



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **AGUIRRE ZAPATA CLAUDIA** con número de matrícula **20164000572** cuyo título es:

“Clonación y expresión del transportador de CMP-ácido siálico de *Macaca mulatta*”

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

Cuernavaca, Mor a 27 de mayo del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

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

DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ
DR. RODRÍGO SAID RAZO HERNÁNDEZ
DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA
DRA. MABEL RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

(Presidente).
(Secretario).
(Vocal).
(Suplente).
(Suplente).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2022-05-27 09:44:11 | Firmante

EjMYv8HZi/91UPFNhFNw68OxlwjbWzQ6WPxMNIbswTKG97+UHUswKbxqTjfy39a7J1g5nJ3RckBO9I0/XP3Tcpgk890xG73eWPOKfHmkbDsiZ8ncPErmeN+FHRYRG+3pPLW76zQfglBjC96K5zyzr9fibXE8K8B9slcGOGJKWThWhJcNkSyqSwN/0RXSIUYWdt3rSrksiEafkFSGzAxIfQy4od5ixU2+QbPKLNGGdNF0QF2LNAasaZz+KEACfM9LncO0MYPsYtZYXmIBVmsJSGVbPQ3B/5Amkwng9eCqQJB+/HCMeNVhFQsSkxgU/DcxLUW1EeJdVnCS5L3eNu2cQ==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-05-27 09:55:37 | Firmante

cgsyRhn1kWQdIjUTxdXxQya+sWhi+YrNyNoijl4NV7MCUBseJx7efvvi5BZOseTKh9Z/LWKxCQ37yHkErbU1G47IHjWeL3CDE6rPkplskewDT5PH/dNKd3phxMKm7/897Gj6+abZJ0dvtG82UjiV/fR+klvQFcnDhOaGWj+7fs54TDSw+WcQLv7S6c4xzjpRQliT7iqPU1cK7y9MAzbiTWMhmPaharf/WgoSguDbW60T0v9VpMle9HXgdNmDhcEW1Ve/7oTgn8slCgaEhpKwt9GxYrHPO483HjE6hptNDFy5eY2pMbrXg7YP9QSZalE2nKCYrr3QWBI03TrSzC7A==

MABEL RODRIGUEZ GONZALEZ | Fecha:2022-05-27 18:38:16 | Firmante

XmUoBARoo3V6sf3Cr0gthGFt2dX/SJbixjiZp4NHezKKu8l61lode5jCik4gbrGLpi/0vqP+T42P77vHLtzw+seuG7xABP6vEmnbsH0i5G55LOi15mp5VwLCClddx86dmP/LPoSJYA MGNUTqKNFA5ENXqNgR+pcLA6SU2k2VISdbqrsMgM2/8TDY9e10i3JsV0QWUljwHK1ouJlut8MFqpdFWyVfVQXrLyJoihRSyx1SlpDOIYR3VulVkBxP741ckZLmCQLp4fipBWT3voRkQnQl3pfAV1y3vuFWKtCro/pfll12h+Zlqrpj3UF0z5VJEtg4f/f4/pFMK2CQsQ==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-05-31 12:09:07 | Firmante

F8ULHkC3AW9O+EgOYIJ0IBSxSQCBMKGPELVSNiCIEWDzmu7RCL4h7AkQPIk7kCcmQgf3XoACji13kuu//TbzB57ROH3GVHsK8iz9Gj+77ooJwR0g53Jcgf64V4ovsixfo1bJZCNydn5RWzzAc87tQmQbAwUu2YYg+6QVVkomf9+ZzLVMhP/L1oa2HojlWbHkNETciGcky3jnQ+ep0abNEV9xa7qFZr+JZCO7G+4OLrMnOIBhMQegQuTGIZF0J69ywrL3kMvjOW3Ct6ld+6Rl6e1Ca9TQ3tCM7V/XvHI+5/eJkqhElHfo/z7+VbHeu1ascWCtphBOG1DH6M/ixg==

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2022-06-09 23:38:17 | Firmante

pgYuhyvovdHtrzbcOME/H8K+SikUXyvoacnqaNAWxnDjfl15Z0hfJ23rvHZrDz3EhxwFtT2PabCnKggjRBnMQ6nGaAM5IJ5VJ4iBTJy9k9e/AWmwMcr4GeRH56+RjMJG6DNXOSQRpiEnpXncOmHWtcYXiliiAoTomFiZybK6Q1feLasd9ku8W9AC/SolgZj4O7mBDF+VGNhKHhUB0LcFe5uKQngX175kidl3HK3fxSCNmKZZDOgA+NCa+eCjr3vHck5Wprgyr3RNiU9oR7xieLtnOBmsCPnknCZqrlJcxkxkL4RBdUtkQJOyle83MHUIGilI1KZSWfNLhKvzIPw==

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



[mwvIFjKO](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kDbZfN0lwKNUteK2DzJZKMBDemdi6is>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE CMP-ÁCIDO SIÁLICO DE MACACA MULATTA”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR)

PRESENTA:
CLAUDIA AGUIRRE ZAPATA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por su amor y paciencia durante todo este proceso de formación, y por ser el ejemplo vivo de determinación, superación y fortaleza.

A mi padre por su apoyo y por creer en mí en todo momento, y por enseñarme a ser rigurosa conmigo misma.

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

A todos mis amigos, que me apoyaron en momentos de dificultad.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular, por sus consejos, su paciencia y su apoyo. Especialmente a Alin y a Brenda.

A mi tutora, la Dra. Roberta Salinas Marín, quien en todo momento se involucró en nuestro crecimiento académico, profesional y personal. Pues además de guiarnos y formarnos en estos primeros pasos de la ciencia, nos enseñó el valor de ser buenas personas.

A los doctores integrantes de mi comité sinodal, por sus observaciones y sugerencias para que mi formación académica y el desarrollo del proyecto se realizaran de manera satisfactoria.

A CONACYT por la beca otorgada con número de registro 30031.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Al Biól. Felipe Olvera Rodríguez, por la revisión experimental y ayuda técnica en el desarrollo del proyecto.

A la Biól. Maricela Olvera Rodríguez, por la gestión administrativa y técnica en el uso de clitómetro de Flujo del LAMMB, Instituto de Biotecnología, UNAM.

A la M.C. Paulina Torres Rodríguez, por el apoyo en el análisis de muestras por citometría de flujo del LAMMB, Instituto de Biotecnología, UNAM.



El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular del Centro de Investigación y Dinámica Molecular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección de la Dra. Roberta Salinas Marín con soporte económico del proyecto C.B. CONACYT A1-S-27518 y con la beca CONACYT de licenciatura el No. 30031.

RESUMEN

Los transportadores nucleótido carbohidrato (SLC35) son proteínas transmembranales antiportadoras. Comprender su estructura-función sigue siendo un reto para los científicos debido a su importancia como facilitadores de la entrada de nucleótidos carbohidratos al lumen de RE o Golgi para que se lleve a cabo un correcto proceso de glicosilación celular.

El mecanismo de transporte del transportador de CMP-ácido siálico humano (hCST; SLC35A1) es el más caracterizado y del único que se sabe presenta isoformas de *splicing*. Interesantemente, una de estas isoformas denominada del177 es funcional de manera similar a la isoforma silvestre a pesar de perder 59 aa codificadas por 177 pb.

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar molecularmente las isoformas de *splicing* del transportador de CMP-ácido siálico en *Macaca mulatta*, mediante el uso de células MA-104 (células de epitelio de riñón de macaco)). En este trabajo se describe cómo se clonaron, secuenciaron e identificaron cinco isoformas de *splicing* del *slc35a1* de células MA-104: la isoforma *wt* (1014pb), la isoforma del313 (701pb), la isoforma del443 (571pb), la isoforma del557 (457pb) y la isoforma del710 (304pb).

La identificación y caracterización molecular de las variantes de *splicing* presentes en el *SLC35A1* de células MA-104 es una contribución a la comprensión de los mecanismos de expresión del *slc35a1* en mamíferos. Adicionalmente, las isoformas identificadas generaron nuevas interrogantes en la regulación de la expresión del *slc35a1* y su posible relación con el sistema NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	4
ÍNDICE	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
1.0 INTRODUCCIÓN.....	12
2.0 HIPÓTESIS	15
3.0 JUSTIFICACIÓN	15
4.0 OBJETIVOS	16
4.1 <i>Objetivo general</i>	16
4.2 <i>Objetivos particulares</i>	16
5.0 ANTECEDENTES	17
5.1 <i>Transportador de CMP-ácido siálico</i>	17
5.2 <i>Isoformas de splicing del transportador de CMP-ácido siálico</i>	21
5.3 <i>Modelos cristalográficos del transportador de CMP-ácido siálico</i>	25
5.4 <i>Análisis de isoformas del CST en otras especies de mamíferos</i>	30
6.0 MARCO TEÓRICO.....	32
6.2 <i>Biosíntesis de CMP-ácido siálico</i>	33
6.3 <i>Sialilación celular</i>	34
6.4 <i>Familia del CST</i>	35
7.0 METODOLOGÍA.....	38
7.1 <i>Cultivo celular</i>	39
7.1.1 <i>MA-104 Clone 1</i>	39
7.2 <i>Extracción de ARN de MA-104</i>	39
7.3 <i>Diseño de oligonucleótidos para clonar el slc35a1 de MA-104</i>	40
7.4 <i>Síntesis de ADNc de MA-104</i>	40
7.5 <i>PCR convencional del slc35a1 de células MA-104</i>	41

7.6 Electroforesis en gel de agarosa	43
7.7 Clonación del <i>slc35a1</i> de MA-104 en el vector pJET1.2/Blunt.....	43
7.8 Clonación del <i>slc35a1</i> de MA-104 en un vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO	44
7.9 PCR de colonia	46
7.10 Purificación de plásmidos.....	47
7.11 Purificación de plásmido por lisis alcalina para realizar transfecciones.....	48
7.12 Ensayo de restricción con enzima <i>KpnI</i>	48
7.13 Secuenciación de Sanger de isoformas del <i>slc35a1</i>	49
8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
8.1 Cultivo celular de las células MA-104.....	49
8.2 Integridad y pureza del ARN extraído de células MA-104.....	50
8.3 Verificación de la correcta síntesis de ADNc de MA-104.....	51
8.4 Amplificación del gen <i>slc35a1</i> en células MA-104.....	52
8.5 Análisis de la clonación del <i>slc35a1</i> de MA-104 en el vector pJET1.2.....	54
8.6 Análisis de la clonación del <i>slc35a1</i> de MA-104 en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.....	57
8.6.1 Isoforma silvestre del <i>slc35a1</i> de MA-104.....	58
8.6.2 Isoforma del313 del <i>slc35a1</i> de MA-104	60
8.6.3 Isoforma del443 del <i>slc35a1</i> de MA-104	62
8.6.4 Isoforma del557	65
8.6.5 Isoforma del710	69
8.7 Análisis de restricción de las isoformas de splicing del <i>slc35a1</i> de MA-104.....	71
8.8 Análisis de isoformas identificadas a nivel de aminoácidos	74
9.0 CONCLUSIONES.....	79
10.0 PERSPECTIVAS.....	79
11.0 ANEXOS	80
11.1 Preparación de soluciones de lisis alcalina.....	80
11.2 Geles de electroforesis de PCR de colonia	81
11.3 Cromatogramas de isoformas encontradas en macaco.....	83
12.0 REFERENCIAS.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
C	Carbono
CHO	Células de ovario de hámster chino
CMP	Citidina-monofosfato
CMP-Sia	CMP-ácido siálico
CMV	Promotor de expresión fuerte de citomegalovirus
CST	Transportador de CMP-ácido siálico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
dNTP	Deoxi nucleótido trifosfato
DTM	Dominio transmembranal
EPO	Eritropoyetina
FSH	Hormona folículo estimulante
Fuc	Fucosa
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -Acetilgalactosamina
GDP	Guanidina difosfato
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -Acetilglucosamina
Lec2	Células mutantes derivadas de CHO deficientes en el transporte de CMP-ácido siálico
LH	Hormona luteinizante
MA-104	Células de riñón de <i>Macaca mulatta</i>
Man	Manosa
ManNAc	<i>N</i> -Acetilmanosamina
NuIO	Ácido nonulosínico
P	Fosforo
PEP	Fosfoenol piruvato
RE	Retículo endoplásmico
SFB	Suero Fetal Bovino
Neu5Ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuraminico
Neu5Gc	Ácido <i>N</i> -glicolilneuraminico
LB	Caldo de lisogenia
SOC	Medio súper óptimo con represión de catabolitos
NTS	Transportador nucleótido carbohidrato
NMD	Desintegración de ARNm mediada sin sentido
UDP	Uridina difosfato
Xil	Xilosa
TA	Temperatura ambiente

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Regiones importantes para el funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico murino	18
Tabla 2. Isoformas del CST en ratón y macaco	30
Tabla 3. Miembros de los transportadores nucleótido- carbohidrato SLC35.....	36
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen del transportador en humano y macaco.....	41
Tabla 5. Reacción de PCR para verificación de ADNc de células MA-104	42
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen del transportador en hámster, humano y macaco.....	42
Tabla 7. Reacción de PCR para realizar la clonación del <i>s/c35a1</i> de MA-104 en pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.....	44
Tabla 8. Reacción de PCR para clonación en pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.....	45
Tabla 9. Reacción para PCR de colonia	46
Tabla 10. Mezcla para secuenciación de Sanger.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Topología de membrana del transportador de CMP-ácido siálico murino 20	
Figura 2. Isoformas del transportador se CMP-ácido siálico humano.	22
Figura 3. Diferencias topológicas del transportador de CMP-ácido siálico silvestre y del77.24	
Figura 4. Modelos teóricos de la isoforma del77 de humano y hámster	24
Figura 5. La estructura cristalina de rayos X del transportador de ácido siálico CMP de ratón en complejo con CMP.	25
Figura 6. Interacciones del CMP y CMP-ácido siálico con el CST murino.	26
Figura 7. Mecanismo de acción propuesto para el CST murino.....	28
Figura 8. Interacción del sitio de unión del hCST con el CMP-Sia.	29
Figura 9. Estructura química del ácido siálico distribuidos en humano y animales. 33	
Figura 10. Biosíntesis de ácido siálico.	34
Figura 11. Esquema general de la metodología experimental	38
Figura 12. Cultivo celular confluyente de la línea MA-104.	49
Figura 13. Electroforesis de ARN extraído de la línea celular MA-104. En la figura se observa.....	50
Figura 14. Productos de PCR convencional.....	51
Figura 15. PCR convencional del <i>slc35a1</i> de MA-104.	53
Figura 16. PCR convencional del <i>slc35a1</i> de MA-104 utilizando la enzima Taq <i>phusion</i>	54
Figura 17. Isoformas del <i>slc35a1</i> de MA-104 clonadas en el vector pJET1.2/Blunt. 55	
Figura 18. Alineamiento de la secuencia (isoforma <i>wt</i> del <i>slc35a1</i> de MA-104). ..	57

Figura 19. Isoformas del <i>slc35a1</i> clonadas a partir de MA-104 en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.	58
Figura 20. Alineamiento de la isoforma <i>wt</i> del <i>slc35a1</i>	59
Figura 21. Análisis de la isoforma <i>del313</i>	61
Figura 22. Análisis de la isoforma <i>del443</i>	64
Figura 23. Mecanismo de eliminación de 130pb del exón 6 en la isoforma <i>del443</i> . 65	
Figura 24. Análisis de la isoforma <i>del557</i>	68
Figura 25. Cromatograma de la isoforma <i>del710</i>	70
Figura 26. Construcciones de las isoformas encontradas del <i>slc35a1</i> en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.	72
Figura 27. Ensayo de restricción de las construcciones <i>slc35a1</i> + pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.	73
Figura 28. Secuencia peptídica teórica de la isoforma <i>wt</i> del CST de macaco.	74
Figura 29. Secuencia peptídica teórica de la isoforma <i>del313</i> del CST de macaco. 75	
Figura 30. Secuencia peptídica teórica de la isoforma <i>del443</i> del CST de macaco. 75	
Figura 31. Secuencia peptídica teórica de la isoforma <i>del557</i> del CST de macaco. 76	
Figura 32. Secuencia peptídica teórica de la isoforma <i>del710</i> del CST de macaco. 76	
Figura 33. Resumen de isoformas identificadas.	77
Figura 34. Geles de electroforesis de los productos de PCR obtenidos durante la clonación del <i>slc35a1</i> en el vector pJET1.2/Blunt.	81
Figura 35. Geles de electroforesis de los productos de PCR obtenidos durante la clonación del <i>slc35a1</i> en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.	82

Figura 36. Cromatograma de isoforma <i>wt</i> del <i>slc35a1</i>	83
Figura 37. Cromatograma de isoforma del313 del <i>slc35a1</i>	84
Figura 38. Cromatograma de isoforma del443 del <i>slc35a1</i>	85
Figura 39. Cromatograma de isoforma del710 del <i>slc35a1</i>	86

1.0 INTRODUCCIÓN

La sialilación celular es un proceso que consiste en la unión covalente de un residuo de ácido siálico a residuos de galactosa (Gal) y *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) mediante enlaces α 2-3 y α 2-6; y también a residuos de ácido siálico mediante enlaces α 2-8 y α 2-9¹². El proceso de sialilación ocurre exclusivamente en el Golgi, donde se encuentran las enzimas sialiltransferasas que utilizan el CMP-ácido siálico como sustrato donador para transferir el ácido siálico a glicoproteínas, glicolípidos y glicoRNAs^{1,3,4}.

La sialilación celular es una modificación postraducciona que ocurre de manera ubicua en las células de deuterostomados⁵⁶, y está relacionada con funciones tales como: rodamiento leucocitario, adhesión celular, respuesta inmunológica, viabilidad celular, interacción célula-patógenos, por mencionar algunas⁷⁻¹⁰.

El proceso de sialilación celular requiere 3 elementos importantes: 1) la presencia del sustrato CMP-ácido siálico; 2) la actividad de las enzimas sialiltransferasas, las cuales se encargan de transferir residuos de ácido siálico a biomoléculasceptoras y 3) el correcto funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico, proteína encargada de transportar CMP-ácido siálico del citoplasma al lumen de la cisterna *trans* Golgi¹¹.

El transportador de CMP-ácido siálico (CST) es una proteína transmembranal de tipo III codificada por el *SLC35A1*. Esta proteína pertenece a la familia de transportadores nucleótido carbohidrato, denominados SLC35¹². El transportador de CMP-ácido siálico es conocido como SLC35A1 donde el término A1 es referente al sustrato CMP-ácido siálico que transporta de manera específica¹².

El modelo topológico de la estructura-función del CST más aceptado hasta el 2019 fue propuesto por Eckhardt *et al.* basado en la secuencia peptídica de ratón¹³. En este modelo se propone que el CST murino (mCST) es una proteína formada por 10 dominios transmembranales (DTM); con 9 loops de los cuales los loops I, III, V y VII están orientados hacia el lumen de Golgi y los loops II, IV, VI y VIII están

orientados hacia el citosol; y las regiones N- y C-terminal que se identificaron como importantes para la localización del CST en Golgi ¹³.

