UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Análisis estructural y funcional de la isoforma del177 del transportador de CMP-ácido siálico en mamíferos

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BRENDA INGRID VELÁZQUEZ DODGE

DIRECTOR: DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN

CUERNAVACA, MORELOS MAYO 2025

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Análisis estructural y funcional de la isoforma del177 del transportador de CMP-ácido siálico en mamíferos

TESIS QUE PRESENTA:

Brenda Ingrid Velázquez Dodge

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Director de Tesis:

Dra. Roberta Salinas Marín

Sinodales:

Dra. Roberta Salinas Marín
Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez
Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

Publicaciones:

Structure-Function Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform
Brenda I. Velázquez-Dodge, Marco A. Ramírez-Martínez et al.
ACS Omega, 12 2024
https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466

Velázquez Dodge, Brenda Ingrid y Salinas Marín, Roberta (2025, marzo-abril). Carbohidratos: ¿defensores o cómplices de los virus? *Revista Digital Universitaria* (*rdu*), 26(2). http://doi.org/10.22201/ceide.16076079e.2025.26.2.6

Los azúcares y el COVID-19 num 62. Revistahypatia.org. Retrieved February 16 2022, https://revistahypatia.morelos.gob.mx/2020/05/07/hypatia-num-64/

RESUMEN

La sialilación es una modificación postraduccional esencial para el correcto funcionamiento celular, mediada por diferentes tipos de sialiltranferasas y el transportador de ácido siálico CMP (CST). En humanos, el CST (hCST) está codificado por el gen *SLC35A1* y presenta múltiples isoformas, incluida la variante del177, que carece de 59 aminoácidos. Este estudio investiga las características estructurales y funcionales de la isoforma del177 tanto en humano como en hámster.

Se realizaron mutaciones puntuales en la variante del177 de hámster (del177-haCST) y se evaluó su impacto funcional utilizando ensayos de resistencia a la lectina RCA-I, donde se midió su proliferación mediante un ensayo de MTT y su glicofenotipo mediante citometría de flujo usando una tinción con la lectina SNA. Nuestros resultados revelaron que la mutación p. Ala26Val, p. Cys263Ser y la Ins-Gly267 restauraron parcialmente la sialilación en la variante del177-haCST. Estos resultados sugieren que estos residuos de aminoácidos desempeñan un papel crítico en la función del transportador.

Además, exploramos una variante patogénica (NM_006416.5) la cual presenta una mutación c.303C>T en la isoforma silvestre ($hCST^{wt}$) y observamos una reducción significativa de su impacto en la variante del177-$hCST^{Q101H}$. Un modelo por homología basado en estructuras cristalinas de ratón y maíz previamente descritas permitió comprender mejor los mecanismos subyacentes mediante el análisis de la interacción de los residuos del CST con el CMP-Sia. De estos análisis se derivó el manuscrito titulado “Structure-function relationships of the CMP-sialic acid transporter through analysis of a pathogenic variant in an alternatively spliced functional isoform”.

Nuestra investigación contribuye a una comprensión más profunda de la dinámica estructural y funcional de las isoformas del177 del CST.

ABSTRACT

Sialylation is a posttranslational modification essential for proper cellular function, mediated by different types of sialyltransferases and the CMP sialic acid transporter (CST). In humans, CST (hCST) is encoded by the SLC35A1 gene and has multiple isoforms, including the del177 variant, which lacks 59 amino acids. This study investigates the structural and functional characteristics of the del177 isoform in both human and hamster.

We performed point mutations in the hamster del177 variant (del177-haCST). We assessed their functional impact using RCA-I lectin resistance assays, where their proliferation was measured by MTT assay and their glycophenotype by flow cytometry using SNA lectin staining. Our results revealed that the p. Ala26Val, p. Cys263Ser mutation and Ins-Gly267 insertion partially restored sialylation in the del177-haCST variant. These results suggest that these amino acid residues play a critical role in transporter function.

In addition, we explored a pathogenic variant (NM_006416.5) which has a c.303C>T mutation in the wild-type isoform (hCSTwt) and observed a significant reduction of its impact on the del177-hCST^{Q101H} variant. A homology model based on previously described mouse and maize crystal structures provided further insight into the underlying mechanisms by analyzing the interaction of CST residues with CMP-Sia. The manuscript entitled “Structure-function relationships of the CMP-sialic acid transporter through analysis of a pathogenic variant in an alternatively spliced functional isoform” was derived from these analyses.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Glicobiología

Humana y Diagnóstico Molecular del Centro de Investigación en Dinámica Celular

de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección de la Dra. Roberta Salinas Marín con soporte económico del proyecto C.B. CONHACYT A1-S-27518.

Se da el reconocimiento y agradecimiento por su apoyo técnico en técnicas de Biología Celular y Molecular a:

Biól. Ana María Gonzáles Jaimes, CIDC, UAEM

Biól. Maricela Olvera Rodríguez, IBT, UNAM

Dra. Mabel Rodríguez González, IBT, UNAM

INDICE

RESUMEN *2*

ABSTRACT *3*

AGRADECIMIENTOS *4*

TABLA DE ABREVIATURAS *8*

LISTA DE TABLAS *9*

LISTA DE FIGURAS *9*

1. INTRODUCCIÓN *10*

1.2. Transportadores de Nucleótido-Carbohidrato (NST's) **11**

2. MARCO TEÓRICO *13*

2.1. Transportador CMP-Sia (CST) **13**

2.2. Estructura de CST y sus diferentes isoformas **13**

2.3. CDG´s provenientes de mutaciones puntuales **18**

3. JUSTIFICACIÓN *20*

3.1. Primera parte: **21**

3.2. Segunda parte: **21**

4. HIPÓTESIS *22*

4.1. Objetivo general **22**

4.2. Objetivos particulares. **22**

5. METODOLOGÍA *23*

5.1. Esquema metodológico **26**

5.2. Análisis de las secuencias filogenéticas 27

5.3. Árbol filogenético de la posición 326 del CST 27

5.4. Modelado por homología 27

5.5. Grafting molecular 28

5.6. Clonación de la isoforma del177 de hámster y humano en el vector TOPO 3.3 TA 29

5.8. Mutagénesis 31

5.9. Validación de las células HEK293T^{KO} 32

5.10. Transfección de células HEK293T^{KO} 34

5.11. Inmuno-tinción del CST en células HEK293T *wt* y KO y análisis mediante citometría de flujo 35

5.12. Tinción con lectinas PNA y SNA en células HEK293T *wt* y KO 35

6. RESULTADOS 36

6.1. Caracterización de las células HEK293T^{KO} 36

6.2. Análisis de los residuos de aminoácidos importantes para el funcionamiento de la isoforma del177 40

6.3. Análisis de los modelos del transportador de CMP-Sia de hámster vs humano 44

6.4. Generación de las construcciones Ala26Val, Cys263Ser y G267 y prueba de funcionalidad. 48

6.5. Cambios morfológicos en el aparato de Golgi y localización del hCST 51

6.6. Análisis de la mutante haCST p. Ala26Val 54

7. DISCUSIÓN 56

8. CONCLUSIÓN 58

8.1. Influencia estructural de mutaciones en la funcionalidad del CST. 58

8.2. Implicaciones de la mutación ins-G267 en la retención de Golgi y el patrón de sialilación 58

8.3. Relación entre estructura tridimensional y funcionalidad del CST 58

8.4. Importancia de considerar variabilidad entre especies en el estudio de isoformas del CST 59

9. PERSPECTIVAS 60

10. BIBLIOGRAFÍA 61

11. ANEXOS 70

11.1. Secuenciación de las mutantes Ins-G267 y A26V 70

11.2. Análisis de la unión de PNA de la mutante G267 en células HEK293T^{KO} comparada con células L10 y HEK293T^{del177} 71

11.3. Comparación del estrés de Golgi mediante BFA vs un CST no funcional 74

11.4. Actividades académicas 75

TABLA DE ABREVIATURAS

Palabra	Abreviatura
Ácido ribonucleico	ARN
Acido siálico	Sia
Aglutinina de *Ricinus communis*	RCA-I
Albúmina de Suero Bovino	BSA
Anclas de glicosilfosfatidilinositol	Anclas de GPI
Buffer salino de fosfatos	¨PBS
Citidín-5'-monofosfato	CMP
Desorden congénito de la glicosilación	CDG
Dominio transmembrana del inglés *trabsmembrane domain*	TMD
Estreptavidina	STV
Silenciamiento en inglés *Knock Out*	KO
Medio Eagle modificado de Dulbecco	DMEM
Pares de bases	Pb
Peanut agglutinin	PNA
Retículo endoplasmático	RE
Revoluciones por minuto	rpm
Sambucus nigra	SNA
Sin teñir	ST
Suero bovino fetal	SBF
Transportador de CMP-Sia	CST
Transportadores acarreadores de solutos	SLC
Transportadores de nucleótido-carbohidrato	NST
Uridin 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa	UGT
Uridin- difosfato- galactosa	UDP-Gal
Wild-Type (silvestre)	*wt*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de NST's y sus sustratos específicos 12

Tabla 2. Residuos de aminoácidos del mCST involucrados en la interacción del CMP-Sia 16

Tabla 3. Parámetros de validación de los modelos 3D teóricos de las isoformas del177 y wt de hámster. 28

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la clonación del SLC35A1 en el vector TOPO 3.3 TA 30

Tabla 5. Condiciones de amplificación para las mutagénesis utilizando la Taq polimerasa phusion 32

Tabla 6. Oligonucleótidos para las diferentes mutagénesis 32

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para analizar molecularmente las células HEK293T wt y KO del SLC35A1 33

Tabbla 8. Reacción de PCR y termociclaje utilizando el templado de ADNc de las células HEK293T wt y KO 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Glicosilación: 11

Figura 2. Isoformas de splicing reportadas del SLC35A1 14

Figura 3. Representación de la topología y funcionalidad del CST. 18

Figura 4. Caracterización de las células HEK293T 38

Figura 5. Glicofenotipo de las células HEK293T wild type y KO 39

Figura 6. Expresión del CST en células HEK293T wt y KO 40

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la isoforma del177 del hCST y haCST 42

Figura 8. Análisis filogenético de la pérdida de la Gly326 en el CST 43

Figura 9. Comparación de los modelos haCST wt y del177 y hCST del177 45

Figura 10. Análisis de las interacciones entre la isoforma del177 y wt del haCST 47

Figura 11. Análisis de la unión de SNA las diferentes mutantes la isoforma del177 del ha-CST 49

Figura 12. Comparación de la resistencia a RCA I de las construcciones mediante ensayo de MTT 51

Figura 13. Organización del aparato de Golgi en células transfectadas con diferentes construcciones 53

Figura 14. Análisis estructural de la mutante p. Ala26Val del haCST del177 55

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glicosilación

Los carbohidratos, también conocidos como glicanos, son biomoléculas compuestas principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno (fórmula general $(CH_2O)_n$). Estas moléculas presentan un grupo aldehído (aldosas) o uno cetona (cetosas) y dos o más grupos alcohol; se clasifican según su complejidad en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, siendo los monosacáridos los menos complejos.[1]

En los organismos vivos existe un proceso llamado glicosilación, el cual consiste en la unión covalente de un glicano a otras biomoléculas, como proteínas, lípidos, ARN, nucleótidos o incluso a otro glicano. Esto da origen a los glicoconjugados, que incluyen glicoproteínas, glicolípidos, anclas de GPI, proteoglicanos, glicoARN, nucleótidos carbohidrato, entre otros (figura 1).[1–3] La glicosilación tiene lugar principalmente en el Retículo Endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi, ya que se requieren elementos específicos presentes en estos organelos para catalizar la unión covalente.

Entre estos elementos destacan las glicosiltransferasas, enzimas encargadas de catalizar la unión covalente entre los carbohidratos y otras biomoléculas. También son fundamentales los nucleótidos-carbohidrato, que actúan como sustratos donadores de glicano y son transportados al RE o al aparato de Golgi por los transportadores de nucleótido-azúcar (NST's).[4–6]

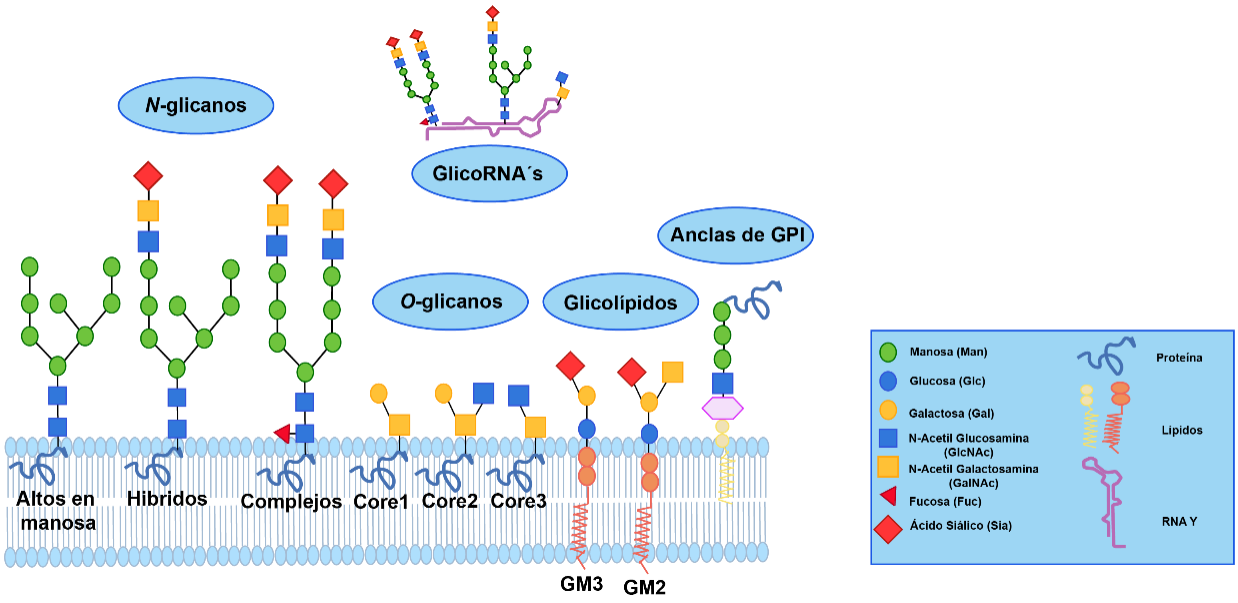


Figura 1. *Glicosilación: diversos tipos de glicoconjugados mediante la union covalente entre un glicano y una biomolécula. Este proceso, fundamental para la funcionalidad biológica, da origen a una amplia gama de glicoconjugados, tales como glicoproteínas, glicolípidos, anclas de GPI, proteoglicanos, glicoARN, nucleótidos carbohidrato, entre otros.*

1.2. Transportadores de Nucleótido-Carbohidrato (NST's)

Los NST's, integrantes de la familia de transportadores acarreadores de solutos (SLC), son proteínas hidrofóbicas con entre 37.4 kDa y 44 kDa. Funcionan como antiportadores, para facilitar el transporte bidireccional de nucleótidos-carbohidratos desde el citosol hasta el lumen del RE o el Golgi y nucleótidos hacia el citosol.[7–10] Los NST´s son proteínas de membrana tipo III que poseen de seis a diez dominios transmembranales (TMD's), con sus extremos -C y -N terminal generalmente orientados hacia el citosol.[7,11–13]

En mamíferos existe una diversidad de NST's, cada uno especializado en el transporte específico de los diferentes nucleótidos-carbohidratos (tabla 1).[14–24] La activación de los nucleótidos-carbohidratos, mediante la unión del carbohidrato con su nucleótido específico, ocurre en el citosol, con la excepción del CMP-Sia, que se sintetiza en el citosol y se activa en el núcleo. Posteriormente, con la asistencia del transportador de CMP-Sia (CST), se

internaliza en el Golgi. Este intrincado proceso refleja la especialización y la complejidad de los mecanismos de transporte celular de los nucleótidos-carbohidratos.[25]

Tabla 1. *Tipos de NST's y sus sustratos específicos*

Nombre del NST	Sustrato	Gen	Localización
Transportador CMP-Sia (CST)	CMP-Sia	SLC35A1	Golgi
Transportador UDP-Gal (UGT)	UDP-Gal, UDP-GlcNAc	SLC35A2	RE/Golgi
Transportador UDP-GalNAc (UGTrel2)	UDP-GalNAc	SLC35A3	RE/Golgi
Transportador UDP-azúcar (MGC2541)	UDP-Ribitol, UDP-Gal	SLC35A4	Golgi
Transportador GDP-Fuc (FUCT1)	GDP-Fucosa	SLC35C1	Golgi
UGTrel7	UDP-ácido glucurónico, UDP-GalNAc	SLC35D1	RE
Transportador UDP-GalNAc, UDP-Glu, GDP-Man (UGTrel8)	UDP-GalNAc, UDP-Glc, GDP-Man	SLC35D2	Golgi
Transportador UDP-GlcA (UGTrel9)	UDP-ácido glucurónico	SLC35E1	RE
Transportador UDP-GlcNAc (UGTrel10)	UDP-GlcNAc	SLC35E2	Golgi
Transportador UDP-GalNAc (UGTrel11)	UDP-GalNAc	SLC35E3	Golgi

Esta tabla resume distintos tipos de NST's, detallando sus sustratos específicos, los genes asociados y sus localizaciones celulares predominantes. La diversidad en las especificidades de transporte refleja la complejidad y la especialización de estos transportadores en los procesos de glicosilación dentro de la célula.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Transportador CMP-Sia (CST)

El CST, localizado en los compartimentos de medial-trans-Golgi, desempeña un papel crucial en la internalización del CMP-ácido siálico desde el citosol hacia el lumen de Golgi.[26,27] Este transportador es el único miembro de la familia NST que transporta un nucleótido monofosfato (CMP). En 2019 se logró cristalizar la estructura del CST de ratón (mCST), el cual revela que sus residuos N- y C-terminales se orientan hacia la cara citosólica de Golgi, como lo había predicho Eckhardt.[24,28,29]

La propuesta estructura-función del mCST sugiere que forma homodímeros con una estructura conformacional similar durante el transporte de CMP y CMP-Sia, donde presenta dos regiones de reconocimiento del sustrato: una orientada hacia el citosol y otra hacia el lumen de Golgi. Se postula que la especificidad del sustrato se debe a una cavidad parcialmente ocluida que se abre solo al reconocer el nucleótido CMP. [29,30] El mCST, junto con el transportador de CMP-Sia de hámster (haCST), comparte un 91% de homología con el transportador de CMP-Sia humano (hCST), sugiriendo una función similar.[29,30] El hCST, con 337 aminoácidos y 10 dominios transmembranales (TMD's), es codificado por el gen SLC35A1, que consta de 8 exones y se encuentra en el cromosoma 6.[31–33]

2.2. Estructura de CST y sus diferentes isoformas

En el 2005 se identificó la primera enfermedad congénita de la glicosilación asociada a mutaciones en el gen SLC35A1 que codifica para el transportador de CMP- ácido siálico humano (SLC35A1-CDG). En este mismo trabajo se identificaron diferentes isoformas de *splicing* del SLC35A1 (figura 2). La isoforma del *splicing* denominada del177 es la única isoforma que conserva el residuo carboxilo terminal reportado como esencial para la localización del CST en Golgi de manera similar a la isoforma silvestre (*wt*).[34]

En 2016 nuestro grupo de investigación determinó que la isoforma del177 del hCST (278 aa) es funcional a pesar de la pérdida de 59 aa codificados por 177 pb del exón 6.[35] En contraste, la isoforma del177 (del177-haCST) identificada en células Lec2, mutantes derivadas de células de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), no es funcional, a pesar de contar con 277 aa y la región COOH terminal considerada importante para la localización y retención en Golgi. .[35,36]

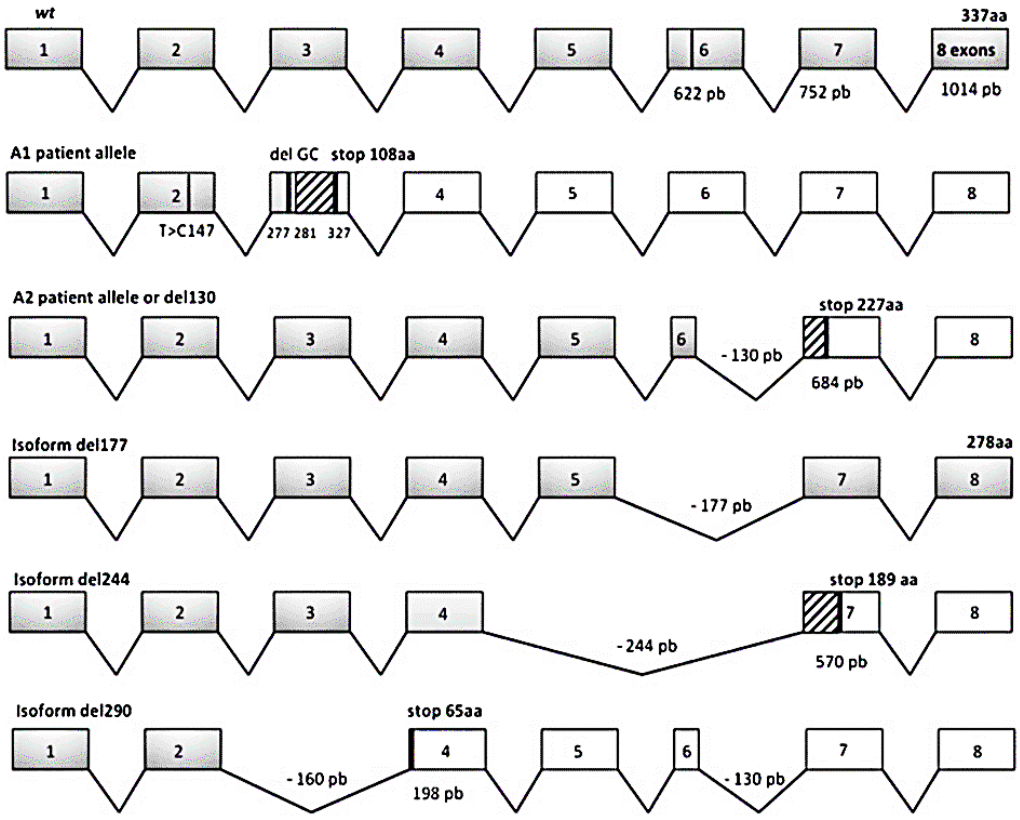


Figura 2. *Isoformas de splicing reportadas del SLC35A1: La isoforma wt del SLC35A1 presenta 8 exones que codifican un producto proteico de 337 aa. El paciente con SLC35A1-CDG descrito por primera vez en 2005 presentó en el alelo A1 una sustitución en la posición 147 T>C y 2 microdeleciones (G277 y C281) que generaron un cambio en el marco abierto de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro en la posición 327 y en el alelo A2 la eliminación de 130 pb (del130) que cubre dos tercios del exón 6 y genera un desplazamiento del marco abierto de lectura y un codón de paro prematuro en la posición 684. La isoforma del177 (278 aa) presenta eliminación completa del exón 6, la isoforma del244 (189 aa) presenta una eliminación en el exón 5 y 6 y la isoforma del290 (65 aa) del exón 3 y una parcial de 130 pb del exón 6.*

Estudios posteriores han intentado identificar y proponer el mecanismo funcional de la isoforma del177-hCST. Hadley et.al en 2019 propuso un modelo por homología del cristal del transportador de GDP-Manosa (Vrg-4) de levadura que presenta un 13.6% de homología con el hCST.[28,37,38] Esta propuesta sugiere que la única diferencia conformacional significativa entre la isoforma del177-haCST y de la del177-hCST es el residuo de Tyr^{207}, proponiendo que este residuo se encuentra en la parte interna de la estructura de la isoforma del177-hCST, mientras que en el modelo de la isoforma del177-haCST este residuo se encuentra orientado en la parte externa de la estructura. Además, se propone que la Tyr^{207} en realidad está sustituyendo a la Tyr^{214} que se recorre en posición cuando se pierden los 59 aa.[28]

El residuo de Tyr^{214} en el modelo de Eckhardt y en la estructura cristalográfica del mCST se ha reportado como esencial para el reconocimiento del sustrato CMP-Sia. Además de este residuo, en ratón se han reportado otros aminoácidos importantes en la interacción del CST con el CMP-Sia (tabla 2) y de acuerdo con el modelo cristalográfico del mCST el mantenimiento de la cavidad parcialmente ocluida es esencial para que el CMP-Sia pueda interactuar correctamente con el mCST. Los dominios que participan directamente en la formación de esta cavidad son el TMD1 y el TMD9.[24,28,31]

***Tabla 2**. Residuos de aminoácidos del mCST involucrados en la interacción del CMP-Sia*

Dominio TM	Numero de residuo	Aminoácido	Cavidad
TM2	52	Glu	Núcleo-base
TM2	55	Lys	
TM7	210	Asn	
TM7	214	Tyr	
TM3	101	Gln	Medio
TM3	102	Asn	
TM8	260	Thr	
TM4	188	Ser	Azúcar
TM4	124	Lys	
TM6	128	Thr	
TM9	272	Lys	
TM1	20	Met	Estructurales
TM1	24	Ala	
TM1	27	Tyr	
TM8	253	Ala	
TM8	257	Gly	
TM8	261	Ser	

Resume los residuos de aminoácidos del mCST que desempeñan un papel crucial en la interacción con el CMP-Sia. La Tirosina en la posición 214 se identifica como esencial para el reconocimiento del sustrato, mientras que otros aminoácidos cruciales participan en la interacción con el CMP-Sia. Además, los dominios transmembranales (TMD1 y TMD9) contribuyen significativamente a la formación de la cavidad parcialmente ocluida, esencial para la correcta interacción con el CMP-Sia.[24,29,39]

Debido a que la cavidad ocluida del CST es pequeña y a los cambios estructurales que ésta presenta al interaccionar con el CMP y CMP-Sia, existía la hipótesis que era específica para estos dos sustratos, teniendo mayor afinidad por el CMP.[29,40] Sin embargo, un estudio reciente donde se utilizó CMP-ribitol como sustrato del CST permitió confirmar que el CST

puede transportar otras moléculas pequeñas como el CDP-ribitol, siempre y cuando estén unidas a un grupo citidin.[41]

Por estos motivos, el funcionamiento de la cavidad de unión del CST con el CMP-Sia se replanteó utilizando como modelo de comparación el transportador de UDP-Gal también conocido como UGT (*UDP-Galactose Transporter*) o SLC35A2. Se realizaron mutaciones especificas en la cavidad de unión de ambos transportadores (CST y UGT) y al compararse se propuso que el CST está conformado por 3 cavidades pequeñas, cada una encargada de reconocer una parte especifica de su sustrato. Estas secciones son: la cavidad nucleotídica, que reconoce al citidín, la cavidad media que reconoce a la unión del fosfato del nucleótido mono fosfatado del azúcar y la cavidad de reconocimiento del azúcar. De estas cavidades propuestas, la cavidad nucleotídica es el primer contacto de la proteína CST con el sustrato para que las demás cavidades puedan modificarse y permitir la internalización del CMP-Sia (figura 3).[39]

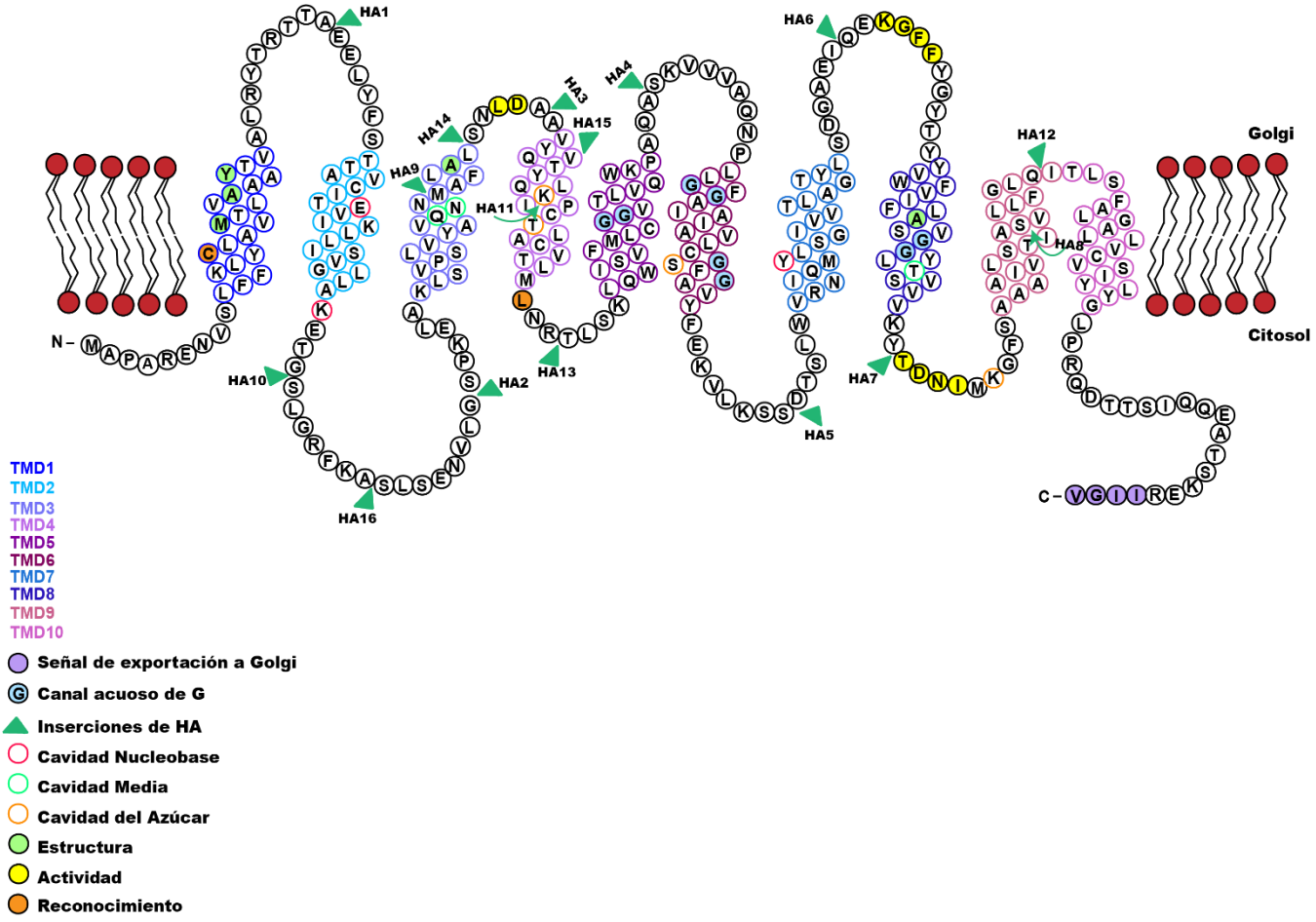


Figura 3. *Representación de la topología y funcionalidad del CST. Se muestra en diferentes círculos de colores los TMDs del transportador. El TMD1(azul), TMD2 (azul aqua), TMD3 (lila), TMD4 (violeta claro) TMD5 (violeta oscuro) TMD6 (magenta) TMD7 (indigo), TMD8 (morado) TMD9 (coral) y el TMD10 (rosa). En el extremo carboxilo terminal se muestra la señal de exportación y retención el Golgi (morado claro). Los triángulos verdes muestran los diferentes sitios donde se realizaron inserciones de HA. En círculos remarcados de diferente color se observan los aa pertenecientes a las diferentes cavidades de reconocimiento núcleo base (círculo rojo), cavidad media (verde), cavidad del azúcar (naranja), los residuos de aminoácidos importantes para generar el cambio conformacional para la apertura de las cavidades se muestran en los círculos con relleno verde, los que son esenciales para la actividad (relleno amarillo) y reconocimiento (relleno naranja), pero no participan en las cavidades de unión. (figura modificada de Eckhardt, et.al. (1999) y Maggioni, Martinez-Duncker, et.al. (2013).*

