantificación
Resultado	7,095.65 µg/mL



isoforma wt-*SLC35A1* se utilizó en primera instancia debido a que existen reportes de su expresión en *E. coli*⁷⁸.

Figura 21. Cuantificación por el método de BSA de la isoforma *wt* del transportador de CMP-ácido siálico humano.

Imagen de las diluciones 1:10 y 1:50 de las muestras de lisado del gen *SLC35A1* de la isoforma *wt* del CST.

Este protocolo contiene dos reactivos los cuales actúan de una manera en la que no interrumpen la interacción de la etiqueta de poli-histidina en el proceso de extracción.

Además, el reactivo Sarkosyl es un detergente con una carga negativa, que provoca una desnaturalización menor de las proteínas, interrumpe los agregados proteicos y las interacciones proteína-proteína sin afectar la función de la misma además de contribuir a la lisis celular y de esta manera disolver los cuerpos de inclusión que se creían contenían a la proteína del transportador^{79,80}.

Las muestras proteicas de las bacterias transformadas con la construcción de la isoforma *wt SLC35* se cargaron con buffer Laemmli 5X , figura 21.

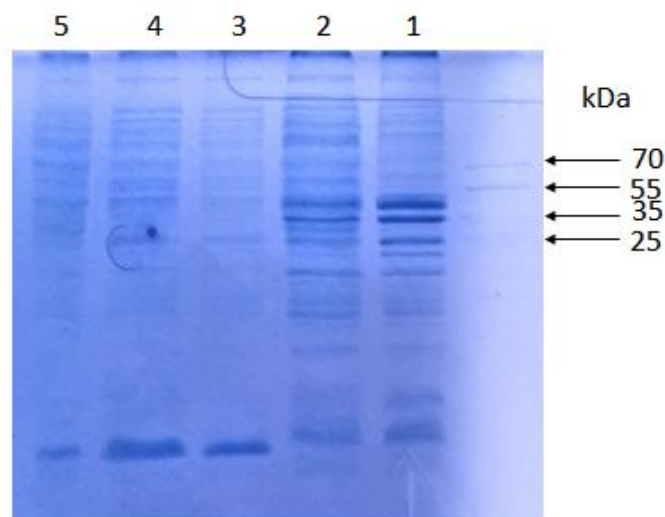


Figura 22. Gel de electroforesis desnaturalizante teñido con azul coomasie.

Gel de acrilamida al 13% donde están numerados los carriles de acuerdo al orden de carga de las fracciones proteicas de la isoforma *wt*.

1. Pellet final, 2. Pellet del sobrenadante dializado, 3. Primer sobrenadante de la extracción proteica, 4. Sobrenadante dializado y concentrado, 5. Sobrenadante concentrado 1 hora.

El análisis del gel de electroforesis permitió identificar un patrón de bandeo del lisado total observando que las posibles bandas que se encuentran arriba de 35kDa es la proteína del transportador de CMP-Sia, además estos lisados no presentaron lisis proteica y posiblemente corresponden al transportador lo cual no se pudo corroborar ya que no se contó con un control con el que se pudiera comparar.

Después de este resultado, se realizó un experimento de Western blot utilizando el anticuerpo anti-His 6X acoplado a alexa flúor 647, figura 22.