En los últimos años el modelo topológico ha sido complementado con información de experimentos de mutagénesis para identificar aquellos residuos de aminoácidos implicados en el correcto funcionamiento del CST ¹⁴. Hasta la fecha, los únicos modelos cristalográficos del CST reportados pertenecen a ratón y maíz ^{15,16}.

El análisis realizado por Duncker *et al.* reveló la relevancia del CST como elemento único e indispensable para el soporte de CMP-ácido siálico en el correcto proceso de sialilación celular en humanos. En este reporte, se identificó un paciente con el desorden congénito de la glicosilación (CDG por sus siglas en inglés) SLC35A1-CDG originado por mutaciones en el gen SLC35A1¹⁰. Este análisis reveló la relevancia del CST como elemento único e indispensable para el soporte de CMP-ácido siálico en el correcto proceso de sialilación celular en humanos. En este reporte, se identificó un paciente con el síndrome SLC35A1-CDG originado por variantes patogénicas en el *SLC35A1*¹⁰.

Hasta el momento se han reportado 5 pacientes con mutaciones en este gen, quienes presentan características como neutropenia, infecciones oportunistas recurrentes, retraso en el desarrollo psicomotor, epilepsia, ataxia, microcefalia e hipotonía. Dentro de los síntomas presentados por los pacientes con SLC35A1-CDG, hay una manifestación compartida entre ellos, que es la presencia de macrotrombocitopenia ^{7,17-20}.

En este trabajo también se reportó que el CST humano (hCST) presenta cinco isoformas de *splicing* alternativo: la isoforma silvestre (377 aa), la isoforma del130 (227 aa), la isoforma del77 (278 aa), la isoforma del244 (189 aa) y la isoforma del290 (65 aa) ¹⁷. El prefijo “del” (del inglés “deltion”) para la isoforma del177 se refiere a la palabra “eliminación” y el número 177 hace referencia a la cantidad de bases ausentes en la isoforma ¹⁷.

La isoforma del177 presenta la eliminación completa del exón 6 que corresponden a 59 aa de la proteína en su forma silvestre. Sin embargo, esta isoforma junto con

la variante *wt*, es la única isoforma que es funcional ²¹ y que conserva la secuencia VGII en el carboxilo terminal, que es indispensable para su localización en Golgi ^{17,22}. En contraste, de acuerdo con la información reportada por Zhiwei Song *et.al* en 2010, en el CST de hámster, el cambio de la región peptídica 236KGFF239 (codificada por el exón 6) resulta en la pérdida de la función del CST ²³.

Adicionalmente, en el año 2012 Masao Kawakita *et.al* demostró con las mutaciones Y214G y S216F (codificados por el exón 6 del *SLC35A1*) que el grupo hidroxilo de ambos aminoácidos es importante para la actividad de transporte del CMP-ácido siálico ²⁴. En resumen, de los 59aa que se pierden dentro de la isoforma del177, seis han sido identificados como relevantes dentro de la actividad de transporte del CST: Y214, S216 y 236KGFF239.

La isoforma del177 también ha sido identificada en hámster. Sin embargo, en este organismo se ha reportado como una proteína no funcional ^{22,25}.

La isoforma del177 de hámster comparte un90% de homología con la isoforma del177 humana, no obstante, aún no se ha elucidado el mecanismo por el cual la isoforma del177 humana lleva a cabo su actividad biológica en humano a pesar de la ausencia de 59 aa, de los cuales seis se han reportado como fundamentales para la actividad del CST.

Cabe resaltar que en otras especies de mamíferos no existen reportes experimentales de la presencia de la isoforma del177 ni de ninguna otra isoforma de *splicing*.

Con el objetivo de analizar la presencia de isoformas de *splicing* en un grupo de mamíferos, en el presente trabajo se clonará el gen *slc35a1* del CST de células MA-104 (*Macaca mulatta*) y las posibles isoformas de *splicing* expresadas en éste organismo que presenta una homología de 99 % con humano y 90% con hámster.

2.0 HIPÓTESIS

El transportador de CMP-ácido siálico de *Macaca mulatta* presenta isoformas de *splicing* alternativo similares a las del transportador de CMP-ácido siálico humano.

3.0 JUSTIFICACIÓN

La sialilación es un proceso relevante dentro del área biotecnológica, y de acuerdo a la FDA, ciertas proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas deben presentar un perfil de sialilación específico para liberarse al mercado, como por ejemplo la proteína EPO, FSH y la hormona LH ²⁶.

La línea celular más utilizada para la producción de las proteínas recombinantes glicosiladas es la línea celular CHO (por sus siglas en inglés), que son células de ovario de hámster chino; pues además de que presentan de manera natural modificaciones de glicosilación ²⁶, también expresan ácido siálico en configuración α 2-3 ²⁷.

La línea celular MA-104 (células de riñón de *Macaca mulatta*) también es otra línea con relevancia biotecnológica, pues ha servido como un modelo para entender los mecanismos de infección viral de aquellos virus que reconocen residuos de ácido siálico superficial en células hospederas ²⁸ como los virus pertenecientes a la familia Paramyxoviridae, ²⁹ Orthomyxoviridae ³⁰ y Coronaviridae ³¹, por mencionar algunos ²⁸.

El CST es un elemento fundamental en el proceso de sialilación celular y se sigue analizando desde la perspectiva estructural y su mecanismo de transporte. La descripción más detallada respecto a su estructura-función está basada en el modelo cristalográfico del CST murino ¹⁶, y el modelo teórico del CST humano (hCST) recientemente publicado ³².

El hCST presenta isoformas de *splicing* alternativo en el *SLC35A1* donde la isoforma de *splicing* denominada del177 del transportador de CMP-ácido siálico es funcional a pesar de perder 59 aa. En contraste, la isoforma del177 identificada en células CHO no es funcional y no se ha reportado si en otros mamíferos existe la presencia de isoformas de *splicing*, ni su funcionalidad. En este trabajo se busca identificar si existe *splicing* alternativo del gen *slc35a1* de células MA-104 (*Macaca mulatta*) para indentificar posibles isoformas de *splicing* como las identificadas en humano. De esta forma se busca contribuir a la comprensión de la estructura-función del CST en otro mamífero diferente a humano como es Macaco utilizando células MA-104 que en un futuro pueden ser utilizadas como parte de procesos biotecnológicos que involucran a la sialilación celular y la correcta actividad del CST.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Caracterizar molecularmente el transportador de CMP-ácido siálico de *Macaca mulatta*.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar la presencia de isoformas de *splicing* del transportador de CMP-ácido siálico de células MA-104.
- Clonar la isoforma silvestre y otras isoformas de *splicing* del transportador de CMP-ácido siálico de células MA-104.
- Analizar teóricamente si las isoformas caracterizadas del transportador de CMP-ácido siálico de células MA-104 podrían ser funcionales.

5.0 ANTECEDENTES

5.1 Transportador de CMP-ácido siálico.

El CST es una proteína transmembranal codificada por el gen SLC35A1 que se encuentra en deuterostomados y algunos moluscos ⁶. Esta proteína pertenece a la familia SLC35 de los transportadores de soluto, cuya función es transportar nucleótidos-carbohidrato del citosol de la célula al lumen de retículo endoplásmico o del Golgi ³³.

El CST se encuentra localizado en la membrana *trans* de Golgi ¹ y transporta CMP-ácido siálico (biosintetizado en núcleo) del citosol al interior de Golgi donde las sialiltransferasas lo utilizan como sustrato donador para transferir el ácido siálico a proteínas, lípidos y ARN no codificantes ^{4,5,34}.

El gen SLC35A1 presenta genes ortólogos en vertebrados mandibulados y se expresa de manera ubicua variando únicamente en el nivel de expresión entre sus órganos y tejidos ³⁵. El *SLC35A1* en humanos se encuentra localizado en 6q15 y cuenta con 8 exones que codifican para una proteína de 337 aa ³⁵.

El primer análisis molecular y topológico del CST en mamíferos se llevó a cabo en un modelo murino ¹³. En el año de 1996, Matthias Eckhardt y colaboradores lograron clonar el *slc35a1* de ratón y expresarlo mediante experimentos de complementación en células CHO y mutantes de células CHO, con perfiles deficientes en glicoproteínas sialiladas y galactosiladas como son Lec2, Lec8 y CHO-6B2 ³⁶. Posteriormente, se realizó un análisis topológico del transportador de CMP-ácido siálico en ratón a partir de experimentos de inserción de etiquetas como marcaje con hemaglutinina (HA) y estudios de inmunofluorescencia en ratón ¹³.

El modelo topológico del CST basado en ratón consta de 337 aa que forman diez DTM; 9 loops, de los cuales los loops I, III, V, VII y IX se encuentran orientados hacia

el lumen de la cisterna *trans* de Golgi, y los loops II, IV, VI y VIII están orientados hacia el citosol y una región N- y C-terminal que están orientados hacia el citosol ¹³, figura 1.

Diversos autores han contribuido a la estructura-función del transportador de CMP-ácido siálico realizando experimentos de mutagénesis sitio puntual, silenciamiento y complementación genética ^{19,24,37-39}. En la tabla 1, se resumen los hallazgos más importantes que han sido reportados y que indican cuáles residuos de aminoácidos son importantes para el correcto funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico ⁴⁰.

Tabla 1. Regiones importantes para el funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico murino. Modificada de: Hadley et.al, Elsevier, 2014.

Regiones importantes en el funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico	Localización	Experimento realizado	Importancia en la funcionalidad del CST
Zipper de Leucina 56-77	DTM2	Formación de quimeras hUGT-hCST	Formación del oligómero del transportador de CMP-ácido siálico
236KGFF239	Loop VIII	Generación de mutantes CST-GFP12 y co-transfección con vector EPO en células CHO MAR-11	Esencial para el correcto funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico
NH ₃ terminal	Cadena terminal en región citosólica.	Marcaje con hemaglutinina en modelo murino del CST	Localización del transportador de CMP-ácido siálico con la membrana de trans Golgi.
COOH terminal	Cadena terminal en región citosólica	Marcaje con hemaglutinina en modelo murino del CST	
153Gly, 154Gly, 177Gly, 179Gly, 189Gly, 192Gly, 256Gly, 257Gly	DTM 5 y DTM 6	Co-transfección de CST en células CHO MAR-11	Involucrado en la formación de un canal acuoso putativo necesario para la ubicación.
Tyr 214 y Ser 216	DTM 7	Formación de quimeras hUGT-hCST	Residuos críticos para el reconocimiento del CMP-ácido siálico
Gln101	DTM3	Mutación natural en pacientes con	Esenciales para la actividad de transporte

		discapacidad intelectual y diátesis hemorrágica	del transportador de CMP-ácido siálico.
Leu136	Loop IV	Generación de mutantes CST-GFP12 y co-transfección con vector EPO en células CHO MAR-11	Esenciales para la actividad de transporte del transportador de CMP-ácido siálico.
Lys272	Loop VIII	Generación de mutantes CST-GFP12 y co-transfección con vector EPO en células CHO MAR-11.	Esenciales para la actividad de transporte del transportador de CMP-ácido siálico.
Leu112 y Asp113	Loop III	Generación de mutantes CST-GFP12 y co-transfección con vector EPO en células CHO MAR-11.	Activación del transportador de CMP-ácido siálico.
Cys16	DTM1	Mutagénesis dirigida CST murino, generada y expresada en <i>P. pastoris</i> .	Reconocimiento específico del sustrato.
Lys65	Loop II	Mutagénesis dirigida CST murino, generada y expresada en <i>P. pastoris</i> .	Reconocimiento de Neu5Ac
1Cys16 – Cys49 Cys127 – Cys131 Cys152 – Cys307	DTM1–DTM2, DTM4–DTM4, DTM5–DTM9, respectivamente	Co-transfección de CST en células CHO MAR-11.	Formación de puentes disulfuro entre los DTM DTM1 – DTM2, DTM4–DTM4, DTM5 – DTM9), respectivamente
Loops entre DTM3 y DTM 7	Loop III, Loop IV, Loop V y Loop VI	Generación de mutantes CST-GFP12 y co-transfección con vector EPO en células CHO MAR-11.	Cruciales para el funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico.
Ile270	Loop VIII	Generación de mutantes CST-GFP12 y co-transfección con vector EPO en células CHO MAR-11.	Actividad de transporte
Aminoácidos terminales IIGV	Cadena C-terminal con vista al citosol	Marcaje con hemaglutinina en modelo murino del CST	Señalización de exporte

En la

figura 1, se muestran los DTM1-DTM10 del CST que fueron identificados mediante etiquetado con hemaglutinina (HA). En la figura se marcan las HA con flechas, de las cuales, las flechas negras indican etiquetas de HA que interfirieron con la actividad del CST mientras que las puntas de flecha verdes marcan la posición de las etiquetas de HA que no interfirieron en la actividad del CST ⁸.

Los DTM2, DTM3 y DTM7 coloreadas en amarillo son esenciales para la actividad del transportador de CMP-ácido siálico¹⁸. Los cuatro aminoácidos VGII marcados con color púrpura están implicados en la translocación /exportación RE a Golgi⁴¹. Los residuos de glicina marcados en color azul contribuyen a la formación de un posible canal acuoso necesario para la translocación de CMP-Sia²⁰. Los aminoácidos de color naranja con contorno negro fueron identificados mediante el marcaje con GFP, y se reportaron como esenciales para la actividad del transportador de CMP-ácido siálico²². Los aminoácidos marcados en rojo se identificaron como indispensables para el reconocimiento del CMP-ácido siálico por el CST¹⁷.

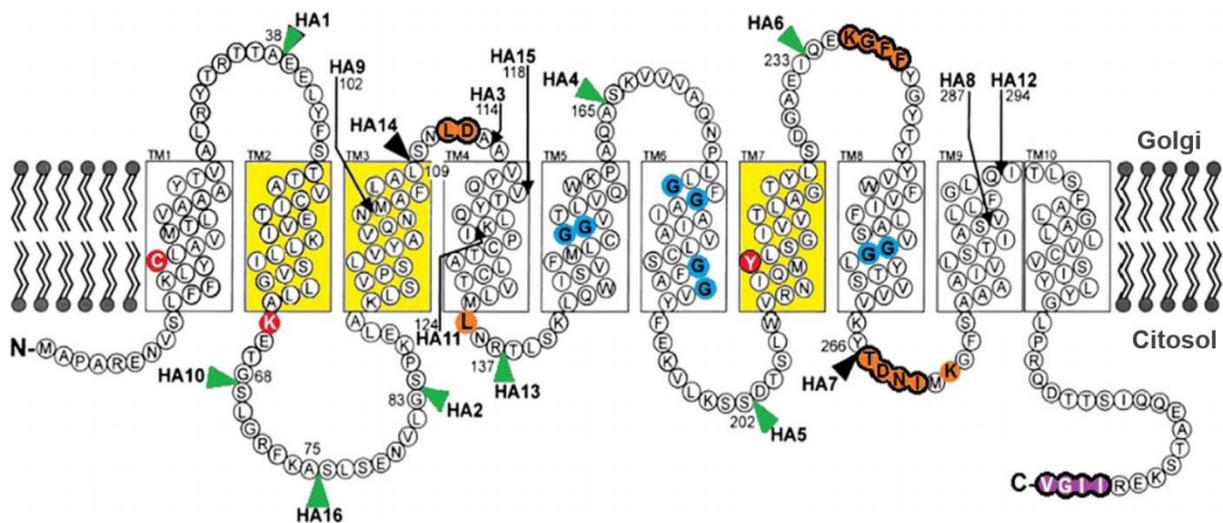


Figura 1. Topología de membrana del transportador de CMP-ácido siálico murino.

En amarillo: DTM esenciales para la actividad de transporte del CST; en azul: glicinas formadoras de un canal acuoso; en rojo: aa de reconocimiento para el CMP-Sia; en naranja: aa esenciales para el transporte de CMP-Sia; en púrpura: región VGII de localización a trans Golgi; flechas verdes: inserciones de HA que no provocaron cambio en la actividad del CST; flechas negras: inserciones de HA que provocaron deficiencia del transporte de CMP-Sia. Imagen modificada de "Mini Review Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress", 2014.

5.2 Isoformas de *splicing* del transportador de CMP-ácido siálico

La comprensión de la relación estructura-función del hCST se ha nutrido en gran parte por la identificación de mutaciones patogénicas que ocasionan desórdenes congénitos de la glicosilación, CDG (por sus siglas en inglés)^{17,19,20}.

El primer paciente con SLC35A1-CDG (desorden congénito de la glicosilación asociado a mutaciones en el *SLC35A1*) reportado presentó macrotrombocitopenia, neutropenia y ausencia del antígeno sialilado sialil Lewis x (sLex) en células polimorfonucleares⁷ provocado por deficiencia en la actividad de transporte del CST¹⁷.

El efecto de las mutaciones en el *SLC35A1*, identificadas en el paciente con SLC35A1-CDG se determinó por complementación genética en células Lec2. Las células Lec2 presentan un fenotipo asialo (sin presencia de ácido siálico) resultado de la sustitución homocigótica G>A en el sitio de empalme del donante del intrón 6 (IVS6 + 1G> A) del *slc35a1* lo que permite que esta línea celular sea viable para realizar experimentos de complementación genética para el estudio del CST¹⁷.

Las células Lec2 fueron utilizadas en estudios de complementación para evaluar la actividad de los 2 alelos del ADNc del transportador de CMP-ácido siálico del primer paciente con SLC35A1-CDG reportado. Los resultados indicaron que no se obtuvo complementación con ninguno de los 2 alelos¹⁷.

Adicionalmente se identificó una inserción de 4 bases CACT en el intrón 6 del *SLC35A1* en la madre del paciente y se propuso que éste cambio podría ser el responsable de eventos de *splicing* alternativo del *SLC35A1* generando la expresión de cinco las isoformas que se expresan de manera natural en humanos.

Las isoformas de *splicing* identificadas fueron: la isoforma silvestre (*wt*) del *SLC35A1* que se expresa en un 47% y codifica para 337aa, la isoforma del130 expresada un 29 % y codifica para 227aa, la isoforma del177 expresada en un 14% y codificante para 278aa, la isoforma del244 es expresada en un 9% y que codifica

para 189aa y finalmente la isoforma del290 expresada en un 1% y codificante para 65aa, figura 2 ¹⁷.

La isoforma de *splicing* del177 presenta la eliminación completa del exón 6 del *SLC35A1* (eliminación de 177 nucleótidos) y a pesar de que carece de 59 aminoácidos codificados por esta región se reportó funcional en humanos y no funcional en hámster ²².