2.3. CDG´s provenientes de mutaciones puntuales

Además de los CDG provenientes de diversas isoformas no funcionales del CST, se han identificado mutaciones puntuales y deleciones en la isoforma silvestre (*wt*) del CST que conducen a trastornos congénitos de la glicosilación de tipo 2F (CDG IIf). Estas mutaciones resultan en la inactivación total o parcial del CST. Ejemplos de estas mutaciones incluyen la mutación compuesta heterocigota p. Thr156Arg (c.467C>G) (NM_006416.5: c.467C>G)

y p. Glu196Lys (c.586G>A) (NM_006416.5: c.586G>A), así como la mutación homocigota p. Ser147Pro (c.439T>C) (NM_006416.5) y la mutación homocigota p. Gln101His (c.330G>C) (NM_006416.5). [42–44]

Se documentó un caso en el que un paciente presentó la mutación homocigota p. Gln101His (c.330G>C) en el TDM3 (NM_006416.5), el cual manifestó un desarrollo psicomotor tardío en la infancia, problemas de comportamiento, microcefalia, rasgos faciales dismórficos, reducción de factores de coagulación y fallecimiento a los 22 años debido a insuficiencia respiratoria. Aunque la variante SLC35A1 (NM_006416.5) se localizó de manera normal en el Golgi sin retención en el retículo endoplásmico, se observó una reducción del 50% en la actividad del transporte de CMP-Sia. Esto resultó en una disminución de la sialilación y un defecto combinado en la N- y la O-glicosilación de tipo mucina, especialmente en el alfa-distroglicano.[45,46]

Basándose en estos hallazgos, se sugiere que el SLC35A1-CDG representa un trastorno combinado con distrofia muscular-distroglicanopatía. Además, se llevaron a cabo estudios que revelaron que la transfección de la variante patogénica SLC35A1 NM_006416.5 en células HEK293T deficientes en la expresión del SLC35A1 pudo restaurar parcialmente la sialilación, pero no logró restablecer la deficiencia en la O-mannosilación. En cambio, esta variante logró rescatar preferentemente los O-glicanos en las células, con una corrección parcial del defecto de sialilación en los N-glicanos. [47]

La incertidumbre sobre cómo la pérdida completa del exón 6 no afecta la funcionalidad del hCST, pero sí impacta en el haCST, así como la falta de comprensión sobre cómo una mutación puntual en un aminoácido puede resultar en la pérdida parcial o total de la funcionalidad del CST, subraya la complejidad de estos procesos biológicos. En este

contexto, es imperativo adoptar un enfoque más amplio que priorice la investigación detallada de la estructura del transportador de CMP-Sia. La relación directa entre la arquitectura molecular de este transportador y su papel en el transporte de CMP-Sia no solo establece las bases para una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes de la glicosilación, sino que también abre perspectivas valiosas para la investigación de trastornos vinculados a este proceso fundamental. En última instancia, el desentrañar estos aspectos contribuirá significativamente a llenar los vacíos en nuestro conocimiento y a avanzar hacia posibles intervenciones terapéuticas más precisas y efectivas.

3. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la estructura-función del hCST ha cobrado relevancia con la identificación de mutaciones puntuales asociadas a enfermedades congénitas de la glicosilación, como el SLC35A1-CDG. Sin embargo, todavía carecemos de un modelo teórico o cristalográfico que permita comprender con precisión el mecanismo de transporte del sustrato CMP-ácido siálico. Esta laguna de conocimiento se hace aún más evidente al intentar explicar por qué la isoforma del177-hCST mantiene su funcionalidad tras la pérdida de 59 aminoácidos, mientras que la isoforma del177-haCST se reporta como no funcional.

Abordar esta incertidumbre es crucial no solo desde una perspectiva académica, sino también para el desarrollo de terapias dirigidas a los CDG. La falta de un modelo explicativo limita nuestra capacidad para diseñar intervenciones terapéuticas precisas. Además, considerando que solo el 1% de las proteínas de membrana cuentan con estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) (https://www.rcsb.org/), establecer un modelo para la isoforma del177-hCST representaría un avance significativo en el análisis de proteínas de membrana en general.

Para abordar estos desafíos, este trabajo de investigación se dividió en dos partes:

3.1. Primera parte:

En esta fase, que dio lugar al artículo Structure-Function Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform, desarrollamos un modelo teórico de la relación estructura-función de las isoformas wt-hCST y del177-hCST. También analizamos cómo la isoforma del177-hCST, al modificarse con la variante patogénica c.303G>C (p.Q101H; NM_006416.5), mantiene su funcionalidad, a diferencia de la isoforma *wt*, que pierde actividad bajo esta modificación.

3.2. Segunda parte:

En esta etapa identificamos los residuos de aminoácidos clave para la funcionalidad del CST. Utilizando técnicas de mutagénesis sitio-específica, buscamos confirmar la posibilidad de restaurar la funcionalidad de la isoforma del177-haCST, mediante la modificación controlada de estos residuos.

Este enfoque nos permitió ampliar nuestra comprensión sobre la estructura-función del CST. Además, que nos permitió proponer el uso del CST para su aplicación directa en la regulación de patrones de sialilación en la industria, así como en el desarrollo de nuevas vías terapéuticas para atender enfermedades relacionadas con desregulaciones en la glicosilación.

4. HIPÓTESIS

Se postula que los residuos de aminoácidos Val^{26}, pertenecientes al TMD1, y la Ser^{263} y Gly^{267}, pertenecientes al TMD9 de la isoforma del177-CST, podrían desempeñar un papel crucial en la apertura de la cavidad de reconocimiento del CST y, en consecuencia, restaurar la funcionalidad de la isoforma del177 del CST de hámster (del177-haCST). Estas adaptaciones estructurales podrían ser determinantes para entender la singularidad funcional de la isoforma del177 y su capacidad para mantener la funcionalidad en presencia de mutaciones específicas, como la Gln101His.

4.1. Objetivo general.

Evaluar y comparar el reconocimiento del CMP-Sia en el CST entre la isoforma wt p. Gln101His y la isoforma del177 p. Gln101His. Asimismo, investigar el impacto de las mutaciones puntuales p. Ala26Val, p. Cys263Ser y la inserción de una p. Gly267 (Ins-Gly267) en la funcionalidad de la isoforma del177-haCST.

4.2. Objetivos particulares.

- Generar la mutación p. Gln101His en la isoforma *wt* y del177 de humano.

- Analizar y comparar el impacto en la sialilación de la mutación p. Gln101His en las isoformas *wt* y del177 de humano en un modelo mutante del SLC35A1 mediante citometría de flujo, ensayo de MTT y microscopia confocal.

- Análisis preliminar de los residuos de aminoácidos implicados en el reconocimiento del CMP-Sia y de los aminoácidos fisicoquímicamente diferentes en los TMD´s 1 y

9 de la isoforma del177 humana (del177-hCST) con respecto a la isoforma del177 de hámster (del177-haCST), mediante modelado por homología y *grafting* molecular.

- Generar los cambios estructurales de aminoácidos p. Ala26Val, p. Cys263Ser y la Ins-Gly267 que permitan obtener una isoforma del177 de hámster funcional.

- Determinar el efecto funcional de las mutaciones puntuales realizadas en la isoforma del177-haCST mediante el uso de lectinas y citometría de flujo en un modelo mutante del SLC35A1 que permita determinar si los cambios estructurales realizados en la isoforma del177 de hámster inducen su funcionalidad.

- Corroborar que los cambios de aminoácidos p. Ala26Val, p. Cys263Ser y la Ins-Gly267 restablecen la funcionalidad de la isoforma del177-haCST mediante un modelo por homología.

5. METODOLOGÍA

A partir de este punto, nos enfocaremos únicamente en la parte 2 del proyecto de investigación, esto debido a que la parte 1 se aborda ampliamente en el artículo "Structure-Function Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform"[48] adjuntado en el apartado de anexos de esta tesis, sin embargo, se referenciaran algunos puntos para complementar información de la parte 2.

La metodología que se seguirá para cumplir con los objetivos particulares de la parte 2 se dividió en metodología teórica y metodología experimental, la cual se representa en el esquema metodológico y se describe a continuación.

1. Análisis preliminar de residuos de aminoácidos:

- Realizar modelado por homología para predecir la estructura tridimensional de las isoformas.
- Realizar *graffting* molecular para analizar la interacción de residuos con CMP-Sia.

2. Generación de cambios estructurales en la isoforma del177 de hámster (del177-haCST):

- Verificar mediante secuenciación que las construcciones contengan las mutaciones deseadas.
- Introducir las mutaciones p. Ala26Val, p. Cys263Ser y Ins-Gly267 en la isoforma del177 de hámster mediante un ensayo de transfección en células mutantes del SLC35A1.

3. Determinación del efecto funcional de las mutaciones:

- Utilizar lectinas para analizar el glicofenotipo de las células mutantes del SLC35A1 transfectadas con las diferentes construcciones mediante citometría de flujo.
- Realizar microscopia confocal para determinar la localización del CST en las células transfectadas con las diferentes construcciones y analizar la morfología de los organelos como Golgi y RE.

4. Confirmación de la restauración de la funcionalidad:

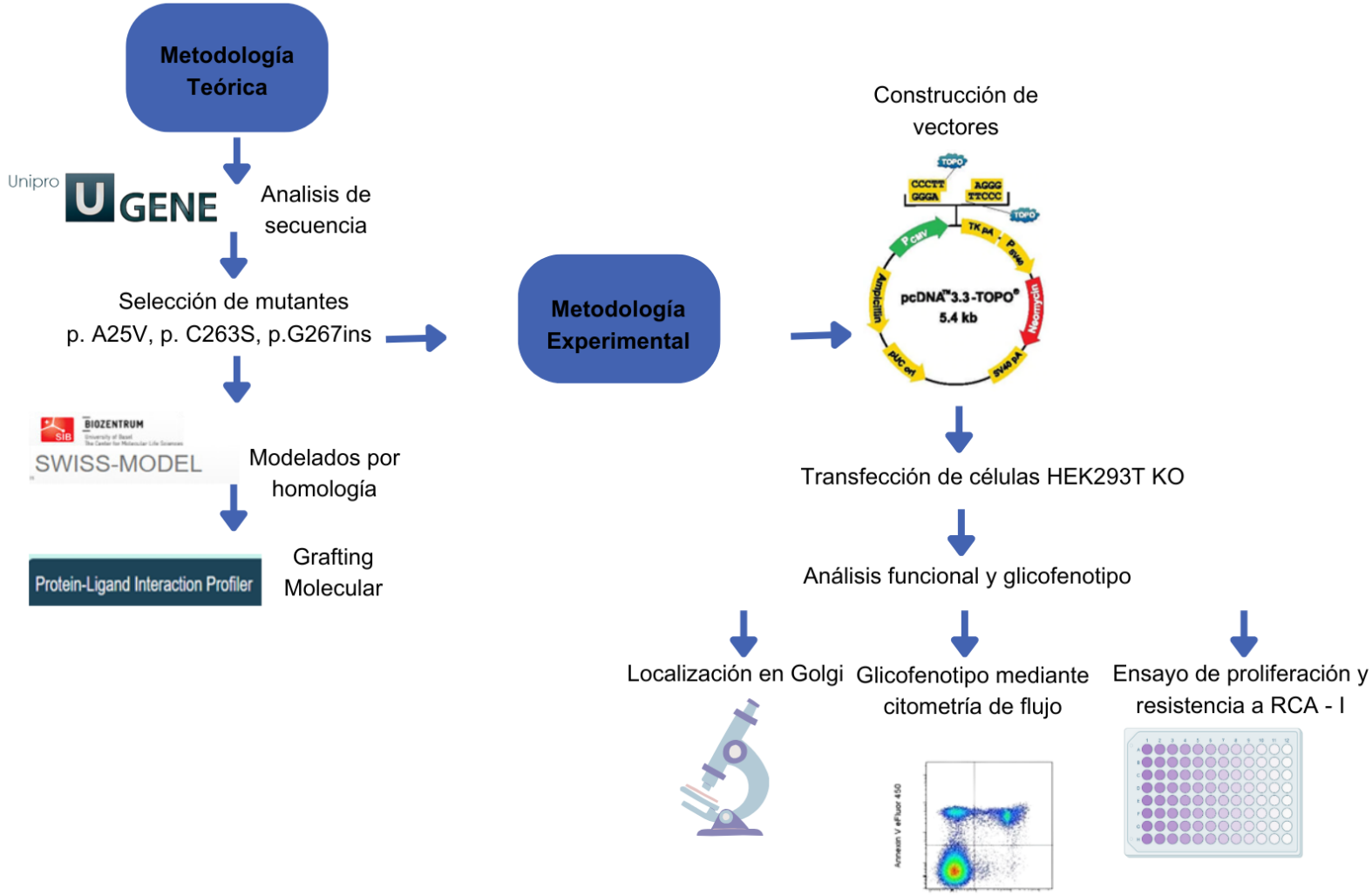
- Comparar la estructura de la isoforma mutada con la isoforma del177-hCST y del177-haCST

- Confirmar que los cambios estructurales de las mutaciones puntuales restauran la funcionalidad de la isoforma del177 del hsCST mediante análisis estructural.

5. Análisis de datos y conclusiones:

- Realizar análisis estadístico de los resultados obtenidos y obtener conclusiones precisas de como estos cambios en los residuos de aminoácidos modifican la funcionalidad y la estructura del del177-haCST.

5.1. Esquema metodológico



5.2. Análisis de las secuencias filogenéticas

Se descargó la secuencia del SLC35A1 humano (Gene ID: 10559) de la página NCBI GeneBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Posterior a esto se realizó un BLASTp y un BLASTn para identificar todas las secuencias homólogas, ajustando los parámetros a un Threshold de e-value: ≤ 1e-5 y un Porcentaje de identidad mínimo: 70%. [49,50] Se realizó un alineamiento de las secuencias que cumplían con los parámetros antes mencionados mediante el modelo de Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT); posteriormente se realizó la visualización del alineamiento en el software U-gene.[51,52]

5.3. Árbol filogenético de la posición 326 del CST

Se realizo un árbol filogenético para evaluar las características evolutivas del residuo de glicina en la posición 326 del CST con la herramienta Galaxy Phylogenetics mediante el método de Maximum Likelihood (ML).[53–55]

5.4. Modelado por homología

El modelo 3D teórico del transportador de CMP-Sia de hámster silvestre (haCST^{wt}) se generaron mediante el servidor *Swiss-Model* (https://swissmodel.expasy.org/),[56] utilizando como modelo la estructura PDB ID 6OH3[29]; los parámetros de validación de los modelos se muestran en la tabla 3. El modelo de la isoforma del177 de hámster (haCST^{del177}) se generar con el servidor AlphaFold 3 (https://alphafoldserver.com/)[57,58] sin usar ningún modelo, esto debido a que las estructuras generadas con otros servidores efectuaban demasiados choques e impedimentos estéricos con el CMP-Sia al acoplarlo como sustrato. Las gráficas y análisis de validación se realizaron mediante el servidor *procheck* (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/).

Tabla 3. Parámetros de validación de los modelos 3D teóricos de las isoformas del177 y wt de hámster.

Parámetros	***Validación***	***Modelo haCST^{WT}***	***Modelo haCST^{del177}***	***Modelo haCST^{A26V}***
QMEANDisCo Global	*Óptima calidad → ≥1*	*0.8 ± 0.05*	*0.7 ± 0.05*	*0.7 ± 0.05*
Ramachandran	*Óptima calidad → >90% en regiones favorecidas. Buena calidad → >75% regiones favorecidas*	*97.2%*	*94.9%*	*95.4%*
Chi1-Chi2	*<-3,00 → Conformaciones desfavorables (menores a 10)*	*0*	*2*	*0*
Propiedades de residuos	*score< 20*	*5.4*	*4.4*	*5.1*
Errat	*Óptima calidad → >95%* *Buena calidad → >91%*	*98.9%*	*96.5%*	*97.5%*

5.5. Grafting molecular

El análisis de la interacción del sustrato CMP-Sia con la isoforma silvestre y del177 de humano y la de hámster se realizó mediante un *grafting* molecular, donde se utilizó el CMP-Sia del cristal del mCST (6OH3) para acoplarlo a los modelos generados con ayuda de los *softwares* Chimera y Pymol,[59–62] posteriormente analizados mediante Protein plus (https://proteins.plus/).[63,64]

5.6. Clonación de la isoforma del177 de hámster y humano en el vector TOPO 3.3 TA

Los transcritos de las isoformas silvestre y del177-hCST ($hCST^{wt}$ y $hCST^{del177}$, respectivamente) fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos TRN-1s y TRN-6AS (tabla 4) mediante ADNc de células HepG2, mientras que para amplificar los de hámster ($haCST^{wt}$ y $haCST^{del177}$) se utilizaron los oligonucleótidos Ha-s y Ha-as (tabla 4) utilizando ADNc de células Lec2, el cual se sintetizo siguiendo el protocolo del kit ADNc RevertAid (#K1622, Thermo Fisher Scientific).

Las secuencias se clonaron en un vector pcDNA TOPO 3.3 TA siguiendo las instrucciones del kit (#K830001, Thermo Fisher Scientific). En un tubo de PCR de 200 µL se adicionaron 2 µL de producto de PCR, 1 µL de solución salina, y 1 µL de vector TOPO 3.3 TA a un volumen final de 6 µL. La reacción se incubó 5 min a TA (Temperatura Ambiente) y se adicionaron 2 µL de la mezcla a un vial de bacterias de la clona Match 1 (*Escherichia coli*) provenientes del kit pcDNA TOPO 3.3. El vial se incubó 30 min en hielo y posteriormente se colocó a 42 °C durante 30 segundos y finalmente en hielo 5 min más. Se adicionaron 250 µL de medio *Super Optimal Cell* (SOC) TA (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10mM de $MgCl_2$, 10mM de $MgSO_4$ y 20mM de glucosa) y las bacterias se incubaron 1 h a 200rpm, 37 °C.

Posteriormente, se tomaron 50 µL de medio con bacterias transformadas y se plaquearon en medio Lauria Bertani (LB) (1% peptona. 0.5% extracto de levadura, 1%NaCl y 1.5% de agar) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Se estriaron 20 colonias y fueron estriadas en una caja nueva con medio LB sin agar/100 µg/mL de ampicilina. De cada colonia estriada se realizó PCR convencional con los oligonucleótidos correspondientes para determinar la presencia de los insertos *wt,* del177 en humano y del177 en hámster.

Las clonas donde se detectaron fueron denominadas W5 y D16, respectivamente en humano, mientras que en hámster se nombró L10 a la construcción con la isoforma del177.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la clonación del SLC35A1 en el vector TOPO 3.3 TA

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Característica	TM	Amplicon
TRN-2s	5´GAACCATGGCTGCCCCGAGAGAC 3´	Amplificación del gen SLC35A1 (humano)	60°C	1412/1235pb
NTR6AS	5´CCGGAACAA GAGAACAGTTAGTACAG 3´	Amplificación del gen SLC35A1 (humano)		
Ha-s	5´-CTCTGCACCATGGCTCAGGCGAG-3´	Amplificación del gen slc35a1 (hámster)	60°C	834/656pb
Ha-as	5´-AATCTCACACCAATGACTCTTTCT-3´	Amplificación del gen slc35a1 (hámster)		
Ha-as1	5'-AATCACACACCAATGACTCTTTCT-3	Amplificación del gen slc35a1 (hámster)	60°C	
CMV	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'	Forward vector TOPO 3.3 TA	60°C	4500pb
TK	5´-CTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3´	Anti-sentido vector TOPO 3.3 TA		

5.7. Purificación de los plásmidos TOPO 3.3 TA con las construccioes hCST^{wt}, haCST^{wt}, haCST^{del177}, hCST^{del177} y corroboración de direccionalidad del inserto

Las clonas de bacterias con inserto en la direccionalidad 5'-3' con respecto al promotor se purificaron por miniprep (#K0482, Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

Adicionalmente, se realizó una PCR del plásmido ya purificado con los oligonucleótidos CMV y TK (Tabla 4), específicos del vector TOPO 3.3 TA y un ensayo de restricción con la enzima Ava I (#ER0381, Thermo Fisher Scientific) para corroborar nuevamente el sentido

del inserto en los plásmidos. La digestión se realizó utilizando 2µL del buffer tango (Thermo Fisher Scientific) y 0.5 µg/µL del plásmido purificado en una reacción final de 20µL. La reacción se incubó a 37 ºC durante 3 h. La inactivación se realizó a 65 ºC durante 20 minutos. Para corroborar la secuencia las construcciones se enviaron a secuenciar mediante Sanger.

5.8. Mutagénesis

Para la reacción de PCR para lograr las diferentes mutagénesis se utilizó una enzima Taq polimerasa phusion de alta fidelidad (#F530S Thermo Fisher Scientific) con el termociclajemostrado en la tabla 5, usando los oligonucleótidos de la tabla 6. Posteriormente se hizo una purificación de banda con el kit GeneJET (#K0691 Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del kit. Esa banda purificada fue cuantificada y posteriormente con la enzima T4 ligasa (#EL0012 Thermo Fisher Scientific) se hizo una mezcla de reacción como se muestra en el protocolo del kit usando 15 ng de la banda purificada; se incubó 5 min a TA y 15 min a 4 °C para que se ligara. Después se hizo una transformación adicionando 5 µL de la mezcla de ligación a un vial de bacterias de la clona Match 1. El vial se incubó 30 min en hielo y posteriormente se colocó a 42 °C durante 30 seg y finalmente en hielo 5 min más. Se adicionaron 250 µL de medio SOC TA y las bacterias se incubaron 1 h a 200 rpm a 37 °C. Finalmente, se inocularon 100 µL de medio con bacterias transformadas en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina. Se cultivaron de 5 a 10 colonias, las cuales fueron inoculadas en medio LB liquido con 100 µg/mL y posteriormente purificadas mediante el kit midiprep (# K0482, Thermo Fisher Scientific), con el protocolo descrito anteriormente. Para corroborar las mutagénesis el plásmido purificado se envió a secuenciación de Sanger.

Tabla 5. Condiciones de amplificación para las mutagénesis utilizando la Taq polimerasa phusion

	25 ciclos				
Tiempo	**30 seg**	**10 seg**	**30 seg**	**5 min**	**10 min**
Temperatura	**98°**	**98°**	**TM**	**72°C**	**72°**

Tabla 6. Oligonucleótidos para las diferentes mutagénesis

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Característica	TM	Amplicon
G267 F	5´-TGCATTCAACAAGGAGAAGCAACTTCA-3´	Inserción G267	65°	7338
G267 R	5´-TTCTCCTTGAATGCAGGTAGTGTCTTG-3'	Inserción G267		
A26V F	5'- GGTGGCTGCAGTTTATACCGTAG-3´	Cambio A26V	70°	7335
A26V R	5'- AGAGTCATCACTGCCAAGCAGT -3´	Cambio A26V		
C263S F	5'- GACACTACCTCCATTCAACAA-3´	Cambio C263S	75°	7335
C263S R	5'- TTGCCTGGGTAACCCATAGAG -3´	Cambio C263S		

5.9. Validación de las células HEK293T^{KO}

Las células Hek293T silvestres (HEK293T^{WT}*)* y con el transportador de CMP-Sia silenciado (HEK293T^{KO}) fueron donadas por el grupo de trabajo de Antje Banning (University of Giessen, Faculty of Medicine, Giessen, Alemania). Se analizaron molecularmente mediante extracción de ARN con el protocolo de Trizoll^{TM} Reagent (#15596018, Thermo Fisher Scientific) a partir de un cultivo en placas de 24 pozos con un 80% de confluencia. Las muestras fueron congeladas a -80°C durante 24 h, se descongelaron y se les adicionó 200 µL de cloroformo, se agitaron manualmente y se incubaron 5 min a TA. Posteriormente se centrifugaron a 12000 x g a 4 °C durante 15 min. Se trasvasó la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL nuevo y se le agregaron 500 µL de isopropanol, se incubó durante 5 min. a TA y se centrifugaron a 12000 x g, a 4 °C durante 10 min. Después se decantó el isopropanol y se adicionó 1 mL de etanol al 75% a cada muestra y se centrifugaron a 12000 x g a 4 °C, 10 min. Las muestras se decantaron y se eliminó el etanol por completo. Por último, el *pellet*

de ARN se resuspendió en 10 µL de agua libre de nucleasas y se cuantificó en un Nano-espectrofotómetro IMPLEN.

La síntesis de ADN codificante (ADNc) se realizó utilizando como molde 2 µg del ARN total purificado. La transcripción inversa se llevó a cabo mediante el protocolo del kit M-MLV (#28025013, Invitrogen), utilizando 1µL de random-primer, 1µL de dNTPs 10 mM y 0.5 µL de la enzima M-MLV, con un termociclaje de 5 min a 65 °C, 60 min a 37 °C y 10 min a 75 °C.

El mix de la reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos TRN-2s, NTR-6as y β-actH-s, β-actH-as como control (tabla 7). El volumen final fue de 25 µL utilizando NH_4SO_4 10X, $MgCl_2$ 25 mM, dNTPs 10 µM, H_2O libre de nucleasas y la enzima Taq polimerasa (#EP0401, Thermo Fisher Scientific), siguiendo los volúmenes y el termociclaje de la tabla 8.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para analizar molecularmente las células HEK293T wt y KO del SLC35A1

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Característica	Tm	Amplicon
TRN 2s	5´GAACCATGGCTGCCCCGAGAGAC 3´	Amplificación del gen SLC35A1 (humano)	60°C	1412pb
NTR 6as	5´CCGGAACAA GAGAACAGTTAGTACAG 3´	Amplificación del gen SLC35A1 (humano)		
β-actH-s	5´GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATT 3´	Amplificación del gen β-actina(humano)	50°C	541pb
β-actH-as	5´AGACAGTCTCCACTCACCCAGGAAG 3´	Amplificación del gen β-actina(humano)		

Tabla 8. Reacción de PCR y termociclaje utilizando el templado de ADNc de las células HEK293T wt y KO

Reacción

Reactivo	Volumen
NH_4SO_4 10X	2.5 µL
$MgCl_2$ 25mM	2.5 µL
dNTPs 10µM	0.5 µL
H_2O	17.25 µL
Oligonucleótido sentido	0.5 µL
Oligonucleótido anti-sentido	0.5 µL
Taq polimerasa	0.25 µL
Templado (ADNc)	1µL

Termociclaje

Ciclos	1	35			1
Tiempo	1 min	1 min	1 min	1min	10 min
Temperatura	95 °C	94°C	60°C/50°C	72 °C	72°C
Etapa	Inicio	Desnaturalización	TM	Extensión	Final

5.10. Transfección de células HEK293T^{KO}

Las células fueron sembradas en una placa de 24 pozos con medio DMEM (#11012 Gibco™) 1% Penicilina-Estreptomicina-S/Glutamina (#15140148 Gibco™) y 10% Suero Bovino Fetal (SBF) (#16000044 Gibco™) a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2, hasta alcanzar un 60% de confluencia. Posteriormente se retiró ese medio y se le agregó 200µL de medio DMEM sin antibiótico y sin SFB, el cual fue incubado 12 min con el 2 µg del plásmido a transfectar y 3 µL de lipofectamina 2000 (#11668030 Invitrogen). Se dejó en condiciones normales de incubación por 4 h. Posteriormente se le agregaron 200 µL de medio DMEM sin antibiótico y 10% de SFB, manteniendo el cultivo durante 72 h. Una vez concluidas las 72 h se retiró ese medio y se agregó medio DMEM con 10% de SFB y 8µg/mL de geneticina G418 (#10131035 Gibco™), realizando un recambio cada 3 días de medio DMEM con geneticina hasta dar un total de 8 días. Posteriormente estas células se colectaron para futuros experimento

5.11. Inmuno-tinción del CST en células HEK293T *wt* y KO y análisis mediante citometría de flujo

Las células HEK293T^{WT} utilizadas como control y mutante *KO* se permeabilizaron con el kit Citofix/Cytoperm (#554714, BD), en donde las células fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en una placa de 96 pozos. Posteriormente se fijaron con 50 µL del buffer *fixed/permeabilized cells* durante 20 min a 4 °C; después las células fueron lavadas 2 veces con 250 µL del buffer *BD Perm/Wash* 1X. Las células fueron incubadas durante 30 min a 4 °C, con el anticuerpo anti-SLC35A1 (#ab230196, abcam) a una concentración de 0.05 µg/mL diluido con el buffer de lavado. Las células fueron lavadas nuevamente con 250 µL, 3 veces con el buffer *BD Perm/Wash* 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario Texas Red IgG (H+L) (#T-2767, Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 4 µg/mL en buffer *BD Perm/Wash* 1X durante 30 min a 4 °C cubriendo de la luz. Por ultimo las células fueron lavadas con el buffer *BD Perm/Wash* 1x, 3 veces y analizadas en un citómetro BD Acuri^{TM} C6 plus utilizando el gate Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC) de células HEK293T tanto *wt* y KO sin teñir, para posterior ajustar hacia el láser de Ex/Em 595/613 nm, el cual corresponde al espectro del anticuerpo Texas Red (H + L) para seleccionar el cuadrante positivo se tomó lo que estuviera delante de 10^3 logs en el eje de las X (Texas Red) con un conteo de 10000 eventos.