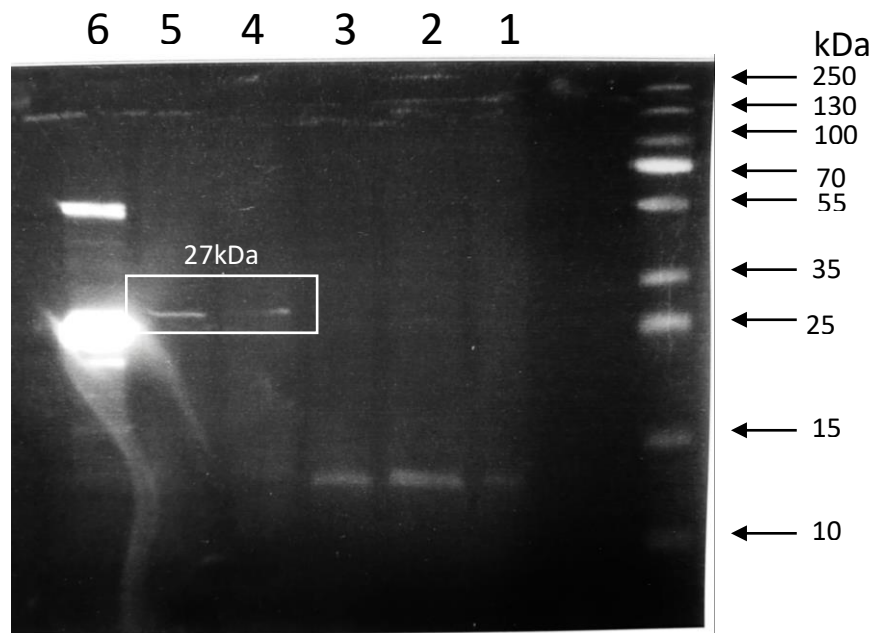


Figura 23. Membrana incubada con anticuerpo anti-His 6X con Alexa Fluor 647

En la membrana se encuentran numerados los carriles de acuerdo al orden de carga. 1. Último sobrenadante dializado y concentrado, 2. Sobrenadante concentrado 1 hora, 3. Primer sobrenadante, 4. Pellet final de la extracción proteica, 5. Pellet del sobrenadante dializado, 6. Control positivo con etiqueta de polihistidina.

En imagen se observan las bandas de interés en el carril 4 y 5 enmarcadas con el recuadro blanco, por lo que se discute que hubo una pérdida parcial de la proteína pero se puede ver que se obtuvo una integridad en las bandas y los pesos de las bandas más intensas se encuentran en el rango esperado.

En esta membrana se utilizó un anticuerpo anti-His 6X acoplado a Alexa flúor 647 con la finalidad de detectar la etiqueta de polihistidina que se induce junto con la proteína y permitió detectar el CST.

Debido a que las extracciones con Sarkosyl no fueron los resultados esperados ya que no se obtiene el bandeo en la parte soluble unicamente en los pellets y que en el gel teñido junto con la membrana revelada se apreciara la banda de interés mejor identificada en los pellets se decidió investigar y aplicar un protocolo alternativo.

9.5.1 Análisis de lisados extraídos con lisozima.

La cuantificación proteica de los lisados obtenidos de las bacterias transformadas (10 g de peso húmedo) con las construcción *wt* y *del177* del *SLC35A1* y extraídas con el protocolo que contiene lisozima se muestran en las tablas 21 y 22.

Tabla 21. Resultados de la concentración de las isoformas *wt* y *del177*.

Dilución	Cuantificación de lisado de bacterias transformadas con la isoforma <i>wt</i>
Resultado	9,476.1 µg/mL

Dilución	Cuantificación de lisado de bacterias transformadas con la isoforma <i>del177</i>
Resultado	9,618.85 µg/mL

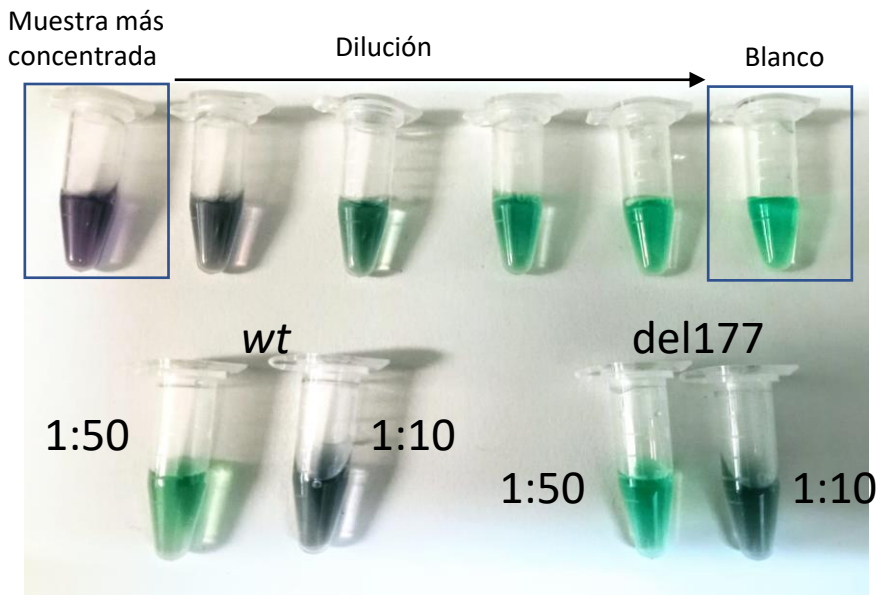


Figura 24. Cuantificación de proteína total obtenida de lisado de bacterias transformadas con las isoformas *wt* y *del177* del CST.

Diluciones 1:10 y 1:50 de las isoformas *wt* y *del177* delCST, respectivamente.

Con este protocolo se realizó un experimento de SDS-PAGE el cual se transfirió a una membrana de PVDF y se tiñó con rojo ponceau, figura 25.