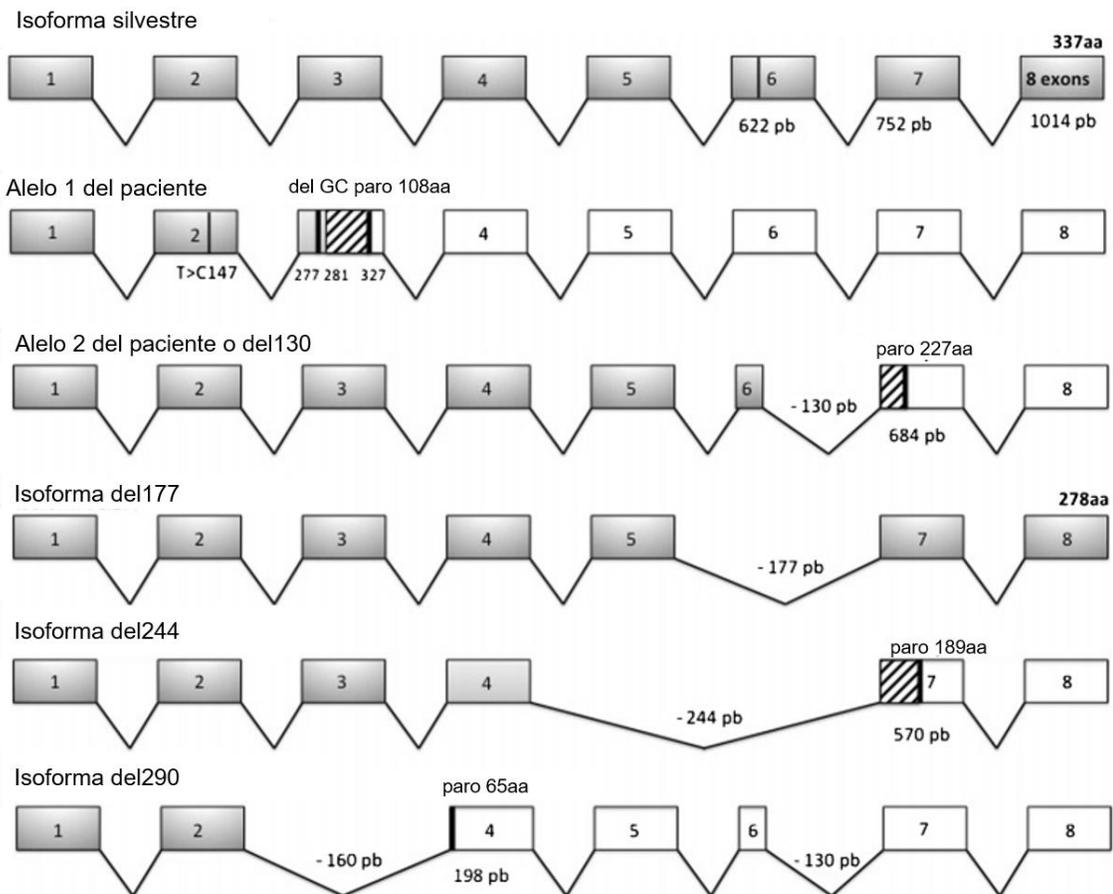


Figura 2. Isoformas del transportador de CMP-ácido siálico humano. El primer paciente descrito con SLC35A1-CDG descrito por primera vez presentó una sustitución 147 T> C y 2 microdelecciones en el alelo 1 (G277 y C281) que generó un cambio de marco de lectura abierto y la aparición de un codón de paro prematuro en la posición 327. El alelo A2 con delección de 130 pb (del130) que cubre dos tercios del exón 6 también genera un cambio del marco de lectura y un codón de paro prematuro en la posición 684. Las isoformas del177 (278 aa) con eliminación completa del exón 6, la del244 (189 aa) con pérdida completa del exón 5 y 6, la isoforma del290 (65 aa) con escisión completa del exón 3 y delección parcial de 130 pb del exón 6. La isoforma del177 es la única que conserva el exón 8

que codifica la región C-terminal de la proteína. Imagen modificada de (Salinas-Marín et. al “A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter”, 2016).

La funcionalidad de la isoforma del177 en humano ha sido explicada mediante dos hipótesis reportadas recientemente. La primera se realizó mediante una predicción de la topología basada en el modelo murino de Eckhardt et. al 1999, donde se propone que la traducción de la isoforma del177 resulta en producto proteico con 8 DTMs y siete loops debido a la ausencia del DTM7, fusionándose los DTM6 y DTM8²¹, sin embargo se reportó que dentro de éste modelo existía la pérdida de los loop VI y loop VII, los cuales se han reportado como esenciales para la función del transportador de CMP-ácido siálico, figura 3.

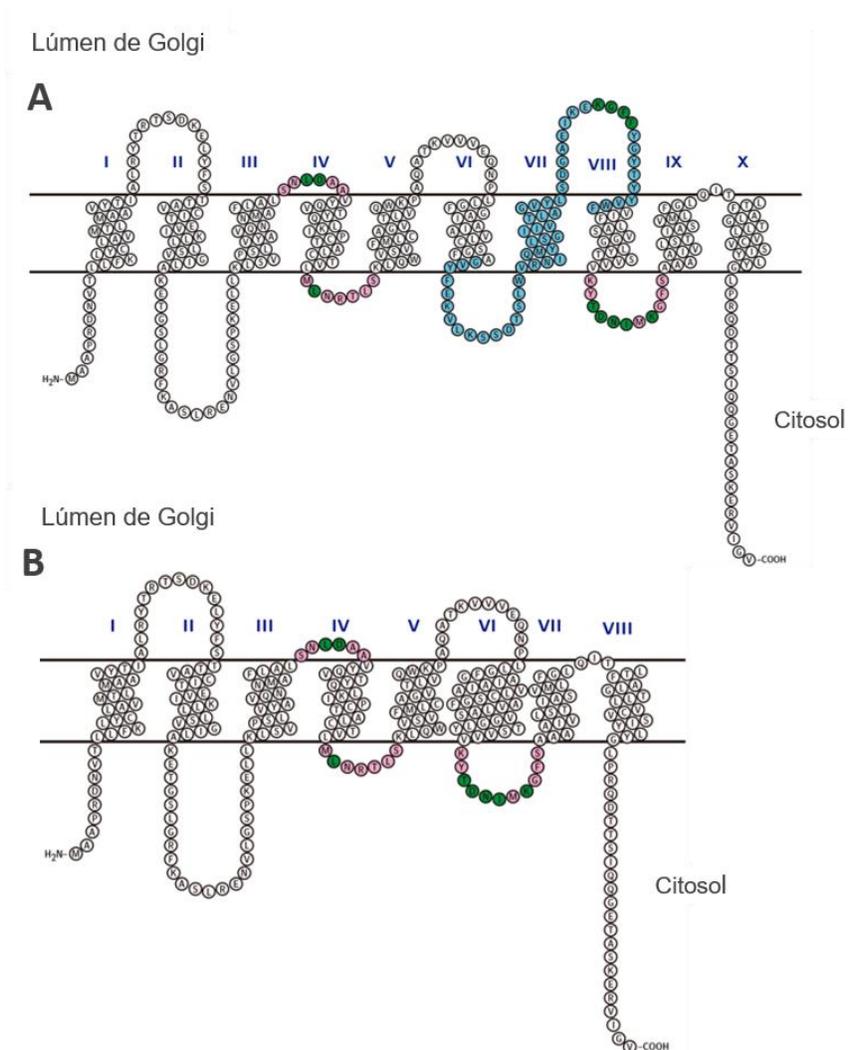


Figura 3. Diferencias topológicas del transportador de CMP-ácido siálico silvestre y del77. (A) Isoforma silvestre humana (*wt*). El color verde y rosa se marcan aquellos residuos de aminoácidos que han sido identificados con relevancia en el funcionamiento del transportador de CMP-ácido siálico, en azul se marcan aquellos residuos de aminoácidos que están codificados por el exón 6 en el *SLC35A1* (B) Isoforma del177-*SLC35A1*. Se observa la pérdida de los aminoácidos codificados por el exón 6 del *SLC35A1* y se observa la fusión de los DTM6 y DTM8, dando resultado a una proteína con ocho DTM totales y siete loops. Imagen modificada de Salinas-Marín *et.al*, “A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter”, 2016.

La segunda hipótesis propuesta por Hadley *et.al* 2019 menciona que la isoforma del177 se traduce en una proteína que conserva los diez DTMs, pero con un acortamiento de las hélices alfa, y que la funcionalidad de la isoforma del77 en humano se debe a que la ausencia de la Tyr214 en la del177 es suplida por un residuo de Tyr207, porque este residuo está involucrado en el reconocimiento del CMP mediante puentes de hidrógeno.

Por otro lado, se realizaron modelos tridimensionales de la isoforma del77 de humano y de hámster y se observó que espacialmente, en el modelo humano la Tyr207 está orientada hacia el interior de la proteína, y en el caso de hámster la Tyr207 se encuentra orientada hacia el exterior. Lo que provocaría la pérdida de la función de la isoforma del177 en hámster (figura 4).

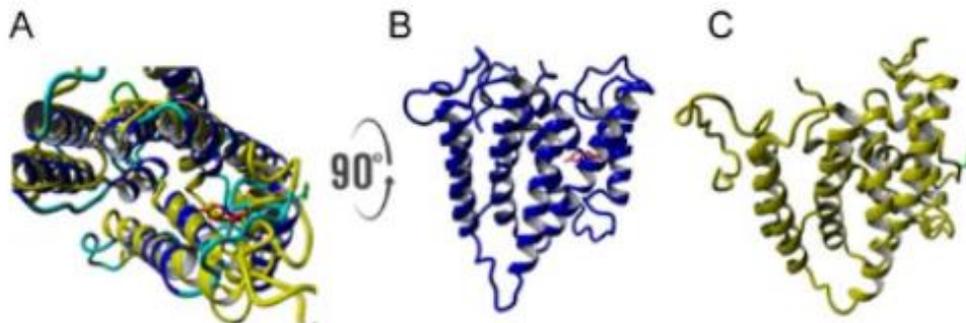


Figura 4. Modelos teóricos de la isoforma del77 de humano y hámster. (A) Se muestra de manera superficial el solapamiento de las estructuras tridimensionales del CST de humano y hámster, en color azul se indica el modelo humano y en amarillo en el modelo de hámster. (B) Se observa de manera lateral la estructura del CST humano, indicando en color rojo la posición de la Tyr207. (C) Se observa de manera lateral la estructura del CST de hámster, indicando en color verde la posición

de Tyr207. Modelo por homología basado en el cristal de CST murino. Imagen tomada de (2019, Hadley et.al, Elsevier).

5.3 Modelos cristalográficos del transportador de CMP-ácido siálico

El CST es uno de los transportadores nucleótido-carbohidrato más caracterizados de todo el grupo de los SLC35 de mamíferos. Actualmente los únicos modelos cristalográficos del CST pertenecen a ratón y a maíz ^{15,16}.

El modelo cristalográfico del CST de ratón ha brindado información acerca del tipo de interacción de los residuos de aminoácidos reportados con relevancia dentro de su actividad, así como la afinidad del CST con el CMP y el CMP-ácido siálico. Adicionalmente ha permitido desarrollar una hipótesis acerca del mecanismo de acción de transporte de CMP-ácido siálico ¹⁶.

La estructura cristalina de rayos X del CST de ratón en complejo con CMP ([6OH2](#)), por fase cúbica lipídica a un pH de 6.5 se muestra en la figura 5. El cristal fue obtenido a partir de difracción de rayos X en un sistema de expresión en la levadura *Komagataella pastoris* con una resolución de 2.58 Å ¹⁶.

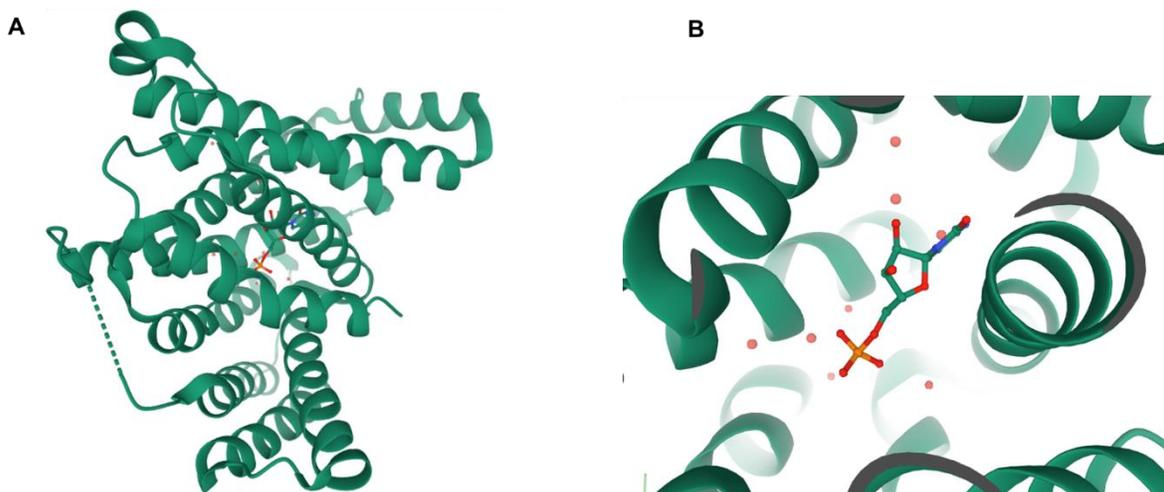


Figura 5. La estructura cristalina de rayos X del transportador de ácido siálico CMP de ratón en complejo con CMP. A) Estructura cristalina completa del CST. Se observan en color verde los 10 DTM descritos en el modelo topológico del mCST. B) Acercamiento superficial del CST. Al centro se

observa ligando CMP-ácido siálico, los puntos rojos representan moléculas de agua. Imagen tomada de (Boudker *et.al*, "Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport", 2019).

El cristal CST murino reveló que existen interacciones del CMP y del CMP-ácido siálico con los DTM3, DTM6 y DTM8. La interacción del CST con el CMP se lleva a cabo a partir de interacciones polares con los residuos S188, Y121, K124, T260, Q101, N102, K55, Y214, N210, y K272, figura 6A. Las interacciones del CST con el CMP-ácido siálico se lleva a cabo a partir de interacciones polares con los residuos A24, Y117, S188, Y121, K124, K272, T260, Q101, N102, K55, Y214, N210, y K272 y N102, figuras 6B y 6C.

Los reportes indican que la selectividad del CST por el CMP-ácido siálico se debe en gran parte a que la citosina está estrechamente coordinada con los residuos Lys55, Tyr214 y Asn210, lo que explica por qué el CST murino no reconoce fácilmente la región nucleotídica de otros carbohidratos activados ¹⁶.

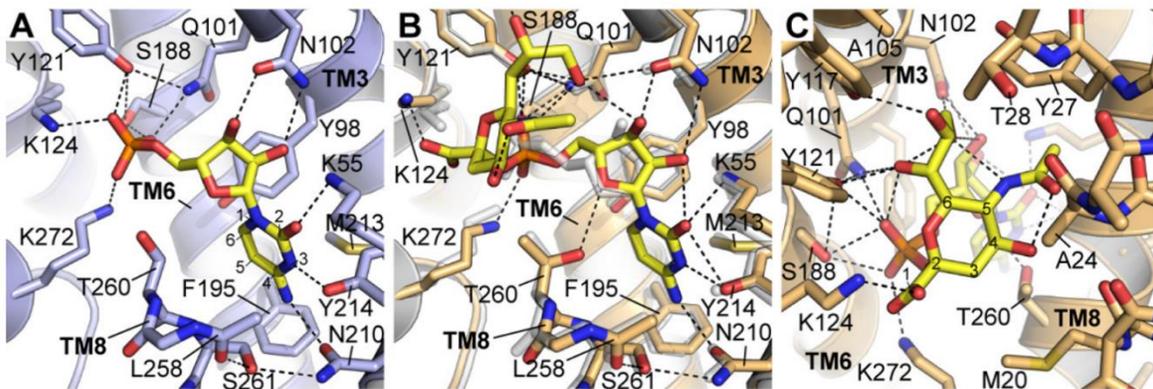


Figura 6. Interacciones del CMP y CMP-ácido siálico con el CST murino. (A) Interacción del CST murino con el CMP. (B) y (C) Interacción del CST murino con el CMP-ácido siálico (Neu5Ac) vista de dos ángulos diferentes. Imagen tomada de (Boudker *et.al*, "Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport", 2019).

Respecto al mecanismo de acción del CST, la hipótesis propuesta se describe en la figura 7. En la figura se presentan los cinco estados posibles del CST, siendo el

primero el que se encuentra de manera abierta hacia el citoplasma para la recepción del ligando CMP-ácido siálico, mediada principalmente por los DTM3, DTM6 y DTM4; se observa que existe un cambio de conformación a diferentes velocidades dependiendo de la molécula con la cuál este interactuando. Si el CST no está acoplado con su ligando correspondiente, el cambio conformacional se vuelve lento.

El siguiente estado es cuando la cavidad del CST se encuentra parcialmente ocluida, lo cual es mediado por el DTM4, ya sea con el ligando correspondiente o sin él. Posteriormente, el CST se encuentra en un estado ocluido, donde el ligando es rodeado por los DTM1, DTM3, DTM4, DTM5, DTM6, DTM8, DTM8 y DTM10. El ligando comienza a ser liberado cuando la cara orientada hacia el lumen de Golgi se encuentra parcialmente ocluida, lo cual es mediado por el DTM9. El ligando es liberado al lumen de Golgi cuando la cavidad está completamente abierta, los dominios que regulan la apertura son los DTM1 y DTM8.