5.12. Tinción con lectinas PNA y SNA en células HEK293T *wt* y KO

Las células fueron lavadas con PBS 1X 2 veces y fijadas con parafolmaldehido al 4% (PFA) durante 20 min a 4 °C. Posteriormente las células fueron lavadas con 200µL de PBS 1X, 3 veces e incubadas en 50µL con las lectinas biotiniladas *Sambucus nigra* (SNA) y *Peanut agglutinin* (PNA) a una concentración de 0.3 µg/mL en medio DMEM durante 30 min a 4 °C. Las células fueron lavadas 3 veces con 200µL de PBS 1x suplementado con de 0.5% de

albúmina de suero bovino (BSA) e incubadas 30 min 4 °C con 0.66 µg/mL de estreptavidina (STV) en 50 µL con medio DMEM y sin exponer a la luz. Por ultimo las células fueron lavadas 3 veces con 200µL de PBS 1X 0.5% de BSA y analizadas en un citómetro en un citómetro BD Facs Canto utilizando el gate Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC) de células HEK293T tanto *wt* y KO sin teñir, para posterior ajustar hacia el láser de Em/Ex 590/617 nm, el cual corresponde al espectro de la STV biotinilada para seleccionar el cuadrante positivo se tomó lo que estuviera delante de 10^3 logs en el eje de las X (STV-Biot) con un conteo de 10000 eventos.

.

5.13. Análisis estadísticos

Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software GraphPrism 9.02 y la significancia estadística se determinó mediante la prueba de Brown-Forsythe y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando $p < 0,05$ como valor significativo. El porcentaje de las células HEK293T^{WT} y HEK293T^{KO} se utilizó como controles de tinción y no se tuvieron en cuenta en el análisis de comparaciones múltiples para determinar los niveles de significancia, se utilizó un n=3 de experimentos independientes. Para el ensayo MTT, se utilizó n = 3 con tres réplicas internas por experimento y un ANOVA Brown-Forsythe ANOVA y Tukey′s de comparaciones múltiples utilizando $p < 0,05$ como valor significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de las células HEK293T^{KO}

Las células HEK293T *wild type (wt)* y mutantes *(KO)* para el gen del transportador de CMP-Sia (SLC35A1) se analizaron mediante RT-PCR, donde se encontró que las células HEK293T^{KO} presentaban bandas de diferentes tamaños en pares de bases (pb), en comparación con las células HEK293T^{WT} (figura 4B). Esto podría deberse a que en la

generación de la mutante mediante CRISPR Cas9 se adicionó una Timina cuatro nucleótidos río arriba de la secuencia PAM, generando un cambio en el marco abierto de lectura, lo que puede dar lugar a diversas isoformas no funcionales (figura 4C). Para corroborar el genotipo de las bandas adicionales se purificó la banda de aproximadamente 1300p para su secuenciación por Sanger. El análisis cromatográfico de la secuencia indico que dicha banda correspondía al SLC35A1, pero no contaba con el exón 2 (figura suplementaria 1[48]) generando un genotipo similar al de las células Lec-2.

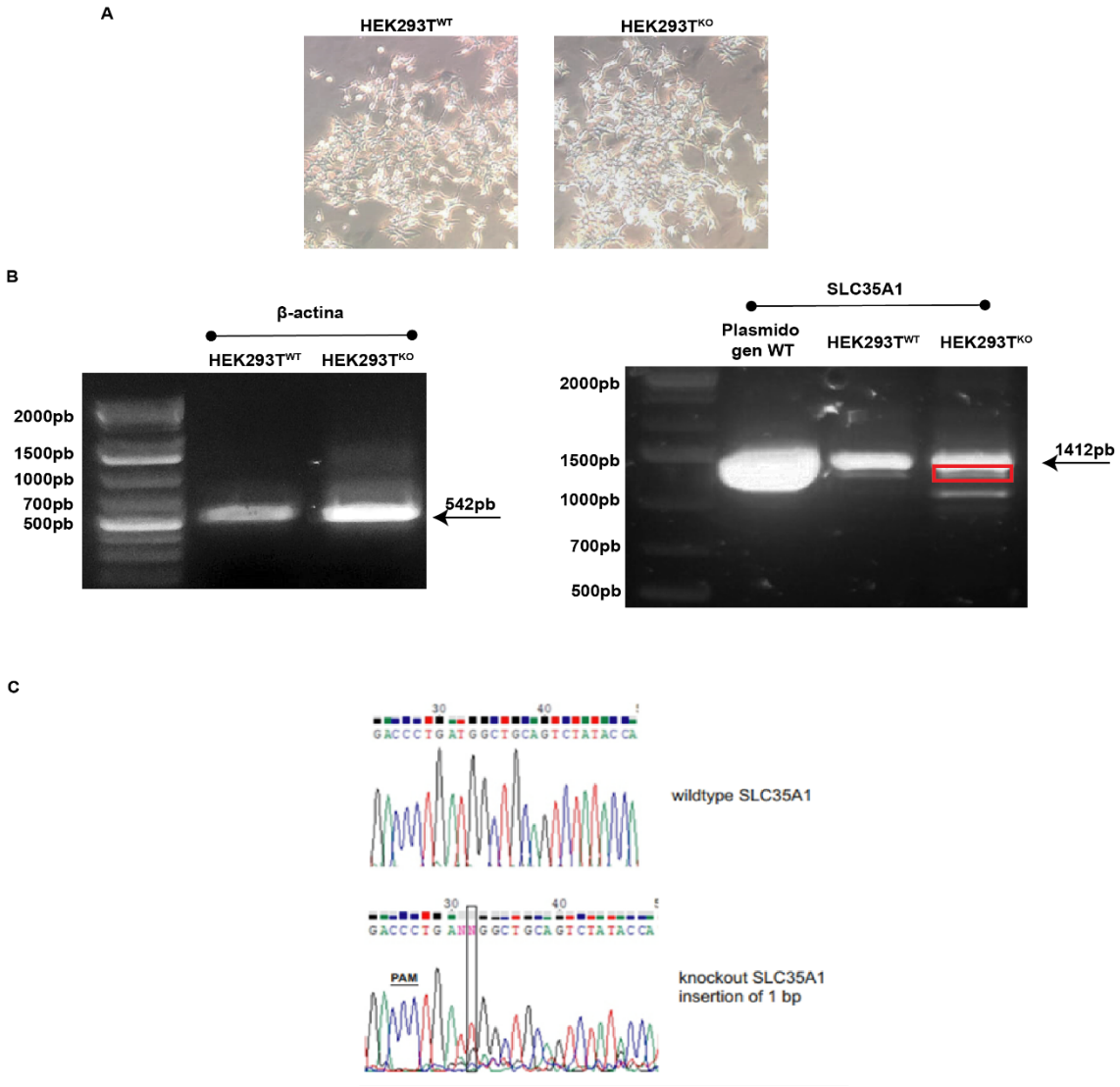


Figura 4. *Caracterización de las células HEK293T. A) Micrografía tomado en microscopio de contraste de fases de las celulas HEK293T wt y KO. B) PCR de un fragmento de 542 pb del gen de ϐ-actina (lado izquierdo) y del SLC35A1 (lado derecho), en células HEK293T wt y KO. En el cuadro rojo se muestra el fragmento que se secuenció para analizar el genotipo. C) Imagen 1 suplementaria de Antje Banning, 2021 donde se realizó la secuenciación para comprobar el KO en las células HEK293T.*

Debido a estos hallazgos se realizó una tinción con lectinas para caracterizar el glicofenotipo de estas células. Se encontró que las células HEK293T^{KO} tienen una mayor unión a la lectina PNA (reconoce antígeno T y estructuras galactosil (β-1,3) y N-acetilgalactosamina) que las células HEK293T^{WT} (figura 5A), mientras que las células, HEK293T^{WT} tienen una mayor unión a la lectina SNA (se une preferentemente al ácido siálico unido a galactosa terminal en enlace α-2,6 y, en menor medida, en enlace α-2,3) que

las células HEK293T^{KO} (figura 5B). Sin embargo, la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las células KO superó a las células control sin teñir (ST) y a las marcadas únicamente con streptavidina (STV), lo que nos hace llegar a la conclusión que tienen una cantidad de Sia residual de aproximadamente de un 15%, similar a lo que ocurre en el fenotipo reportado en las células Lec-2. Por estas razones se realizó una tinción con un anticuerpo anti-SLC35A1, para observar si las células HEK293T^{KO} expresaban al hCST. Como control de permeabilización se utilizó a la clona DM1A anti-tubulina como control de permeabilización. En este caso encontramos que tanto las células HEK293T^{WT}, como las KO presentan una IMF similar para el hCST (figura 5C), lo que nos hace pensar que nuestro anticuerpo anti-SLC35A1 se une a las isoformas no funcionales del hCST.

,

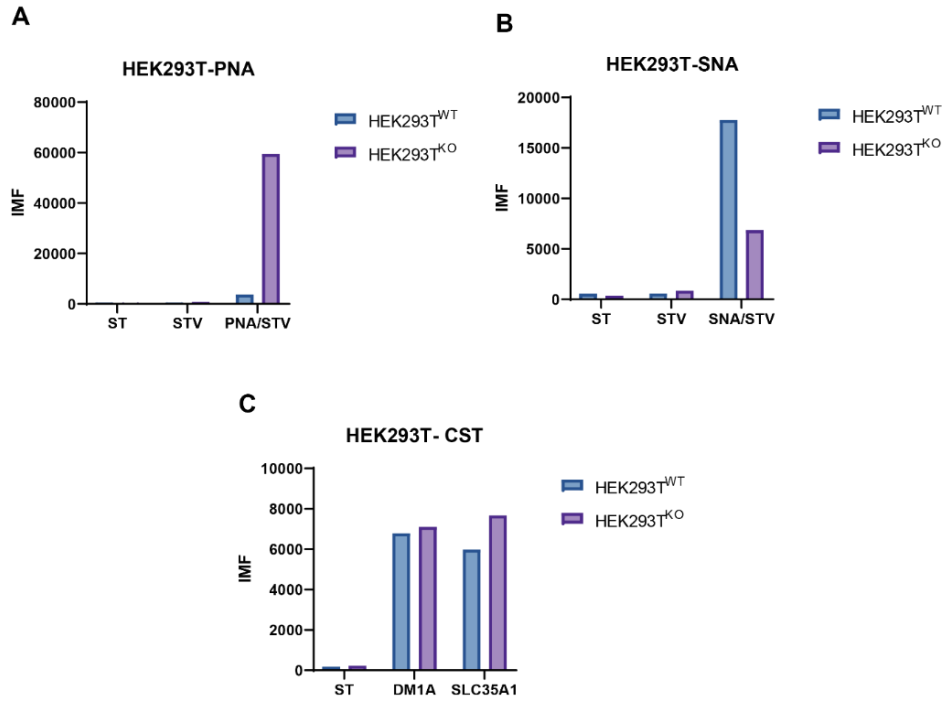


Figura 5. *Glicofenotipo de las células HEK293T wild type y KO. A) Se realizó una tinción con la lectina PNA, en donde se muestra en el eje Y la intensidad media de fluorescencia (IMF), mostrando a las células HEK293T^{KO} con una alta unión a PNA, mientras que las células HEK293T^{WT} no presentan unión. B) La tinción con la lectina SNA muestra una IMF mayor para las células HEK293T^{WT}, mientras que las células HEK293T^{KO} presentan menor unión, sin embargo, esta unión es mayor a los controles ST y STV. C) Tinción utilizando el anticuerpo anti-SLC35A1 para marcar al CST y como control de permeabilización el anticuerpo anti-tubulina DM1A; en este caso ambas células presentan una IMF similar para el marcaje contra el CST. n=1*

Para terminar de confirmar la presencia de isoformas no funcionales del hCST se realizó una microscopía confocal en donde se utilizó el mismo anticuerpo anti-SLC35A1 que en los experimentos con citometría de flujo. Se observó que en las células HEK293T^{WT} el hCST se encuentra distribuido en la periferia del núcleo, mientras que en las células HEK293T^{KO} se encuentra en *clusters* en algunas células y disgregado en otras (figura 6).

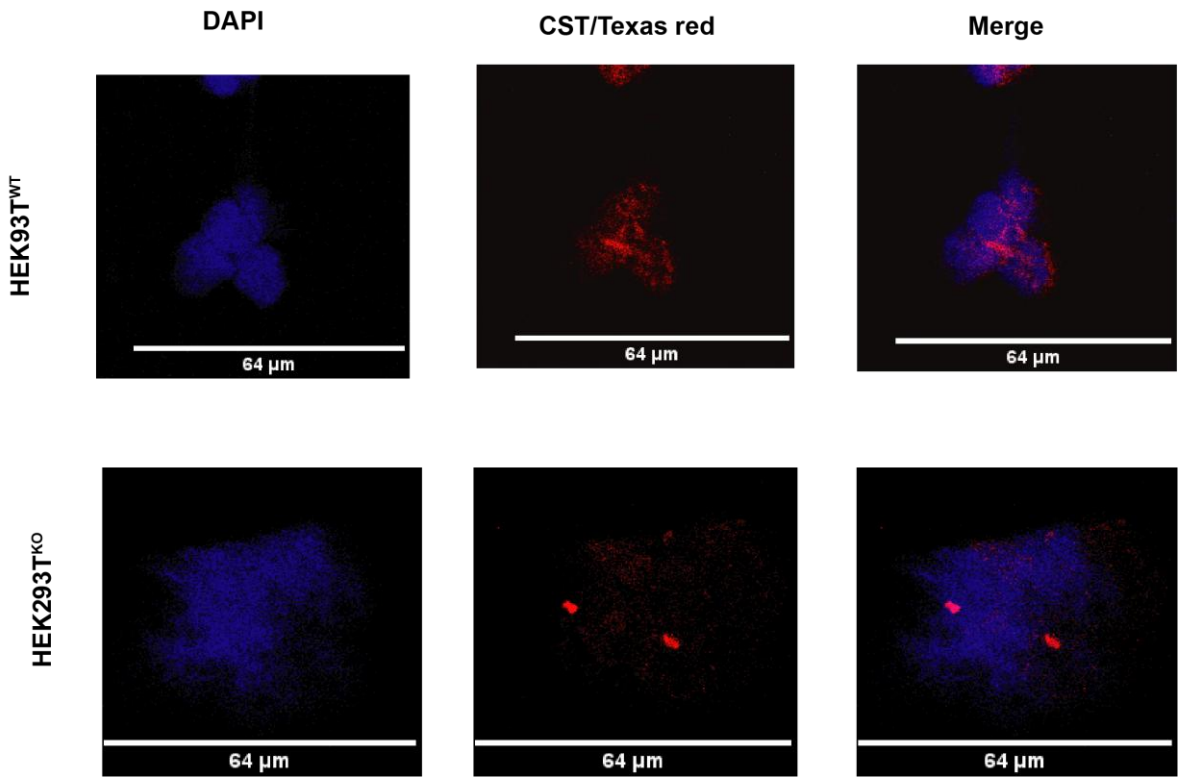


Figura 6. *Expresión del CST en células HEK293T wt y KO: A) En el panel de arriba se observa que las células HEK293T^{WT} muestran al CST distribuido en la periferia del núcleo, mientras que en el panel de abajo las células HEK293T^{KO} muestran clusters localizados en los extremos de la célula y en otras células se encuentra disgregado.*

6.2. Análisis de los residuos de aminoácidos importantes para el funcionamiento de la isoforma del177

Dado que la alteración de un residuo de aminoácido puede provocar la ganancia o pérdida de función en la isoforma del177 como se observó en el artículo *"Structure-Function*

Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform", en donde se demostró que al realizar la mutación p. Gln101His incrementa la funcionalidad del hCST-del177 a un 67%.[48] Se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen de la isoforma del177 hCST y haCST, con el objetivo de analizar si los aminoácidos previamente identificados como cruciales para la formación de la cavidad y responsables de la interacción con el CMP-Sia se mantenían en ambas isoformas. Se observó que todos los residuos de aminoácidos responsables de la interacción con el CMP-Sia permanecen intactos, mientras que se identificaron cambios en los aminoácidos cercanos a aquellos que participan en el mantenimiento de la estructura.

En consecuencia, se decidió analizar los aminoácidos de los dominios transmembranales (TMD) 1 y 9, los cuales según Ahuja en la estructura del cristal de ratón contiene residuos estructurales que ayudan a la apertura de la cavidad del CST[29]. Se seleccionaron aquellos cercanos a los residuos de aminoácidos estructurales con cambios fisicoquímicos más significativos, optando por la mutación Ala26Val en el TMD1 y Cys263Ser en el TMD9 (figura 7). Además, se observó la pérdida de una glicina en la posición 326 en la isoforma *wt* y en la posición 267 en la isoforma del177 del haCST. Para evaluar la relevancia de esta pérdida de aminoácido, se llevó a cabo un análisis filogenético. Se descubrió que la mayoría de los mamíferos conservan esta glicina en la posición 326; sin embargo, una familia específica de roedores, que incluye al ratón, hámster, hámster dorado y rata, presenta la pérdida de este aminoácido (figura 8). Por lo tanto, se decidió incorporar la Ins-G267 como parte de las mutaciones realizadas.

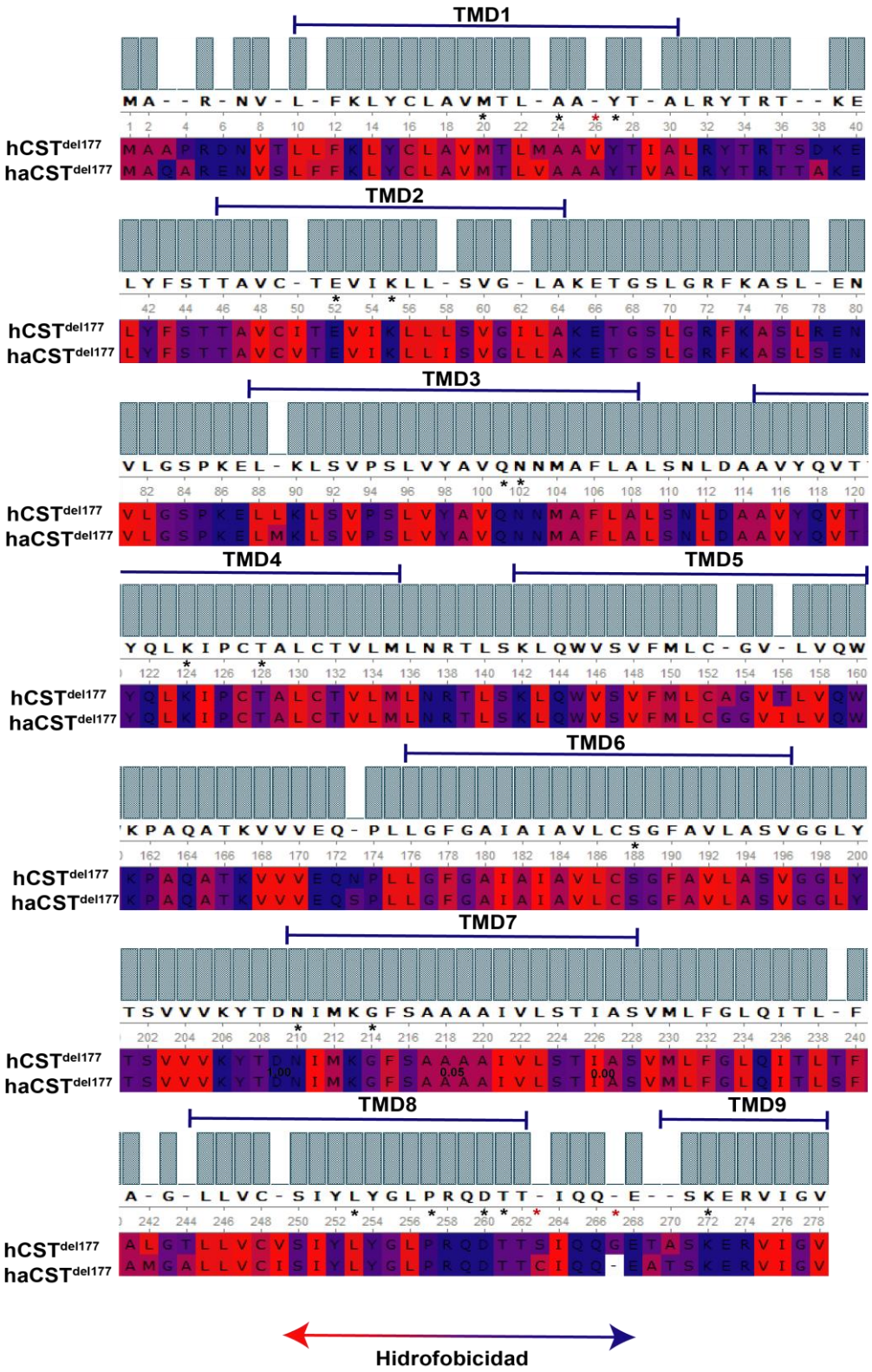


Figura 7. *Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la isoforma del177 del hCST y haCST. Marcados con * se muestran los aa que interaccionan con el sustrato o son importantes para mantener la cavidad del CST, mientras que en * se marca los residuos de aa que se decidió modificar de acuerdo con su diferencia de hidrofobicidad entre el hCST y él haCST.*

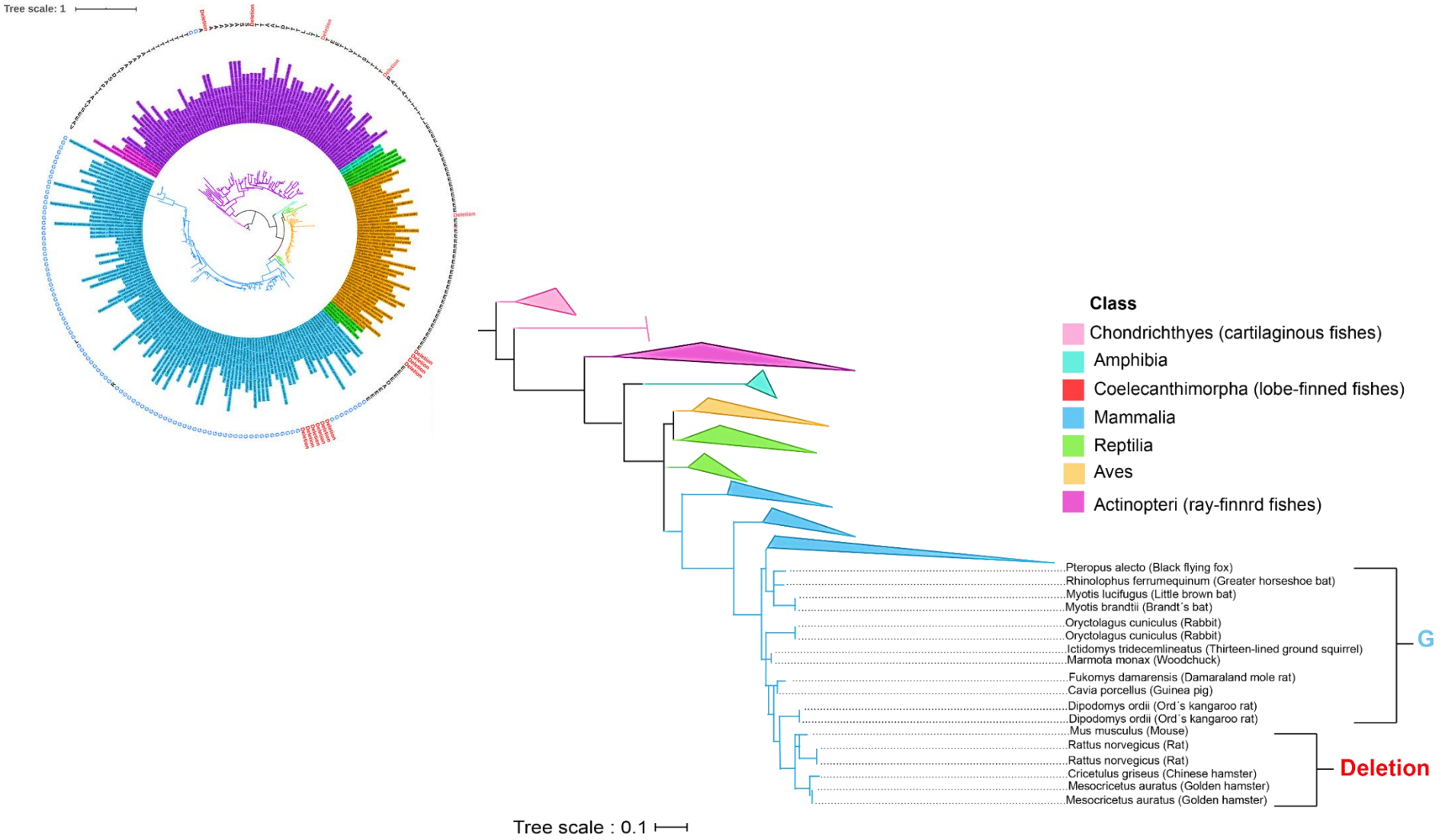


Figura 8. *Análisis filogenético de la pérdida de la Gly326 en el CST. Se observa que en mamíferos un grupo especifico de la familia de los roedores presenta la pérdida de este aminoácido.*

6.3. Análisis de los modelos del transportador de CMP-Sia de hámster vs humano

Los modelos realizados por homología muestran que la isoforma *wt* y del177 presentan su extremo N-terminal y C-terminal orientados hacia el lado citosolico. La estructura del177 de hámster (haCST^{del177}) en el C-terminal muestra una hélice desorganizada; esto es debido a que esa fracción terminal no se encuentra en el modelo del cristal de ratón, por lo que al hacer el modelo el servidor AlphaFold 3 no la acopló correctamente, sin embargo, no afecta en cómo esta estructura interacciona con el sustrato (figura 9 B). La diferencia entre las estructuras haCST^{WT} y haCST^{del177} es que la primera presenta 10 TMD´s, mientras que la del177 únicamente 9, perdiendo el TMD7 y parte del TMD8; así mismo presenta una conformación más cerrada en la cavidad de unión a diferencia de la haCST^{WT} (figura 9 C). En el caso de la isoforma del177 de hámster podemos observar que al sobreponer el modelo se acopla de una forma muy similar a la isoforma del177 humana (figura 9 D). El modelo de la isoforma del177 humana (hCST^{del177}) que se utilizó como comparación para la isoforma del177 de hámster (haCST^{del177}) fue el utilizado en el artículo "*Structure-Function Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform*"[48].