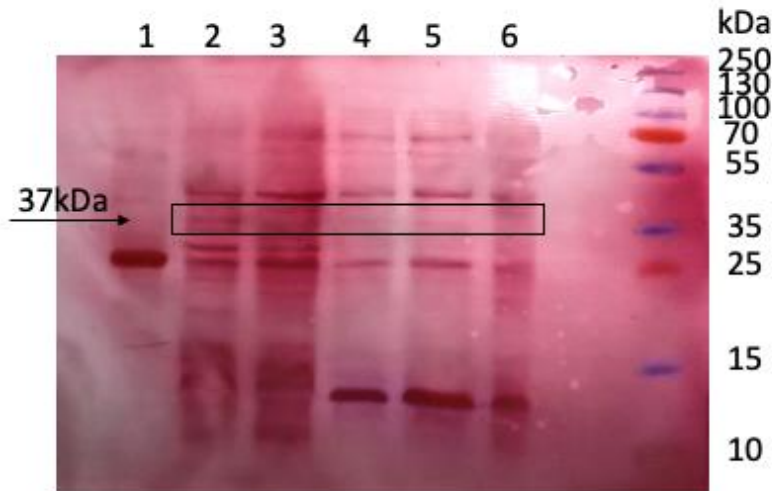


Figura 25. Membrana teñida con rojo ponceau. Lisado total obtenido con lisozima.

El orden de carga de esta membrana se señala a continuación: 1. Control positivo, 2. Pellet del sobrenadante dializado, 3. Pellet final, 4. Primer sobrenadante, 5. Sobrenadante concentrado 1 hora y 6. Sobrenadante dializado y concentrado. Dentro del recuadro negro se señalan las posibles bandas que corresponderían al CST.

*9.6 Análisis por PCR de los insertos de las isoformas *wt* y *del177* del *SLC35A1*.*

Para verificar que las colonias utilizadas en el proceso de extracción proteica mantuvieran la expresión de las isoformas *wt* y *del177* del *SLC35A1*, se realizó una PCR del plásmido purificado, teniendo como resultado la figura 25. en donde se distingue que las colonias aún preservan el inserto.

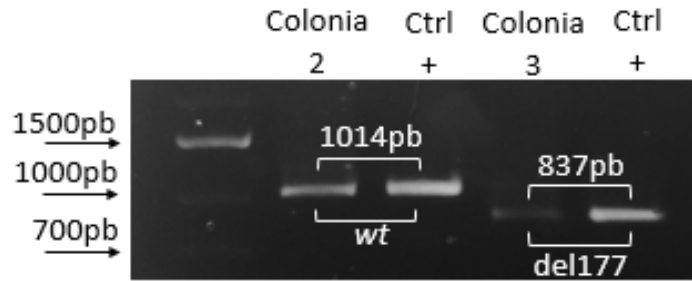


Figura 26. PCR de colonias transformadas con la isoforma *wt* y *del177* del SLC35A1

En la figura se muestran las bandas correspondientes a cada isoforma *wt*-SLC35A1 (1014 pb) y *del177*-SLC35A1 (837 pb) con su respectivo control positivo, demostrando que aún contienen el inserto respectivo

10.0 CONCLUSIONES

- Las isoformas *wt* y *del177* del *SLC35A1* se amplificaron, clonaron y expresaron en el vector de clonación pcDNA™3.1 Directional TOPO®
- Los protocolos de extracción de proteína de las bacterias transformadas con las isoformas *wt* y *del177*-SLC35A1 se lograron estandarizar, obteniendo mayor rendimiento proteico con lizosima protocolo.
- La isoforma silvestre se logró fraccionar en pellet y sobrenadante; determinando en algunos experimentos de Western blot bandas con un peso molecular similar a los reportados en *E. coli*, sin embargo no se logró visualizar la isoforma *del177*.
- La cepa de *E. Coli*, Mach One podría no ser la indicada para la expresión de la proteínas de membrana como las isoformas *wt* y *del177* del CST.
- No se logró purificar de manera total ni confirmar la estructura peptídica de la isoforma funcional *del177*-SLC35A1, pero se sentaron las bases para continuar con el proyecto en el laboratorio.

11.0 PERSPECTIVAS

- Expresar la isoforma wt y del177 del transportador de CMP-ácido siálico humano en la cepa BL21 Gold 3 de *E. coli*.

12.0 ANEXOS

12.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA OBTENER CÉLULAS MACH ONE

Buffer TB: La preparación de 1 L de buffer TB se realizó disolviendo 3.24 g de Pipes, 1.93 g CaCl₂.H₂O y 18.63 g KCl en agua destilada. Se ajustó el pH a 6.7 utilizando KOH 2.5 N y una vez ajustado se adicionó 6.92 g de MnCl₂. Al finalizar se procedió a filtrar la solución en una membrana de 0.22 µm y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

12.2 PREPARACIÓN DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR GENERULER 1 KB PLUS DNA

La preparación del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA (SM1333, Thermo Fisher Scientific) utilizado en los geles de agarosa se realizó diluyendo en partes iguales con buffer de carga TriTrack DNA Loading Dye (6X) (R1161, Thermo Fisher Scientific).