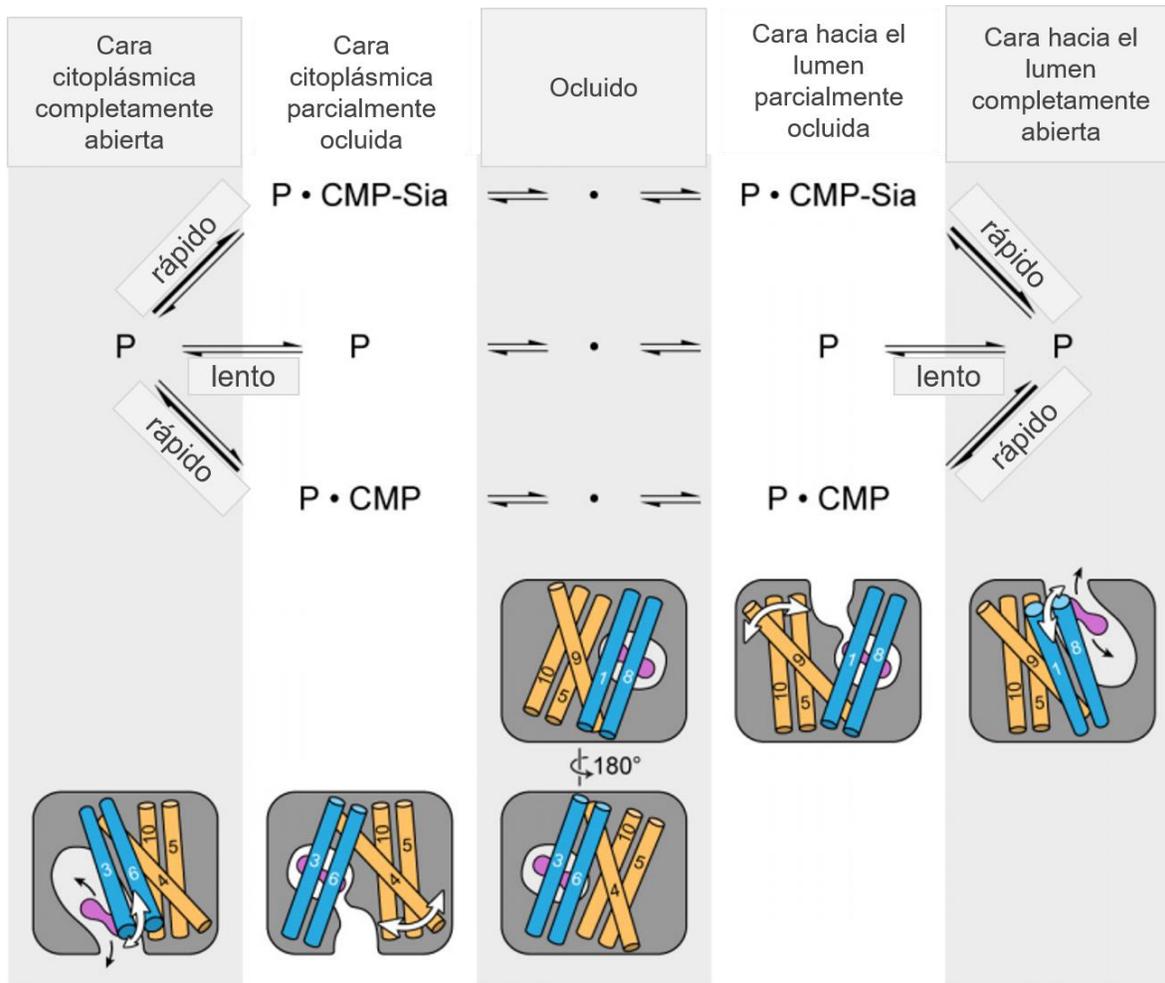


Figura 7. Mecanismo de acción propuesto para el CST murino. P= proteína. El ligando es indicado con color lila, y los dominios transmembranales se observan como cilindros enumerados, Imagen modificada de: (Boudker et.al, "Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport", 2019).

En cuanto al modelo teórico del CST humano, los reportes indican que en realidad la selectividad del CST por el CMP-Sia corresponde propiamente a la interacción de los residuos Tyr214, Ser216, Tyr260 Asn210, Glu52, Lys55, Tyr98 y Asn102 con los anillos del azúcar y de la base nitrogenada del CMP. Esto indica que cualquier carbohidrato o molécula pequeña que esté acoplado a una citidina, tiene la posibilidad de ser transportado por el CST siempre y cuando el tamaño del ligando no rebase el tamaño propio de la cavidad del CST, figura 8A ³².

Los residuos de Lys 272 y Lys 124 están conservados en todos los CST (figura 8B), lo cual soporta la idea de que el transportador tiene la capacidad de transportar moléculas fosfatadas que estén cargadas negativamente y que no tengan un tamaño mayor al ligando original debido al tamaño de la cavidad del CST, figura 8C

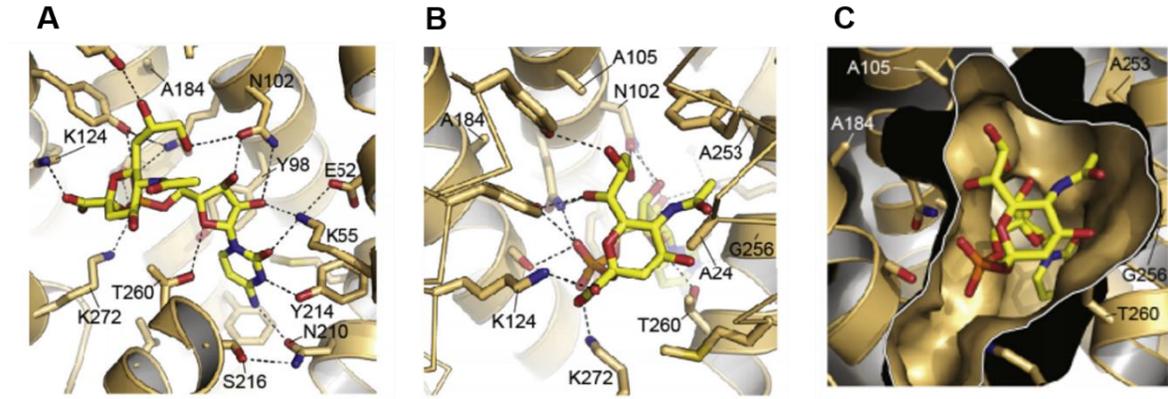


Figura 8. Interacción del sitio de unión del hCST con el CMP-Sia.

A) Estructura del sitio de unión del hCST acoplado con CMP-Sia (marcado en color amarillo). B) Estructura del sitio de unión del hCST acoplado con CMP-Sia (A) con una rotación de 90°. C) Representación superficial de la estructura de la cavidad que permite la entrada de CMP-Sia en el hCST.

El modelo cristalográfico de mCST y el modelo teórico hCST han brindado información relevante para comprender el funcionamiento del CST en mamíferos, sin embargo, considerando que los residuos Tyr214, Ser216 and 236KGFF239 están codificados por la región correspondiente al exón 6, aún no existe un modelo que explique de manera acertada la funcionalidad de la isoforma de *splicing* del177 en el hCST.

5.4 Análisis de isoformas del CST en otras especies de mamíferos.

Las isoformas del130, del244, del290 y del177 CST se han caracterizado en humano, y las isoformas del177 y la isoforma 2+3 (-178pb) en hámster respectivamente²². Sin embargo, existen reportes teóricos basados en experimentos de anotación genómica y mapeo computacional que proponen la presencia de isoformas de *splicing* del CST en otros mamíferos como ratón y macaco, tabla 2 ^{42,43}.

La isoforma SLC35A1-201 y la isoforma SLC35A1-202 en macaco, están descritas en el servidor *Ensembl*, refiriéndose la primera a una isoforma de 347aa, y la segunda a la isoforma wt de 337aa.

Las isoformas SLC35A1-201, SLC35A1-203 y SLC35A1-204 de macaco presentan de manera predictiva un marco abierto de lectura de acuerdo a los reportes de anotación genómica, codificando para los aminoácidos que se indican en la tabla 2 ⁴⁴.

Las isoformas SLC35A1-201 y SLC35A1-202 de ratón también presenta un marco abierto de lectura, en donde se reportan dos isoformas del CST, una isoforma *wt* y una isoforma de menor tamaño con 250aa. Por el contrario, las isoformas SLC35A1-203, SLC35A1-204 y SLC35A1-205 de ratón aparentemente no presentan un marco abierto de lectura de acuerdo a la información reportada en *Ensembl* (tabla 2)⁴²,

Tabla 2. Isoformas del CST en ratón y macaco

Organismo	Nombre de la isoforma	Tamaño en pb	Proteína
Macaco	SLC35A1-201	3545pb	347aa
Macaco	SLC35A1-202	3515pb	337aa
Macaco	SLC35A1-203	1023pb	340aa
Macaco	SLC35A1-204	977pb	185aa

Ratón	SLC35A1-201	2039pb	336aa
Ratón	SLC35A1-202	751pb	250aa
Ratón	SLC35A1-203	1141pb	_____
Ratón	SLC35A1-204	554pb	_____
Ratón	SLC35A1-205	358pb	_____

Los reportes de la presencia de éstas isoformas indican que en macaco y ratón existe *splicing* alternativo del *slc35a1*. Sin embargo, aún no existen reportes de que las proteínas producidas por las isoformas predictivas sean funcionales además de la isoforma silvestre. Ni se han clonado de manera experimental para experimentos de análisis molecular más detallados.

6.0 MARCO TEÓRICO

6.1 ¿Qué es el ácido siálico?

El ácido siálico es un carbohidrato que pertenece a la familia de los ácidos nonulosónicos, los cuales se componen de un esqueleto de nueve átomos de carbonos que se encuentran ciclados mediante un enlace de esterificación entre el carbono C2 y el C6 ⁴⁵. Los ácidos nonulosónicos tienen la característica de presentar una carga negativa en el grupo carboxilato del carbono C1 a pH fisiológico adquiriendo propiedades fisicoquímicas diferentes al resto de los carbohidratos ⁴⁵. El ácido siálico está involucrado en diversas funciones biológicas como el reconocimiento celular, adhesión, señalización celular, respuesta inmune y desarrollo neuronal ⁴⁵.

El ácido siálico presente en humanos es el ácido 5-*N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), que se diferencia del ácido 5-*N*-glicolineuramínico (Neu5Gc) presente en el resto de los mamíferos únicamente por la ausencia de un grupo hidroxilo en la región amino del carbono C5, figura 9. La ausencia del grupo hidroxilo en el grupo amida del C5 en la estructura química del Neu5Ac en humanos se debe a la pérdida del funcionamiento del gen CMAH que codifica para una hidroxilasa citoplásmica, que se origina debido a la ausencia del 92pb que corresponden al exón 6 del gen CMAH humano^{46,47}. El ácido siálico presente en humanos es el ácido 5-*N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), que se diferencia del ácido 5-*N*-glicolineuramínico (Neu5Gc) presente en el resto de los mamíferos únicamente por la ausencia de un grupo hidroxilo en la región amino del carbono C5, figura 9. La ausencia del grupo hidroxilo en el grupo amida del C5 en la estructura química del Neu5Ac en humanos se debe a la pérdida del funcionamiento del gen CMAH que codifica para una hidroxilasa citoplásmica, que se origina debido a la ausencia del 92pb que corresponden al exón 6 del gen CMAH humano ^{46,47}.

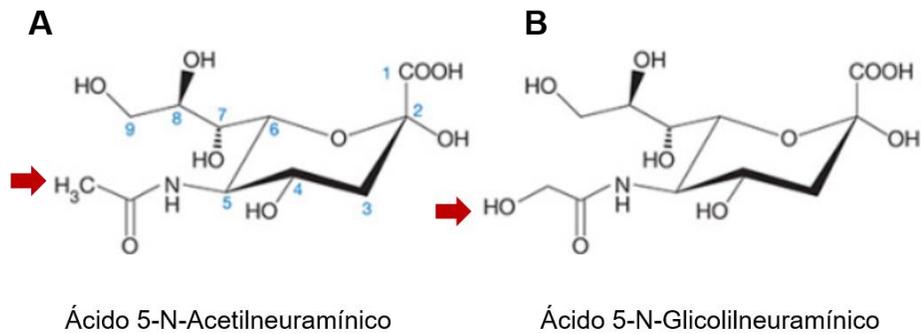


Figura 9. Estructura química del ácido siálico distribuidos en humano y animales. (A) Estructura del Neu5Ac. En azul se marcan los nueve carbonos que forman el esqueleto del ácido siálico. La flecha roja indica el grupo R unido a la amida del C5 de la estructura del Neu5Ac. (B) Estructura del Neu5Gc, la flecha roja indica el grupo R de la amida del C5 de la estructura del Neu5Gc.

Los miembros de la familia del ácido siálico llevan una cadena lateral similar al glicerol del C7 al C9, pero varían en el sustituyente unido al C5 debido a modificaciones por acetilación, hidroxilación y aminación principalmente, lo cual les permite obtener una amplia diversidad estructural.

6.2 Biosíntesis de CMP-ácido siálico

La biosíntesis del CMP-ácido siálico es un proceso que inicia en el citosol y finaliza en el núcleo celular. El ácido siálico es el único carbohidrato que se activa dentro del núcleo mientras que el resto de los carbohidratos se activan en el citosol ¹.

A partir de una molécula de *N*-acetilmanosamina (ManNAc), proveniente de la epimerización de una molécula de GlcNAc o proveniente de ManNAc libre como producto de otras vías metabólicas, ocurre una fosforilación por la enzima ManNAc 6 cinasa, dando lugar a una molécula de ManNAc-6-P.

La enzima ácido siálico-9-P sintasa lleva a cabo una reacción de condensación entre la ManNAc-6-P y una molécula de fosfoenol piruvato (PEP) que resulta en una molécula de ácido Neu5Ac-9-P o ácido siálico 9-P.

La enzima ácido siálico 9-fosfatasa cataliza la reacción del Neu5Ac-9-P a Neu5Ac para su posterior entrada al núcleo.

Dentro del núcleo la enzima CMP- ácido siálico sintasa cataliza la formación de la molécula CMP- ácido siálico mediante CTP y ácido siálico. Posteriormente sale de núcleo y pasa al lumen de Golgi mediante el transportador de CMP-ácido siálico en donde el CMP-ácido siálico será utilizado como azúcar donador para las reacciones de sialilación, figura 10.

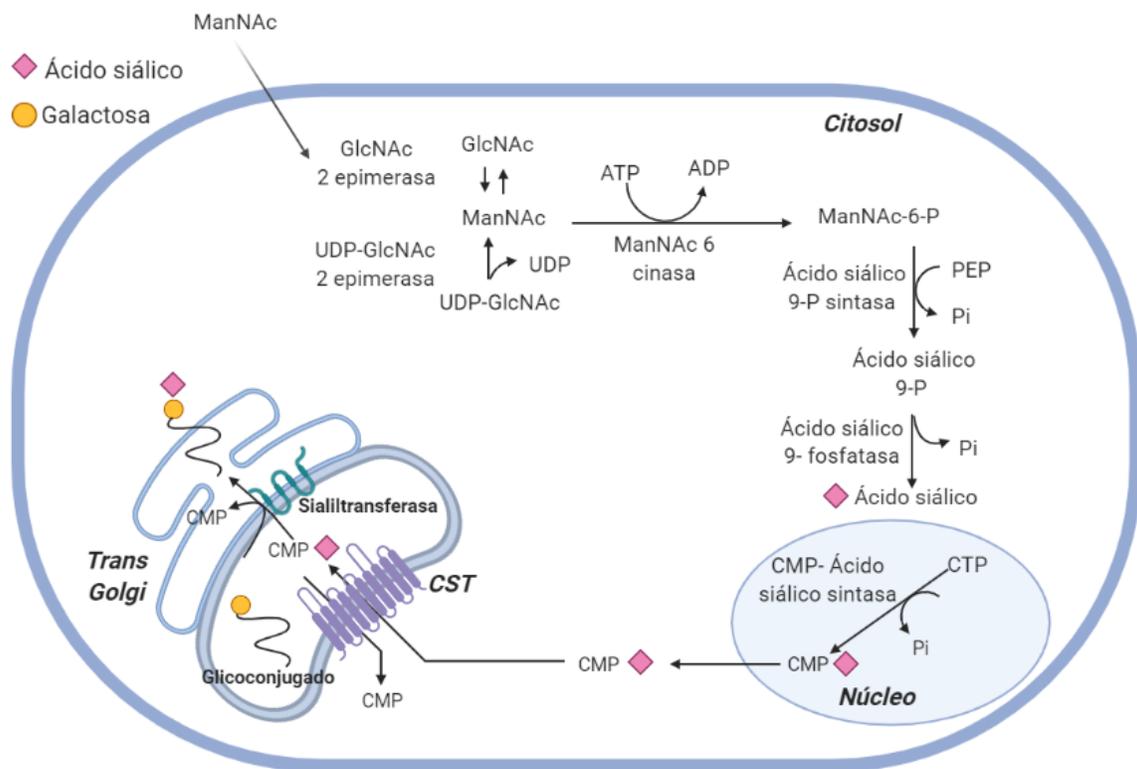


Figura 10. Biosíntesis de ácido siálico. Modificada (Jacobs *et al*, 2001, "Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway," *Biochemistry*).

6.3 Sialilación celular

La sialilación celular es un proceso que consiste en la adición covalente de una o más unidades de ácido siálico a una molécula como glicoproteínas, glicolípidos y glicorRNAs debido a la actividad de sialiltransferasas, las cuales conforman uno de

los grupos de la familia de las glicosiltransferasas (enzimas que transfieren carbohidratos). Las sialiltransferasas toman como molécula donadora al CMP- ácido siálico para formar a uno de los cuatro enlaces posibles con la molécula aceptora, los cuales son: Neu5Ac α 2-6Gal, Neu5Ac α 2-3Gal, Neu5Ac α 2-6GalNAc y Neu5Ac α 2-8Neu5Ac ⁴⁸.

La sialilación es un proceso que ocurre de manera tejido-específico y dentro de la célula se produce exclusivamente en la cisterna *trans* del aparato de Golgi, por lo que la que la adición del ácido siálico ocurre de manera terminal en los glicoconjugados ⁴⁹.

La sialilación celular es un mecanismo importante en procesos de comunicación célula-célula; adhesión celular y señalización. También, la presencia del ácido siálico afecta el tiempo de vida de los eritrocitos y trombocitos; el plegamiento proteico, la formación de proteínas O-glicosiladas como las mucinas que lubrican y protegen diferentes órganos; afecta la funcionalidad otros elementos sialilados importantes como las siglectinas que se encargan del reconocimiento de patógenos gracias a la presencia de ácido siálico ⁴⁹.

En los últimos años se han descubierto enfermedades asociadas con la sobre expresión del ácido siálico, o su deficiencia en las células, como lo son el caso de: las sialidosis, la trombocitopenia, la trombastenia, y también deficiencias en el transportador de ácido siálico pueden resultar en desórdenes congénitos de la glicosilación, en éste caso, el síndrome SLC35A1-CDG ⁵⁰.

6.4 Familia del CST

Los transportadores de nucleótido carbohidrato juegan un papel fundamental para la síntesis de glicoconjugados ¹, los cuales adquieren propiedades fisiológicas y fisicoquímicas gracias a su unión con los nucleótidos-carbohidrato, los cuales son

internalizados del citosol al lumen de RE o al lumen de Golgi gracias a un grupo de transportadores portadores de soluto O SLC. Los SLC a su vez se dividen en familias dependiendo del tipo de solutos que transportan. En éste caso, la familia correspondiente al transporte de nucleótidos carbohidratos es la 35, y las subfamilias en las que se divide corresponden de la subfamilia A, a la subfamilia G dependiendo del ligando, tabla 3 ¹².

Los transportadores nucleótido carbohidrato son organelo específicos, se pueden expresar diferencialmente en la membrana de retículo endoplásmico, en la membrana de Golgi o en la membrana de ambos organelos. Actualmente la topología propuesta para los transportadores SLC35 es de 10 dominios transmembranales, con las terminaciones N- y C-terminal ubicados en la cara citosólica.