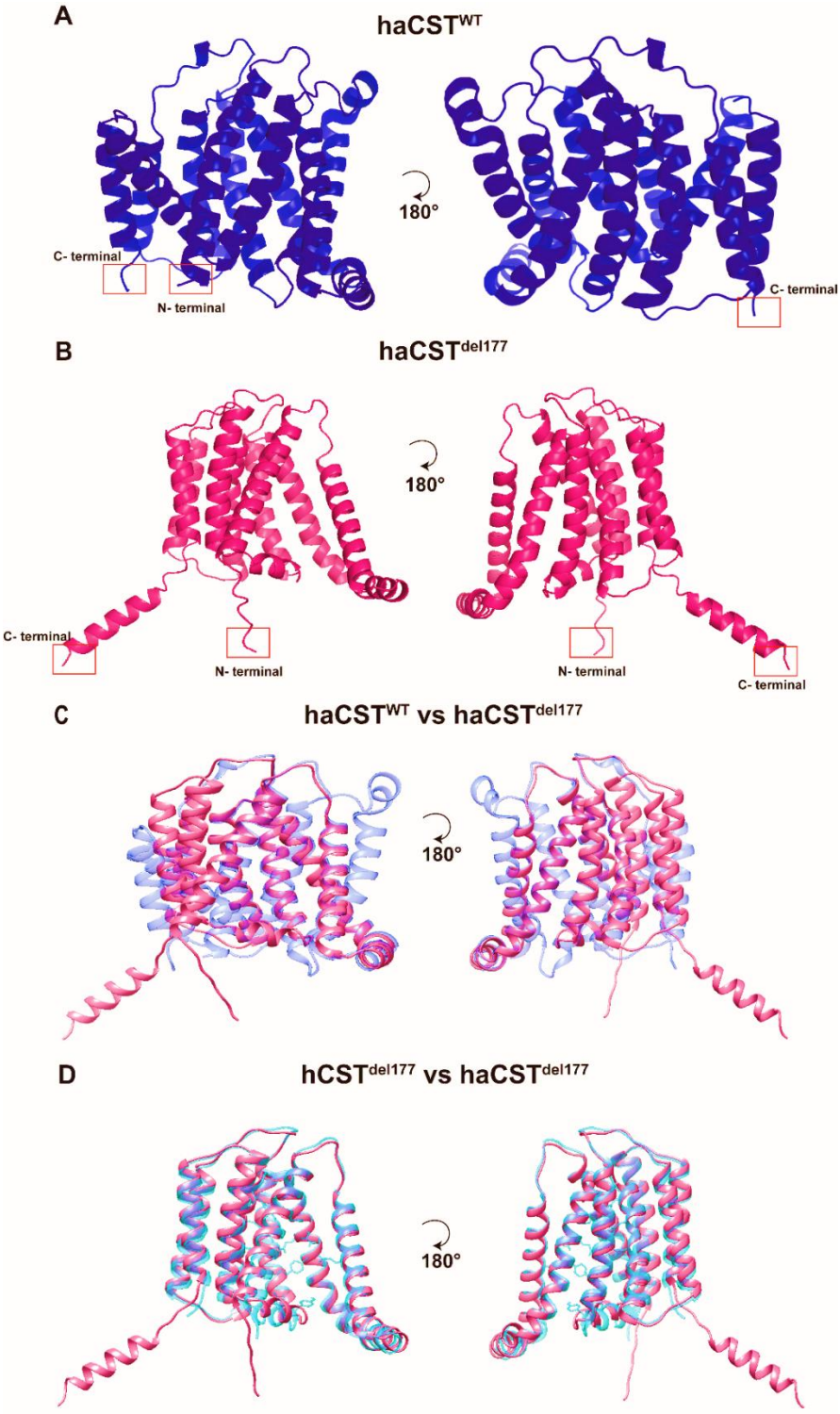


Figura 9. *Comparación de los modelos haCST wt y del177 y hCST del177. A) muestra la estructura haCST silvestre (haCST^{WT}) con 10TMD´s y el N- y C- terminal hacia el mismo extremo. B) Muestra la isoforma del177 del haCST (haCST^{del177}), el cual presenta 9 TMD´s y al igual que el haCST^{WT} presenta su N- y C- terminal hacia el mismo extremo. C) Muestra la comparación entre la isoforma del177 y wt del haCST, donde se observa la pérdida del TM7 de la isoforma del177 y una mayor compactación. D) Muestra la comparación entre la isoforma del177 del haCST y hCST, donde se observa una conformación similar entre ambas. QMeanDisco haCST^{wt}= 0.8 ± 0.05, QMeanDisco haCST^{del177}= 0.7 ± 0.05*

El análisis de las interacciones entre la isoforma del177 y wt del haCST muestra que el modelo haCTS^{del177} pierde la mayoría de sus interacciones en comparación con el modelo haCST^{WT}, en donde se observa que el modelo de la isoforma del177 únicamente cuenta con un puente de hidrógeno del OH del residuo Asn102 con el grupo citidín y el grupo amino de este mismo residuo con el Sia. La Lys124 forma un puente de hidrogeno con el grupo fosfato, al igual que la Ser188, la Tyr98 forma una interacción pi con el Sia y la Tyr27 genera un contacto hidrofóbico con el grupo citidín (figura 10). El modelo haCST^{WT} presenta sus interacciones muy similares a la isoforma *wt* humana en su forma ocluida[48].

Teniendo en cuenta lo observado en el alineamiento de las secuencias genéticas donde los aminoácidos que pertenecen a la estructura de la cavidad en la isoforma del177-haCST no son diferentes a los de la isoforma silvestre, pero aun así en los modelos generados por homología se observa que la isoforma del177-haCST pierde su interacción con el sustrato, se tomó la decisión de modificar los residuos de aminoácidos estructurales con mayor diferencia hidrofóbica, basándonos en que la estructura del modelo haCST^{del177} se observa más compacta que el modelo wt, pudiendo generar impedimentos estéricos en la cavidad de unión. Debido a estos análisis de estructura los aminoácidos que se seleccionaron para mutación fueron los siguientes: p. Ala26Val, p. Cys263Ser e Ins-Gly267.

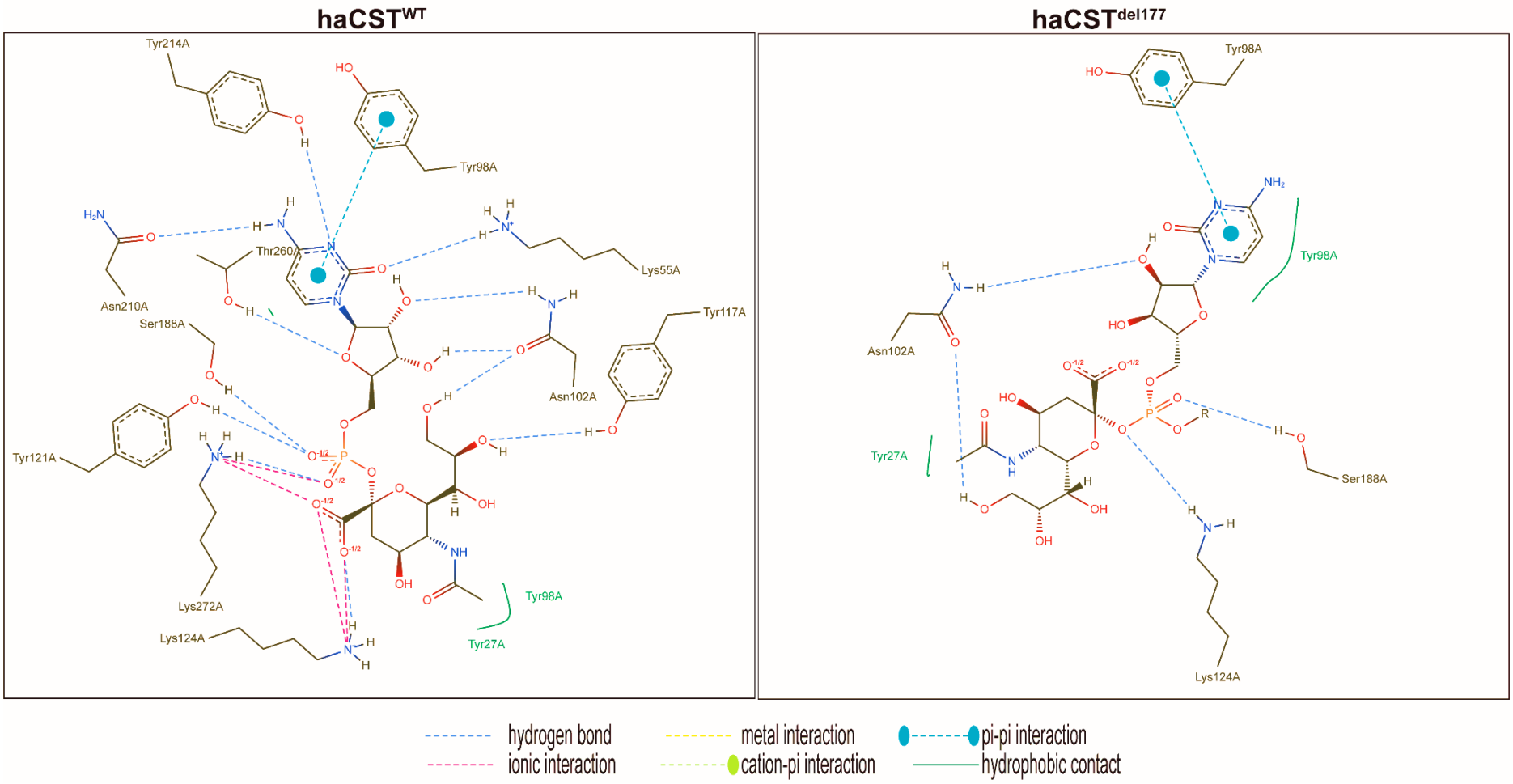


Figura 10. *Análisis de las interacciones entre la isoforma del177 y wt del haCST. Se observa cómo el sustrato interactúa con el hsCST^{del177} y cómo éste pierde la mayoría de sus interacciones en comparación con el modelo wt, generando menores puntos de contacto y menor afinidad con el sustrato, disminuyendo así su afinidad y actividad.*

6.4. Generación de las construcciones Ala26Val, Cys263Ser y G267 y prueba de funcionalidad.

Las construcciones se realizaron mediante mutagénesis dirigida, las cuales fueron verificadas por secuenciaron de Sanger y se alinearon con la secuencia de la isoforma del177 haCST y hCST del NCBI (Anexo1).

Para corroborar que estas mutaciones permiten restaurar la funcionalidad de la isoforma del177 haCST se realizó una tinción con la lectina SNA, donde se observó que las células que expresaban la isoforma del177 de hámster (haCST^{del177}) presentan alrededor de un 35.7% de unión a SNA de forma basal, teniendo en cuenta la union a la lectina SNA basal de las células HEK293T^{KO}, únicamente se incrementa un 19.8% la unión a Sia, sin embargo, al realizar la inserción en la isoforma (haCST^{G267}), la unión a SNA disminuye un 8.4%, mientras que con la mutación p. Ala26Val (haCST^{A26V}) la unión a SNA se incrementa a un 25.5% y la mutación p. Cys263Ser (haCST^{C263S}) genera un incremento de unión a Sia con respecto a la isoforma del177 del 23.5% (figura 11). Cabe mencionar que este experimento fue realizado con un n=3, sin embargo, uno de ellos fue realizado con una lectina SNA acoplada a Cy5 (#CL-1305-1, Vector lab), por lo que puede haber errores de desviaciones por el cambio de la lectina. La disminución de la unión de la lectina SNA en la mutante haCST^{G267} nos llamó la atención, por lo que se realizó una tinción utilizando la lectina PNA (*Peanut Agglutinin*), la cual detecta el antígeno-T, estructuras galactosil (β-1,3) y N-acetilgalactosamina, para analizar cómo es que esta disminución de Sia α2-6 podría afectar la glicosilación. Encontramos una reducción de la unión de PNA de aproximadamente un 17% en la mutante haCST^{G267} con respecto a la haCST^{del177} (Anexo 2). Esto podría ser debido a que la inserción de la Gly267 estaría fomentando la unión de Sia con un enlace diferente a α2-6.

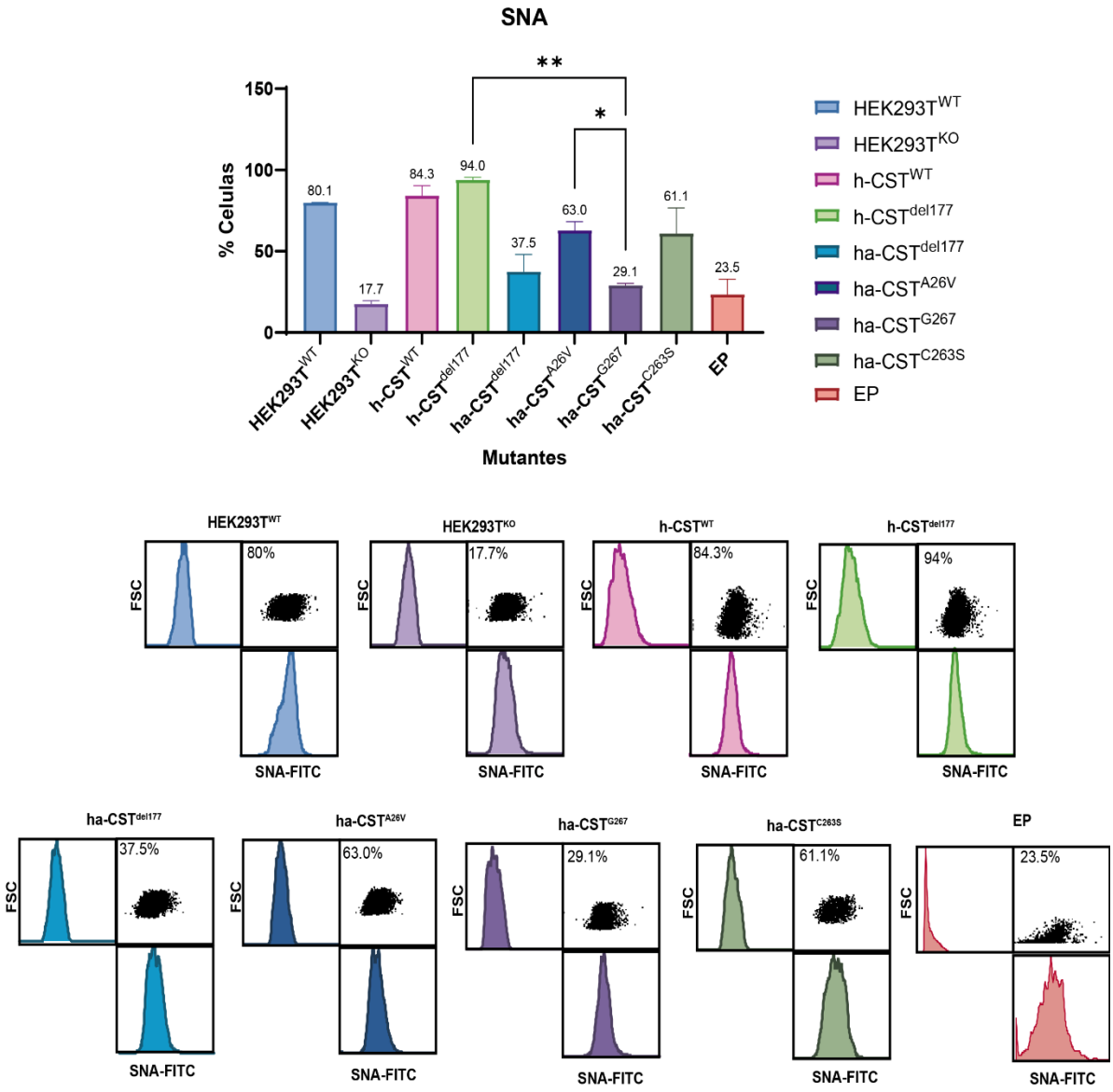


Figura 11. *Análisis de la unión de SNA las diferentes mutantes la isoforma del177 del ha-CST. En la gráfica se muestra el porcentaje de células positivas para la unión a SNA, siendo la isoforma mutada ha-CST^{C263S} la que generó mayor cambio en comparación con la isoforma del177 ha-CST. En el panel de abajo se muestra el histograma de las células, en el eje de las Y se observa la complejidad de las células (FSC) y en el eje de las X el porcentaje de unión a SNA. Se utilizaron las isoformas WT y del177 de humano como control positivo al igual que la línea celular HEL293T^{KO} como control negativo y* plásmido vacío *(EP) como control de transfección. n=3 p<0.05. (p<0.0332 (*), p<0.0021 (**))*

Para verificar lo observado mediante citometría de flujo se realizó un ensayo de RCA I en estas mutantes. Las células haCST^{del177} no presentaron la resistencia a la citotoxicidad de la lectina RCA I, mientras que las mutantes haCST^{A26V} y haCST^{C263S} presentaron un incremento de resistencia a dicha lectina (figura 12). En este experimento no se analizó la mutante haCST^{G267} debido a la poca confluencia que presentaron las células cuando se realizó el experimento.

Se realizaron unas micrografías usando un microscopio óptico de campo claro a una resolución de 40X, donde se compara a las células sin el tratamiento con RCA I (control), contra las células 48 h después de que se agregó la lectina. Se observó que las células transfectadas con las construcciones haCST^{A26V} y haCST^{c263S} presentan una mayor resistencia al RCA I que la isoforma del177 haCST, pero a pesar de esto la morfología pequeña y redondeada, con formación de agregaciones entre ellas mismas indica una señal de estrés en estas células (figura 12B).

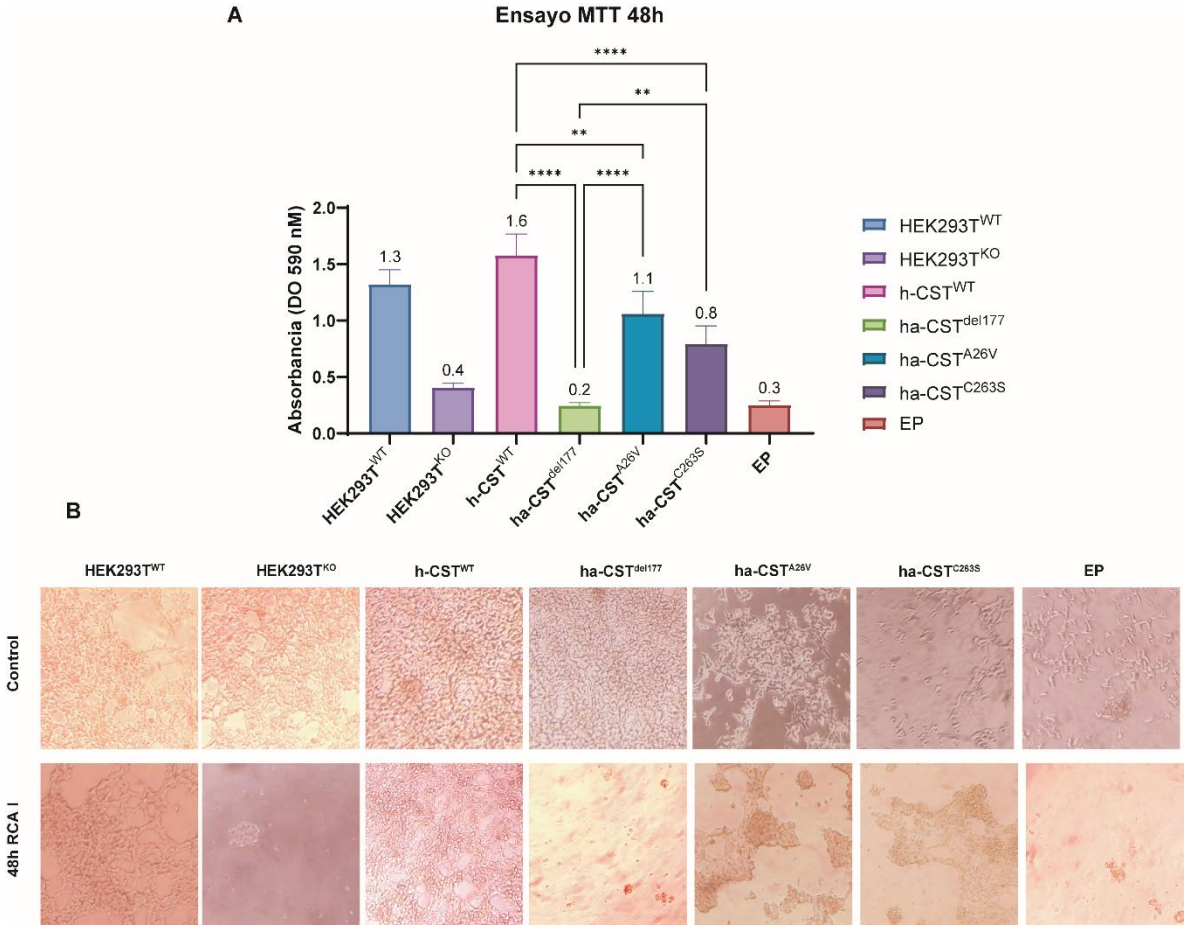


Figura 12. *Comparación de la resistencia a RCA I de las construcciones mediante ensayo de MTT. A) Gráfica de las unidades de absorbancia de las construcciones después de exponerse a RCA I por 48 h; entre mayor es el nivel de absorbancia mayor proliferación celular, por lo que se interpreta como una mayor resistencia a RCA I. B) Micrografía de las células HEK293T^{KO} transfectadas con las diferentes mutantes, donde se muestra la morfología 48 h después de la incubación con RCA I, observando que las construcciones mutadas tienen una mayor resistencia a RCA I que la isoforma haCST$^{del177.}$ n=3 p<0.05. (p<0.0332 (*), p<0.0021 (**), p<0.0002 (***), p<0.0001 (****))*

6.5. Cambios morfológicos en el aparato de Golgi y localización del hCST

Existen reportes donde se indica que la falta de Sia o una glicosilación incorrecta altera la morfología del Golgi hacia un estado fragmentado y desorganizado.[65–67] Con la finalidad de correlación en el recobro del sialofenotipo con la morfolgía de Golgi, se realizó una inmunotinción de GM130, un marcador de la cisterna cis-Golgi, en las células transfectadas

con las diferentes mutantes. Además, para caracterizar la distribución del CST en las líneas celulares de tipo salvaje (*wt*) y mutantes se utilizó un anticuerpo anti-SLC35A1.

Las células HEK293T^{KO} mostraron un Golgi disgregado y una localización desorganizada del hCST en comparación con el patrón compacto y organizado observado en las células HEK293T^{WT}. Además, las células hCST^{WT} y hCST^{del177} mostraron un GM130 más compacto situado en cerca del núcleo y una localización organizada de hCST similar a la de las células HEK293T^{WT}.

Las células haCST^{A26V} y haCST^{C263S} mostraron una notable compactación del GM130 y una localización organizada de la hCST en comparación con las células haCST^{del177}, que exhibieron un GM130 ligeramente menos redondeada y una hCST en forma de clusters (figura 13). Con estos resultados podemos proponer que las mutantes haCST^{A26V} y haCST^{C263S} generan una restauración del Golgi debido a la presencia de Sia, ya que se ha observado que aberraciones en la glicosilación como la deficiencia de Sia pueden dañar a Golgi (Anexo 3).[65]

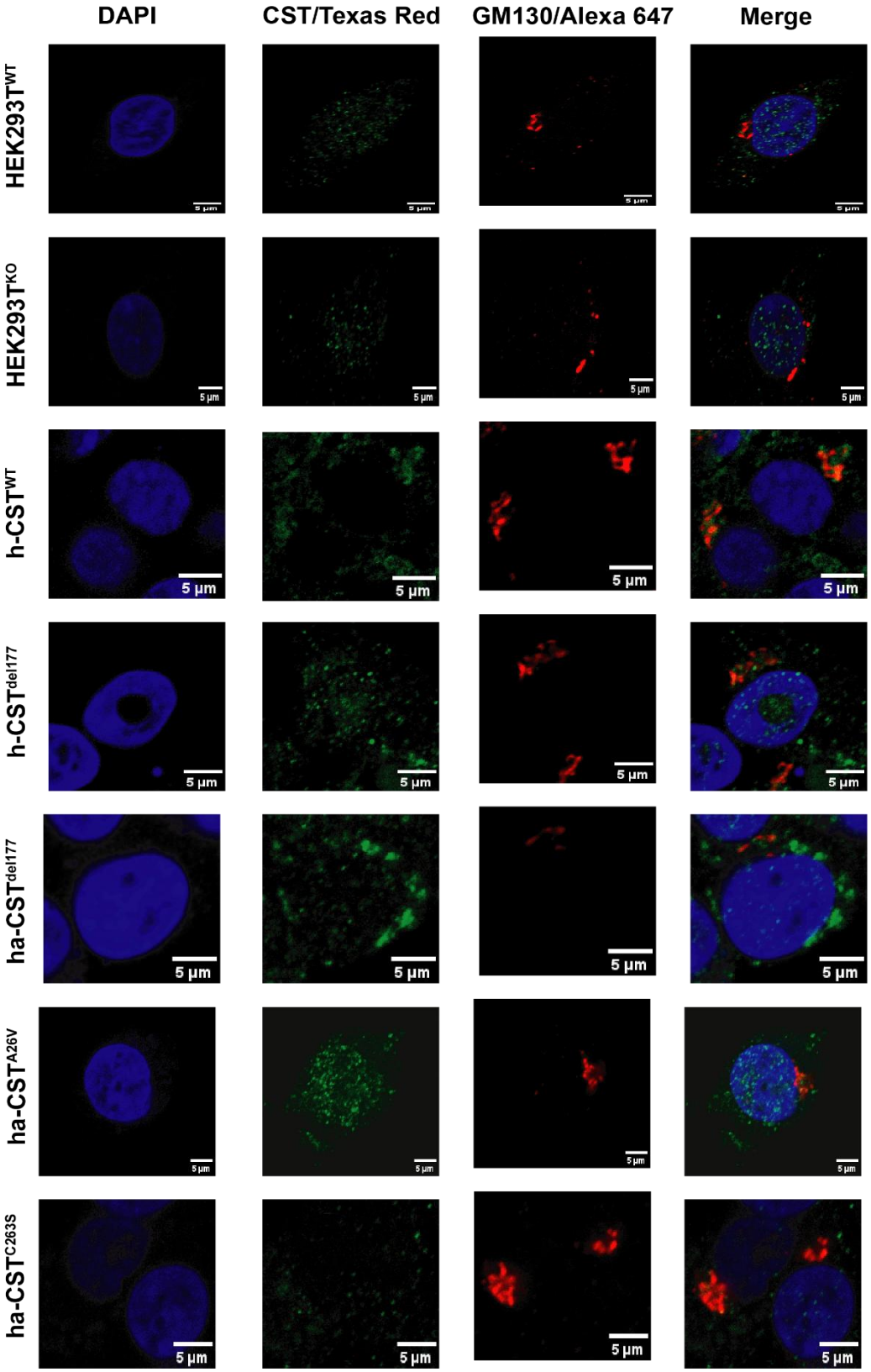


Figura 13. *Organización del aparato de Golgi en células transfectadas con diferentes construcciones. Se utilizó microscopía confocal para visualizar GM130 en las células que sobreexpresaban las diferentes isoformas de CST en células HEK293T^{KO}. El cis-Golgi se marcó específicamente con un anticuerpo GM130 (rojo), mientras que el CST se visualizó con un anticuerpo anti-SLC35A1 (verde). Las micrografías se capturaron con un microscopio confocal Nikon A1R+ STORM con un objetivo de 100 aumentos. Los núcleos celulares se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Barra de escala = 5 µm*

6.6. Análisis de la mutante haCST p. Ala26Val

Se realizó un modelado de la mutación del177 haCST p. Ala26Val (haCST^{A26V}), con la finalidad de entender cómo es que este residuo de aminoácido puede estar participando en la recuperación de la funcionalidad del transportador. El arreglo de la estructura es muy similar a la isoforma del177 haCST, su N- y C- terminal se encuentran orientados hacia el lado citosólico y la única diferencia notoria es el movimiento de una hélice cercana al TMD 7, permitiendo que la cavidad de interacción con el sustrato no se observe tan compacta (figura 14). Lo que se observa en la posición 26 del modelo haCST^{A26V} es que la Val, al ser un aminoácido voluminoso e hidrofóbico rota la hélice del TMD1, dejando a la Tyr27 más expuesta hacia el sustrato, generando una interacción hidrofóbica entre en anillo fenilo de la Tyr27 y el CMP-Sia (figura 14 C). Esta rotación del TMD1 también contribuyó a que hubiera menor impedimento estérico entre los demás residuos y posiblemente favoreció el reacomodo de la hélice del TMD7 generando una cavidad menos compacta, ya que se observa que se recuperan contactos entre los residuos de aminoácidos y el CMP-Sia. Dentro de estos contactos se encuentra la interacción de la Lys55 con el grupo citidín y la Tyr27 mediante un contacto hidrofóbico con el Sia. Además, se mantienen las interacciones de la Ser188 y Lys124 con el grupo fosfato (figura 14 D), que en anteriores reportes ya se había dejado clara la importancia de estas interacciones, por lo que con esto se puede observar la importancia de los aminoácidos estructurales encargados de la apertura de la cavidad del CST.

Los modelos de la ins-G267 y p. Cys263Ser no se lograron hacer debido a que se encuentran en una zona que aún no ha sido resuelta mediante cristalografía, por lo que esa zona presenta regiones desordenadas que no aportan congruencias al modelo.