12.3 PREPARACIÓN DE BUFFER TAE 50 X

La preparación de 100 mL de buffer TAE 50x se realizó pesando 24.2 g de tris base en un vaso de precipitado de 250 mL, se le añadieron 25 ml de agua destilada y posteriormente se colocó en una parrilla de agitación hasta su disolución. Una vez disuelto el reactivo tris base, se agregó 5.71 mL de ácido acético glacial. Después se midieron 10 mL de EDTA 0.5 M en una probeta y se añadieron al mismo vaso de precipitado. Finalmente, la solución se aforó a 100 mL en una probeta y se traspasó a su contenedor final.

12.4 PREPARACIÓN DE MEDIO LB SÓLIDO CON ANTIBIÓTICO

La preparación de 250 mL de Medio LB se realiza disolviendo en agua destilada 2.5 g de peptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl. Posteriormente se agrega 3.75 g de agar y se transfiere a un matraz y se tapa con un tapón hecho de algodón y gasas. El medio se esteriliza en una autoclave durante 15 min. Luego se deja entibiar y se agrega 0.1 mg/mL de ampicilina. Finalmente, el medio se vierte en cajas Petri de 100x 15 mm y una vez que se enfrían, se reservan boca abajo a 4 °C hasta su uso.

12.5 PREPARACIÓN DE MEDIO LB LÍQUIDO CON ANTIBIÓTICO

La preparación de 250 ml de Medio LB líquido se realiza disolviendo en agua destilada 2.5 g de peptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl en un matraz. Posteriormente, el medio se esteriliza tapado con un tapón de algodón y gasas en una autoclave durante 15 min, se deja enfriar a TA y se agrega 0.1 mg/ mL de ampicilina. Finalmente se reserva a 4 °C hasta su uso.

12.6 PREPARACIÓN DE MEDIO SOC

La preparación de 50 ml de medio SOC se realiza pesando 1 g de triptona, 0.25 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl y 0.0093 g de KCl en un vaso de precipitado. Después se debe ajustar el pH a 7 utilizando NaOH 1N. Una vez ajustado se pasa la solución a un frasco de vidrio con tapa. Por último, el medio debe ser esterilizado durante 30 min y posterior a eso se guarda a 4 °C hasta su uso.

12.7 PREPARACIÓN DE GLICEROLES DE LAS CLONAS POSITIVAS

Las clonas positivas fueron incubadas en tubos de ensayo con medio LB líquido con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 12 h, posteriormente se colocaron 850 µL del cultivo obtenido en un microtubo de 1.5 mL, se le añadieron 150 µL de glicerol estéril y se resuspendió suavemente el volumen completo. Inmediatamente, se procedió a congelar los tubos a -80 °C.

12.8 PREPARACIÓN DE BUFFER DE CORRIDA PARA WESTERN BLOT

Para la preparación de 1L de buffer de corrida se mide en una probeta 200ml del stock Tris-Glicina 5x, 800ml de H₂O destilada y se pesa 1 g de SDS, se vacía a un bote con tapa y se mantiene en refrigeración a 4°C hasta su uso.

12.9 PREPARACIÓN DE BUFFER DE TRANSFERENCIA PARA WESTERN BLOT

Para la preparación de 1L de buffer de transferencia se mide en una probeta 200ml del stock Tris-Glicina 5x, 600ml de H₂O destilada y 200ml de MeOH al 20%, se vacía a un bote con tapa y se mantiene en refrigeración a 4°C hasta su uso.

12.10 PREPARACIÓN DE ACRILAMIDA PARA GELES DE ELECTROFORESIS

La preparación de la acrilamida se comienza disolviendo con mucho cuidado y respirar tanto 30g de acrilamida, 0.8g de bisacrilamida en un vaso de precipitados con 100 ml de H₂O destilada, la solución ya disuelta se transfiere a un frasco ámbar con tapa y se mantiene a 4°C hasta su uso.