Tabla 3. Miembros de los transportadores nucleótido- carbohidrato SLC35. Tabla modificada de (NCBI, Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function 2019)

Nombre del gen	Nombre de la proteína	Sustrato	Localización celular	Longitud en aminoácidos biológica en	Reporte de actividad organismos
SLC35A 1	Transportador de CMP-Sia	CMP-Sia	Exclusivamente Golgi	337	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Trypanosoma brucei brucei</i>
SLC35A 2	Translocador de UDP-Gal	UDP-Gal; UDP-GalNAc	Golgi y RE	396	<i>Homo sapiens, C. elegans, Arabidopsis thaliana, Toxoplasma gondii, Trypanosoma brucei brucei, Drosophila melanogaster, Entamoeba histolítica</i>
SLC35A 3	Transportador de UDP-GalNAc	UDP-GalNAc	Predominantemente Golgi	325	<i>Homo sapiens, C. elegans, Arabidopsis thaliana,</i>

					<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> <i>brucei</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> ,
SLC35A 4	Probable transportador de UDP-azúcar	UDP-GalNAc	Predominantemente Golgi	324	<i>Homo sapiens</i> , <i>C. elegans</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Entamoeba histolítica</i>
SLC35A 5	Probable transportador de UDP-azúcar	UDP-azúcar putativo	Principalmente Golgi	424	<i>Homo sapiens</i>
SLC35B 1	Probable transportador de UDP-galactosa	ADP/ATP	Golgi y RE	322	<i>Homo sapiens</i>
SLC35B 2	Transportador de PAPS 1	PAPS	Exclusivamente Golgi	422	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>
SLC35B 3	Transportador de PAPS2	PAPS	Exclusivamente Golgi	401	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>
SLC35B 4	Transportador de UDP-Xyl	UDP-Xyl; UDP-GINcAc	Golgi y RE dependiendo de la expresión del sistema.	331	<i>Homo sapiens</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
SLC35C 1	Transportador de GDP-Fuc	GDP-Fuc	Predominantemente Golgi	364	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Oryza sativa</i>
SLC35C 2	Proteína del gen 1 sobreexpresada por cáncer de ovario	GDP-Fuc putativo	Golgi y/o RE	365	<i>Homo sapiens</i>
SLC35D 1	Transportador de UDP-Glucronico	UDP-GlcA; UDP-GalNAc	Exclusivamente RE	355	<i>Homo sapiens</i> , <i>C.elegans</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>

SLC35D 2	Transportador de UDP-GalNAc/GDP-Man; UDP-Glc	UDP-GalNAc;GD P-Man; UDP-Glc	Exclusivamente RE	337	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Trypanosoma burcei burcei</i> , <i>Saccharomices cereviceae</i> .
SLC35D 3	Proteína 1 similar una conexión marginal	UDP-GalNAc; UDP-GlcNAc;UD P-GA	RE, Golgi y endosomas tempranos	416	<i>Homo sapiens</i>
SLC35F 2	SLC35F2	Sustrato desconocido	Posiblemente en membrana celular	374	<i>Homo sapiens</i>

7.0 METODOLOGÍA.

La metodología experimental que se llevará a cabo se describe de manera general en la figura 11.

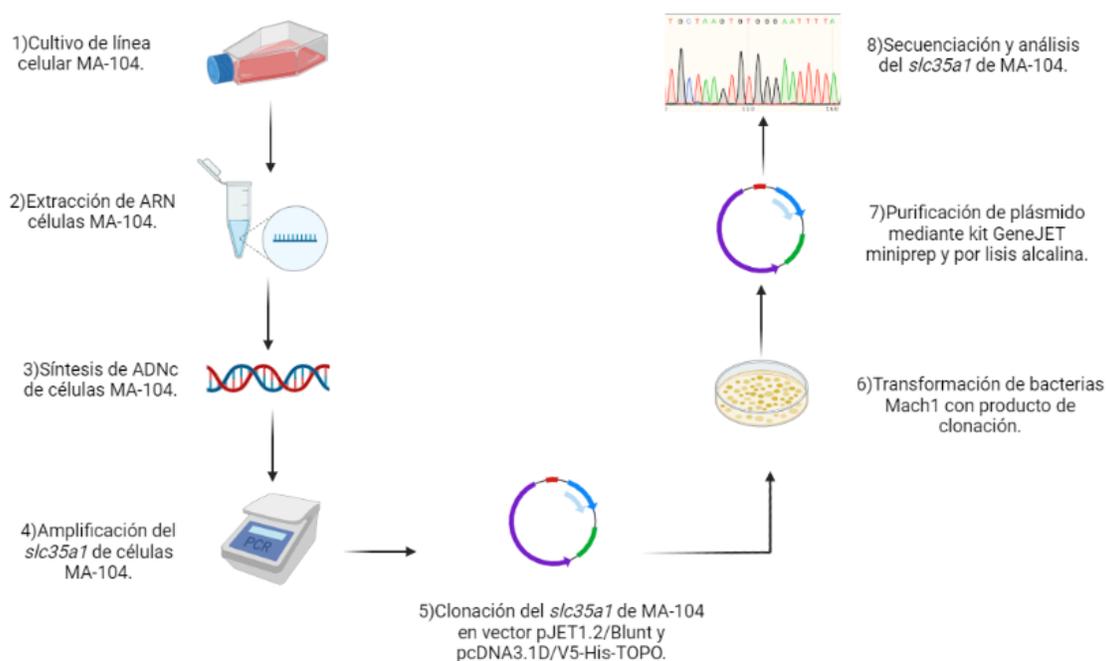


Figura 11. Esquema general de la metodología experimental. 1) Cultivo celular de la línea MA-104, 2) Extracción de ARN, 3) Síntesis de ADNc de MA-104, 4) Amplificación del *slc35a1* de MA-104, 5) Clonación del *slc35a1* de MA-104 en el vector pJET1.2/Blunt y en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO 6) Transformación de bacterias competentes Mach1, 7) Purificación de plásmido por lisis alcalina y por kit de purificación GeneJET Miniprep y 8) Secuenciación del *slc35a1* de MA-104.

7.1 Cultivo celular

7.1.1 MA-104 Clone 1

La línea celular adherente MA-104 (ATCC® CRL-2378.1™) correspondiente a epitelio de riñón de *Macaca mulatta* fue donada por la Dra. Vanessa López del laboratorio de inmunología viral, UAEM. Las células se cultivaron en una caja T25 en 5mL de medio DMEM (12100046, Gibco); suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, (26140-079, Gibco); y al 1% de estreptomicina-penicilina (15140122, Gibco); a 37°C en una atmósfera humificada al 5% de CO₂.

7.2 Extracción de ARN de MA-104

Las células MA-104 se cultivaron en cajas de 24 pozos a una densidad de 2.5×10^5 células/mL durante 24 h. Posteriormente fueron lavadas con 1mL PBS 1X y tratadas con 1mL de TRIzol (15596026, Applied Biosystem) y almacenadas a -80°C durante cinco días.

Las muestras de TRIzol fueron descongeladas y se adicionaron 200µL de cloroformo frío al 100% mezclando mediante agitación durante 15 segundos. La mezcla se incubó durante 2 min. a TA y posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm a 4°C durante 15 min.

La fase acuosa del sobrenadante se recuperó y se adicionaron 500µL de isopropanol frío al 100% y se incubó durante 10 min. a TA. Posteriormente, se centrifugó a 13,500 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue decantado y el pellet se resuspendió en 1mL de etanol frío al 75% y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min.

El etanol se decantó y el pellet de RNA se dejó secar durante 5 min. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 10 µL de agua libre de RNAsas (W4502, Sigma-Aldrich) y se cuantificó en el NanoDrop (™ 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific) a longitudes de onda de 260nm y 280nm. La integridad del RNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.3 Diseño de oligonucleótidos para clonar el *slc35a1* de MA-104

Los oligonucleótidos para clonar el *slc35a1* de MA-104 fueron diseñados a partir de la herramienta Snap Gene Viewer DNA basados en la secuencia del transportador *slc35a1* de *Macaca mulatta* ([NM_001266759.1](#)) y *Chlorocebus sabaeus* ([XM_008006550.2](#))

Los oligonucleótidos sentido o TRN-2s con la secuencia 5' GAACCATGGCTGCCCCGAGAGAC3'¹⁷, TOPO MA F 5' CACCATGGCTGCCCCGAGACAA 3', y el oligonucleótido anti sentido *Chlorocebus R* con la secuencia 5'GCCTCACGTGAGACTCCTGTTAAG3' se sintetizaron en la Unidad de síntesis y secuenciación del IBT, UNAM con las especificaciones indicadas en la tabla 4.

7.4 Síntesis de ADNc de MA-104

El ARN extraído de las células MA-104 fue previamente cuantificado en un NanoDrop (N50-TOUCH UV/Vis Spectrophotometer, Implen). La síntesis de ADN codificante (ADNc) fue realizada partiendo de 2 µg de ARN total, 1 µL de dNTP's (00342481, Thermo Fisher Scientific), 1 µL de oligo dT y llevado a un volumen de 12 µL con agua grado molecular. La mezcla se incubó a 65°C durante cinco min. y posteriormente la mezcla se incubó en hielo durante cinco min. más.

A la mezcla de reacción se le adicionaron 7 µL de mix First Strand Buffer (K1651, Invitrogen), 4 µL de Buffer 5x, 2 µL de DTT 0.1M y 1 µL de inhibidor de RNAasa. La mezcla fue incubada durante 2 min. a 37°C. Después se añadieron 0.5 µL de enzima transcriptasa reversa (28025013, Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 50 min. La reacción se desactivó incubando la reacción a 70°C durante 15 min. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20 °C para su uso posterior.

7.5 PCR convencional del *slc35a1* de células MA-104

La PCR convencional utilizando los oligonucleótidos GADPH5q-GADPH3q (85 pb del gen *GADPH*) y los oligonucleótidos TRN-2s-NTR4-as que amplifican 854pb (exón2-exón 7) del *slc35a1* se realizó para verificar la correcta síntesis de ADNc obtenido de MA-104.

La PCR convencional para la amplificación completa del *slc35a1* de células MA-104 se realizó con los oligonucleótidos TRN-2s y Chlorocebus R acuerdo a la tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen del transportador en humano y macaco.

Oligonucleótidos				
Organismo	Nombre	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón
Humano	TRN-2s	5' GAACCATGGCTGCCCCGAGAGAC 3'	67.5°C	854 pb
Humano	NTR-4as	5' GCAGCAGCGGCCATTGTCCTTTCC 3'	67.5°C	
Humano	GADPH5q	5' CCATCTTCCAGGAGCGAGATCC 3'	60°C	85 pb
Humano	GADPH3q	5' GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC 3'	60°C	
Macaco	TOPO MA F	5' CACCATGGCTGCCCCGAGACAA 3'	60°C	1048 pb
Macaco	Chlorocebus R	5' GCCTCACGTGAGACTCCTGTTAAG3'	60°C	
Humano	TRN-2s	5' GAACCATGGCTGCCCCGAGAGAC 3'	67.5°C	1047 pb
Macaco	Chlorocebus R	5' GCCTCACGTGAGACTCCTGTTAAG3'	60°C	

El mix para la reacción de PCR para amplificar un gen endógeno como GADPH fue preparado como se indica en la tabla 5, utilizando el par de oligonucleótidos GADPH5q-GADPH3q. También se utilizaron los oligonucleótidos TRN-2s y NTR-4as de humano y que se alinea con el gen *slc35a1* de macaco en el exón 2 y exón 7 respectivamente.

Tabla 5. Reacción de PCR para verificación de ADNc de células MA-104

Reactivo	Volumen
Agua grado molecular	16.75 μ L
NH ₄ SO ₄ 10X	2.5 μ L
MgCl ₂ 25 mM	3 μ L
Oligo sentido (20 pmolar)	0.5 μ L
Oligo antisentido (20 pmolar)	0.5 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
Taq Polimerasa	0.25 μ L
ADNc MA-104	1 μ L

El gradiente de temperaturas fue diseñado de la siguiente manera; 94°C durante 1 min., temperatura de alineamiento respecto a la tabla 5, 72°C durante 1 min., y un ciclo adicional a 72°C durante 10 min.

EL ADNc verificado con la PCR convencional indicada anteriormente se utilizó como templado para amplificar la región codificante del *slc35a1* de células MA-104, preparando un mix para PCR como se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen del transportador en hámster, humano y macaco.

Reactivo	Volumen
Agua grado molecular	16.75 μ L
NH ₄ SO ₄ 10X	2.5 μ L
MgCl ₂ 25 mM	3 μ L
Oligo sentido TRN-2s (20 pmolar)	0.5 μ L
Oligo antisentido Chlorocebus R (20 pmolar)	0.5 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
Taq Polimerasa	0.25 μ L
ADNc MA-104	1 μ L

El gradiente de temperaturas fue diseñado de la siguiente manera; 94°C durante 1 min., temperatura de alineamiento respecto a la tabla 5, 72°C durante 1 min., y un ciclo adicional a 72°C durante 10 min.

7.6 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ARN extraído anteriormente, fue verificado mediante electroforesis. Se realizó una dilución 1:10 con agua libre de nucleasas (W4502, Sigma Aldrich) y se cargaron 10 µL de ARN correspondiente con 5 µL de buffer de carga 6X para ADN. Las muestras de ARN se corrieron en un gel de agarosa al 1% con un volate de 70 V durante 1 h. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 1kp Plus (SM1333, Thermo Fisher Scientific).

Los productos de PCR convencional de MA-104 fueron mezclados con buffer de carga 6X para ADN y las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % con un voltaje de 70 V durante 1 h. El gel de electroforesis fue visualizado en el transiluminador de luz UV (UV-Transiluminador, Model E3000, Accuris Instruments)

7.7 Clonación del *slc35a1* de MA-104 en el vector pJET1.2/Blunt

La reacción de PCR convencional utilizando como templado el ADNc obtenido de MA-104 se realizó utilizando los oligonucleótidos TRN-2s-Chlorocebus R. El producto de PCR se cuantificó en un Nanodrop (N50-TOUCH UV/Vis Spectrophotometer, Implen).

La mezcla para la reacción de clonación se realizó con 10 µL de buffer de ligación 2X (proporcionado por el kit), 6 µL de agua libre de nucleasas, 1µL de producto de PCR correspondiente y 1 µL de enzima blunting (K1231, Thermo Fisher Scientific).

La reacción fue incubada a 70°C durante 5 min y posteriormente se colocó en hielo y se adicionó 1 µL del vector de clonación pJET1.2/Blunt (50 ng/µL) y 1 µL de enzima T4 ligasa. Finalmente, la reacción se incubó a 22°C durante 30 min.

La mezcla de reacción de clonación (8 µL) se mezcló con 150 µL de bacterias quimio competentes Mach One. La suspensión celular se incubó en hielo durante 30 min.

Posteriormente, las bacterias fueron incubadas en un termo bloque a 42°C durante 1 min. y después se incubaron en hielo durante 30 min.

Al cultivo se le adicionaron 250 µL de medio SOC preparado previamente a TA. Finalmente se incubaron a 37°C durante 1 h a 200 rpm en una incubadora (Incu-Shaker Mini, Benchmark).

Del volumen total de las bacterias Mach One transformadas, se inocularon 30 µL y 100 µL en dos cajas Petri con medio LB+ Ampicilina 0.1 mg/mL, respectivamente, y se incubaron 12-16 h a 37°C.

7.8 Clonación del *slc35a1* de MA-104 en un vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO

La clonación del *slc35a1* de MA-104 en el vector de clonación pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (K480001, Invitrogen) se realizó partiendo del templado obtenido por PCR convencional como se indica en la tabla 7. Posteriormente, se llevó a cabo una segunda PCR utilizando el par de Oligos TOPO MA F-Chlorocebus R para asegurar la direccionalidad 5'-3' en la inserción con el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, tabla 8.

Tabla 7. Reacción de PCR para realizar la clonación del *slc35a1* de MA-104 en pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.

Reactivo	Volumen
Agua grado molecular	16.75 µL
NH ₄ SO ₄ 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	3 µL
Oligo sentido TRN-2s (20 pmolar)	0.5 µL
Oligo antisentido Chlorocebus R (20 pmolar)	0.5 µL
dNTP's 10 mM	0.5 µL
Taq Polimerasa	0.25 µL
ADNc MA-104	1 µL

El gradiente de temperatura se llevó a cabo de la siguiente manera: 94°C durante 1 min., 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 min.

Tabla 8. Reacción de PCR para clonación en pcDNA3.1D/V5-His-TOPO

Reactivo	Volumen
Agua grado molecular	17.75 μ L
Buffer HF 5X	5 μ L
Oligo sentido TOPOMA F 20 pmolar	0.5 μ L
Oligo antisentido Chlorocebus R 20 pmol	0.5 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
Taq Phusion	0.05 μ L
Templado	1 μ L

El gradiente de temperatura se llevó a cabo de la siguiente manera: 98°C durante 10 segundos, 70°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 min.

El producto de PCR para clonación fue purificado mediante columna con el Kit GeneJET Gel Extraction Kit (K0691, Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del manual. El producto de PCR purificado fue cuantificado en un NanoDrop (N50-TOUCH UV/Vis Spectrophotometer, Implen).

La reacción de clonación se realizó con 20 ng de producto de PCR purificado, 1 μ L de solución salina (proporcionada por el kit), 1 μ L de vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (K490001, Thermo Fisher) y se llevó a un volumen final de 6 μ L con agua grado molecular. La reacción se mezcló lentamente mediante pipeteo y se incubó a 22°C durante 5 min.

Para la transformación de bacterias competentes *E. coli* Mach1 se consideró un volumen de 2 μ L de la reacción de clonación para 150 μ L de bacterias competentes y la reacción de transformación se incubó en hielo durante 30 min.

Posteriormente, el vial se incubó a 42°C durante 1 min. y después se incubó nuevamente durante 30 min. en hielo. Al terminar de añadieron 250 µL de medio SOC (proporcionado por el kit) a TA y el vial se incubó a 37° a 200 rpm durante 1 h.

En una caja de medio LB+Amp 0.1 mg/mL se inocularon 50 µL y 100 µL y se incubaron a 37°C durante 12 h.

7.9 PCR de colonia

Para la verificación de la correcta ligación de los insertos del *slc35a1* dentro de los vectores de clonación pJET1.2/Blunt y pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, se realizó una PCR de colonia con los oligonucleótidos TRN-2s y Chlorocebus R, y TOPO MA F y Chlorocebus R, respectivamente. Siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 9.

Tabla 9. Reacción para PCR de colonia

Reactivo	Volumen
Agua grado molecular	16.75 µL
NH ₄ SO ₄ 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	3 µL
Oligo sentido TRN-2s o TOPO MA F (20 pmolar)	0.5 µL
Oligo antisentido Chlorocebus R (20 pmolar)	0.5 µL
dNTP's 10 mM	0.5 µL
Taq Polimerasa	0.25 µL
ADNc MA-104	1 µL

El producto de PCR fue observado mediante electroforesis. Las colonias positivas fueron aisladas y mediante su preparación en glicerol al 15% se almacenaron a -80°C para su preservación.