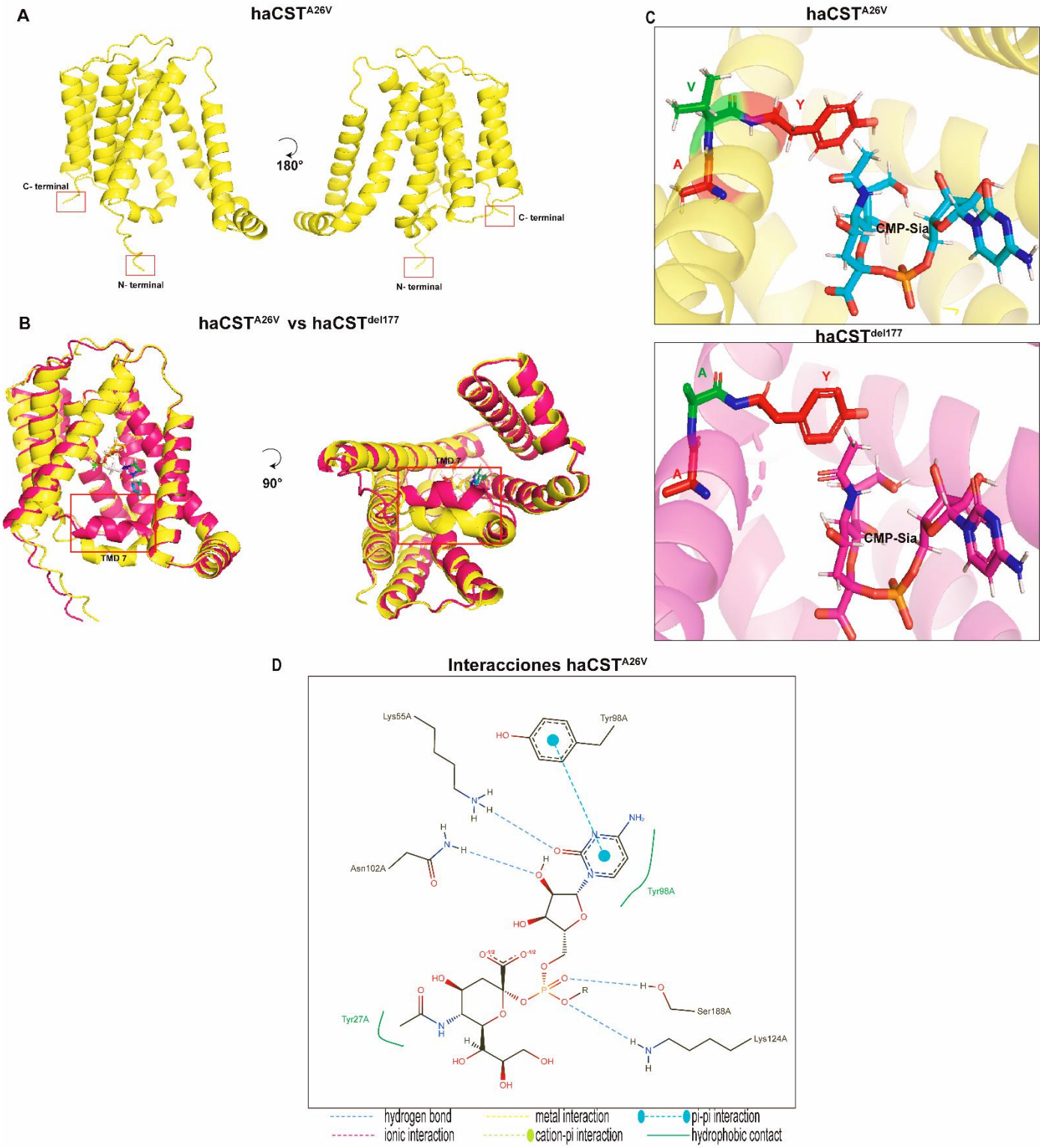


Figura 14. *Análisis estructural de la mutante p. Ala26Val del haCST del177. A) Modelo de la mutación p. Ala26Val de la isoforma del177, mostrando 9TMD y el N- y C- terminal en el mismo extremo. B) Comparación del modelo haCST^{A26V} (amarillo) contra el modelo haCST^{del177} (rosa) observando una apertura mayor en la cavidad del modelo mutante debido al movimiento de una hélice del TMD 7. C) Análisis del cambio estructural del TMD1 debido a la mutación p. A26V, donde en verde se marca el cambio A26V y en rojo los residuos vecinos como la Ala25 y la Tyr27. D) Interacciones del haCST^{A26V} con el CMP-Sia, se observan interacciones de puentes de hidrógeno de los residuos Lys124 y Ser188 con el grupo fosfato y los residuos Lys55 y Asn102 con el citidín.*

7. DISCUSIÓN

Las mutaciones p. Ala26Val y p. Cys263Ser en el transportador de CMP-ácido siálico (CST) del hámster (haCST) provocan un aumento en la expresión de ácido siálico α2-6 en la superficie celular. Este hallazgo sugiere que los residuos Val26 y Ser263 desempeñan un papel crucial en la reorganización estructural del CST, facilitando una interacción más eficiente con el CMP-Sia, a pesar de no formar parte directa del sitio de unión al sustrato. Este efecto se refleja también en la reorganización del aparato de Golgi, que adopta una morfología más similar a la observada en la isoforma del177 humana y en la isoforma silvestre (wt) del haCST.

En contraste, la inserción de G267 (ins-G267) en el haCST resulta en una menor incorporación de ácido siálico en la superficie celular, incluso inferior a la observada en la isoforma del177 del hámster. Sin embargo, la baja unión a la lectina PNA sugiere la posibilidad de que el ácido siálico producido esté presente en diferentes tipos de enlaces, como α2-3, o α2-8.[68–70] Esto es coherente con la predominancia de enlaces α2-3 y ácido policialico en células CHO, además, se ha reportado que ciertas mutaciones en el CST pueden influir en la preferencia de las sialiltransferasas por sus sustratos.[71,72].

Para confirmar estas hipótesis, es necesario realizar tinciones adicionales con lectinas específicas como MAA, la cual se une a enlaces α2-3 de Sia y RCA-I que se une galactosa o *N*-acetilgalactosamina. Igualmente se deben realizar ensayos de MTT por separado para cada mutante, dado que las células que expresan haCST-G267 muestran una proliferación menor, también es importante evaluar posibles cambios en la conformación del aparato de Golgi asociados a esta mutación.

A nivel estructural, se observa que la isoforma del177 del haCST pierde la mayoría de sus interacciones con el CMP-Sia en comparación con la isoforma wt del haCST y la isoforma del177 humana. Esta pérdida de interacciones podría deberse a una cavidad de unión más reducida, resultado de un rearreglo estructural inducido por los aminoácidos circundantes.

En el caso de la mutación p. Ala26Val, se detecta un desplazamiento hacia el exterior de una hélice en el TMD 7, además de una rotación hacia el exterior de la cavidad del TMD1, lo que genera una cavidad de unión más abierta y permite interacciones adicionales, como las de los residuos Lys55 y Tyr27, en donde se ha reportado que estos residuos de aminoácidos son especialmente importantes debido a que participan en la especificidad y afinidad del transportador hacia el CMP-Sia.[29]

El cambio estructural de la mutante Ala26Val correlaciona con un aumento del 27% en la incorporación de ácido siálico en células HEK293T con la construcción haCST^{A26V}. Sin embargo, no se lograron modelar las mutaciones p. Cys263Ser e ins-G267 debido a que estos residuos se encuentran en regiones aun no resultas en el cristal del mhCST, por lo que los modelados presentan regiones desordenadas. Sin embargo, cabría hacer el énfasis de que las posiciones 263 y 267 están cercanas a la secuencia de retención en Golgi, por lo que la rotación de ese zonda por el cambio es estructural de aminoácidos podría ser importante.[11,73,74]

8. CONCLUSIÓN

8.1. Influencia estructural de mutaciones en la funcionalidad del CST.

Las mutaciones p. Ala26Val y p. Cys263Ser en el transportador de CMP-ácido siálico del hámster (haCST) demostraron tener un impacto funcional significativo, evidenciado por un aumento en la expresión de ácido siálico α2-6 en la superficie celular. Estos resultados revelan que incluso residuos que no participan directamente en el sitio de unión al sustrato pueden inducir reorganizaciones estructurales capaces de mejorar la afinidad o eficiencia del transportador hacia el CMP-Sia. Así, se reafirma que la función del CST no depende únicamente de los residuos en el sitio activo, sino también de aquellos que influyen en la arquitectura general del transportador.

8.2. Implicaciones de la mutación ins-G267 en la retención de Golgi y el patrón de sialilación

La inserción de G267 ocasionó una disminución significativa en la incorporación de ácido siálico en la superficie celular, posiblemente por alteraciones en el procesamiento intracelular y cambios en la preferencia de las sialiltransferasas. Asimismo, la baja afinidad por la lectina PNA sugiere un cambio en el tipo de enlace del ácido siálico producido (α2-3 o α2-8), lo que deberá confirmarse mediante el uso de lectinas específicas en estudios posteriores.

8.3. Relación entre estructura tridimensional y funcionalidad del CST

El modelado estructural permitió observar que la isoforma del177 del haCST presenta una cavidad de unión al CMP-Sia más cerrada en comparación con la isoforma silvestre y la isoforma del177 humana, lo que conlleva una pérdida de interacciones esenciales

para la unión del sustrato. Por el contrario, la mutación Ala26Val genera una expansión de dicha cavidad, facilitando nuevas interacciones relevantes, como las de Lys55 y Tyr27, que se correlaciona con una mayor incorporación de ácido siálico. Estos hallazgos demuestran que la flexibilidad estructural y la dinámica de las hélices transmembranales pueden modular la eficiencia del transportador.

8.4. Importancia de considerar variabilidad entre especies en el estudio de isoformas del CST

Se evidenció que la misma isoforma (del177) puede presentar diferencias funcionales notables entre especies, como el hámster y el humano, debido a cambios en residuos estructurales circundantes que no afectan directamente el sitio de unión. Esto subraya la necesidad de abordar el estudio del CST desde una perspectiva comparativa interespecies, considerando no sólo la secuencia conservada, sino también los elementos estructurales que influyen en la localización, especificidad y eficiencia del transportador.

En conclusión, los residuos estructurales del CST, aunque no estén directamente involucrados en la unión al CMP-Sia, tienen un impacto significativo en la funcionalidad del transportador. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la influencia de los aminoácidos estructurales en la actividad del CST y sugieren que la funcionalidad de una misma isoforma puede variar entre especies debido a diferencias en estos residuos, incluso cuando la cavidad de unión al sustrato permanece sin cambios.

9. PERSPECTIVAS

Las mutaciones en el CST pueden influir en la actividad y especificidad de las sialiltransferasas. Para evaluar estos efectos, se propone realizar tinciones con una variedad de lectinas específicas como: MAA (*Maackia amurensis aglutinina***)**, la cual detecta residuos de ácido siálico unidos en enlace α2-3, RCA-I (*Ricinus communis aglutinina* I) que se une a residuos de galactosa terminales, útiles para detectar glicanos no sialilados y PNA (*Arachis hypogaea aglutinina*), que identifica estructuras de Galβ1-3GalNAc, cuya exposición aumenta en ausencia de sialilación.

Estos análisis permitirán determinar si las mutaciones en el CST alteran la preferencia de las sialiltransferasas por ciertos enlaces y cómo afectan la sialilación de glicoconjugados en la superficie celular.

La localización de las sialiltransferasas puede verse afectada por mutaciones en el CST.[75] Se propone realizar estudios de colocalización mediante microscopía de superresolución para observar la distribución de las sialiltransferasas en relación con el CST y otros marcadores del Golgi. Estos estudios pueden revelar cambios en la organización del Golgi y cómo las mutaciones en el CST afectan la proximidad y la interacción funcional entre estas enzimas.

Implementar estas estrategias experimentales permitirá una comprensión más profunda de cómo las mutaciones en el CST afectan la sialilación celular, la organización del aparato de Golgi y la función celular en general.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Varki, A. *et al.* Essentials of Glycobiology. *Essentials of Glycobiology* (2022) doi:10.1101/9781621824213.

2. Varki, A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* **27**, 3 (2017).

3. Krasnova, L. & Wong, C. *Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis*. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034420.

4. Helenius, J. & Aebi, M. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 171–178 (2002).

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

6. Moremen, K. W. & Haltiwanger, R. S. Emerging structural insights into glycosyltransferase-mediated synthesis of glycans. *Nat Chem Biol* **15**, 853–864 (2019).

7. Parker, J. L. & Newstead, S. Gateway to the Golgi: molecular mechanisms of nucleotide sugar transporters. *Curr Opin Struct Biol* **57**, 127–134 (2019).

8. Capasso, J. M. & Hirschberg, C. B. Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: Evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7051–7055 (1984).

9. Hirschberg, C. B., Robbins, P. W. & Abeijon, C. TRANSPORTERS OF NUCLEOTIDE SUGARS, ATP, AND NUCLEOTIDE SULFATE IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM AND GOLGI APPARATUS. *Annu Rev Biochem* (1998) doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.49.

10. Saier, M. H. *et al.* The Transporter Classification Database (TCDB): Recent advances. *Nucleic Acids Res* **44**, D372–D379 (2016).

11. Zhao, W. & Colley, K. J. Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *The Golgi Apparatus: State of the Art 110 Years after Camillo Golgi's Discovery* 190–206 (2008) doi:10.1007/978-3-211-76310-0_13.

12. Parker, J. L. & Newstead, S. Structural basis of nucleotide sugar transport across the Golgi membrane. *Nature* **551**, 521–524 (2017).

13. Zhu, G., Jaskiewicz, E., Bassi, R., Darling, D. S. & Young W.W., J. β1,4 N-Acetylgalactosaminyltransferase (GM2/GD2/GA2 synthase) forms homodimers in the endoplasmic reticulum: A strategy to test for dimerization of Golgi membrane proteins. *Glycobiology* **7**, 987–996 (1997).

14. Kitano, M. *et al.* Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* **296**, 100354 (2021).

15. Szulc, B. *et al.* Biosynthesis of GlcNAc-rich N- And O-glycans in the golgi apparatus does not require the nucleotide sugar transporter SLC35A3. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 16445–16463 (2020).

16. Yoshioka, S., Sun-Wada, G. H., Ishida, N. & Kawakita, M. Expression of the human UDP-galactose transporter in the Golgi membranes of murine Had-1 cells that lack the endogenous transporter. *J Biochem* **122**, 691–695 (1997).

17. Edmondson, A. C. *et al.* A human case of SLC35A3-related skeletal dysplasia. *Am J Med Genet A* **173**, 2758–2762 (2017).

18. Miura, N. *et al.* Human UDP-galactose translocator: Molecular cloning of a complementary DNA that complements the genetic defect of a mutant cell line deficient in UDP-galactose translocator. *J Biochem* **120**, 236–241 (1996).

19. Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S. & Kawakita, M. Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the human UDP-galactose transporter, and of related complementary DNAs belonging to the nucleotide-sugar transporter gene family. *J Biochem* **120**, 1074–1078 (1996).

20. Sosicka, P. *et al.* Origin of cytoplasmic GDP-fucose determines its contribution to glycosylation reactions. *Journal of Cell Biology* **221**, (2022).

21. Sturla, L. *et al.* Core fucosylation of N-linked glycans in leukocyte adhesion deficiency/ congenital disorder of glycosylation IIc fibroblasts. *Glycobiology* **15**, 924–934 (2005).

22. Lühn, K., Wild, M. K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R. & Vestweber, D. The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat Genet* **28**, 69–72 (2001).

23. Helmus, Y. *et al.* Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter. *Blood* **107**, 3959–3966 (2006).

24. Hadley, B. *et al.* Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress. *Comput Struct Biotechnol J* **10**, 23–32 (2014).

25. Chang, T. Chapter 5: Glycosylation. *ion. Chem. Utah State University* 1–15 (2017) doi:10.1101/glycobiology.3e.005.

26. Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A. & Gerardy-Schahn, R. Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7572–7576 (1996).

27. 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. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 31106–31118 (2006).

28. Hadley, B. *et al.* Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. *Comput Struct Biotechnol J* **17**, 1123–1134 (2019).

29. Ahuja, S. & Whorton, M. R. Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport. *Elife* **8**, 1–27 (2019).

30. Dean, N., Zhang, Y. B. & Poster, J. B. The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31908–31914 (1997).

31. Eckhardt, M., Gotza, B. & Gerardy-Schahn, R. Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8779–8787 (1999).

32. Aoki, K. *et al.* Expression and activity of chimetic molecules between human UDP-galactose transporter and CMP-sialic acid transporter. *J Biochem* **126**, 940–950 (1999).

33. Martinez-Duncker, I., Mollicone, R., Codogno, P. & Oriol, R. The nucleotide-sugar transporter family: A phylogenetic approach. *Biochimie* **85**, 245–260 (2003).

34. 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. *Blood* **105**, 2671–2676 (2005).

35. 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).

36. Eckhardt, M., Gotza, B. & Gerardy-Schahn, R. Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20189–20195 (1998).

37. Dean, N., Zhang, Y. B. & Poster, J. B. The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31908–31914 (1997).

38. Parker, J. L., Corey, R. A., Stansfeld, P. J. & Newstead, S. Structural basis for substrate specificity and regulation of nucleotide sugar transporters in the lipid bilayer. *Nature Communications 2019 10:1* **10**, 1–10 (2019).

39. Li, D. & Mukhopadhyay, S. A three-pocket model for substrate coordination and selectivity by the nucleotide sugar transporters SLC35A1 and SLC35A2. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 101069 (2021).

40. Nji, E., Gulati, A., Qureshi, A. A., Coincon, M. & Drew, D. Structural basis for the delivery of activated sialic acid into Golgi for sialyation. *Nat Struct Mol Biol* **26**, 415–423 (2019).

41. Ury, B., Potelle, S., Caligiore, F., Whorton, M. R. & Bommer, G. T. The promiscuous binding pocket of SLC35A1 ensures redundant transport of CDP-ribitol to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry* **296**, 100789 (2021).

42. Kauskot, A. *et al.* A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica* **103**, e613–e617 (2018).

43. Ng, B. G. *et al.* Mosaicism of the UDP-Galactose Transporter SLC35A2 Causes a Congenital Disorder of Glycosylation. *Am J Hum Genet* **92**, 632 (2013).

44. Ng, B. G. *et al.* Encephalopathy caused by Novel Mutations in the CMP-Sialic Acid Transporter, SLC35A1. *Am J Med Genet A* **173**, 2906 (2017).

45. Mohamed, M. *et al.* Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport. *Neurology* **81**, 681–687 (2013).

46. Riemersma, M. *et al.* Disease mutations in CMP-sialic acid transporter SLC35A1 result in abnormal α-dystroglycan O-mannosylation, independent from sialic acid. *Hum Mol Genet* **24**, 2241–2246 (2015).

47. Szulc, B., Zadorozhna, Y., Olczak, M., Maszczak-Seneczko, D. & Wiertelak, W. Novel insights into selected disease-causing mutations within the slc35a1 gene encoding the cmp-sialic acid transporter. *Int J Mol Sci* **22**, 1–24 (2021).

48. Velázquez-Dodge, B. I. *et al.* Structure-Function Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform. *ACS Omega* (2024) doi:10.1021/ACSOMEGA.4C08466/ASSET/IMAGES/LARGE/AO4C08466_0008.JPEG.

49. Camacho, C., Boratyn, G. M., Joukov, V., Vera Alvarez, R. & Madden, T. L. ElasticBLAST: accelerating sequence search via cloud computing. *BMC Bioinformatics* **24**, 1–16 (2023).

50. Camacho, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform* **10**, 421 (2009).

51. Okonechnikov, K. *et al.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **28**, 1166–1167 (2012).

52. Katoh, K., Asimenos, G. & Toh, H. Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. *Methods in Molecular Biology* **537**, 39–64 (2009).

53. Batut, B. *et al.* Community-Driven Data Analysis Training for Biology. *Cell Syst* **6**, 752-758.e1 (2018).

54. Hiltemann, S. *et al.* Galaxy Training: A powerful framework for teaching! *PLoS Comput Biol* **19**, (2023).

55. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425 (1987).

56. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**, W296–W303 (2018).

57. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* **19**, 679–682 (2022).

58. Abramson, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* **630**, 493–500 (2024).

59. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).

60. Citing UCSF Chimera. https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/credits.html.

61. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 935–949 (2004).

62. Seeliger, D. & De Groot, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des* **24**, 417–422 (2010).

63. Fährrolfes, R. *et al.* ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Res* **45**, W337–W343 (2017).

64. Schöning-Stierand, K. *et al.* ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Res* **48**, W48–W53 (2020).

65. Eisenberg-Lerner, A. *et al.* Golgi organization is regulated by proteasomal degradation. *Nature Communications 2020 11:1* **11**, 1–14 (2020).

66. Zhang, X. & Wang, Y. Glycosylation quality control by the Golgi structure. *J. Mol. Biol.* **428**, 3183–3193 (2016).

67. Machamer, C. E. The Golgi complex in stress and death. *Front Neurosci* **9**, 421 (2015).

68. Ishida, N., Ito, M., Yoshioka, S., Sun-Wada, G. H. & Kawakita, M. Functional Expression of Human Golgi CMP-Sialic Acid Transporter in the Golgi Complex of a Transporter-Deficient Chinese Hamster Ovary Cell Mutant. *The Journal of Biochemistry* **124**, 171–178 (1998).

69. Janas, T. & Janas, T. Membrane oligo- and polysialic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 2923–2932 (2011).

70. Croset, A. *et al.* Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol* **161**, 336–348 (2012).

71. Wiertelak, W., Olczak, M. & Maszczak-Seneczko, D. An interaction between SLC35A1 and ST3Gal4 is differentially affected by CDG-causing mutations in the SLC35A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **635**, 46–51 (2022).

72. Qi, F. *et al.* ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6 differ in their regulation of biological functions via the specificities for the α2,3-sialylation of target proteins. *The FASEB Journal* **34**, 881–897 (2020).

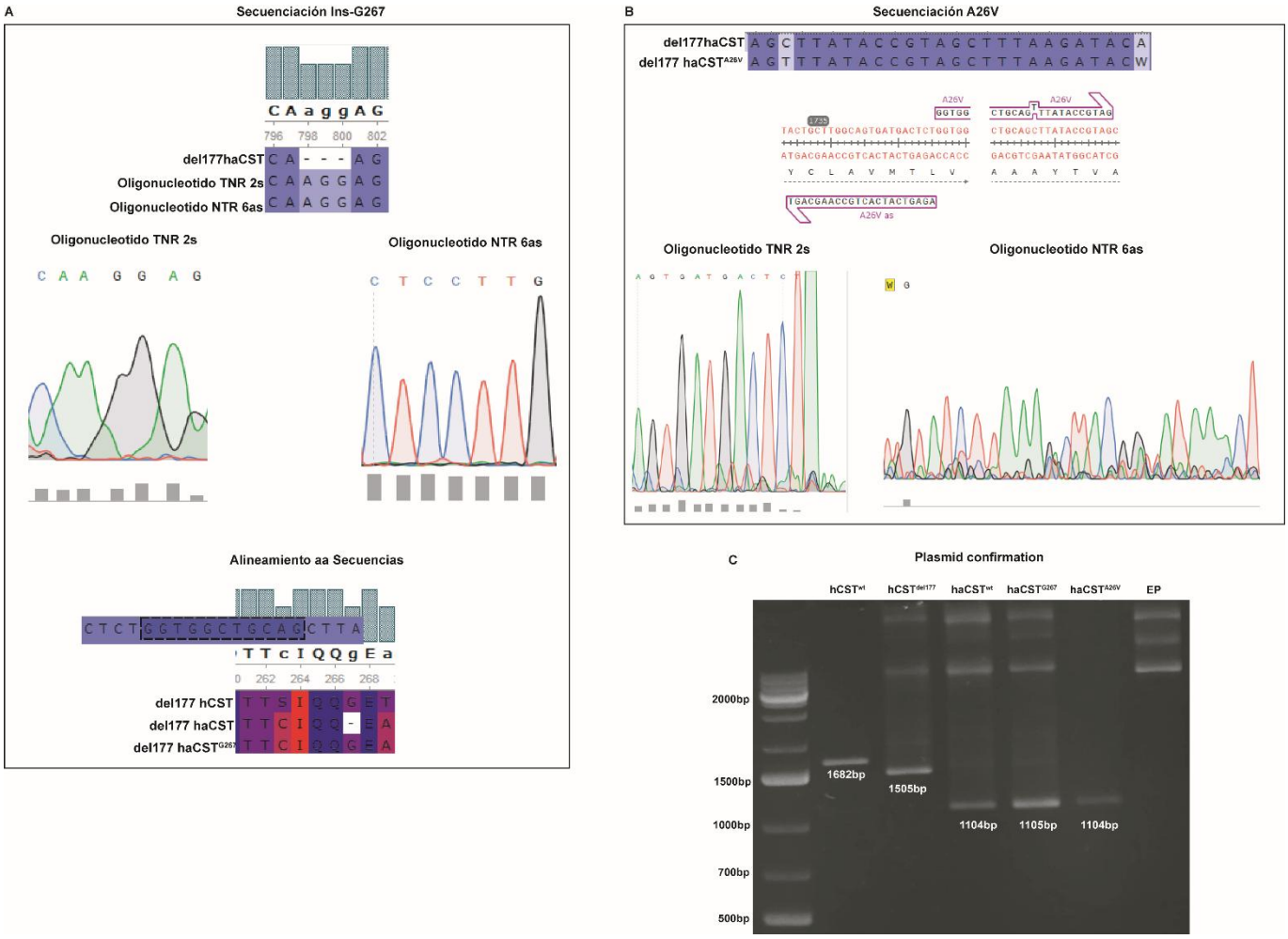
73. Maggioni, A. *et al.* Characterisation of CMP-sialic acid transporter substrate recognition. *ChemBioChem* **14**, 1936–1942 (2013).

74. Eckhardt, M. & Gerardy-Schahn, R. Molecular cloning of the hamster CMP-sialic acid transporter. *Eur J Biochem* **248**, 187–192 (1997).

75. Yagi, H. *et al.* Deciphering the sub-Golgi localization of glycosyltransferases via 3D super-resolution imaging. *Cell Struct Funct* **49**, 47 (2024).

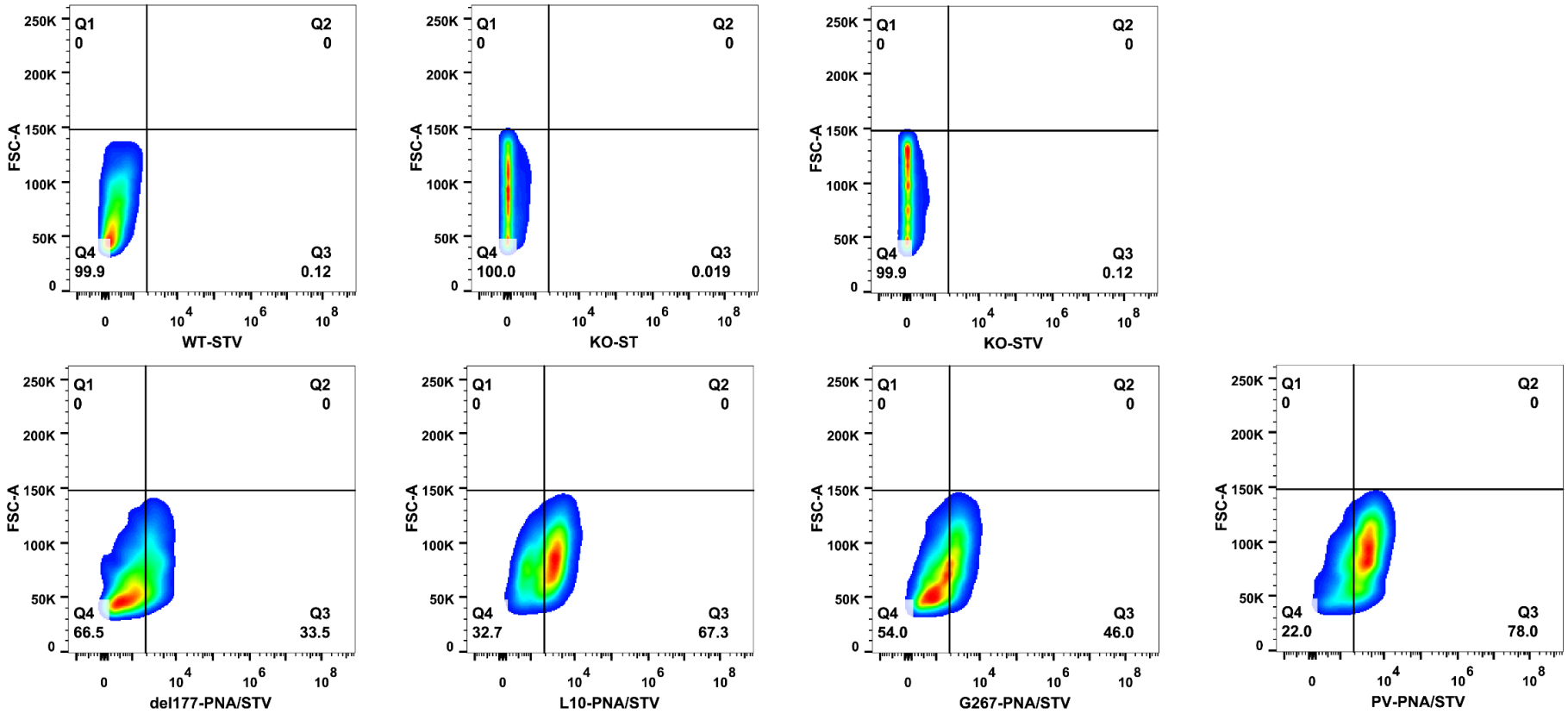
11. ANEXOS

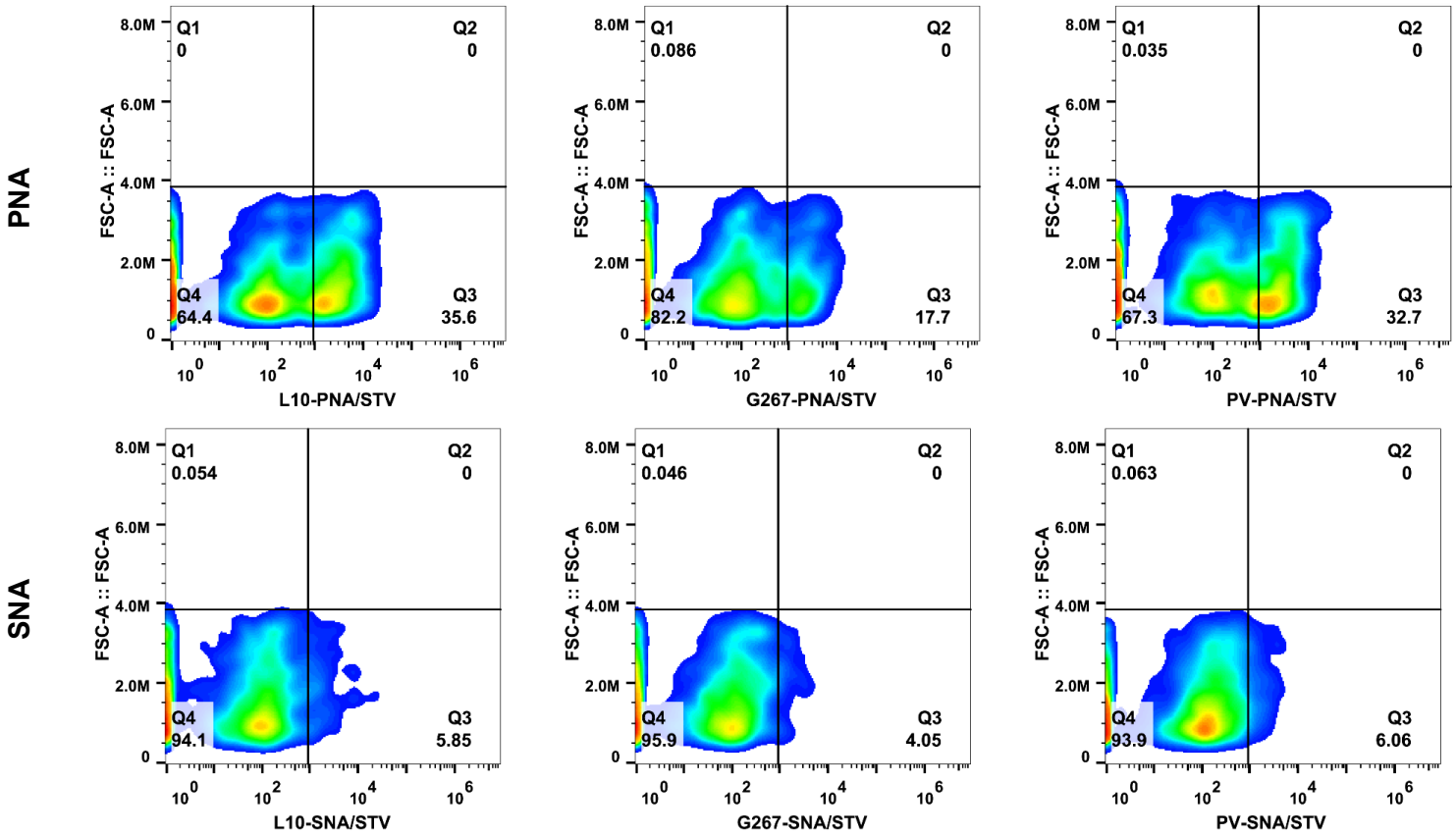
11.1. Secuenciación de las mutantes Ins-G267 y A26V