13.0 REFERENCIAS

1. CORDIS | Europea Comisión. (2017, 7 febrero). CORDIS Comisión Europea. Recuperado 1 de marzo de 2022, de <https://cordis.europa.eu/article/id/191017-protein-structure-and-glycosylation/es>
2. Varco A. (2008). Sialic acids in human health and disease. Cell Press, Sialic acids in human health and disease
3. Vari A, Kornfeld S. Antecedentes históricos y descripción general. 2017. Fundamentos de Glicobiología. 3ra edición. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/> doi:10.1101/glyco biology.3e.001
4. Schauer R Logros y desafíos de la investigación del ácido siálico. *GlicoconjJ* 17:485–499 (2000)
5. Varki A, Schauer R Ácido siálico. En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (eds) *Essentials of glycobiology*, 2nd edn. Laboratorio de Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, págs. 199–217 (2008)
6. Sam J Moons, Gosse J Adema, Max TGM Derks, Thomas J Boltje, Christian Büll, Sialic acid glycoengineering using N-acetylmannosamine and sialic acid analogs, *Glycobiology*, Volume 29, Issue 6, June 2019, Pages 433–445, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz026>
7. C. Pérez-Cerdá, M.aL. Girós, M. Serrano, B. Pérez Dueñas, M.aJ. Ecaj, C. Medrano, L. Gort, B. Pérez González. (2015). Trastornos de la glicosilación. Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo. https://www.rarecommons.org/files/images/imce/CDG/protocolo_cdg.pdf
8. Chen X, Varki A Avances en la biología y química de los ácidos siálicos. *ACS Chem Biol* 5:163–176 (2010)
9. Li, Y., Chen, X. Metabolismo del ácido siálico y sialiltransferasas: funciones y aplicaciones naturales. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 887–905 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4040-1>
10. Hadley, B., Litfin, T., Day, C. J., Haselhorst, T., Zhou, Y., & Tiralongo, J. (2019, January 1). Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.002>

11. Taylor RE, Gregg CJ, Padler-Karavani V, Ghaderi D, Yu H, Huang S, Sorensen RU, Chen X, Inostroza J, Nizet V, Varki A Mecanismo novedoso para la generación de xeno-autoanticuerpos humanos contra los no humanos Ácido siálico Ácido N - glicolilneuramínico. *J Exp Med* 207: 1637– 1646 (2010).
12. SLC35A1 solute carrier family 35 members A1 [Homo sapiens (human)] -Gene-NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=10559>.
13. Eckhardt, M., Gotza, B., & Gerardy-Schahn, R. (1999). Membrane topology of the mammalian CMPsialic acid transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8779–8787. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8779>
14. Barbara Hadley, Thomas Litfin, Chris J. Day, Thomas Haselhorst, Yaoqi Zhou, Joe Tiralongo, Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume 17, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.002>.
15. 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>
16. De, D., Biológicas, C., De, Y., Salud, L., En, M., & De, C. (n.d.). UNIVERSIDAD DE SONORA “CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOSILACIÓN TERMINAL DE LA IgG SÉRICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2” QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: MAESTRO EN CIENCIAS. Retrieved March 4, 2022, from <http://148.225.114.121/bitstream/unison/2235/1/pinedaorozcodamarism.pdf>
17. Ajit Varki, Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., & Seeberger, P. H. (2017). *Essentials of Glycobiology*. Nih.gov; Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>
18. Leticia, B., Olivera, S., Rojas, B., Hernández Juárez, J., Belem, I., Velasco, G., Luis, M., García-Cruz, Antonio Hernández-Cruz, P., Papel, E., Ácido, D., En, S., Desarrollo, E., Cáncer, D., & Mama, D. (n.d.). Retrieved June 17, 2022, from <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2021/reb213b.pdf>
19. Ácido siálico: estructura, funciones y enfermedades - Lifeder. <https://www.lifeder.com/acidosialico/>.
20. Sialiltransferasa: una visión general | Temas de ScienceDirect.

<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/sialyltransferase>

21. Salinas-Marín, R. EFECTO DEL KNOCK DOWN DEL TRANSPORTADOR DE CMP-ÁCIDO SIÁLICO SOBRE EL PERFIL DE SIALILACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA DE HEPATOCARCINOMA (HEPG2). (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2016)
22. Hadley, B. et al. Mini Review Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress. *CSBJ* 10, 23–32 (2014)
23. Zhao, W., Chen, T. L. L., Vertel, B. M. & Colley, K. J. 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. *J. Biol. Chem.* 281, 31106–31118 (2006).
24. Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6709370/>
25. Eckhardt, M., Gotza, B. & Gerardy-Schahn, R. Mutants of the CMP-sialic Acid Transporter Causing the Lec2 Phenotype*. <http://www.jbc.org/> (1998)
26. Takeshima-Futagami, T. et al. Amino acid residues important for CMP-sialic acid recognition by the CMP-sialic acid transporter: Analysis of the substrate specificity of UDPgalactose/CMP-sialic acid transporter chimeras. *Glycobiology* 22, 1731–1740 (2012)
27. Salinas-Marín, R., Mollicone, R. & Martínez-Duncker, I. A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter. *Glycoconj. J.* 33, 897–906 (2016).
28. Martínez-Duncker, I. et al. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. (2005) doi:10.1182/blood
29. Zhang, Y., Zhang, Y., Sun, K., Meng, Z., & Chen, L. (2018). The SLC transporter in nutrient and metabolic sensing, regulation, and drug development. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy052>
30. Muhlenhoff, M., Bethe, A., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter (complementation cloning/Lec2 mutant/nucleotide sugar transport/polysialic acid). *Biochemistry*, 93, 7572–7576. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38787/pdf/pnas01519-0157.pdf>
31. Claudia, A.Z (2021) Clonación y expresión del transportador de CMP-ácido siálico de