7.10 Purificación de plásmidos.

Las clonas Mach1 transformadas fueron seleccionadas previamente e inoculadas en 5 mL de medio LB líquido + Ampicilina 0.1 mg/mL.

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

El sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido se resuspendió en 250 µL de solución de resuspensión proporcionada por el Kit de purificación Gene JET Plasmid Miniprep (#K0502, Thermo Fisher Scientific), suplementada con ARNasa A. Posteriormente se adicionaron 250 µL de solución de lisis (#k0502, Thermo Fisher Scientific) mezclando por inversión e incubando durante 5 min. a TA. Al terminar la reacción se adicionaron 350 µL de solución de neutralización mezclando por inversión.

El lisado de bacterias se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a una columna de purificación (Kit #0502, Thermo Fisher Scientific) y se centrifugó nuevamente a 13500 rpm durante 1 min.

El sobrenadante fue descartado y la columna de purificación fue lavada con 500 µL de solución de lavado (diluido previamente con etanol 100%) y centrifugado a 13500 rpm durante 1 min. El sobrenadante fue descartado y se añadieron nuevamente 500 µL de solución de lavado y se centrifugó a 13500 rpm durante 1 min. El sobrenadante se descartó y se centrifugó nuevamente a 13500 rpm para retirar los residuos de la solución de lavado.

Finalmente, se agregaron 50 µL de buffer de elución (kit #0502, Thermo Fisher) a la columna y se incubó durante 2 min. a TA. Posteriormente, se centrifugó a 13500 rpm durante 2 min. El sobrenadante colectado corresponde el plásmido purificado, el cual fue cuantificado y almacenado a -20°C.

7.11 Purificación de plásmido por lisis alcalina para realizar transfecciones.

Las clonas seleccionadas fueron inoculadas en 5 mL de medio de cultivo LB + Amp 0.1 mg/mL e incubadas a 37°C durante 12 h.

El cultivo fue transferido a un tubo y centrifugado a 5000 rpm durante 1 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido con 100µL de solución de lisis alcalina I (anexo 11.1) y mezclado mediante vórtex. Posteriormente se agregaron 200µL de solución de lisis alcalina II (anexo 11.1) y se mezcló por inversión. Después se adicionaron 150 µL de solución de lisis alcalina III (anexo 11.1), se mezcló por inversión y se incubó a TA por 5 min.

La reacción se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó un volumen 1:1 de fenol-cloroformo a TA. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, y fue adicionada con 300 µL de isopropanol 100% a TA. La mezcla fue incubada durante 2 min. a TA, y centrifugada a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue decantado y al pellet se le adicionaron 500 µL de etanol al 70%. El pellet resuspendido se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y los residuos de etanol fueron eliminados. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 50 µL de agua suplementada con ARNasas (10 mg/mL) y almacenado a -20°C.

7.12 Ensayo de restricción con enzima KpnI

El ensayo de restricción se llevó a cabo preparando una mezcla con 1 µL de las construcciones de plásmido pcDNA3.1D/V5-His-TOPO + *slc35a1* de MA-104 correspondientes, 2 µL de Buffer KpnI 10X, 1 µL de enzima KpnI y se llevó a un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasas.

La mezcla se incubó a 37°C durante 3h y la reacción enzimática se desactivó incubando la mezcla a 80°C durante 20min. Los productos del ensayo de restricción fueron verificados mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1%.

7.13 Secuenciación de Sanger de isoformas del *slc35a1*

Los plásmidos verificados mediante PCR y ensayo de restricción se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM; siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 10.

Tabla 10. Mezcla para secuenciación de Sanger.

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

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cultivo celular de las células MA-104.

Las células MA-104 se cultivaron durante 7 días bajo las condiciones establecidas en la metodología. En la figura 12, se observa una imagen obtenida con un microscopio óptico del cultivo confluyente morfología descrita en la ATCC ⁵¹.

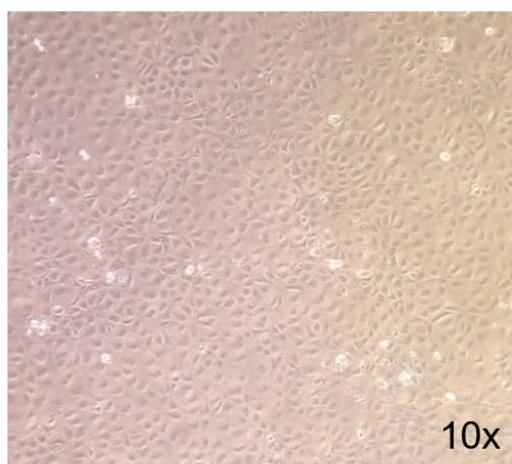


Figura 12. Cultivo celular confluyente de la línea MA-104. La imagen muestra un cultivo celular a los 7 días posteriores a su siembra en un frasco de cultivo T25 observado con microscopio compuesto.

La observación bajo el microscopio compuesto permitió verificar la confluencia y morfología de las células para los experimentos posteriores.

8.2 Integridad y pureza del ARN extraído de células MA-104.

La integridad del ARN extraído de células MA104 fue verificado mediante electroforesis. En la figura 13, se observa una dilución 1:10 del RNA de MA-104 donde se detectaron las bandas que corresponden a las subunidades ribosomales 28S, 18S y 5S.

Una vez analizada la integridad y pureza del ARN por electroforesis, este resultado se complementó mediante su cuantificación obteniendo una relación de pureza 260/280 nm entre 1.8 y 2.0. Las muestras bajo estas condiciones se utilizaron como templado para la síntesis de ADNc.

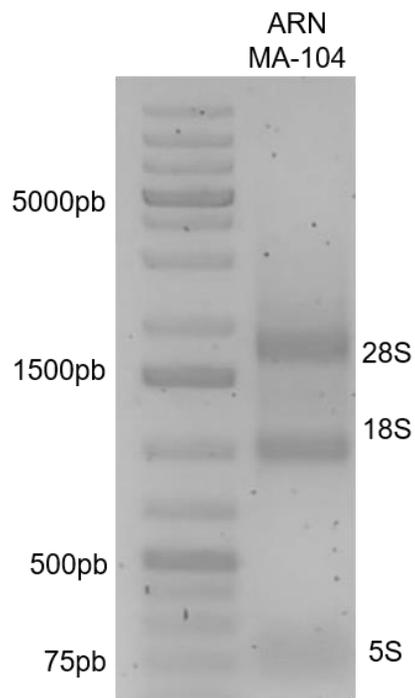


Figura 13. Electroforesis de ARN extraído de la línea celular MA-104. En la figura se observan las bandas que corresponden a las unidades ribosomales 28S, 18S y 5S.

8.3 Verificación de la correcta síntesis de ADNc de MA-104.

La correcta síntesis del ADNc de MA-104 se analizó amplificando una región del gen constitutivo de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) expresado en humano (85 pb). También se amplificó una región del gen que codifica para el CST utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento del *SLC35A1* (del exón 2 al exón 7, 854 pb). Los controles positivos utilizados fueron ADNc obtenido de células HepG2 (hepatocarcinoma celular humano) para GADPH y una construcción del gen *SLC35A1* humano en un vector topo 3.3 TA previamente clonado en el Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular⁵². Los productos de PCR de *GADPH* y del *SLC35A1* se observan en figura 14A y B, respectivamente.

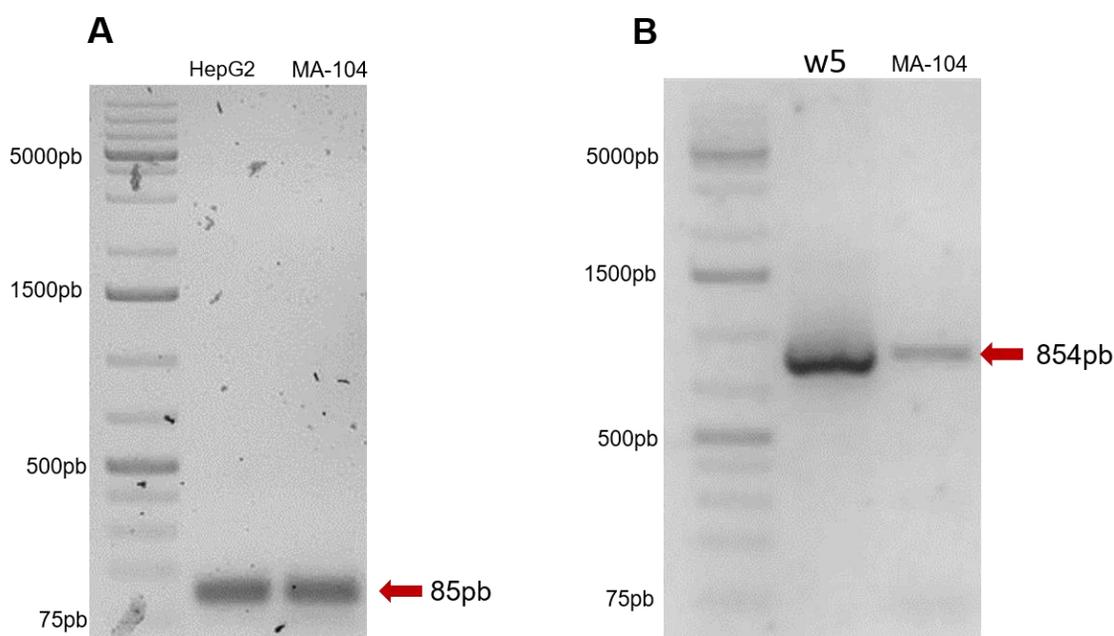


Figura 14. Productos de PCR convencional. A) PCR del gen constitutivo GADPH. HepG2= ADNc de la línea de Hepatocarcinoma celular humano, MA-104= ADNc de la línea celular MA-104. La flecha roja indica las bandas correspondientes al producto de PCR convencional con los oligonucleótidos GADPH5q y GADPH3q. B) PCR del CST de humano y de células MA-104. w5= vector TOPO 3.3 con el inserto *SLC35A1*, MA-104= ADNc de la línea celular MA-104. La flecha roja indica las bandas correspondientes al producto de PCR convencional con los oligonucleótidos TRN2a-NTR4as.

Se obtuvieron los amplicones correspondientes al tamaño esperado de los genes endógenos como se indica en la figura 14 A-B y con ello se comprobó la correcta síntesis ADNc de células MA-104 y la expresión del gen *slc35a1* en la línea celular MA-104 utilizando un par de oligonucleótidos diseñados para el *SLC35A1* humano.

8.4 Amplificación del gen *slc35a1* en células MA-104.

El marco de lectura abierto completo del gen del *slc35a1* de MA-104 se logró amplificar diseñando un par de oligonucleótidos que se alinean a la secuencia teórica de la isoforma silvestre del *slc35a1* de *Macaca mulatta*. En la figura 15, se observa el producto de amplificación del *slc35a1* utilizando como templado ADNc de células MA-104.

El amplicón obtenido fue de 1048 pb debido a que el oligonucleótido sentido TRN-2s se alinea a partir de 4 nucleótidos previos al codón de inicio (en la región UTR5'), mientras el oligonucleótido antisentido Chlorocebus R se alinea 30 nucleótidos posteriores al codón de paro TGA (en la región UTR3').

En un gel de electroforesis (figura 15) se identificó la banda que corresponde al peso esperado de 1048 pb, correspondiente a la isoforma silvestre del *slc35a1* de células MA-104. Adicionalmente, en la reacción de PCR utilizando el par de oligonucleótidos TRN2s-Chlorocebus R, se lograron observar dos bandas adicionales de menor tamaño que la banda correspondiente a la isoforma silvestre.

Hasta este punto experimental se habían logrado identificar 3 isoformas del *slc35a1* en células MA-104 por PCR convencional.

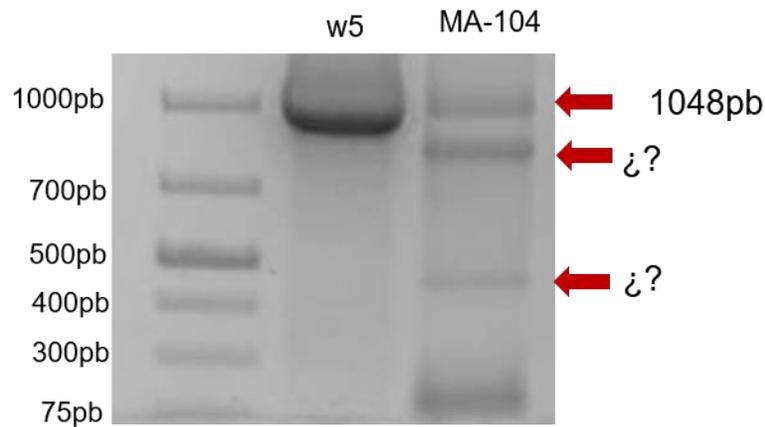


Figura 15. PCR convencional del *slc35a1* de MA-104.

w5= isoforma wt del SLC35A1 de humano. MA-104= templado de ADNc de la línea celular MA-104. El amplicón correspondiente a la isoforma *wt* se indica con una flecha roja en 1048 pb. Las isoformas identificadas a partir de una amplificación con Taq Polimerasa se indican con una flecha roja y con signos de interrogación.

Para asegurar la correcta amplificación del *slc35a1* de MA-104, también se optó por llevar a cabo una reacción de PCR convencional con la enzima Taq *phusion* que es una enzima de alta fidelidad, evitando posibles cambios de bases, y adicionalmente, una mayor capacidad de amplificación. El cambio de esta variable dentro de los experimentos de PCR convencional, permitió observar bandas adicionales a las 3 identificadas anteriormente, figura 16.

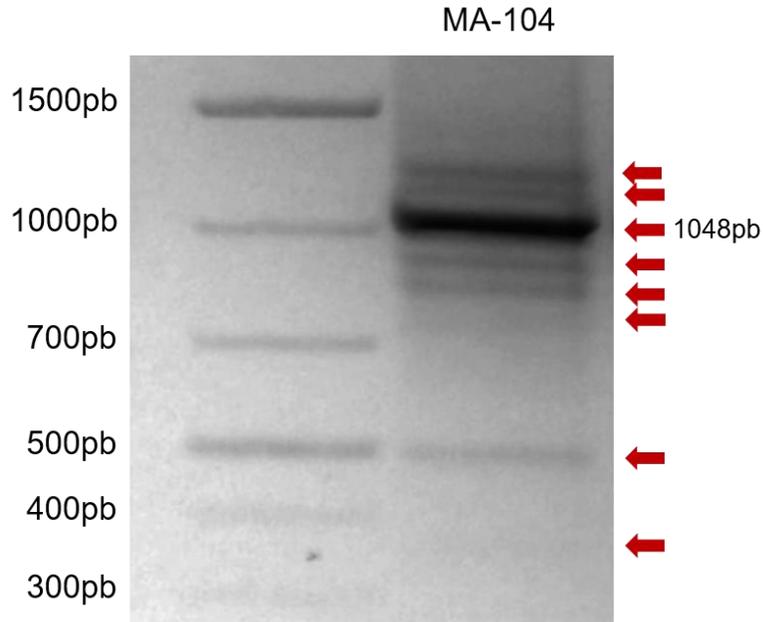


Figura 16. PCR convencional del *slc35a1* de MA-104 utilizando la enzima Taq *phusion*.

En la imagen se marca con flechas rojas las isoformas identificadas mediante la amplificación del *slc35a1* de MA-104 por PCR convencional.

La banda observada con mayor intensidad, corresponde a la isoforma silvestre previamente identificada en la figura 15. El uso de la enzima Taq *phusion* y la estrategia de realizar PCR convencional a partir de templado obtenido en PCR's anteriores, permitió identificar otras posibles isoformas expresadas en la línea celular MA-104.

Los productos de amplificación confirmaron la presencia de isoformas del *slc35a1* en macaco, por lo tanto, ambos amplicones se utilizaron posteriormente para los experimentos de clonación y transformación.

8.5 Análisis de la clonación del *slc35a1* de MA-104 en el vector pJET1.2

La clonación del producto de PCR obtenido con el par oligonucleótidos TRN-2s y Chlorocebus R utilizando como templado ADNc de MA-104 generó 50 colonias, de las cuales, seis de ellas resultaron positivas, obteniendo el 12% de eficiencia (anexo 11.2). Únicamente se detectó 1 colonia positiva para el inserto correspondiente a

1048pb de la isoforma *wt*. Adicionalmente, se identificaron dos bandas con un tamaño menor a la isoforma *wt*, figura 17.

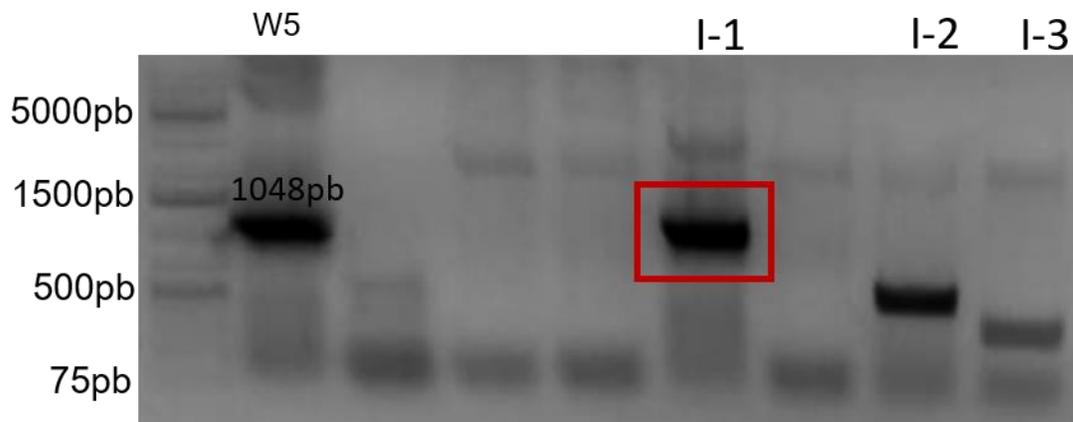


Figura 17. Isoformas del *slc35a1* de MA-104 clonadas en el vector pJET1.2/Blunt.

En el recuadro rojo se indica la isoforma *wt* de MA-104 identificada mediante la clonación en el vector pJET1.2/Blunt (I-1), los carriles indicados como I-2 e I-3 corresponden a dos isoformas adicionales encontradas mediante la clonación en el vector pJET1.2/Blunt.

En la imagen se observan las bandas identificadas a partir de la clonación con el vector pJET1.2/Blunt. w5= vector TOPO 3.3 con el inserto *SLC35A1* de humano como control +, I-1 = Isoforma *wt* del *slc35a1* de MA-104, I-2= isoforma 2 identificada a partir de la clonación con pJET1.2/Blunt, I-3= isoforma 3 encontrada a partir de la clonación con pJET1.2/Blunt.