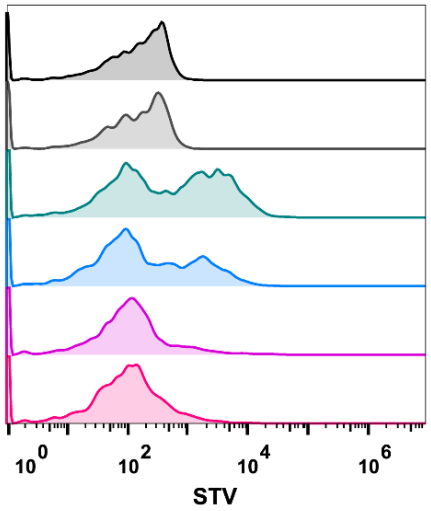


Anexo 1. *Secuenciación de las mutantes Ins-G267 y A26V: A) Muestra la secuenciación de Sanger y la calidad de la adición de codón AGG para generar la inserción de una glicina en la posición 267 en el haCST del177. B) Secuenciación de Sanger donde se muestra el cambio puntual C>T para realizar la modificación de la Ala26Val, así como la calidad de la secuenciación. C) PCR de la amplificación de los diferentes plásmidos utilizados para la transfección en las células HEK293T^{KO}.*

11.2. Análisis de la unión de PNA de la mutante G267 en células HEK293T^{KO} comparada con células L10 y HEK293T^{del177}



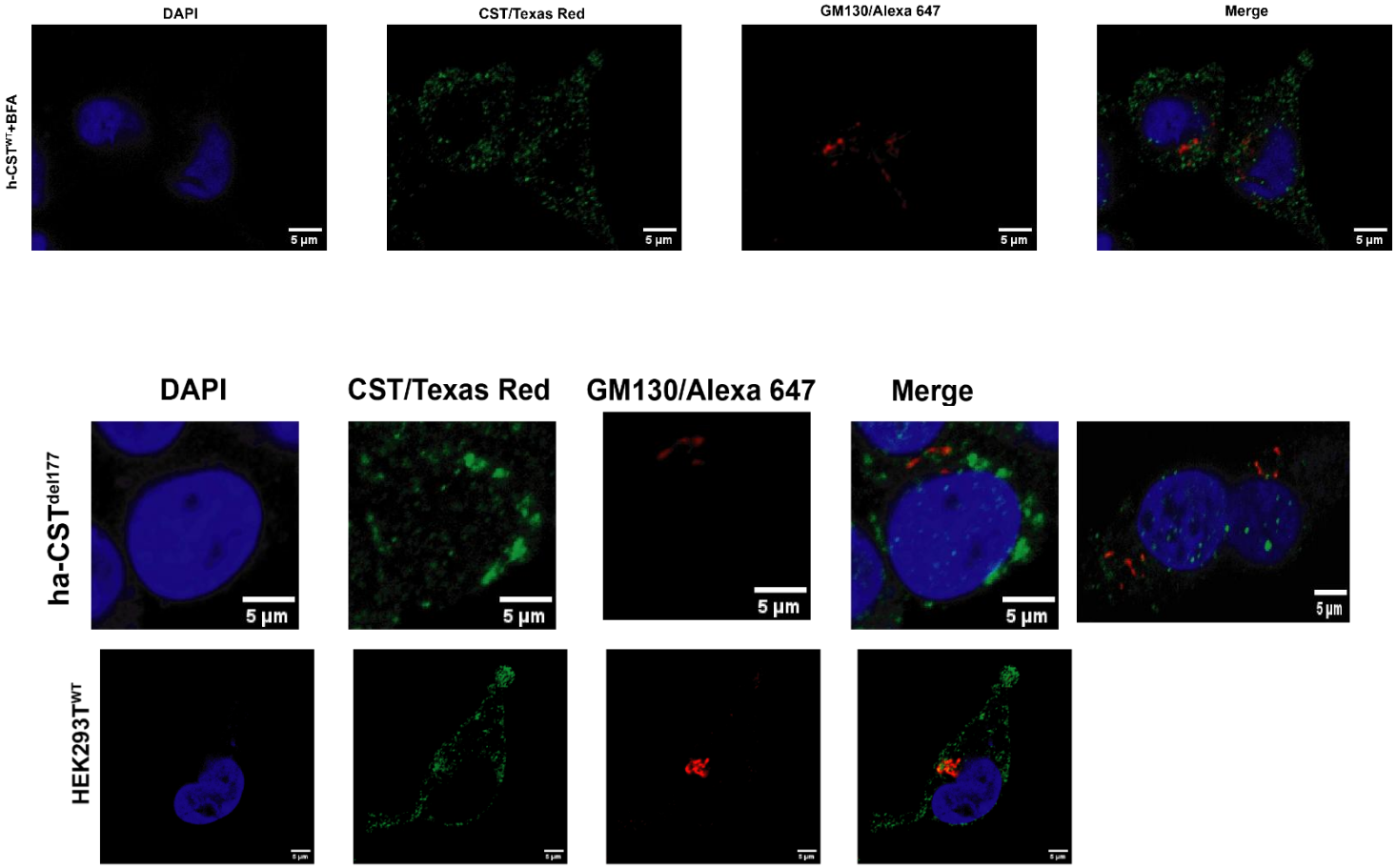

PNA
SNA
FSC-A :: FSC-A
8.0M
6.0M
4.0M
2.0M
0
Q1
0
Q2
0
Q4
64.4
Q3
35.6
L10-PNA/STV
Q1
0.086
Q2
0
Q4
82.2
Q3
17.7
G267-PNA/STV
Q1
0.035
Q2
0
Q4
67.3
Q3
32.7
PV-PNA/STV
Q1
0.054
Q2
0
Q4
94.1
Q3
5.85
L10-SNA/STV
Q1
0.046
Q2
0
Q4
95.9
Q3
4.05
G267-SNA/STV
Q1
0.063
Q2
0
Q4
93.9
Q3
6.06
PV-SNA/STV



	Sample Name	Geometric Mean : RL1-A
	WT-ST	54.2
	WT-STV	49.3
	L10-PNA	145
	G267-PNA	39.3
	L10-SNA	28.0
	G267-SNA	24.5

Anexo 2. *Análisis de la unión de PNA de la mutante G267 en células HEK293T^{KO} comparada con células L10 y HEK293T^{del177}: En el primer dot plot podemos observar cómo es que las células HEK293T^{G267} disminuyen su unión a PNA en comparación con las células L10. Así mismo se puede ver que presenta solo un 10% más de PNA que las células HEK293T^{del177}. El segundo dot plot muestra la comparación de SNA y PNA, en donde se observa que a pesar de que las células HEK293T^{G267} presentan una disminución de PNA no muestran un aumento de SNA. El histograma muestra la media geométrica de la IMF, donde se observa una menor fluorescencia de PNA en comparación con las células L10. Sin embargo, el SNA es muy similar al de estas células.*

11.3. Comparación del estrés de Golgi mediante BFA vs un CST no funcional



Anexo 3. *Comparación del estrés de Golgi mediante BFA vs un CST no funcional: El primer panel muestra una microscopía confocal de células HEK293T wt que han estado incubadas 48h con Brefeldina (BFA), donde se muestra una disgregación de GM10 y del CST. El panel de abajo muestra la comparación de células HEK293T^{KO} transfectadas con el haCST^{del177}, mostrando una estructura similar a las células wt+BFA, mientras que las células HEK293T^{WT} presentan una organización y clustering de GM130 y un rearreglo del CST en la periferia de la célula, dejando ver que una glicosilación aberrante es similar al daño causado por BFA.*

11.4. Actividades académicas

Anexo de Actividades académicas

Fecha y locación	Evento	Participación	Reconocimiento
30 oct – 20 sept 2020, UAEM, Mor, Mex	Structural biology simposium	Presentación poster	Diploma
9-12 nov 2020, Phoenix, AZ, USA	2020 ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR GLYCOBIOLOGY	Presentación poster	Memorias
17-19 enero 2023, Max Planck Institute, Berlin, Alemania	GlycoBiotec 2023	Presentación poster	Memorias
3-6 oct 2023, Online	7th Latin American Glycobiology congress	Presentación poster	Diploma
1-2 mayo 2024, Athens, GA, USA	2024 Glycosicnce simpossium	Presentación Oral	Memorias
26-27 Sep 2024, Milwaukee, Wi, USA	2024 Translational Glycomics Symposium	Presentación poster	Travel Award

ACS OMEGA

Open Access

This article is licensed under CC-BY-NC-ND 4.0

http://pubs.acs.org/journal/acsodf

Article

Structure–Function Relationships of the CMP-Sialic Acid Transporter through Analysis of a Pathogenic Variant in an Alternatively Spliced Functional Isoform

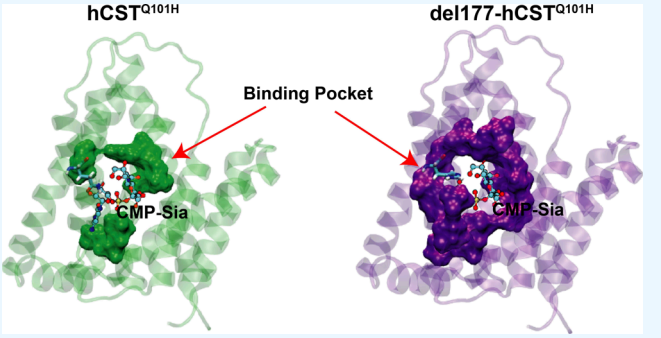
Brenda I. Velázquez-Dodge, Marco A. Ramírez-Martínez, Nina Pastor, Iván Martínez-Duncker,* Yobana Pérez-Cervera, Héctor M. Mora-Montes, Blanca E. Domínguez-Mendoza, and Roberta Salinas-Marín*

Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 50622–50633

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: The human CMP-sialic acid transporter (hCST) is a mammalian highly conserved type III antiporter that translocates CMP-sialic acid into the Golgi lumen, supporting sialylation. Although different works have focused on elucidating structure–function relationships in the hCST, this is the first study to address them in an alternatively spliced isoform. We have previously reported the expression of a functional human del177 isoform that has skipping of exon 6, resulting in a loss of 59 amino acids, without change in the open reading frame and conserving its C-terminal region. To elucidate structure–function relationships, we interrogated this isoform with a known pathogenic variant c.303C>T (p.Q101H) for the *wt* isoform, showing that its pathogenicity is significatively reduced in the mutated del177 isoform (del177^{Q101H}). This is further explained by using a homology model based on previously reported mouse and maize crystal structures.



INTRODUCTION

Sialylation is terminal glycosylation where sialic acid (Sia) residues can be linked in an α2,3- or α2,6-glycosidic covalent bond to galactose (Gal) moieties, in an α2,6 bond to N-acetylgalactosamine (GalNAc) residues, and in an α2,9- or α2,8-bond to another Sia residue at the outer end of glycans. Sialylation plays a crucial role in multiple biological functions in both health and disease.[1−4] Sialic acids are a family of negatively charged nonuloses with highly variable chemical structures and widely distributed in vertebrates; the N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) is the main form found in humans. Sia coupled to CMP (CMP-Sia) is the donor substrate of sialyltransferase enzymes necessary to carry out the sialylation of proteins, lipids, or RNA.[5−8]

The human CST (hCST) is a 337 aa, ten transmembrane domain (TMD) protein responsible for internalizing CMP-Sia into the Golgi lumen, and it is encoded by *SLC35A1*.[9−11] Over the years, the functional mechanism of hCST has been described through several strategies, including punctual mutations and chimeras. A major advancement in the structural comprehension of the hCST was the elucidation of the crystallographic structure of the mouse transporter (mCST) reported in 2019, opening a window to explore different aspects of the hCST, including pathogenic variants and their impact on protein structure/function.[9,12,13] Also, clinical and functional data have been obtained through studies in patients affected by pathogenic variants in *SLC35A1* that cause the congenital disorder of glycosylation (CDG), SLC35A1-CDG. SLC35A1-CDG is mainly characterized by neurological and development delay, hypotonia, coagulation defects or macrothrombocytopenia, neutropenia, and a deficit of sialyl-Lewis-X antigen on the surface of neutrophils.[14,15]

Martinez-Duncker et al. reported the first patient affected by SLC35A1-CDG and described the presence of alternative splicing of the hCST including the del130 (227 amino acids), del244 (189 amino acids), del290 (65 amino acids), and del177 (278 amino acids) isoforms. Afterward, Salinas-Marín et al. showed that even though the human del177 (del177-hCST) isoform loses 177 bp corresponding to exon 6, related to TMD 7 (V208–G217 stretch),[14,16,17] it remains functional, in contrast to the hamster del177 (haCST) isoform expressed in CHO mutant cells, namely, Lec2, characterized by deficient CMP-Sia transport (*Cricetulus griseus*; del177-haCST).[18−20]

Received: September 14, 2024
Revised: October 24, 2024
Accepted: November 14, 2024
Published: December 13, 2024



Downloaded via UNIV AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS on February 17, 2025 at 17:14:42 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

© 2024 The Authors. Published by American Chemical Society

Further SLC35A1-CDG cases have been reported, including a female with a homozygote c.303G>C (p.Q101H; NM_006416.5) missense mutation in *SLC35A1* localized in TMD3 of the hCST that clinically presented with delayed psychomotor development, behavioral problems, microcephaly, dysmorphic facial features, reduction of some coagulation factors, and dying at the age of 22 years due to respiratory failure.[21] The Q101H pathogenic variant did not affect Golgi localization, but its transporter activity was reduced by 50%.[21]

The overexpression of Q101H hCST in SLC35A1-deficient cells restored sialylation of O-glycans epitopes but not N-glycan sialylation.[22] Dimerization analysis of the Q101H variant using the NanoBiT approach suggested that Q101H alters hCST dimerization. Interestingly, this variant partially rescued the sialylation defect in *SLC35A1* knockout cells, suggesting the possibility that hCST works in monomeric and dimeric conformations because, apparently, dimerization may not be strictly required for its transport activity.[23] Based on the crystal structure of mCST, homology modeling revealed that the Q101H variant loses interaction with the CMP-Sia substrate. Supporting this hypothesis, Li et al. proposed that the Q101 residue is positioned in the middle pockets of the transporter cavities, affecting its interaction with the phosphate group of CMP and consequently the internalization of the substrate.[24]

This work aimed to obtain novel structural information to explain the functionality of del177-hCST by assessing the impact of the p. Q101H (del177-hCST^{Q101H}) compared with the mutated full-length hCST (hCST^{Q101H}).

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture. The HEK293T wild-type (HEK293T^{WT}) and knockdown (HEK293T^{KO}) cell lines were obtained by Antje Banning and Ritva Tikkanen's working group (University of Giessen faculty of medicine Giessen, Germany) and kindly donated to our laboratory.[25] Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Genotyping and Phenotyping of HEK293T^{KO} Cells. HEK293T^{KO} cells were analyzed by RT-PCR using Taq DNA polymerase (#EP0401, Thermo Fisher Scientific) to identify mutant *SLC35A1* gene expression. Analysis was made using forward TRN-2s 5′-GAACCATGGCTGCCGAGAGAGAC-3′ and reverse NTR-4as 5′-GGAAAGGA-CAATGGCCGCTGCTGCTGC-3′ primers. PCR products were analyzed in melt agarose, and a lower size band than the *wt* of *SLC35A1* was purified and Sanger sequenced (Figure S1). Furthermore, HEK293T^{KO} cells and HEK293T^{WT} (used as the control) were permeabilized with a Cytofix/Cytoperm kit (no. 554714, BD) following the manufacturer's protocol. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with anti-SLC35A1 antibody (#ab230196, Abcam) at 0.05 μg/mL. As the permeabilization control, we used an antitubulin DM1A antibody (#62204, Thermo Fisher Scientific) at 0.05 μg/mL and Alexa flour 647 goat antimouse as the secondary antibody. In addition, staining with biotinylated *Sambucus nigra* lectin (SNA, B-1305-2, Vector laboratories) was performed at 0.3 μg/mL, and cells stained were analyzed by flow (Figure S2).

Site-Directed Mutagenesis of c.303 G > C in SLC35A1. The vector Topo 3.3 TA (K8300−01, Life Technologies) was used to clone *wt* and del177 isoforms from SLC35A1 according to Salinas-Marín.[16] Site-directed mutagenesis of c.303 G > C (Q101H) was made using Phusion Site-Directed enzyme (#F-541, Thermo Fisher Scientific). PCR amplicons were obtained using primers forward Mut-RSM5:5′-GTG TAT GCT GTT CAC AAC AAC ATG GCT T-3′ and reverse MUT-RSM3:5′-TAA CGA TGG CAC ACT TAA CTT CAA CAG TTC-3′, where the forward oligonucleotide carries punctual mutation. Thermocycling conditions of PCR were as follows: initial denaturation step at 98 °C for 30 s, 30 cycles of amplification at 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 5 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products (5 μL) were ligated with the T4 ligase enzyme (EL0012, Thermo Fisher Scientific).

Chemicompetent, match-one clones (*Escherichia coli*) were transformed by heat shock and plated on selective LB agar plates. Positive clones were screened by conventional PCR with the oligonucleotides forward TRN-2s 5′-GAAC-CATGGCTGCCGAGAGAGAC-3′ and reverse NTR6-as 5′-GGAAAGGACAATGGCCGCTGCTGC-3′. Mutant constructions were sent for sequencing either on purified DNA and after confirmation by PCR-ARMS with the trioligonucleotide system forward 5′-GCTAGGAAAGCCATGTTGTTC-3′, normal reverse 5′-GCTAGGAAAGCCATGTTGTTC-3′, and the reverse oligonucleotide including punctual mutation 5′-GCTAGGAAAGCCATGTTGTTG-3′. Sanger sequencing results were analyzed by the Snap Gene Viewer obtaining WT^{Q101H} and del177^{Q101H} constructions.

Transfection of HEK293T^{KO} Cells and Antibiotic Selection. The HEK293T^{KO} cell is a model with a deficiency of sialic acid residues on the cell's surface. 24 h before transfection, cells were seeded onto 24-well plates. Transfection of WT, del177, WT^{Q101H}, and del177^{Q101H} constructions was done using 3 μL of lipofectamine 2000 (#1668019, Thermo Fisher Scientific) and 2 μg of plasmid diluted with a DMEM medium free of serum and antibiotic in a 200 μL final volume. Thus, cells were incubated for 24 h, supplemented with 300 μL of DMEM medium with 10% FBS, and incubated for 48 h. Cell selection was performed by Geneticin G418 (#4727878001, Roche potency 892 μg/mg) at 2 mg/mL for 7 days. Then, total RNA was isolated using the Trizol reagent from the selected cells, and cDNA was synthesized from 2 μg of the total RNA. Finally, normal and mutated transcripts overexpressed were analyzed by PCR-ARMS, as explained above (Figure S3).

Cytotoxicity Assay by RCA-I Lectin. After 7 days of Geneticin selection, HEK293T^{KO} transfected cells with WT, del177 constructions, and their mutated counterparts WT^{Q101H} or del177^{Q101H} were seeded into 96-well plates for 24 h and exposed to 10 ng/mL *Ricinus communis* Agglutinin lectin (RCA-I, Vector Laboratories, Inc.) for 48 h, and cell proliferation was measured through the MTT assay. For the MTT assay, 5 μg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide was diluted in PBS, and 10 μL of MTT solution was added to cells grown on 100 μL of DMEM medium and cells were incubated for 4 h under conditions described above. After that, we added 150 μL of MTT solvent (4 mM HCl/isopropanol, v/v) into each well, and the plates were incubated for 10 min at 37 °C under agitation. Then, the absorbance was measured on a Spectra Max M5 (Molecular devices) at 590 nm.

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

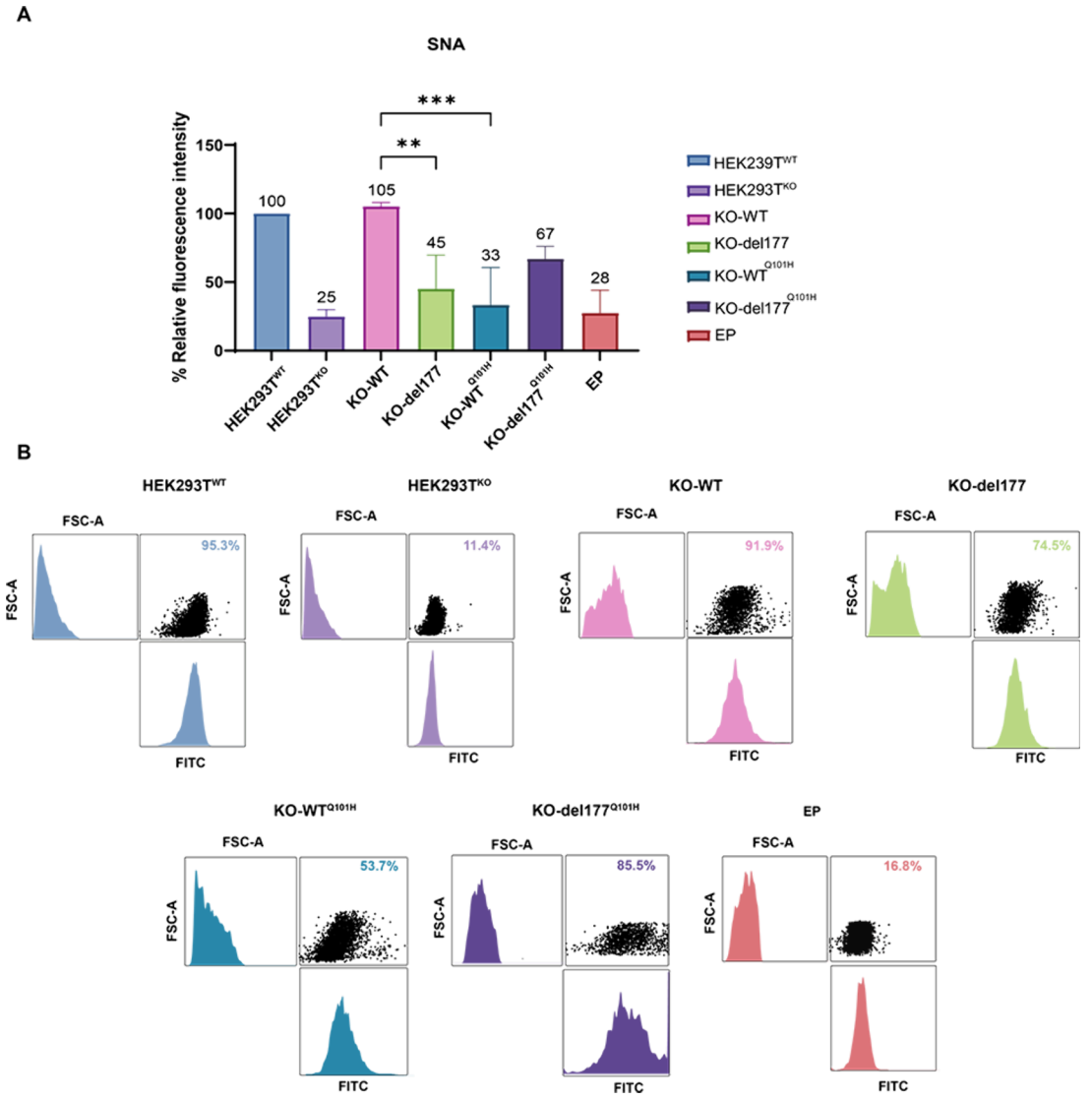


Figure 1. Analysis of SNA lectin cell surface binding by flow cytometry. (A) Graph of the relative fluorescence intensity corresponding to SNA lectin binding in transfected cells, normalized to levels of HEK293T^{WT} cells. The relative fluorescence intensity from SNA reactivity was not significantly different between the KO-del177^{Q101H} and KO-WT cells. Furthermore, KO-del177^{Q101H} showed significantly improved SNA binding concerning KO-WT^{Q101H} cells. (B) Representative cytometry histograms of percentages of SNA-positive cells. The horizontal axes show the fluorescence intensity of SNA lectin conjugated to FITC, while the vertical axes show the morphology in forward scatter. Figure S4 shows the percentage of cell positives for SNA lectin. n = 3, mean ± , ***p < 0.05. EP = HEK293T^{KO} cells transfected with an EP.

Lectin Staining. The HEK293T^{KO} cells were transfected with the *wt* hCST isoform (KO-WT), the del177-hCST isoform (KO-del177), as well as the mutated Q101H wild-type variant (KO-WT^{Q101H}) or the mutated Q101H del177 (KO-del177^{Q101H}) isoform. These cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and stained with 13 μg/mL SNA (FL-1301−2, Vector Laboratories) coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) diluted in a DMEM medium. Lectin-labeled samples were assessed by flow cytometry (Facs Canto II BD) and analyzed by Flow Jo V10 software.