macaca mulatta [Licenciatura] UAEM

32. Alin, H.B(2021). Análisis del transportador de CMP-ácido siálico de mamíferos [Licenciatura] UAEM
33. Maggioni, A., Hadley, B., von Itzstein, M., & Tiralongo, J. (2014). Expression, solubilisation, and purification of a functional CMP-sialic acid transporter in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 101, 165– 171. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.07.003>
34. Tiralongo, J. (2005). Functional expression of the CMP-sialic acid transporter in *Escherichia coli* and its identification as a simple mobile carrier. *Glycobiology*, 16(1), 73–81. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj029>
35. Mabashi-Asazuma, H., Shi, X., Geisler, C., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., & Jarvis, D. L. (2012). Impact of a human CMP-sialic acid transporter on recombinant glycoprotein sialylation in glycoengineered insect cells. *Glycobiology*, 23(2), 199–210. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws143>

36. Berninsone, P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., & Hirschberg, C. B. (1997). Functional Expression of the Murine Golgi CMP-Sialic Acid Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12616–12619. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12616>
37. pcDNATM3.1 Directional TOPOTM Expression Kit. (2022). Thermofisher.com. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K490001#/K490001>
38. Willig, T. N. et al. Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigen in leukocytes - A new syndrome? *Blood* 97, 826–828 (2001).
39. Martinez-Duncker, I. et al. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. (2005) doi:10.1182/blood.
40. Riemersma, M. et al. Disease mutations in CMP-sialic acid transporter SLC35A1 result in abnormal α -dystroglycan O-mannosylation, independent from sialic acid. (2014)
41. Ng, B. G. et al. Encephalopathy caused by novel mutations in the CMP-sialic acid transporter, SLC35A1. *Am. J. Med. Genet. Part A* 173, 2906– 2911 (2017).
42. Lin, N. et al. Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cell Engineering to Increase Sialylation of Recombinant Therapeutic Proteins by Modulating Sialyltransferase Expression HHS Public Access. *Biotechnol Prog* 31, 334– 346 (2015)
43. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells | Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867421005031?token=1D8C8AD52FF24991> Ahuja, S., & Whorton, M. R. (2019). Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport. *ELife*, 8, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.45221>
44. Broussard, A. C., & Boyce, M. (2019). Life is sweet: The cell biology of glycoconjugates. *Molecular Biology of the Cell*, 30(5), 525–529. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0247>

45. 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>
46. Cotton, T., Parker, E., & Joseph, D. (2014). The role of sialic acid synthases in sialic acid biosynthesis. *Chemistry in New Zealand*, 78(2), 69–74
47. Gerardy-Schahn, R., Oelmann, S., & Bakker, H. (2001). Nucleotide sugar transporters: Biological and functional aspects. *Biochimie*, 83(8), 775–782. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01322-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01322-0)
48. Magda, D., Pérez, O., Dra, V., Remedios, M., López, M., Araceli, R., Tellez, G., & Magaña Pérez. (n.d.). GUÍA DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Analisis-Instrumental.pdf>
49. Jacobs, C. L., Goon, S., Yarema, K. J., Hinderlich, S., Hang, H. C., Chai, D. H., & Bertozzi, C. R. (2001). Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 40(43), 12864–12874. <https://doi.org/10.1021/bi010862s>
50. Kooner, A. S., Yu, H., & Chen, X. (2019). Synthesis of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and its glycosides. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02004>
51. 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>
52. Ma, X., Li, Y., Kondo, Y., Shi, H., & Han, J. (2021). Slc35a1 deficiency causes thrombocytopenia.
53. 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*, 14(15), 1936–1942. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300298>