Inicialmente, se analizó por secuenciación únicamente la isoforma *wt* para asegurar que los insertos clonados correspondieran a la secuencia del *slc35a1* de MA-104.

La orientación 5'-3' del inserto de la isoforma silvestre con respecto al promotor T7 se analizó y se verificó mediante la secuenciación de Sanger del plásmido y posteriormente se realizó un alineamiento con la secuencia teórica del *slc35a1* de *Macaca mulatta* obtenida del servidor de Ensembl ([ENSMMUG00000017028](https://ensembl.org/Macaca_mulatta/Transcript/View?transcript=ENSMMUG00000017028)) y la secuencia del *SLC35A1* de humano ([NM_006416.5](https://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_006416.5)), figura 18. En el alineamiento se observaron cambios puntuales respecto a la isoforma *wt* de humano, pero respecto a la isoforma *wt* de macaco coincidió en un 100% de acuerdo con la reportada en Ensembl.

Cabe mencionar que los cambios puntuales respecto a la isoforma *wt* de humano se observaron en los resultados de la secuenciación sentido y antisentido, aclarando que no fue un error de secuenciación y llegando al consenso de las bases mostradas en la figura. Por lo tanto, se decidió utilizar este plásmido recombinante denominado pWMA subsecuentemente como templado para realizar una clonación en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO que contiene un promotor de expresión en eucariontes.

Humano	ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACCTTTATTATTCAAGTTATACTGCTTGGCAGTGATG	60
MacacoWT_Ensembl	ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACCTTTATTATTCAAGTTATACTGCTTGGCAGTGATG	60
pJET_WTMA104	ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACCTTTATTATTCAAGTTATACTGCTTGGCAGTGATG	60

Humano	ACCCGATGGCTGCACCTTATACCATAGCTTTAAGATACACAAGGACATCAGACAAGAA	120
MacacoWT_Ensembl	ACCCGATGGCTGCACCTTATACCATAGCTTTAAGATACACAAGGACATCAGACAAGAA	120
PJET_WTMA104	ACCCGATGGCTGCACCTTATACCATAGCTTTAAGATACACAAGGACATCAGACAAGAA	120
*** *****		
Humano	CTCTACTTTTCAACCACAGCCGCTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG	180
MacacoWT_Ensembl	CTCTACTTTTCAACCACAGCCGCTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG	180
PJET_WTMA104	CTCTACTTTTCAACCACAGCCGCTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG	180

Humano	GGAATTTAGCTAAAGAACTGGTAGCTCGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAA	240
MacacoWT_Ensembl	GGAATTTAGCTAAAGAACTGGTAGCTCGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAA	240
PJET_WTMA104	GGAATTTAGCTAAAGAACTGGTAGCTCGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAA	240

Humano	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAAGTGTGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGT	300
MacacoWT_Ensembl	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAAGTGTGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGT	300
PJET_WTMA104	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAAGTGTGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGT	300

Humano	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGGTGACC	360
MacacoWT_Ensembl	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGGTGACC	360
PJET_WTMA104	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGGTGACC	360

Humano	TACCAGTTGAAGATCCCGTGTACTGCTTTATGCACTGTTTTAATGTTAAACCGGACACTC	420
MacacoWT_Ensembl	TACCAGTTGAAGATCCCGTGTACTGCTTTATGCACTGTTTTAATGTTAAACCGGACACTC	420
PJET_WTMA104	TACCAGTTGAAGATCCCGTGTACTGCTTTATGCACTGTTTTAATGTTAAACCGGACACTC	420

Humano	AGCAAATTACAGTGGGTTTCAGTTTTATGCTGTGTGCTGGAGTTCACGCTGTACAGTGG	480
MacacoWT_Ensembl	AGCAAATTACAGTGGGTTTCAGTTTTATGCTGTGTGCTGGAGTTCACGCTGTACAGTGG	480
PJET_WTMA104	AGCAAATTACAGTGGGTTTCAGTTTTATGCTGTGTGCTGGAGTTCACGCTGTACAGTGG	480

Humano	AAACCCTCCAAGCTACAAAAGCTGGTGGAAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTCT	540
MacacoWT_Ensembl	AAACCCTCCAAGCTACAAAAGCTGGTGGAAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTCT	540
PJET_WTMA104	AAACCCTCCAAGCTACAAAAGCTGGTGGAAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTCT	540

```

Humano          ATAGCTATTGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAGGAGTATAATTTGAAAAAGTTTAAAG 600
MacacoWT_Ensembl ATAGCTATTGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAGGAGTATAATTTGAAAAAGTTTAAAG 600
PJET_WTMA104    ATAGCTATTGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAGGAGTATAATTTGAAAAAGTTTAAAG 600
*****

Humano          AGTTCAGATACTTCTCTTTGGGTGAGAAACATTCAAATGATCTATCAGGGATTATGTG 660
MacacoWT_Ensembl AGTTCAGATACTTCTCTTTGGGTGAGAAACATTCAAATGATCTATCAGGGATTATGTG 660
PJET_WTMA104    AGTTCAGATACTTCTCTTTGGGTGAGAAACATTCAAATGATCTATCAGGGATTATGTG 660
*****

Humano          ACATTACCTGGCGTCTACTTGTTCAGATGGAGCTGAAATTAAGAAAAAGGATTTTCTAT 720
MacacoWT_Ensembl ACATTACCTGGCGTCTACTTGTTCAGATGGAGCTGAAATTAAGAAAAAGGATTTTCTAT 720
PJET_WTMA104    ACATTACCTGGCGTCTACTTGTTCAGATGGAGCTGAAATTAAGAAAAAGGATTTTCTAT 720
*****

Humano          GGTTACACATATATGTCCTGGTTTGTCTATCTTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACT 780
MacacoWT_Ensembl GGTTACACATATATGTCCTGGTTTGTCTATCTTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACT 780
PJET_WTMA104    GGTTACACATATATGTCCTGGTTTGTCTATCTTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACT 780
*****

Humano          TCTGTGTGGTTAAGTACACAGACAAACATCATGAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT 840
MacacoWT_Ensembl TCTGTGTGGTTAAGTACACAGACAAACATCATGAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT 840
PJET_WTMA104    TCTGTGTGGTTAAGTACACAGACAAACATCATGAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT 840
*****

Humano          GTCCCTTCCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTTGGATTACAGATAAACAACCTCACCTTTGCC 900
MacacoWT_Ensembl GTCCCTTCCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTTGGATTACAGATAAACAACCTCACCTTTGCC 900
PJET_WTMA104    GTCCCTTCCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTTGGATTACAGATAAACAACCTCACCTTTGCC 900
*****

Humano          GTGGTACTCTTCTGTATGTGTTTCCATATACTCTATGGATTACCCAGACAAGACAG 960
MacacoWT_Ensembl GTGGTACTCTTCTGTATGTGTTTCCATATACTCTATGGATTACCCAGACAAGACAG 960
PJET_WTMA104    GTGGTACTCTTCTGTATGTGTTTCCATATACTCTATGGATTACCCAGACAAGACAG 960
*****

Humano          ACATCCATCCAACAAGGAGAAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTGA 1014
MacacoWT_Ensembl ACATCCATCCAACAAGGAGAAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTGA 1014
PJET_WTMA104    ACATCCATCCAACAAGGAGAAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTGA 1014
*****

```

Figura 18. Alineamiento de la secuencia (isoforma *wt* del *slc35a1* de MA-104).

Humano= Isoforma *wt* del *SLC35A1* de humano, Macaco WT_Ensembl= Isoforma *wt* del *slc35a1* de *Macaca mulatta* reportada en Ensembl, PJET_WTMA104= Isoforma *wt* del *slc35a1* de células MA-104 clonada en vector pJET1.2/Blunt.

8.6 Análisis de la clonación del *slc35a1* de MA-104 en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO

Utilizando el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO se lograron clonar cinco isoformas del *slc35a1* de células MA-104 mediante el diseño del oligonucleótido TOPO MA F 5' CACCATGGCTGCCCGAGACAA 3' que aseguró la inserción del gen en sentido 5'-3' respecto al promotor CMV. De 52 colonias analizadas, se obtuvieron 17 colonias positivas, obteniendo un porcentaje de eficiencia de clonación del 32.6% (anexo 11.2). Las isoformas fueron denominadas con el prefijo “del”, indicando que hay una eliminación de pb que se indican con número después del prefijo.

Las isoformas identificadas fueron la isoforma *wt* (1014pb), la isoforma *del313* (701pb), la isoforma *del443* (571pb), la isoforma *del557* (457pb) y la isoforma *del664* (350pb), figura 19.

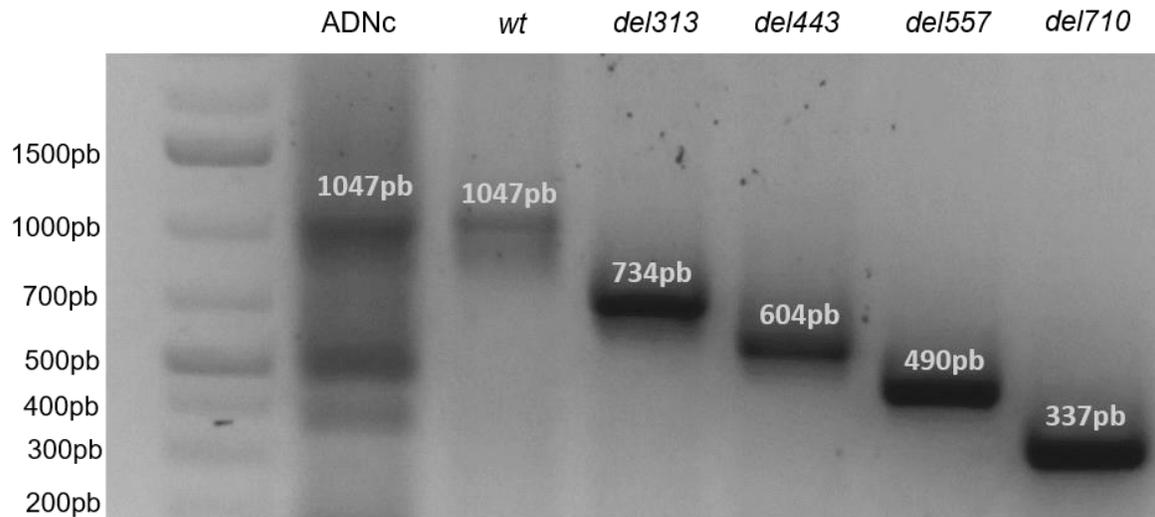


Figura 19. Isoformas del *slc35a1* clonadas a partir de MA-104 en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.

ADNc= ADN complementario.

8.6.1 Isoforma silvestre del *slc35a1* de MA-104

La secuencia obtenida por secuenciación de Sanger de la construcción de mayor tamaño (1047 pb) se alineo con la isoforma *wt* de macaco, figura 20. En el alineamiento se observa que coincide en un 100% (8 exones) de acuerdo con la secuencia *wt* reportada en Ensembl ([ENSMMUT00000023954.4](#))⁴⁴. La comparación de secuencias se realizó en orden sentido y antisentido, de manera que se aseguró que no se encontraran mutaciones puntuales o cambios de bases que no coincidieran con los reportes de la isoforma *silvestre* de Ensembl. En el anexo 11.3 se encuentran los cromatogramas obtenidos de la secuenciación.

	EXÓN 1	
Macaco_Ensembl	ATGGCTGCCCGAGAGacaatgtcactttattattcaagttatactgcttggcagtgatg	60
WT_MA104	ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACCTTATTATTCAAAGTTATACTGCTTGGCAGTGATG	60

Macaco_Ensembl	accgtgatggctgcagcctataccatagctttaaagatacacaaggacatcagacaagaa	120
WT_MA104	ACCGTGATGGCTGCAGCCTATACCATAGCTTAAAGATACACAAGGACATCAGACAAGAA	120

	EXÓN 2	
Macaco_Ensembl	ctctacttttcaaccagccgtgtgtatcacagaagttataaagttattgctaagtgtg	180
WT_MA104	CTCTACTTTTCAACCACAGCCGTGTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG	180

Macaco_Ensembl	ggaattttagctaaAGAAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAAT	240
WT_MA104	GGAAATTTTAGCTAAAGAAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAAT	240

	EXÓN 3	
Macaco_Ensembl	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAACGTGGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGTT	300
WT_MA104	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAACGTGGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGTT	300

Macaco_Ensembl	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGgtgacc	360
WT_MA104	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGGTGACC	360

Macaco_Ensembl	taccagttaaagattccgtgtactgcttattgcaactgttttaagttaaacggacactc	420
WT_MA104	TACCAGTTAAAGATTCCGTGTACTGCTTATGCACTGTTTAAATGTTAAACCGGACACTC	420

	EXÓN 4	
Macaco_Ensembl	agcaaattacagtggtttcagtttttatgctgtgtgctggagtcacgcttgtagctgg	480
WT_MA104	AGCAAATTACAGTGGGTTTCAGTTTTTATGCTGTGTGCTGGAGTCACGCTTGTACAGTGG	480

Macaco_Ensembl	aaaccagccaagctacaaaagtgtgGTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTGGTGCCT	540
WT_MA104	AAACCAGCCCAAGCTACAAAAGTTGTG GTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTGGTGCCT	540

	EXÓN 5	
Macaco_Ensembl	ATAGCTATGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAGgagtatattttgaaaagttttaaag	600
WT_MA104	ATAGCTATGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAGGAGTATATTTGAAAAGTTTAAAG	600

Macaco_Ensembl	agttcagatacttctctttgggtgagaacattcaaatgtatctatcagggattattgtg	660
WT_MA104	AGTTCAGATACTTCTCTTTGGGTGAGAAACATTCAAATGTATCTATCAGGGATTATTGTG	660

	EXÓN 6	
Macaco_Ensembl	acattagttggcgtctacttgtcagatggagctgaaattaaagaaaaggatttttctat	720
WT_MA104	ACATTAGTTGGCGTCTACTTGTGAGATGGAGCTGAAATTAAGAAAAGGATTTTCTAT	720

Macaco_Ensembl	ggttacacatattatgtctgggtttgtcatctTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACT	780
WT_MA104	GGTTACACATATTATGTCTGGTTGTGTCATCTTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACT	780

	EXÓN 7	
Macaco_Ensembl	TCTGTTGTGGTTAAGTACACAGACAACATCATGAAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT	840
WT_MA104	TCTGTTGTGGTTAAGTACACAGACAACATCATGAAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT	840

Macaco_Ensembl	GTCCTTCCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTGGATTACAGATAcactcacctttgcc	900
WT_MA104	GTCCTTCCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTGGATTACAGATACACTCACCTTTGCC	900

	EXÓN 8	
Macaco_Ensembl	ctgggtactcttctgtatgtgtttccatatactctatggattaccagacaagacact	960
WT_MA104	CTGGGTACTCTTCTGTATGTGTTCCATATATCTCTATGGATTACCCAGACAAGACACT	960

Macaco_Ensembl	acatccatccaacaaggagaaacagcttcaaggagagagttattgggtgtgta	1014
WT_MA104	ACATCCATCCAACAAGGAGAAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTA	1014

Figura 20. Alineamiento de la isoforma *wt* del *slc35a1*.

Macaco_Ensembl = isoforma *wt* reportada en servidor Ensembl, WT_MA104 = isoforma de 1047pb obtenida experimentalmente. En letras de color rojo se indican los exones.

8.6.2 Isoforma del313 del *s/c35a1* de MA-104

La isoforma de 734 pb se identificó a partir de los resultados de la secuenciación siguiendo el protocolo indicado en la tabla 10, y se encontró que la isoforma de 734 pb presentaba la ausencia del exón 3 (160pb) y 4 (153pb), regiones que se observan como líneas punteadas en el alineamiento mostrado en la figura 21A.

En la figura 22B se muestra la región del cromatograma de la secuenciación donde se une la región del exón 2 y el exón 5 debido a la ausencia de los exones 3 y 4 del *s/c35a1* de células MA-104.

A

	EXÓN 1	
MacacoWT_Ensembl	ATGGCTGCCCGAGAGacaatgtcaccttattattcaagttatactgcttggcagtgatg	60
del313 MA-104	ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACCTTATTATTCAAGTTATACTGCTTGGCAGTGATG	60

MacacoWT_Ensembl	accgtgatggctgcagcctataccatagctttaagatacacaaggacatcagacaaagaa	120
del313 MA-104	ACCGTGATGGCTGCAGCCTATACCATAGCTTTAAGATACACAAGGACATCAGACAAAGAA	120

	EXÓN 2	
MacacoWT_Ensembl	ctctacttttcaaccacagccgtgtgtatcacagaagttataaagttattgctaagtgtg	180
del313 MA-104	CTCTACTTTTCAACCACAGCCGTGTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG	180

MacacoWT_Ensembl	ggaatthttagctaaAGAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAGCATCTTTAAGGAAAAAT	240
del313 MA-104	GGAAATTTAGCTAA-----	194

	EXÓN 3	
MacacoWT_Ensembl	CTCTGGGGAGCCCCAAGGAACGTGGAAGTTAAGTGTGCCAICGTTAGTGTATGCTGTT	300
del313 MA-104	-----	194
MacacoWT_Ensembl	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGgtgacc	360
del313 MA-104	-----	194
	EXÓN 4	
MacacoWT_Ensembl	taccagttaaagattccgtgtactgctttatgcaactgttttaagttaaaccgggacaactc	420
del313 MA-104	-----	194
MacacoWT_Ensembl	agcaaattacagtggtgtttcagttttatgctgtgtgctggagtcacgcttgtacagtggtg	480
del313 MA-104	-----	194
MacacoWT_Ensembl	aaaccagcccaagctacaaaagtgtgtGTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTGCT	540
del313 MA-1	-----GTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTGCT	221

	EXÓN 5	
MacacoWT_Ensembl	ATAGCTAATGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAG	600
del313 MA-104	ATAGCTAATGCTGTATTGTGCTCAGGATTTGCAGGAGTATATTTTGAAAAAGTTTAAAG	281

MacacoWT_Ensembl	agttcagatacttctctttgggtgagaacattcfaatgtatctatcagggattattgtg	660
del313 MA-104	AGITCAGATACTTCTCTTTGGGTGAGAACCATTCAAATGTATCTATCAGGGATTATTGTG	341

	EXÓN 6	
MacacoWT_Ensembl	acattagttggcgtctacttgtcagatggagctgaaattaaagaaaaggattttctat	720
del313 MA-104	ACATTAGITGGCGTCTACTTGTGATGGAGCTGAAATTAAGAAAAGGATTTTCTAT	401

MacacoWT_Ensembl	ggttacacatattatgtctgtgttgcacatctTCTTGCAGGTTGGTGGCCTCTACACT	780
del313 MA-104	GGTTACACATATTATGTCTGGTITGTGATCTTCTTGCAGGTTGGTGGCCTCTACACT	461

	EXÓN 7	
MacacoWT_Ensembl	TCTGTTGGTTAAGTACACAGACAACATCATGAAAGGCTTTTCTCAGCAGCGGCCATT	840
del313 MA-104	TCTGTTGGTTAAGTACACAGACAACATCATGAAAGGCTTTTCTCAGCAGCGGCCATT	521

MacacoWT_Ensembl	GTCCTTCCACCATTTGCTTCAGTAATGCTGTTGGATTACAGATAA	900
del313 MA-104	GTCCTTCCACCATTTGCTTCAGTAATGCTGTTGGATTACAGATAACACTCACCTTTGCC	581

MacacoWT_Ensembl	ctgggtactcttcttctgtatgtgtttccatatactctatggattaccagacaagacact	960
del313 MA-104	CTGGGTACTCTTCTTGTATGTGTTTCCATATATCTCTATGGATTACCCAGACAAGACACT	641

	EXÓN 8	
MacacoWT_Ensembl	acatccatccaacaaggagaaacagcttcaaaaggagagagttattgggtgtgtga	1014
del313 MA-104	ACATCCATCCAACAAGGAGAAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTGA	701

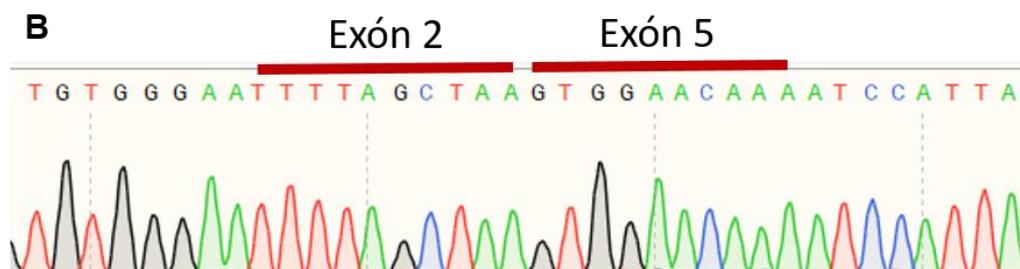


Figura 21. Análisis de la isoforma del313.