Immunostaining Microscopy. Transfected and selected cells mentioned above were seeded in 8-well μ-slide microscopy chambers (80806, Ibidi) and permeabilized for 5 min with PBS supplemented with 0.05% triton X-100. After that, cells were fixed with 4% PFA for 30 min at 4 °C, three washes were performed with PBS, and blocking was made with 5% bovine serum albumin (BSA) for 1 h. Anti-TGN 46 antibody (ab2809, clone 2F7.1, Abcam) was used to label TGN using 2 μg/mL, and GM130 antibody (ab169276, Abcam) at 7 μg/mL was employed to stain Cis-Golgi incubating cells overnight at 4 °C. Secondary antibodies employed were antimouse IgG1-PE/CY7 (no. 406613, BioLegend) for TGN46 or antimouse IgG-Alexa 647 (ab150107, Abcam) for GM130 diluted in 5% BSA, and cells were incubated for 1 h at room temperature (RT). The hCST was marked with the anti-SLC35A1 antibody at 0.05 μg/mL for 2 h at RT and contra-stained with the antirabbit-Texas Red antibody (T-2767, Thermo Fisher Scientific) at 4 μg/mL for 1 h at RT. Confocal images were acquired with a Nikon A1R+ laser scanning confocal head coupled to an Eclipse Ti-E inverted microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a motorized stage (TI-S-E, Nikon) and controlled through Nis Elements C v.5.00 software located at Unidad de Microscopía IIBO-UNAM, RRID:SCR_022204. Cells were analyzed under an Apo TIRF 100X Oil DIC N2 (N.A. 1.49); single plane images were sequentially captured

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

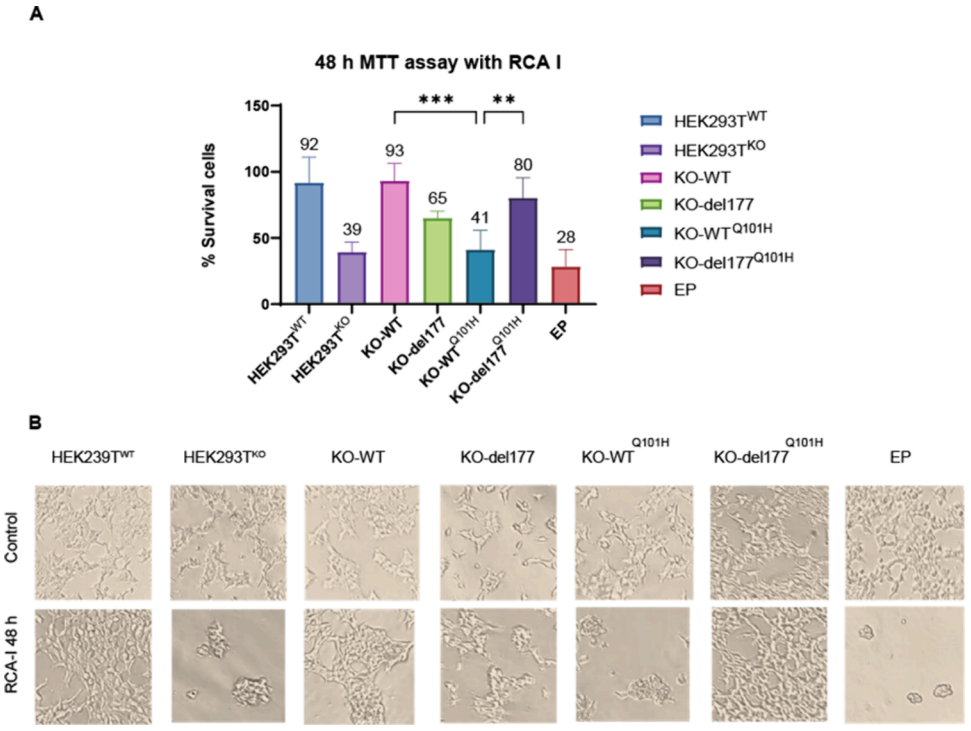


Figure 2. Cytotoxicity assay with RCA-I lectin. (A) The absorbance was measured 48 h after exposition to RCA-I lectin, where KO-WT^{Q101H} cells showed less proliferation compared to KO-WT and KO-del177^{Q101H} cells. HEK293T^{WT} cells were used as a positive control, HEK293T^{KO} cells were used as a negative control, and HEK293T^{KO} cells were transfected with an EP as a transfection control. For absorbance analysis, a one-way Brown−Forsythe ANOVA test and Tukey's multiple comparisons test were used. $n = 4$, ****$p < 0.05$. (B) Micrographs were taken at 10X resolution, and cell morphology was contrasted with that of cells transfected without RCA-I (control) treatment.

using standard galvanometric scanners, excitation wavelengths of 405 (2 mW), 561 (2.2 mW), and 647 (17.1 mW) with AOTF modulation, the pinhole aperture set at 76.63 μm, and both standard and GaAsP detectors, including a transmitted light one, and analyzed by Fiji: ImageJ software.

Homology Models. Models were built in the AlphaFold 3 (AF3) server[26] using the sequences for hCST and the del177-hCST variant from the UNIPROT databases P78382-1 and P78382-2, respectively.[27] This generated structures for the open conformation, akin to the model of CST from maize (CST_{ZM}), and in the partially closed conformation, 6OH3 was used for hCST, and the del177 variant was only retrieved in the open conformation. To obtain del177 models in a partially occluded conformation close to mCST, AF2 was used in conjunction with the mCST structure 6OH3[9] as a template. Given that AF3 and AF2[28] do not currently allow for arbitrary ligands in model building, coordinates for CMP-Sia were grafted onto each structure using the crystallographic structures of the mCST and CST_{ZM} (PDB ID 6OH3[9] and 6I1R,[29] respectively) as templates. As CST_{ZM} is bound to CMP only, the orientation of Sia was manually corrected to avoid clashes with the transporter helices by rotating around the phosphate-sialic dihedral angle. Parameters for CMP-Sia were obtained in the Charmm-gui server[30] with the ligand reader and the modeler tool[31] and the Charmm36m[32] force field. Mutants hCST^{Q101H} and del177^{Q101H} were constructed in the same server using the mutation tool[33] as a template for the AF2 and AF3 output models.

Structure Optimization. All structures (hCST, hCST^{Q101H}, del177-hCST, and del177-hCST^{Q101H}) in complex with CMP-Sia were submitted to the Charmm-gui server to add hydrogen atom coordinates and to generate the topology and parameter files needed for energy minimization. Energy minimization was performed in CHARMM48 software[34] with the Charmm36m[32] force field to remove steric clashes produced by grafting CMP-Sia onto the transporter structures. All atoms were kept fixed, except for those located 5.0 Å away from CMP-Sia. A first round of 100 steps for the hydrogen atoms only was carried out with the steepest descent, followed by 500 steps of conjugate gradient and by 500 steps of Adopted Basis Newton−Raphson (ABNR) minimization algorithms for all atoms in and around CMP-Sia. This was enough to achieve a convergence.

Ligand−protein interaction diagrams were analyzed with LigPlot+[35] using the default parameters (maximum distance hydrogen−acceptor = 2.7 Å, and maximum distance donor−acceptor = 3.35 Å). Structure visualization and rendering were done in the VMD 1.9.3 software.[36]

Statistical Analysis. Flow cytometry data were analyzed using GraphPrism9 software, and statistical significance was determined by the one-way Brown−Forsythe ANOVA test and Tukey's multiple comparisons test, using $p < 0.05$ as the significant value. The mean fluorescence intensities (MFIs) obtained from HEK293T^{WT} and HEK293T^{KO} cells were used as staining controls and were not considered in the multiple comparisons analysis to determine significance levels. The MFI was normalized by taking HEK293T^{WT} cells as 100% in three independent experiments. For the MTT assay, we used $n = 4$ with three internal replicates per experiment and a one-way Brown−Forsythe ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, using $p < 0.05$ as the significant value.

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

RESULTS

The Pathogenicity of the Q101H Variant Is Reduced in the del177 Isoform. To assess the pathogenicity of the Q101H variant, HEK293T^{KO} cells were used. These cells have a defect in the transport of sialic acid compared to HEK293T^{WT} cells and are characterized by a reduced sialophenotype previously reported.[25] The glycophenotype of cells transfected with the full-length wild-type transcript (KO-WT), the del177 isoform (KO-del177), the full-length wild-type transcript bearing the Q101H variant (KO-WT^{Q101H}), and the del177 isoforms bearing the Q101H variant (KO-del177^{Q101H}) was assessed by flow cytometry by measuring the surface binding of the SNA lectin that recognizes α-2,6 Sia residues. As expected, the HEK293T^{KO} cells showed a lower relative fluorescence (24.5% relative MFI with 11.4% positive cells) for SNA binding with respect to 100% MFI from HEK293T^{WT} (95.3% positive cells). Furthermore, cells transfected with an empty plasmid (EP) were considered as a negative control and exhibited similar relative fluorescence (27.5% relative MFI, $p < 0.00013$, and 16.8% positive cells) for SNA reactivity as HEK293T^{KO} cells (Figure 1).

KO-WT cells restored SNA binding to levels comparable to HEK293T^{WT} cells (105.2% relative MFI and 91.9% positive cells normalized to HEK293T^{WT} cells). In comparison, the KO-del177 cells showed improved SNA binding but to a lower degree (45.2% relative MFI, $p < 0.015$, and 74.5% positive cells) (Figure 1). The KO-WT^{Q101H} cells were also able to partially restore sialylation (33.4% relative MFI, $p < 0.0016$; with 53.7% positive cells), consistent with previous findings[21,23] (Figure 1). Interestingly, the KO-del177^{Q101H} cells showed 67% relative MFI and 85.5% SNA+ binding, indicating that this variant is not as pathogenic in the del177 isoform.

To further corroborate the reduced pathogenicity of the del177^{Q101H} isoform, HEK293T^{KO} transfected cells were exposed to the RCA-I lectin, and cytotoxicity was measured through the MTT assay.[37] This lectin has been previously used to isolate mutants from CHO cells lacking Sia because galactosylated epitopes for RCA-I are exposed. RCA-I binds to uncapped Gal or GalNAc residues of glycoconjugates attached to the cell membrane, resulting in a decreased expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and inhibition of glycopeptide synthesis, causing cell death.[38,39] As expected, the RCA-I lectin was highly cytotoxic for HEK293T^{KO} cells (39% survival rate) and EP cells (28%) compared to control HEK293T^{WT} cells (92% survival), which were resistant. Interestingly, the KO-del177^{Q101H} cells (80% survival rate) showed similar resistance as HEK293T^{WT} cells (93%, $p < 0.8780$), in contrast to the KO-WT^{Q101H} cells that presented a similar cytotoxicity (41%) as the HEK293T^{KO} cell. By MTT results, the KO-del177^{Q101H} cells showed a higher cell survival rate than the KO-del177 cells (65%, $p < 0.6580$), unlike KO-WT^{Q101H} cells that were not resistant to RCA-I treatment ($p < 0.0003$), (Figure 2A). Hence, the Q101H mutation presents a less severe effect in the del177 isoform compared with the WT.

Furthermore, micrographs of HEK293T^{WT} cells exposed to RCA-I lectin showed a healthy morphology while HEK293T^{KO} and EP cells showed stress like KO-WT^{Q101H} cells. In contrast, the KO-del177^{Q101H} cells showed a morphology like HEK293T^{WT} and KO-WT cells (Figure 2B). Surprisingly, the KO-del177^{Q101H} cells were observed to be healthier than the KO-del177 cells.

The del177^{Q101H} Does Not Affect Golgi Localization or Structure. In previous reports, it was shown that Q101H hCST correctly localizes in the Golgi.[24] To corroborate whether this also occurred with KO-del177^{Q101H}, we examined its localization by confocal microscopy using the TGN46 antibody that labels the *trans*-Golgi network integral membrane protein 2 (TGN). We found that KO-del177^{Q101H} cells properly colocalized with the TGN46 as did KO-WT, KO-del177^{Q101H}, and KO-WT^{Q101H} cells (Figure S5).

To further probe the status of the Golgi, we performed immunostaining of GM130 (red; cis-Golgi marker) in cells transfected with the different isoforms.[40−43] Additionally, we analyzed the distribution of hCST (green) in *wt* and mutant cell lines. As expected, the variants did not colocalize with the cis-Golgi compartment. Following the micrographs, HEK293T^{KO} cells showed a disaggregated and unlinked appearance of the GM130 protein and disorganized localization of the hCST compared with the compact composition and organized pattern of GM130 and hCST observed in HEK293T^{WT} cells. Furthermore, KO-WT and KO-del177 cells displayed tight-packed GM130 situated close to the nucleus, restoration of disturbed Golgi, and organized localization of hCST as well as HEK293T^{WT} cells. In addition, KO-del177^{Q101H} cells exhibited noticeable compaction of GM130 and a restored hCST localization compared to KO-WT^{Q101H} cells that displayed a slightly less rounded localization of GM130, and the hCST was loczalised in a kind of cluster that was less evident in KO-del177 cells (Figure 3).

The del177-hCST Retains the Sialic Acid Cavity. A homology modeling was performed to explain how the CMP-Sia substrate might be interacting with binding cavities of the del177^{Q101H} isoform and how these interactions could favor the increase of sialic acid in cells transfected with this variant. Inspection of the models produced by AF3[26] revealed two main conformations for the hCST. One structure corresponds to a closed conformation on both sides of the transporter, as in the mCST structures,[9] while the other structure is in an outward-facing conformation, as in the CST$_{ZM}$ crystal structure.[29] Both conformations differ in the conformation of the core helices and show a different position of the binding cavity toward the substrate, where a closed conformation recognizes the CMP-Sia with a cavity oriented in the middle. In contrast, the outward-facing conformation has an external cavity recognizing the CMP. The hCST and del177-hCST models were grafted using these two positions (Figure 4).

As previously described, the del177-hCST variant is functional despite losing 59 residues (192 aa-251 aa). AF3 model building of the del177 variant resulted in structures compatible with an outward-facing conformation as in CST$_{ZM}$. Furthermore, the CMP-Sia substrate fits in the same interaction cavity as that in the full or hCST version. Since AF3 retrieved two different conformations for hCST, we built the partially occluded conformation of the del177-hCST isoform. As AF3 does not allow for template-target modeling, we used AF2 with the 6OH3 crystal structure as a template.

A comparison of the hCST and del177-hCST transporters reveals that the overall structure remains unchanged. Furthermore, truncation of hCST leads to the loss of the C-terminal fragment of TMD6 from residues 192 to 196, the entire TMD7 from residues 210 to 228, and the N-terminal fragment from residues 244 to 250 of TMD8 (Figure 5). These structural elements are close to the CMP-binding pocket, but the truncated transporter retains the sialic acid cavity. The

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

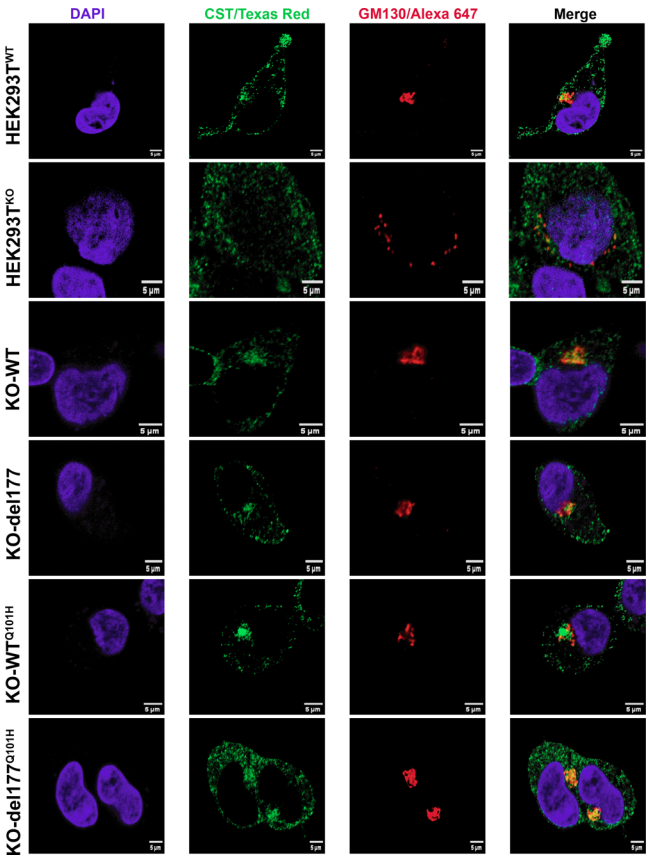


Figure 3. Confocal microscopy was employed to visualize GM130 in cells overexpressing the hCST isoforms in HEK293T^{KO} cells. The cis-Golgi was specifically labeled using a GM130 antibody (red), while hCST was visualized with an anti-SLC35A1 antibody (green). Observations were made in KO-WT, KO-del177, KO-WT^{Q101H}, and KO-del177^{Q101H} cells, comparing the GM130 structure concerning HEK293T^{KO} cells. In KO-WT and KO-del177^{Q101H} cells, Golgi morphology restoration was evident compared to HEK293T^{KO} cells. However, GM130 was observed disturbed in KO-WT^{Q101H} cells, and hCST protein was detected as a cluster. Micrographs were obtained on a Nikon A1R+ STORM confocal microscope with a 100x objective. Cell nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole. Scale bar is 5 μm.

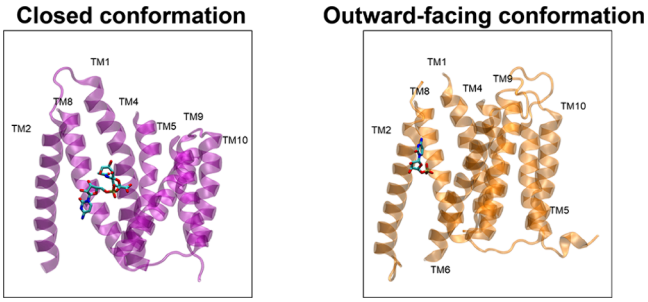


Figure 4. Different conformations of hCST transporters bound to CMP and the CMP-Sia substrate. Crystal structures for mCST (6OH3) and CST$_{ZM}$ (6I1R) are shown in purple and orange, respectively. TMDs 3, 6, and 7 are hidden for clarity. Models for the hCST and del177-hCST isoforms used these two structures as templates.

interactions that ensure transport selectivity remain unchanged too, with specific residues reading both the cytosine and the sialic acid moieties.

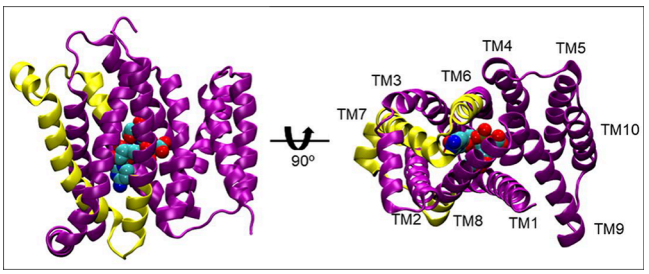


Figure 5. Missing region in the del177-hCST isoform. Front view of the mCST transporter; the residues lost by truncation are shown in yellow. A 90^o upward turn shows the bottom view of the transporter; each TMD is indicated. CMP-Sia is shown in a space-fill representation.

CMP-Sia Interacts with hCST-del177^{Q101H} in an hCST-like Fashion. To investigate the effect of deletion and the effect of the point mutation Q101H on its interaction with the ligand, we constructed protein−ligand interaction maps for all complexes and mutants. Protein−ligand interaction maps were built in LigPlot+,[35] using the CMP-Sia of the mCST transporter as a common reference. When CMP-Sia is in a mouse-like position in the hCST, it is stabilized by several interactions, all of them reported in previous publications as important for function.[9,29,44] In both hCST and hCST^{Q101H}, N3 and C4-amine in the cytosine are recognized by Y214 and N210, conferring selectivity for cytosine over uracil. These residues are lost in the del177-hCST isoform, but their interactions could be compensated by a H-bond interaction between the C4-amine in the cytosine and the aromatic ring of Y259, reminiscent of a cation−pi interaction (Figure 6).

Residues Q101 and Y121 read out two CMP-Sia regions, engaging one oxygen of the phosphate group and one from the sialic acid through H bonds. These interactions are reduced to only one hydrogen bond in the Q101H point mutant in the hCST^{Q101H} variant. To determine the importance of these interactions, SNA lectin binding restoration assays were carried out in hCST-deficient cells by complementation with different variants from hCST. Taking the rescue afforded by the *wt* hCST transporter as 100%, hCST^{Q101H} partially restores function with ∼33% hCST activity. Surprisingly, del177-hCST^{Q101H} is better at restoring SNA lectin binding, with ∼67% hCST activity, compared to del177-hCST with ∼45% activity. The higher activity of del177-hCST^{Q101H} could be explained in terms of H101 and Y121 creating a hydrogen-bond network that resembles the interactions seen in the hCST transporter, as shown in Figure 6. Despite having similar interactions, the reduction of the hydrogen-bond network leads to decreased activity (Figure 6). It is interesting to notice that not only the number of interactions is important but also the identity of these interactions plays a role in determining function. Our models suggest that reducing the number of hydrogen bonds to the phosphate group and sialic acid moieties is related to reduced SNA lectin binding restoration. This behavior could be explained by fewer interactions, which lead to the ligand not being read in the right position.

On the other hand, when we analyzed the interactions of CMP-Sia in a maize-like position, we noticed that the position of the cytosine moiety is pointing toward outside the transporter, and it is mainly stabilized by VdW interactions. Although residues N102, K55, Y214, K272, and Y98 are the only contacting shared residues between the two positions,

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

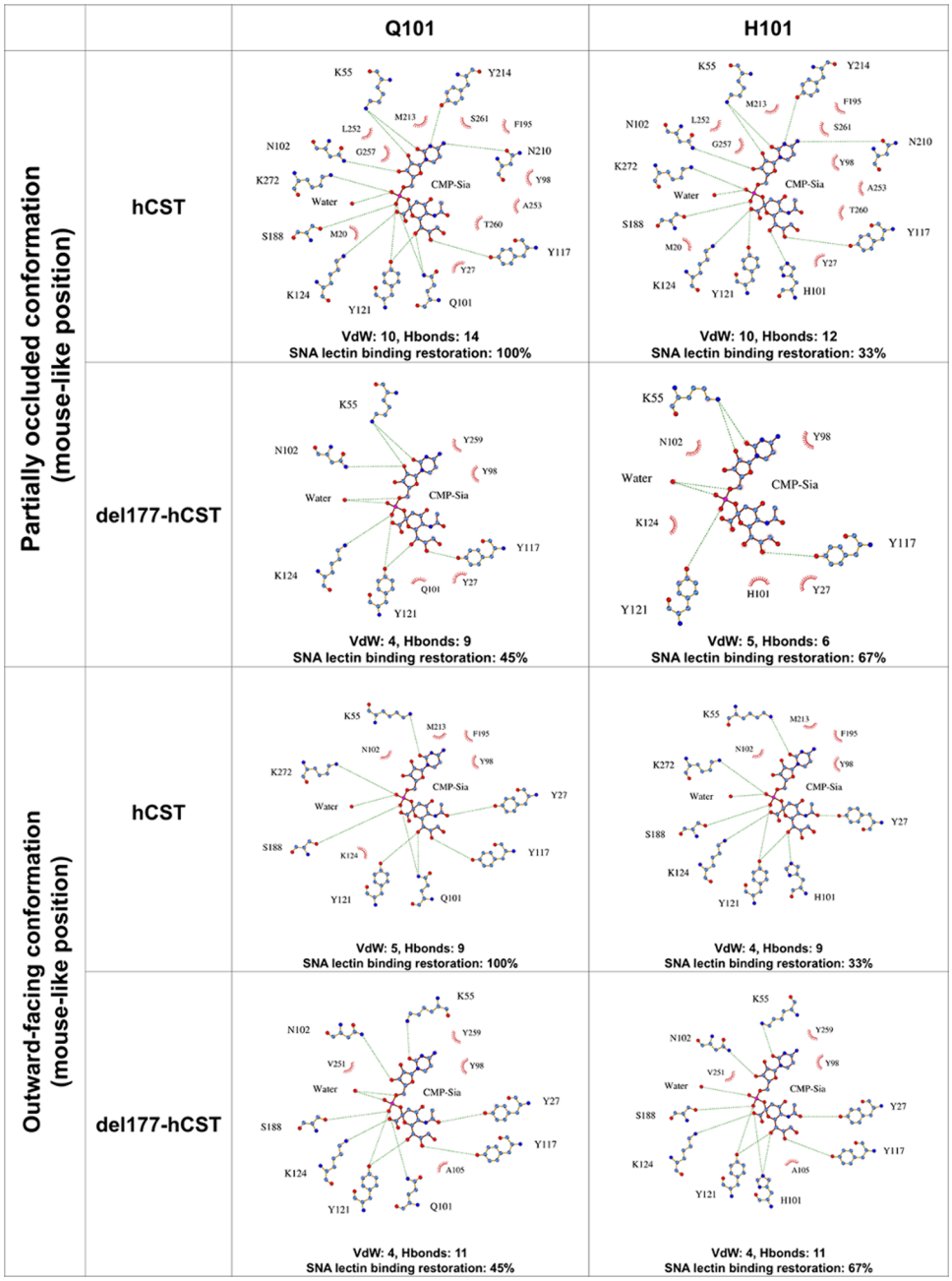


Figure 6. Protein−ligand interaction maps of CMP-Sia in the mouse-like position. Each row shows the hydrogen bonds and van der Waals (VdW) interactions for the Q101 and H101 point mutations for the hCST and the del177-hCST isoform. On the bottom of each panel, the total number of H bonds and VdW interactions are shown as well as SNA lectin binding restoration percentages. For each map, the model engaging in more interactions is shown.

these residues show H-bonding with different moieties compared to the mouse-like position (Figure 7).

All models with CMP-Sia in a maize-like conformation failed to engage in hCST-like interactions, as seen previously (Figure 6). This behavior might be explained by the upward position and the inversion of the ligand, which leads to a loss of H-bonding interactions. Also, residue Q101 and the point mutation Q101H are far from CMP-Sia in both conformations (partially occluded and outward-facing conformation). This suggests that the effect of the Q101H mutation happens only in the partially occluded and inward-facing conformations (Figure S6).

DISCUSSION

The hCST functions as an NST for transporting CMP-Sia through an antiporter mechanism. It can also act as a uniporter, being temperature sensitive and behaving as a saturable system.[29,45−47] Over the years, function−structure relationships have been proposed by site-directed mutagenesis, epitope insertion,[12] and chimeras with UDP-Gal transporter, and recently, a mouse crystal model has been proposed.[48−50] These experiments have provided important details about CST, including that it is highly specific for its substrate CMP-Sia/CMP with a higher affinity for CMP.[9,51] However, this theory may be discarded because CST is also capable of recognizing CDP-Ribitol, suggesting an ability to translocate

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

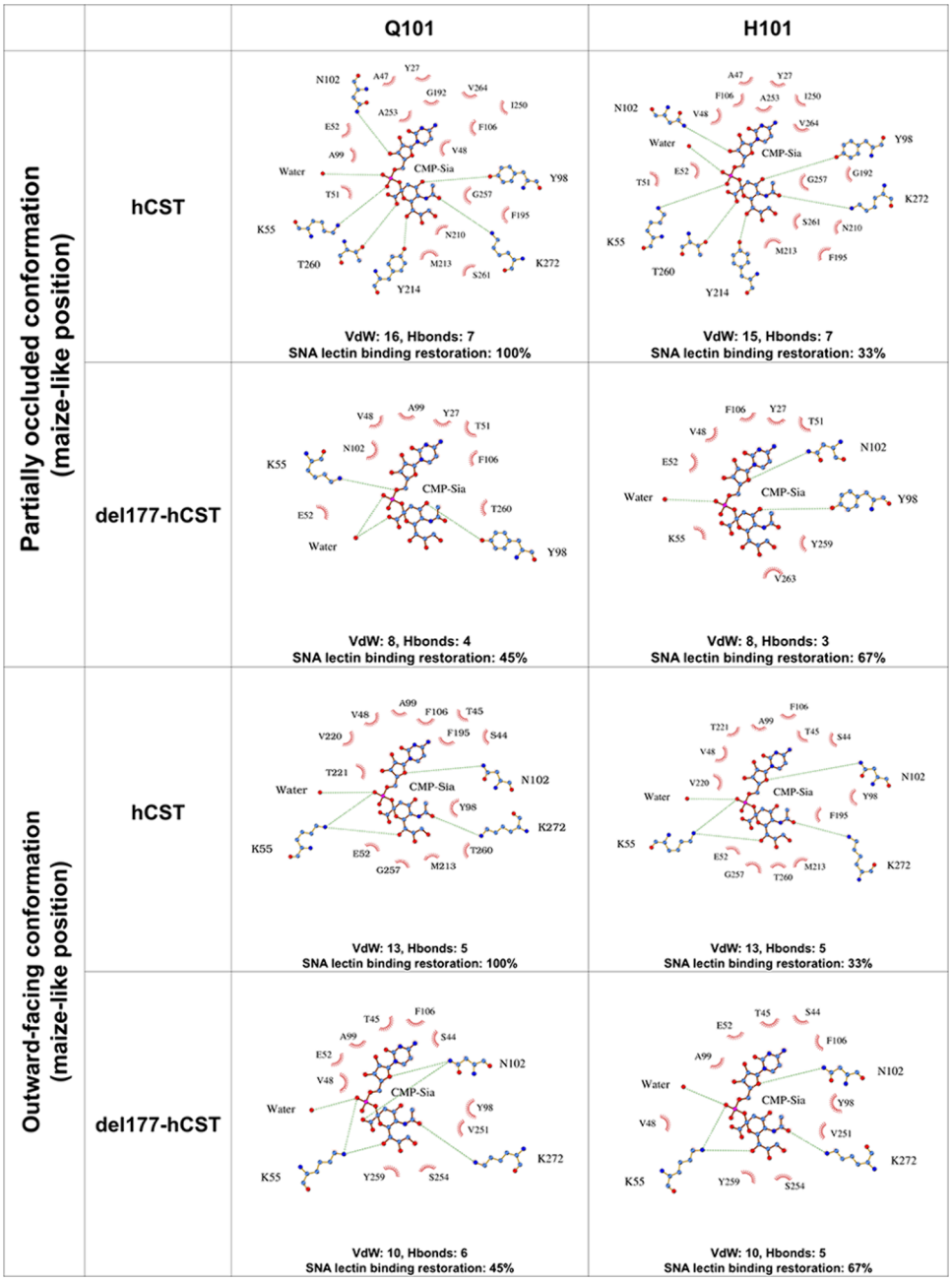


Figure 7. Protein−ligand interaction maps of CMP-Sia in the maize-like position. Each row shows the VdW and H-bond interactions between CMP-Sia and hCST and del177-hCST isoforms carrying the Q101H mutation.

small molecules if they are attached to a nucleobase cytidine, forwarding the theory that substrate recognition is due to three small cavities that recognize sugar, nucleotide, and phosphate group where the nucleobase cavity is responsible for internalizing the substrate.[24,44] Even though information on the structure and function of hCST has advanced due to these contributions, the structure−function relationships in its splice variants have not been completely explored.