54. Münster-Kühnel, A. K., Tiralongo, J., Krapp, S., Weinhold, B., Ritz-Sedlacek, V., Jacob, U., & Gerardy-Schahn, R. (2004). Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*, 14(10), 43–51. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh113>
55. Neelamegham, S., Aoki-kinoshita, K., Bolton, E., Frank, M., Lütteke, T., Boyle, N. O., Packer, N., Stanley, P., & Toukach, P. (2019). Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) Guidelines Running. *Glycobiology*, 29(9), 620–624.
56. Petasny, M., Bentata, M., Pawellek, A., Baker, M., Kay, G., & Salton, M. (2021). Splicing to Keep Cycling: The Importance of Pre-mRNA Splicing during the Cell Cycle. *Trends in Genetics*, 37(3), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.013>
57. 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>
58. Ury, B., Potelle, S., Caligiore, F., Whorton, M. R., & Bommer, G. T. (2021). The promiscuous binding pocket of SLC35A1 ensures redundant transport of CDP-ribitol to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100789. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100789>
59. Wickramasinghe, S., & Medrano, J. F. (2011). Biochimie Primer on genes encoding enzymes in sialic acid metabolism in mammals. *Biochimie*, 93(10), 1641–1646. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.002>.
60. 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/cwn_080.
61. Muhlenhoff, M., Bethe, A., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP- sialic acid transporter (complementation cloning/Lec2 mutant/nucleotide sugar transport/polysialic acid). *Biochemistry*, 93, 7572–7576.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38787/pdf/pnas01519-0157.pdf>

62. Claudia, A.Z (2021) Clonación y expresión del transportador de CMP-ácido siálico de macaca mulatta [Licenciatura] UAEM.

63. Alin, H.B(2021). Análisis del transportador de CMP-ácido siálico de mamíferos [Licenciatura] UAEM.

64. Maggioni, A., Hadley, B., von Itzstein, M., & Tiralongo, J. (2014). Expression, solubilisation, and purification of a functional CMP- sialic acid transporter in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 101, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.07.003>.

65. Tiralongo, J. (2005). Functional expression of the CMP-sialic acid transporter in *Escherichia coli* and its identification as a simple mobile carrier. *Glycobiology*, 16(1), 73–81. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj029>.

66. Mabashi-Asazuma, H., Shi, X., Geisler, C., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., & Jarvis, D. L. (2012). Impact of a human CMP-sialic acid transporter on recombinant glycoprotein sialylation in glycoengineered insect cells. *Glycobiology*, 23(2), 199–210. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws143>.

67. Berninsone, P., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., & Hirschberg, C. B. (1997). Functional Expression of the Murine Golgi CMP-Sialic Acid Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12616–12619. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12616>.

68. Lee, C.-H. (2017). A Simple Outline of Methods for Protein Isolation and Purification. *Endocrinology and Metabolism*, 32(1), 18. <https://doi.org/10.3803/enm.2017.32.1.18>

69. Salinas-Marín, R., Dominguez, B., Castro, R., Martínez-Duncker, I., De, T., Prioritarios, S., & De Glicoproteínas, A. (n.d.). *SERIE LA GLICOBIOLOGÍA: AVANCES EN*. <http://libros.uaem.mx/archivos/epub/analisis-glicoproteinas/analisis-glicoproteinas.pdf>

70. Frankel, S., Sohn, R., & Leinwand, L. (1991). The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4), 1192–1196. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.4.1192>

71. Massiah, M. A., Wright, K. M., & Du, H. (2016). Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media. *Current Protocols in Protein Science*, 84(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0613s84>
72. *Protocols*. *Benchling*. (2023). Benchling.com. <https://benchling.com/protocols/OFiw0z/large-scale-extraction-of-recombinant-proteins-from-bacteria/sbs>
73. Tiralongo, J. (2005). Functional expression of the CMP-sialic acid transporter in *Escherichia coli* and its identification as a simple mobile carrier. *Glycobiology*, 16(1), 73–81. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj029>
74. 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>
75. *Scientific Reports*. (2023, February 11). Nature; Nature. <https://www.nature.com/srep/>
76. Lochhead, J. J., Yang, J., Ronaldson, P. T., & Davis, T. P. (2020). Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00914>
77. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
78. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology list of issues. (2022). Taylor & Francis. <https://www.tandfonline.com/loi/ibmg20>

79. Zapater, J. L., & Colley, K. J. (2012). Sequences Prior to Conserved Catalytic Motifs of Polysialyltransferase ST8Sia IV Are Required for Substrate Recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6441–6453. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.322024>
80. Schauer, R., & Kamerling, J. P. (2018). Exploration of the Sialic Acid World. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1–213. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2018.09.001>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. NAVARRETE CABRERA GABRIELA** con número de matrícula **10018679** cuyo título es:

Clonación, expresión y purificación de la isoforma funcional del177 del transportador de CMP-ácido siálico humano

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 9 de octubre del 2023

Atentamente
Por una universidad culta
Una universidad de excelencia

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. BLANCA EDA DOMINGUEZ MENDOZA
DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ
DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN
DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
DR. NELSON AVONCE VERGARA**

**(PRESIDENTE)
(SECRETARIO)
(VOCAL)
(SUPLENTE)
(SUPLENTE)**

MIE/VRRC/EAE

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAGDALENA GUERRA CRESPO | Fecha:2023-10-09 19:03:21 | Firmante

mxxGRKuL7ozQM7DFiJBv6Fu/q7+FKz8YZ61DDy3BnkfM3d6XDI2nuY3T1xpYYdmLVwmK0mQo2nslNwKsTimius0BNMF8LJRODesRbGMnPD5OIh4iCOd011wUPITVyxHhDDt
t8Zu5sel6+8N9f+ZygOR9BuSZsRzb2b2CyUOj33x+9ykWKbHrFBvd5sK3ZXSUGU20eMqZOA+Posx0TJ2pQn/Jju6yPkrV//41bzDC3h8Yyn7V5gjuwU49sc6SGBfYP4hOoQEQEaDW
A8InL1QJ1E2xI/HQsNVQz1ov8m4J7FRQT2Z5Pq9XYjOtc+P1G9B7yU8id/GMvsSEmBiJrBUVFXQ==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2023-10-09 21:46:10 | Firmante

IJ0HIA7mOIRsXGnRyV+MNP8RxHpy6sa8Zwi/2wyh6/AS6LoFk4ZHOivJE7a/pFYIGVtU+AJSBW0+3PZOex9uT+TefY4ENHdd7IjdjChcYJL4tzsheGISF+h/Bnl0gDEcnT4vusQC
5owh3UINCvEn/qJvd1P0qnmigAF+fiM0Vd56q0UZmNDE6vJ+75VfV/QnOJa0hZHoAJurefyJD+zjMGLKvfocAaPcSkaQCbOmTykVD49p9wibpAUh7muZZAFSKosYu+0aDlfoS
PqdlgyQq5g551L5Y+JkXfYDhH/ndu/UE5wwV9adwcgaBf8eo2kgedMVvBxFOAIJdbHg==

BLANCA EDA DOMINGUEZ MENDOZA | Fecha:2023-10-10 08:55:24 | Firmante

D1cMmDP3x3odmWmN5u909vo5fOvKDwwO7glyvaL6GOLnWuOVTxJzTGsCfGz1os8lb/Nm8fLAn4jy9bzA0BEB0tiVN+MvNpCZQxV+BoPScxW52mKY9TpurC9f8UYh6nvbHj1p
sj3u+AfvZVJBSQHUQZkXAwWVd0UElaTCsAYCe4eM3YUMqvs7CAVISITDqUdqpQclwRcAaCoupKcZRHedyGeHm6xiYQBINB38CWZrb6a3xV2RvGbc9kdbQCKyLT2DsG7/N
DNALI0QrwOcP9xS/du12c9mgvYw1kpenh+0hRZijFC9TCfvtAJhrCBX+Nsh63Cps33RQz7OST74bacA==

NELSON AVONCE VERGARA | Fecha:2023-10-17 02:18:35 | Firmante

aGNidnpquF5PIEzXMsEz4TBBknHZ+2fSvwi/219Uej3EnrYu2mXOxvNTkw0kIX05skTitQWhxkVnFKW2EG3B67wdNUvc2pw/XC0n1PnDzxllyfccV6H6DKmB6AxUyp1LhMUH5YEB
jP0JOhr3InERs2Dczm69Tc5aby7uzfgrA3H76KcJVH01O5vfGxBt+ncPclMaDMpBV9O0eTIGZ+RRAf+JqJFCmfVJm1JASITke6AGafZEr7HJ3ZYhkicLcfMaZckLjEr5Cy48dAJiE9
JNFV5cjYaZcKcUacDKoh4EDZwRX3kJDfnigUf5HRmRli3XVHNQEIsXaW7K4E4m3fizg==

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2023-10-18 11:21:33 | Firmante

OHi0IT9feKM44sISFis35jae8H5KuWMr2tlgWruFqzBCdex0t1Q+Uy6ZvXHoCq742cEcR6MG4x5PkejIIShjn7dL/WW+3LIQfwP3VNQZINajQSSi7Kut/qIIDEU6K8gdvS2Pmagg6HBnd
S5nNbjiXRquDA816MCOhl14jRjRcQNSYdy0pdUzQ5UySfniiymAW18R01RXjbcJ/pJOg4MFz8h3fBnKiEMaZu+PRr9c6PgwnbkbxATdviC1F1NxnKIPgXWDR3L3MOGEOVqws4JS
E9dcF81qinU4Zr0DcMDNUjnsQQnsVTA8+FzxdTGS85SwwSX0NeyvXNgiNIHeD3u0g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



cfMnz5GEI

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mKCWIER1F4opoiailNtjS26S2DIB49xx>