In previous reports, we described the functionality of an alternative spliced isoform of hCST, named del177-hCST. Here, we explore the different functional effects of the c.303C>T (p.Q101H) pathogenic variant, previously reported in a patient affected by SLC35A1-CDG and that decreases 50% of the hCST activity.[21] In this work, through SNA lectin binding assays and RCA-I lectin cytotoxicity assays on transfected HEK293T^{KO} cells with normal and mutated (c.303C>T) wild-type and del177-hCST variants, we show that the deleterious effect of the p.Q101H WT variant is not observed in the p.Q101H del177 isoform, providing novel structural insights into CMP-sialic acid recognition.[16]

To determine if p.Q101H affected the Golgi localization of the del177 isoform, we analyzed its overlap with the TG46 Golgi marker. We did that because the inhibition of terminal Golgi glycosylation causes the accumulation of glycoconjugate proteins, leading to changes in the Golgi structure. Through the years, it has been shown that alterations in terminal fucosylation and sialylation disrupt the normal operation of Golgi, causing accumulation of glycoproteins because charge proteins in vesicular traffic are highly glycosylated, leading to an increase in Golgi size and loss of its function to export

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

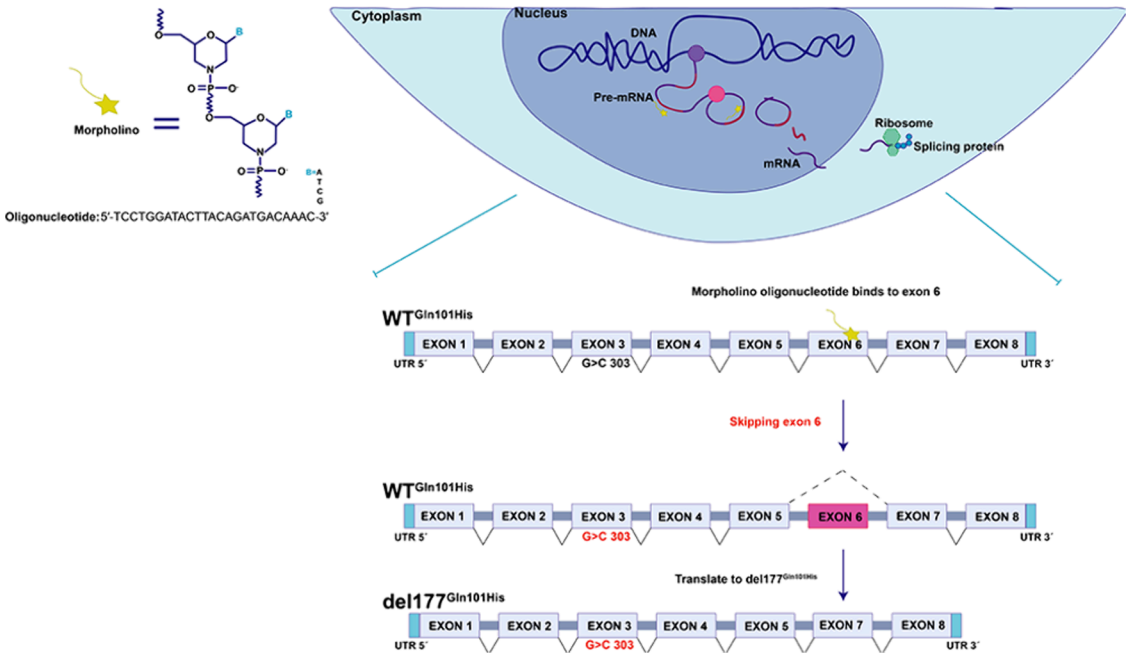


Figure 8. Gene therapy by morpholino oligos in vivo. The backbone of these oligos consists of morpholine rings, distinctively connected to nitrogen atoms instead of the conventional oxygen atoms found in DNA or RNA. This atypical structure confers increased stability and resistance to nucleases. Upon binding to its target RNA sequence, the morpholino oligo disrupts normal cellular processes associated with the recognition and binding of RNA by proteins or other nucleic acids. This steric hindrance interferes with the proper functioning of the target RNA, often resulting in the inhibition of translation or the induction of exon skipping in pre-mRNA. In SLC35A1-CDG patients carrying the c.303C>T punctual mutation in the SLC35A1 gene, exon 6 would be blocked, causing a mature mRNA, which subsequently could be translated into the del177^{Q101H} protein. This strategic manipulation of gene expression demonstrates the potential of morpholino oligomers in modulating splicing events for therapeutic purposes.

proteins, generating deficient traffic.[40,52,53] Concerning Golgi localization experiments, all hCST variants showed overlap with the TGN46 Golgi marker. We observed that cells with sialic acid deficiency, such as HEK293T^{KO} and the over-expressing KO-WT^{Q101H} isoform, displayed disturbed distribution and widening stacks of TGN46 (Figure S5).

Furthermore, these changes were also accompanied by morphological modifications in GM130, which were restored in cells overexpressing the del177 isoform and its mutant del177^{Q101H}, becoming similar in appearance to HEK293^{WT} cells. Our findings confirmed Golgi fragmentation as a response to deficient sialylation induced by depletion in functional hCST. Considering GM130 morphology changes and its destabilization as a consequence of hCST deficiency, it could be proposed as a marker in the case of alterations in the *SLC35A1*, which compromise normal sialylation based on the fact that GM130 has already been proposed as a neuro-degenerative marker in diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, a neurodegenerative disease known to fragment Golgi due to cellular stress and protein transport dysfunction, similar to what occurs in hCST disfunction when the CST does not work correctly.[41,54] Furthermore, a possible explanation could be that the collateral impact of sialylation depletion results in under-sialylation of the glycosyltransferases and enzymes that are required for the adequate and functional organization of Golgi.

In the homology models, it was observed that the del177-hCST model retains its substrate recognition cavity despite losing the C-terminal fragment of TMD6, the entire TMD7, and the N-terminal fragment of TMD8. In this cavity, the K55 residue interacts with the cytidine base in both the partially occluded and outward-facing conformations, like the mouse model.[9]

In the partially occluded model, the Y27 residue maintains its VdW interaction, which has been described as important for maintaining the cavity structure in the mouse model. However, in the outward-facing conformation in hCST and del177-hCST, Y27 forms a hydrogen bond with Sia, suggesting that once CMP-Sia is internalized into the cavity, Y27 helps stabilize the complex.

Additionally, other residues previously described in the literature as being important for CMP-Sia recognition lose their interaction in the del177-hCST model but are replaced by others. For example, Y214 in the hCST model recognizes cytosine. Still, in the del177-hCST model, this interaction is replaced by Y259 and Y98 through VdW interactions, providing the necessary stability to keep the substrate properly oriented. Therefore, upon comparison of the hCST and del177-hCST models, it is observed that the del177 isoform in both conformations presents a lower number of interactions in the middle cavity, and the nucleobase recognition site is in the occluded conformation. However, these are compensated by forming additional hydrogen bonds in the outward-facing conformation, which contributes to substrate stability once internalized into the cavity.[9,24] This could correlate with the findings of Salinas-Marín et al., where the del177 isoform showed no significant variation compared to the wild-type isoform at 72 h post transfection.[16]

Focusing on the outward-facing conformation, we find that Q101 in the hCST belongs to the middle recognition cavity and interacts with phosphate and Sia groups. These interactions are recovered in the del177-hCST^{Q101H} and lost in the hCST^{Q101H} model. This is particularly significant as

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

these interactions have been previously reported to be crucial for maintaining the stability and recognition of CMP-Sia. The loss of these interactions in hCST^{Q101H} could be one of the key reasons why this isoform loses 50% of its functionality. Furthermore, the hCST^{Q101H} model cannot be compensated because Q101 generates a steric hindrance affecting the formation of interactions that can stabilize the substrate; meanwhile, in the del177-hCST^{Q101H} model, the elimination of 59 amino acid residues leaves a more flexible cavity avoiding the Q residue steric hindrance, generating the recovery or compensation of certain interactions that help stabilize the substrate within the cavity.

CONCLUSIONS

In this study, we confirm that the pathogenic variant c.303C>T (p.Q101H) of hCST, previously reported to decrease transporter activity by 50% in an SLC35A1-CDG patient, shows significantly reduced pathogenicity in the mutated del177 isoform (del177^{Q101H}) when it is overexpressed in HEK293T^{KO} cells. Furthermore, we contribute to the understanding of the structure and function of the del177 variant, an isoform that challenges the paradigms of membrane protein studies by remaining functional even when it loses 59 aa. This is because the recognition cavity retains a structure similar to that of the WT isoform. Thus, the remarkable similar ability to restore sialylation between del177^{Q101H} and the wild-type isoform opens a window for the del177 variant as a potential genetic therapy in SLC35A1-CDG caused by the Q101H variant.

Previously, we reported the oligonucleotide morpholino, which allows blocking of the inclusion of exon 6 in pre-RNAm from the SLC35A1 gene. This alternative could be considered in these patients to redirect the protein translation process toward the del177^{Q101H} variant instead of the WT^{Q101H} mutant. This approach holds promise for therapeutic assistance to individuals affected by this CDG (Figure 8).

The use of oligonucleotides as biotherapeutics has increased in recent years, with successful applications in treating infectious diseases, such as vaccines against hepatitis B or SARS-CoV-2, and chronic diseases, such as muscular dystrophy.[55−57] However, its potential for treating rare diseases has not yet been fully explored. Research into the use of oligo morpholinos in treating rare diseases is ongoing, and initial results are promising. These drugs have the potential to offer new hope for patients with rare diseases to allow more treatment options.

ASSOCIATED CONTENT

Data Availability Statement

All software described in the modeling section are free for use and available for download from their respective Web sites after prior registration: LigPlot+ version 2.2 (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/download2.html), CHARMM48 (https://academiccharmm.org/program), and VMD 1.9.3 (https://www.ks.uiuc.edu/Development/) were used for visualization and are available as free software. Web servers such as AlphaFold 2, AlphaFold 3, and charmm-gui can be found at https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb, https://alphafoldserver.com/, and https://charmm-gui.org/, respectively. Finally, the UNIPROT and PDB databases are available at https://www.uniprot.org/ and https://www.rcsb.org/. The final AlphaFold models were selected after grafting the CMP-sialic acid onto each model and searching for steric clashes. The selected models were then minimized and analyzed for their ligand−protein interactions. All mutants Q101H were generated using the previously selected models. The models described previously as well as the input for CHARMM48 minimization and the input parameters are available for download as a.rar compressed archive. GraphPad Prism 9 was used for calculating IC50 and CC50 values (https://www.graphpad.com/). Origin 8.5 and Adobe Photoshop 2020 were used for data visualization (https://www.adobe.com/mx/).

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.4c08466.

Figure S1, analysis of genotype from HEK293T^{KO} cells; Figure S2, analysis of glycophenotype from HEK293T^{KO} cells; Figure S3, PCR-ARMS to assess c.303G>C point mutation in transfected HEK293T^{KO} cells; Figure S4, percentage of SNA-positive cells by flow cytometry; Figure S5, analysis of TGN and hCST localization by confocal microscopy; and Figure S6, interaction of the outward-facing and partially occluded conformations of the hCST and del177-hCST models (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Roberta Salinas-Marín − *Laboratorio de Glicobiología y Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209 Morelos, México;* orcid.org/0000-0003-0815-447X; Email: rsm@uaem.mx

Iván Martínez-Duncker − *Laboratorio de Glicobiología y Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209 Morelos, México*; Email: duncker@uaem.mx

Authors

Brenda I. Velázquez-Dodge − *Laboratorio de Glicobiología y Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209 Morelos, México*

Marco A. Ramírez-Martínez − *Laboratorio de Dinámica de Proteínas, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, México*

Nina Pastor − *Laboratorio de Dinámica de Proteínas, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, México;* orcid.org/0000-0001-7755-2936

Yobana Pérez-Cervera − *Centro de Estudios en Ciencias de la Salud y la Enfermedad, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez 68110 Oaxaca, México*

Héctor M. Mora-Montes − *Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato Gto 36050, México*

Blanca E. Domínguez-Mendoza − *Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma Del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209 Morelos, México*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.4c08466

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

Author Contributions

Conceptualization: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P., and R.S.-M.; methodology: B.I.V.-D., M.A.R.-M., and N.P.; software: B.I.-V.D., M.A.-R.M., and N.P.; validation: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P., and R.S.-M.; formal analysis: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P.; B.D.-M., H.M.M.-M., Y.P.−C., I.M.-D., and R.S.-M.; investigation: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P, I.M.-D., and R.S.-M.; resources: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P.; B.D.-M., H.M.M.-M., Y.P.-C., I.M.-D., and R.S.-M.; data curation: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P., I.M.-D., and R.S.-M.; writing—original draft preparation: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P., I.M.-D., and R.S.-M.; writing—review and editing: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P.; B.D.-M., H.M.M.-M., Y.P.-C., I.M.-D., and R.S.-M.; visualization: B.I.V.-D., M.A.R.-M., N.P., I.M.-D., and R.S.-M.; supervision: N.P., I.M.-D., and R.-S.M.; project administration: B.I.V.-D. and R.S.-M.; funding: R.S.-M.

Funding

The work carried out in our laboratory was supported by CONACYT grant number A1-S-27518, and BIVD was supported by CONACYT scholarship number 858568.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Antje Banning and Ritva Tikkanen for donating HEK293T^{WT} and HEK293T^{KO} cells. The authors also acknowledge the technical support received from Ph.D. Miguel Tapia-Rodriguez in the Microscopy Unit of IIBO-UNAM. Finally, the authors also thank Leticia Olvera, Maricela Olvera, and Erika Melchy Pérez for technical support in molecular biology and for providing facilities to use cytometry from the Biotechnology Institute, UNAM.

■ ABBREVIATIONS

aa, amino acids; A.U., absorbance units; BSA, bovine serum albumin; CDG, congenital disorder of glycosylation; CMP-Sia, cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid; EP, empty plasmid; CST, CMP-Sia transporter; hCST, human CST; haCST, hamster CMP-Sia transporter; mCST, mouse CMP-Sia transporter; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; Gal, galactose; GalNAc, N-acetyl galactosamine; MFI, mean fluorescence intensity; MTT, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid; NST, nucleotide sugar transporter; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; PI, propidium iodide; RCA-I, *Ricinus communis* agglutinin lectin; RT, room temperature; Sia, sialic acid; Siglecs, sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins; SNA, *Sambucus nigra* lectin; STs, sialyltransferases; TMDs, transmembrane domains; TGN, trans-Golgi network; WGA, wheat germ agglutinin; *wt*, wild-type

■ REFERENCES

(1) Varki, A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14* (8), 351−360.
(2) Dobie, C.; Skropeta, D. Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *Br. J. Cancer* **2021**, *124* (1), 76−90.
(3) Traving, C.; Schauer, R. Structure, Function and Metabolism of Sialic Acids. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 1330−1349.
(4) Schauer, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr. Opin Struct Biol.* **2009**, *19* (5), 507−514.
(5) Varki, A; Schauer, R. Sialic Acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*; Springer, 2009; pp. 335−349.
(6) Varki, A. Biological roles of glycans. *Glycobiology.* **2017**, *27* (1), 3.
(7) Schauer, R; Kamerling, J. P. Exploration of the Sialic Acid World. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Academic Press Inc., 2018; Vol. 75, pp.1−213.
(8) Lewis, A. L.; Chen, X.; Schnaar, R. L.; Varki, A. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. In *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
(9) Ahuja, S.; Whorton, M. R. Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport. *Elife.* **2019**, *8*, 1−27.
(10) Zhao, W; Colley, K. J. Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. In *The Golgi Apparatus: State of the Art 110 Years after Camillo Golgi's Discovery*; Springer: Vienna; 2008; pp. 190−206.
(11) 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.* **2006**, *281* (41), 31106−31118.
(12) Eckhardt, M.; Gotza, B.; Gerardy-Schahn, R. Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (13), 8779−8787.
(13) Eckhardt, M.; Mühlenhoff, M.; Bethe, A.; Gerardy-Schahn, R. Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1996**, *93* (15), 7572−7576.
(14) Willig, T. N.; Breton-Gorius, J.; Elbim, C.; 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.* **2001**, *97* (3), 826−828.
(15) Kauskot, A.; Pascreau, T.; Adam, F.; et al. A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica.* **2018**, *103* (12), e613−e617.
(16) Salinas-Marín, R.; Mollicone, R.; Martínez-Duncker, I. A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter. *Glycoconj J.* **2016**, *33* (6), 897−906.
(17) Martinez-Duncker, I.; Dupré, T.; Piller, V.; 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. *Blood.* **2005**, *105* (7), 2671−2676.
(18) Eckhardt, M.; Gotza, B.; Gerardy-Schahn, R. Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (32), 20189−20195.
(19) Eckhardt, M.; Gerardy-Schahn, R. Molecular cloning of the hamster CMP-sialic acid transporter. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248* (1), 187−192.
(20) Deutscher, S. L.; Nuwayhid, N.; Stanley, P.; Briles, E. I. B.; Hirschberg, C. B. Translocation across golgi vesicle membranes: A CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell.* **1984**, *39* (2), 295−299.
(21) Mohamed, M.; Ashikov, A.; Guillard, M.; et al. Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport. *Neurology.* **2013**, *81* (7), 681−687.
(22) Ng, B. G.; Asteggiano, C. G.; Kircher, M.; et al. Encephalopathy caused by Novel Mutations in the CMP-Sialic Acid Transporter, SLC35A1. *Am. J. Med. Genet A* **2017**, *173* (11), 2906.
(23) Szulc, B.; Zadorozhna, Y.; Olczak, M.; Maszczak-Seneczko, D.; Wiertelak, W. Novel insights into selected disease-causing mutations within the slc35a1 gene encoding the cmp-sialic acid transporter. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (1), 304−324.
(24) Li, D.; Mukhopadhyay, S. A three-pocket model for substrate coordination and selectivity by the nucleotide sugar transporters SLC35A1 and SLC35A2. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297* (3), No. 101069.
(25) Banning, A.; Zakrzewicz, A.; Chen, X.; Gray, S. J.; Tikkanen, R. Knockout of the cmp−sialic acid transporter slc35a1 in human cell lines increases transduction efficiency of adeno-associated virus 9:

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

Implications for gene therapy potency assays. *Cells* **2021**, *10* (5), 1259.
(26) Abramson, J.; Adler, J.; Dunger, J.; et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature. Published online* **2024**, *630*, 493.
(27) The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D523−D531.
(28) Mirdita, M.; Schütze, K.; Moriwaki, Y.; Heo, L.; Ovchinnikov, S.; Steinegger, M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods.* **2022**, *19* (6), 679−682.
(29) Nji, E.; Gulati, A.; Qureshi, A. A.; Coincon, M.; Drew, D. Structural basis for the delivery of activated sialic acid into Golgi for sialyation. *Nat. Struct Mol. Biol.* **2019**, *26* (6), 415−423.
(30) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (11), 1859−1865.
(31) Kim, S.; Lee, J.; Jo, S.; Brooks, C. L.; Lee, H. S.; Im, W. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *J. Comput. Chem.* **2017**, *38* (21), 1879−1886.
(32) Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods.* **2017**, *14* (1), 71−73.
(33) Park, S. J.; Kern, N.; Brown, T.; Lee, J.; Im, W. CHARMM-GUI PDB Manipulator: Various PDB Structural Modifications for Biomolecular Modeling and Simulation. *J. Mol. Biol.* **2023**, *435* (14), No. 167995.
(34) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (10), 1545−1614.
(35) Roman, A. L.; Mark, B. S. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2778−2786.
(36) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33−38.
(37) Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (23), 12827.
(38) Wu, J. H.; Singh, T.; Herp, A.; Wu, A. M. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the Ricinus communis toxic protein (ricin). *Biochimie.* **2006**, *88* (2), 201−217.
(39) You, W. K.; Kasman, I.; Hu-Lowe, D. D.; McDonald, D. M. Ricinus communis Agglutinin I Leads to Rapid Down-Regulation of VEGFR-2 and Endothelial Cell Apoptosis in Tumor Blood Vessels. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176* (4), 1927.
(40) Eisenberg-Lerner, A.; Benyair, R.; Hizkiahou, N.; et al. Golgi organization is regulated by proteasomal degradation. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1−14.
(41) Huang, B.; Li, X.; Zhu, X. The Role of GM130 in Nervous System Diseases. *Front. Neurol.* **2021**, *12*, No. 743787.
(42) Nakamura, N.; Rabouille, C.; Watson, R.; et al. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.* **1995**, *131* (6 Pt 2), 1715−1726.
(43) Nakamura, N. Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J. Pharmacol Sci.* **2010**, *112* (3), 255−264.
(44) Ury, B.; Potelle, S.; Caligiore, F.; Whorton, M. R.; Bommer, G. T. The promiscuous binding pocket of SLC35A1 ensures redundant transport of CDP-ribitol to the Golgi. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, No. 100789.
(45) Berninsone, P.; Eckhardt, M.; Gerardy-Schahn, R.; Hirschberg, C. B. Functional expression of the murine Golgi CMP-sialic acid transporter in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (19), 12616−12619.
(46) Capasso, J. M.; Hirschberg, C. B. Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81* (22), 7051.
(47) Chiaramonte, M.; Koviach, J. L.; Moore, C.; et al. Inhibition of CMP-Sialic Acid Transport into Golgi Vesicles by Nucleoside Monophosphates†. *Biochemistry.* **2001**, *40* (47), 14260−14267.
(48) Aoki, K.; Ishida, N.; Kawakita, M. Substrate Recognition by UDP-galactose and CMP-sialic Acid Transporters. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (24), 21555−21561.
(49) Aoki, K.; Ishida, N.; Kawakita, M. Substrate Recognition by Nucleotide Sugar Transporters. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (25), 22887−22893.
(50) Takeshima-Futagami, T.; Sakaguchi, M.; Uehara, E.; et al. 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.* **2012**, *22* (12), 1731−1740.
(51) Ahuja, S.; Cahill, J.; Hartfield, K.; Whorton, M. R. Inhibition of CMP-sialic acid transport by endogenous 5-methyl CMP. *PLoS One.* **2021**, *16* (6), No. e0249905.
(52) Xiang, Y.; Zhang, X.; Nix, D. B.; et al. Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 4.
(53) Zhang, X.; Wang, Y. Glycosylation quality control by the Golgi structure. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428* (16), 3183−3193.
(54) van Bommel, D. M.; Toonen, R. F.; Verhage, M. Mapping localization of 21 endogenous proteins in the Golgi apparatus of rodent neurons. *Scientific Reports.* **2023**, *13* (1), 1−9.
(55) Li, D.; Adams, A. M.; Johnsen, R. D.; Fletcher, S.; Wilton, S. D. Morpholino Oligomer-Induced Dystrophin Isoforms to Map the Functional Domains in the Dystrophin Protein. *Mol. Ther Nucleic Acids.* **2020**, *22*, 263−272.
(56) Gupta, S.; Sharma, S. N.; Kundu, J.; Pattanayak, S.; Sinha, S. Morpholino oligonucleotide-mediated exon skipping for DMD treatment: Past insights, present challenges and future perspectives. *J. Biosci.* **2023**, *48* (4), 38.
(57) Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (6), 2529−2573.

https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08466
ACS Omega 2024, 9, 50622−50633

Cuernavaca, Mor., a 25 de mayo de 2025

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS

P R E S E N T E

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: Análisis estructural y funcional de la isoforma del177 del transportador de CMP-ácido siálico en mamíferos, que presenta la M. en C. Brenda Ingrid Velázquez Dodge (10009575) para obtener el título de Doctorado en Ciencias.

Director de tesis: Dra. Roberta Salinas Marín
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz Fac. Medicina-UAEM	APROBADO	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Delia Vanessa López Guerrero Fac. Nutrición-UAEM	APROBADO	
Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Héctor Manuel Mora Montes Universidad de Guanajuato	APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Roberta Salinas Marín CIDC-UAEM	APROBADO	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2025-06-02 21:54:40 | FIRMANTE

wkK0sFxwybVsXVY6Vc7Hm/1vPsNo6wogb4wU5HbVsyrRteuwJc3RgDDMO0RqIvJoTe/yxHdRJYNyIB1hbklSnLF+290WP7ZQY9HaR6JfWrQd58Ab7771vTK/OOHgdJf376F02o/2CBJMaUPZopc5j5GljPfECCjDZrXsnn3b4NBJc8R1krlAu38FzkIVr6l5p/RuyITcXdPgpbLAObfqMnxV98q0QGRb8Pm7wo6BqQCEobc1XYRo5AAg2Qe41LEdW+CPv25u0LrYVfEngpGTmbvsLs1LixHX8Ve9SQ+teZGfdCpvBB06xSaoCTVK5Uw13d/0GARmV4bTYJz+aNQM2w==

HÉCTOR MANUEL MORA MONTES | Fecha:2025-06-02 21:58:05 | FIRMANTE

MYKbR9WnBoYXWtcp2bRnMuIwR1cFs0tZ/Wc16ezlpSxp1Ls5kW/pQlNwIJMMp44V7QCTrGiqwxKt14rynQ+ftSkWHc5mF2ldnSjilyEtcwab2hfxaETBIeOsBuXXsq0RRSUsPE7GHnLv8Weft06qKAn40MssD0414SJ4uf/oMWzvDca0+3kv6EKP2vH+OeesaVdu41ApKyDuSlfA6XM0oGVC6cmrkDw/DiNTHgkOWd5fmnA9EKmBkjGcyhkm9BYtjeDCnUgBW/wL2/ZUoroEhKvOgfGMiTlmXf5SpgyyXWgD/Uj3eDEV8fhafM9eKicUKM2/oHu785MLDj862kza8Q==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2025-06-02 22:35:06 | FIRMANTE

iREbGnlVtlRTD/MvYir+zfAvu6nPWsmwcekEJoxQoRqktjVU3XW5XWG6xZFCntIE+z2cl+he2Mds49B0xWJzfB2dZzQQ2WjnXtwwnPh5Qmia5Auk3qhIi2JjfLwnfG/iLjLZiNGs0xGBhMQLVVMAK+ryWLzc6uLI0Sl7ETe1T0YyLepqBlX+9xEEEK3X9oaeHbO5P59Lb1wCl+03X/NM+WCoGL+7nsfZKZVueIS23GQcb/b3NHTS0YiGs5x227+PpBbd8bCX3YvNqm/VfS4q64+TRPGPBMEn+l8qhSuOD2uQD2e0fuEJHuvgyBDJbKk06W/9cgRLbqR8AfZQIaVPaA==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2025-06-02 22:45:57 | FIRMANTE

J8j1mklntADshI/50RzOiyiaPwvx6masryBG/MOSI+7Azsv+G4//NM3SFgOk5JDveBEOhzT0/+O0n7+bgCwelj8FJxxvGLueP+Zg01oKSsuuA9JsGeXl9un9B79+fGyhhth/mmqPSw7MzrlDZ2ToZf2NXPzCkoKSR+aU+77ztc4wS4HQUVBk7M7hPceI6mOmQh0DScvOHfhMuQ2ZYowBvDAE19gK+cXlE3f5v14TfxQE3jhc0UPj0mUlOvLRayKiD9ko5+rFzOebiWXUAza/KZhEkeE0UN1muZHJjiNYu4xWfQX01thTotjeBD+5UzTtEimb5eZPkzQi+pACEY4J0g==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2025-06-02 23:47:30 | FIRMANTE

lq8KTs15HKQGQVxLE0FQqAoUaNgDvOamEUkD517G2bKK5HEnWRxn6/i2jVq0pd7QNy2aFt87OqfpzDuhQ+7sS9HZwopfLdYXExYSP83aXStGeKXI+GMbMtNVMSwvFLSnZe0eu8ULTicDNYnTgpxTgYQdYXXUx/Dgp7DK17oT/WydmpMNaX+frNbMrJkOe1+DMCN7kTw6YWQuGq8+/u9MGnSbMAthQOLLibdOW+e1BwSCV4H+vlVZTcbk4nZZhbc5e+F6y9JPVF/tRAeV9V7cw7l5dR+XNez19O6TJF4zmfyEpKp09vdFN62LRhmKu4nH/Vge/975AGnwjdOt4eT3IQ==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2025-06-03 08:22:31 | FIRMANTE

swB/zg+VLHRVl3QGqMF9qg7AHNcZ+iSGX3c3HuSxAT6S7yWJ5Z5MWCT9dRolMGGxgcv6dkNGqW6C/GahH6hrCqRKYaLIxbkp5gsMa7EzfbsuUoLR7IUAv+nl3i3RdKSbecj7s32ljJpcOu748ZgTwVjMRFJGOUWQ4Rl65zw5l/dqsJk7fwd2uLZZl1YIE1TKc835oPPQIQpydNpTy2ShbNiGBbs4Ll93Ttr4ry5gUZaWlL1a6fwo3QkUGHiJH4bmKkMYqcZc/0c1Ld6pkkoFgztSnY6MJuB/uVEV92rmsG5dNKl0DLrsI91TI5gdFwg2S2n6GyY37BtNjLonhXMPoQ==

LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA | Fecha:2025-06-03 08:44:34 | FIRMANTE

IjZ1Zmht1eIh5JX9uZK7GdVy7gogvw3yli+waNK78CG8zmrY3phAMgabJBEQO4+qaGZENyIUHbTyWvab6ChJbS4xx2QOOP73BJKRoLzz4PmV/92txHRA+LFUqB0v0//3iSYpKozE0U28s3EIhlcLpt5h/fCh5DHX1Xe+SOaaDP4274KVP+jnsxePFxIZQ3Ovu3ifKHfp7aYlCeUeS65k8sJgzLQ7iM6pDFHUpKvrxjrsBm545eo3tHT3tOAeJUlp/Qbs6xDSHRtrHkVByz08PTEozndu3Zk4EC7AUPCntDn9J6wxHbLMColiiDsmX9GOIPw6hqd5tKLQo3UCM7D77Q==

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

VbBvog0yE

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/02ROcyy9LQSrz2LjJtqDO84G8dClztMk