A) Alineamiento correspondiente a la isoforma del313 y la isoforma *wt* del *slc35a1* de *Macaco mulatta* reportada en Ensembl (MacacoWT_Ensembl) ⁵³. B) Región del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación de Sanger de la isoforma del313. Las líneas rojas indican el término de la secuencia correspondiente al exón 2 y el inicio de la secuencia correspondiente al exón 5.

A partir del análisis de los resultados de secuenciación se determinó que la ausencia de 313pb se debió a la pérdida de 160pb correspondientes al exón 3 y 153pb correspondientes al exón 4. A esta isoforma se le denominó del313.

Los cromatogramas correspondientes de la secuenciación sentido y antisentido para la isoforma del313 se muestran en el anexo 11.3.

8.6.3 Isoforma del443 del *slc35a1* de MA-104

Los resultados de secuenciación de Sanger de la isoforma de 604 pb indicaron la ausencia del exón 3 (160pb), 4 (153pb) y una región del exón 6 (130pb), lo que equivale a la pérdida de 443pb. Por esta razón a esta isoforma se le denominó del443. La secuencia de bases que se pierden se observan como líneas punteadas en el alineamiento mostrado en la figura 22A.

En la figura 22 B se observa una región del cromatograma de la secuenciación obtenida de esta isoforma utilizando los oligonucleótidos TOPO MA F y Chlorocebus R, en donde se identificó la unión del exón 2 y exón 5 en ausencia de los exones 3 y 4 (también indicado en la figura 22 A con el subrayado en rojo).

En la figura 22C, se explica la determinación de la eliminación parcial de 130 pb del exón 6 de la isoforma de 604 pb. Debido a la calidad de los resultados de la secuenciación, la última región del exón 6 de esta isoforma, se obtuvo a partir de la comparación de los resultados sentido y antisentido de la secuenciación. Se consideraron las bases de los cromatogramas que eran congruentes con la secuencia *wt* del *slc35a1* reportada en Ensembl. De esta forma se estableció la secuencia correcta y se identificó la eliminación parcial de 130 pb. Las bases sombreadas en color verde azulado y gris que se marcan en la figura, corresponden a las últimas 31 bases que se encuentran en el exón 6 en la isoforma del443 (figura 22C).

A

	EXÓN 1	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	ATGGCTGCCCGAGAGacaatgtcactttattattcaagttatactgcttggcagtgatg ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACITTAATATTCAAGTTATACTGCTTGGCAGTGAITG *****	60 60
	EXÓN 2	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	accgtgatggctgcagcctataccatagctttaagatacacaaggacatcagacaaagaa ACCGTGATGGCTGCAGCCTATACCATAGCTTTAAGATACACAAGGACATCAGACAAAGAA *****	120 120
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	Ctctacttttcaaccacagccgtgtgtatcacagaagttataaagttattgctaagtggtg CTCTACTTTTCAACCACAGCCGTGTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG *****	180 180
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	ggaatttttagctaaAGAAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAAA GGAATTTTAGCTAA----- *****	240 194
	EXÓN 3	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	CTCTTGGGAGCCCCAAGGAAGTGTGAAGTTAAGTGTGCCAICGTTAGTGTATGCTGTT -----	300 194
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTACCAGgtgacc -----	360 194
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	taccagttaaagattccgtgtactgtttatgcactgttttaagttaaacccggacactc -----	420 194
	EXÓN 4	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	agcaaattacagtggtttcagttttatgctgtgtgctggagtcaagcttgcacagtggtg -----	480 194
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	aaaccagcccaagctacaaaagttgtgCTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTGTCT -----CTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTTGGTGTCT *****	540 227
	EXÓN 5	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	ATAGCTATTGCTGTATTGTCTCAGGAITTCAGGaggtatattttgaaaaagttttaaag ATAGCTATTGCTGTATTGTCTCAGGAITTCAGGAGGTATATTTTGAAAAAGTTTAAAG *****	600 287
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	agttcagatacttctctttgggtgagaaacattcaaatgtatctatcagggattattgtg AGTTCAGATACTTCTCTTTGG----- *****	660 293
	EXÓN 6	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	acattagttggcgtctacttgtcagatggagctgaaattaaagaaaaaggatttttctat -----	720 293
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	ggttacacatattatgtAtggtttttcacttTCTTGCAGTGTGGTGGCCTCTACACT -----TCTTGCAGTGTGGTGGCCTCTACACT *****	780 337
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	TCTGTTGTGGTTAAGTACACAGACAACATCAIGAAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT TCTGTTGTGGTTAAGTACACAGACAACATCAIGAAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCATT *****	840 397
	EXÓN 7	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	GTCCITTCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTTGGATTACAGATAAcactcacctttggc GTCCITTCACCATTGCTTCAGTAATGCTGTTTGGATTACAGATAAcactcacctttggc *****	900 457
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	ctgggtactcttctgtatgtgtttccatataatctctatggattaccagacaagacact CTGGGTACTCTTCTTGTatgtgtttccatataatctctatggattaccagacaagacact *****	960 517
	EXÓN 8	
MacacoWT_Ensembl del443_MA104	acatccatccaacaaggagaaacagcttcaaaggagagagttattgggtgtgtga ACATCCATCCAACAAGGAGAAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTGA *****	1014 571

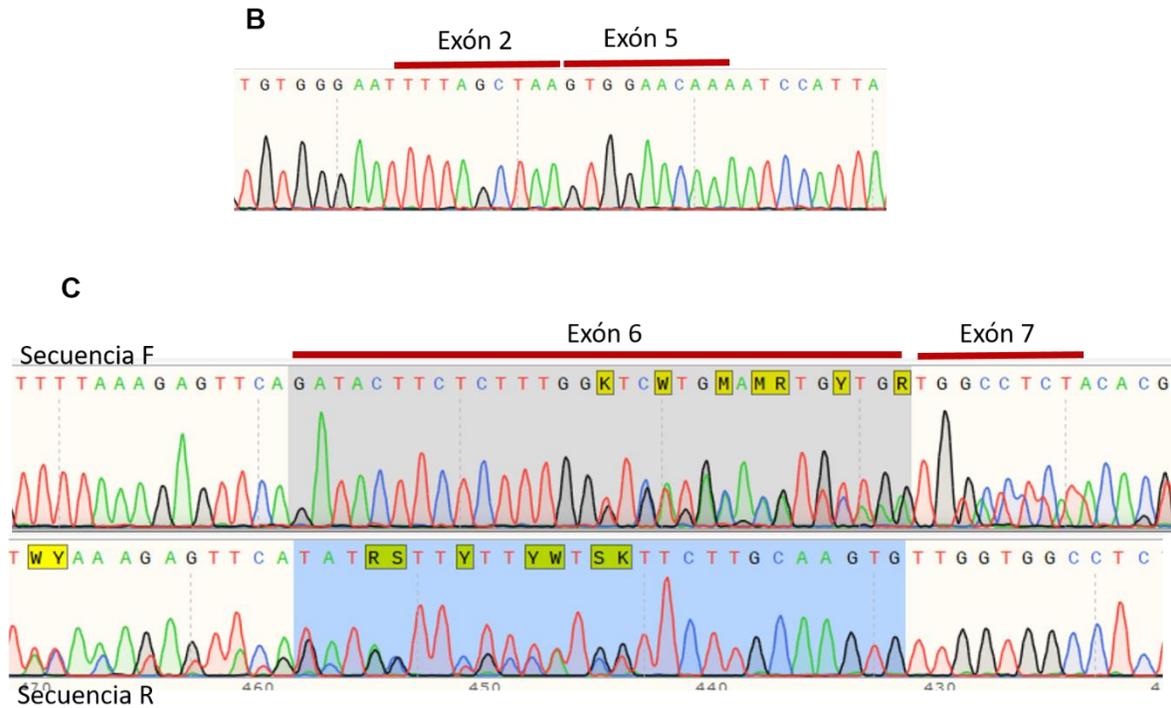


Figura 22. Análisis de la isoforma del443.

A) Alineamiento de la isoforma *wt* del *slc35a1* de *Macaco mulatta* reportada en Ensembl (MacacoWT_Ensembl) ([ENSMUT00000023954.4](https://www.ensembl.org/Macaca_mulatta/Transcript/View?transcript=ENSMUT00000023954.4)) y los resultados de la secuenciación de la isoforma del443 en donde se observan las regiones ausentes del exón 3 y 4, y 130pb del exón 6. B) Región del cromatograma de secuenciación donde se indica el término de la secuencia correspondiente al exón 2 y el inicio de la secuencia correspondiente al exón 5 que se unen debido a la ausencia del exón 3 y 4. C) Región del cromatograma indicando la región que se mantiene en el exón 6 y el inicio del exón 7.

A partir de la depuración de los resultados obtenidos de la secuenciación de Sanger, y haciendo un análisis de la región eliminada en el exón 6, se determinó que las 130pb de bases ausentes en la isoforma del443 se generan debido a la presencia de un sitio donador de *splicing* GT en la posición 622 dentro del exón 6. Esto se observa también en la generación de la isoforma del130 en el *SLC35A1* humano, donde la inducción de la pérdida de las 130pb se debe a la presencia de un sitio donador GT en el exón 6, originado por la inserción CACT en el intrón 6⁵⁴.

En la figura 23 se muestra de manera gráfica la generación de la isoforma del130 en humano, y el sitio donador de *splicing* GT en el exón 6 del *slc35a1* en *Macaco mulatta*.

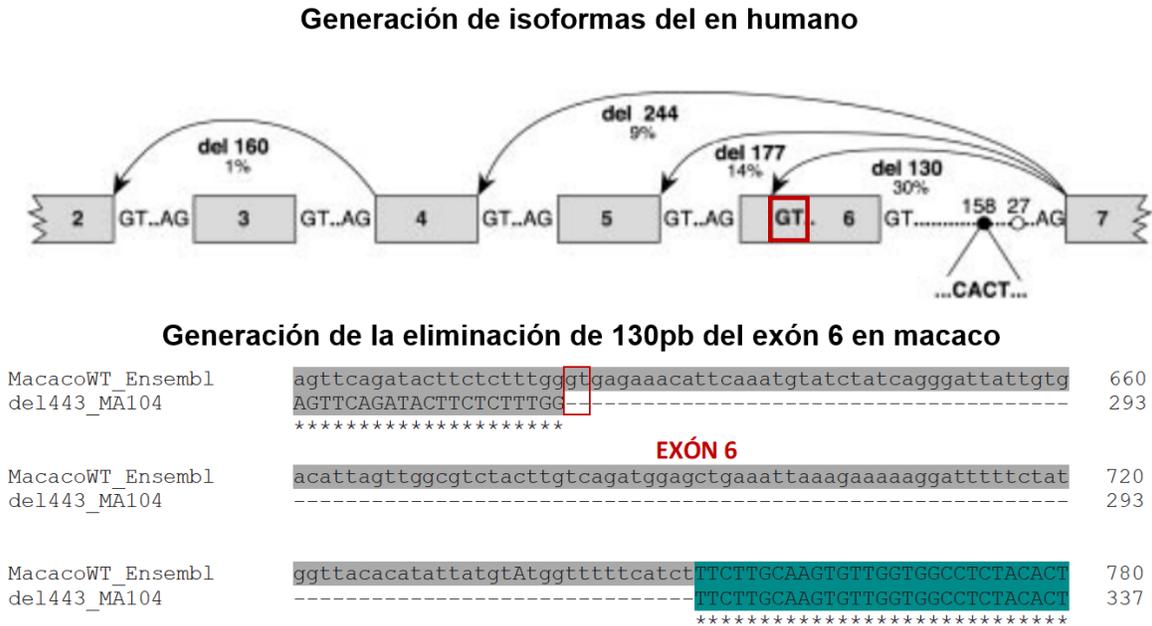


Figura 23. Mecanismo de eliminación de 130pb del exón 6 en la isoforma del443.

En la figura se indica con un recuadro rojo, el sitio donador de *splicing* GT en el exón 6 para humano y para macaco, lo cual genera la pérdida parcial de 130pb del exón 6 en la isoforma del130 humana y del443 en macaco.

En el anexo 11.3 se muestran los cromatogramas del resultado de la secuenciación sentido y antisentido de la isoforma del443.

8.6.4 Isoforma del557

La isoforma de 490 pb se secuenció utilizando los oligonucleótidos TOPO MA F y Chlorocebus R, y a partir de los resultados se observó que presenta la ausencia de los exones 3 (160pb), 4 (153pb), 5 (67pb) y 6 (177pb). La eliminación de estas regiones resulta en la pérdida de 557pb, denominando a esta isoforma como del557. Las bases ausentes se indican como líneas punteadas en el alineamiento de la figura 24A. Adicionalmente, además de la ausencia de cuatro exones, se

encontraron dos cambios en las posiciones 64 y 77 que se muestran resaltados en color amarillo en el alineamiento.

En la figura 24B, en el cromatograma de secuenciación se indican las regiones donde se une el exón 2 con el exón 7, originados por la pérdida de las 557pb; 160pb del exón 3, 153pb del exón 4, 67pb del exón 5 y 177pb del exón 6 ⁵⁵.

En la figura 24 C, se muestra una comparación de las bases en las posiciones 64 y 77 en la secuencia de la isoforma *wt* reportada en Ensembl ([ENSMMUT00000023954.4](#)) y las bases encontradas a partir de la secuenciación de la isoforma del557. Los cambios observados corresponden a G>C64 y a C>T77, sin embargo, consideramos a ambos cambios como un error de la secuenciación de Sanger, porque que en el resto de las isoformas no se observaron estos cambios dentro de los cromatogramas sentido y antisentido.

A

	EXÓN 1	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	ATGGCTGCCCGAGAGacaatgtcactttattattcaagttatactgcttggcagtgatg ATGGCTGCCCGAGAGACAATGTCACITTTATTATCAAGTTATACTGCTTGGCAGTGATG *****	60 60
	EXÓN 2	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	accggtgatggctgcagcctataccatagctttaagatacacaaggacatcagacaaagaa ACCCGTGATGGCTGCAGICTATACCATAGCTTTAAGATACACAAGGACATCAGACAAAGAA ***	120 120
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	ctctacttttcaaccacagccgtgtgtatcacagaagttataaagttattgctaagtggtg CTCTACTTTTCAACCACAGCCGTGTGTATCACAGAAGTTATAAAGTTATTGCTAAGTGTG *****	180 180
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	ggaatttttagctaa 194 GGAATTTTAGCTAA 194 *****	
	EXÓN 3	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	AGAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAAATGCTTGGGGAGCCC -----	254 194
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	CAAGGAAGTGTGAAGTGAAGTGTGCCAICGTAGTGTATGCTGTTCAAGAACACATGGC -----	314 194
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	TTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGgtgacctaccagttaaagat -----	374 194
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	tcctgttactgctttatgcaactgttttaagttaaaccggacactcagcaaatcagtg -----	434 194
	EXÓN 4	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	ggtttcagtttttatgctgtgtgctggagtcacgcttgtacagtggaaccagcccaagc -----	494 194
	EXÓN 5	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	tacaaaagtgtgtGTGGAACAAAATCCATTAATAGGGTTTGGTGCTATAGCTATTGCTGT -----	554 194
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	ATTGTGCTCAGGATTTGCAGgagtatattttgaaaaagttttaagagttcagatacttc -----	614 194
	EXÓN 6	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	tcctttgggtgagaaacattcaaatgtatctatcagggattattgtgacattagttggcgt -----	674 194
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	ctacttgtcagatggagctgaaattaaagaaaaaggatttttctatggttacacatatta -----	734 194
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	tgtctggtttgtcatctTTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACTTCTGTGTGGTTAA ----- TTCTTGCAAGTGTGGTGGCCTCTACACTTCTGTGTGGTTAA *****	794 237
	EXÓN 7	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	GTACACAGACAACATCATGAAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCAATGTCCTTTCCACCAI GTACACAGACAACATCATGAAAGGCTTTTCTGCAGCAGCGGCCAATGTCCTTTCCACCAI *****	854 297
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	TGCTTCAGTAATGCTGTTGGATTACAGATAAcactcacctttgccctgggtactcttct TGCTTCAGTAATGCTGTTGGATTACAGATAcactcacctttgccctgggtactcttct *****	914 357
	EXÓN 8	
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	tgtatgtgtttccatatactctatggtattaccagacaagacactacatccatccaaca TGTATGTGTTCCATATATCTCTATGGATTACCCAGACAAGACACTACATCCATCCAACA *****	974 417
MacacoWT_Ensembl del557_MÁ104	aggagaacagcttcaaaggagagagttattggtgtgtga 1014 AGGAGAACAGCTTCAAAGGAGAGAGTTATTGGTGTGTGA 457 *****	

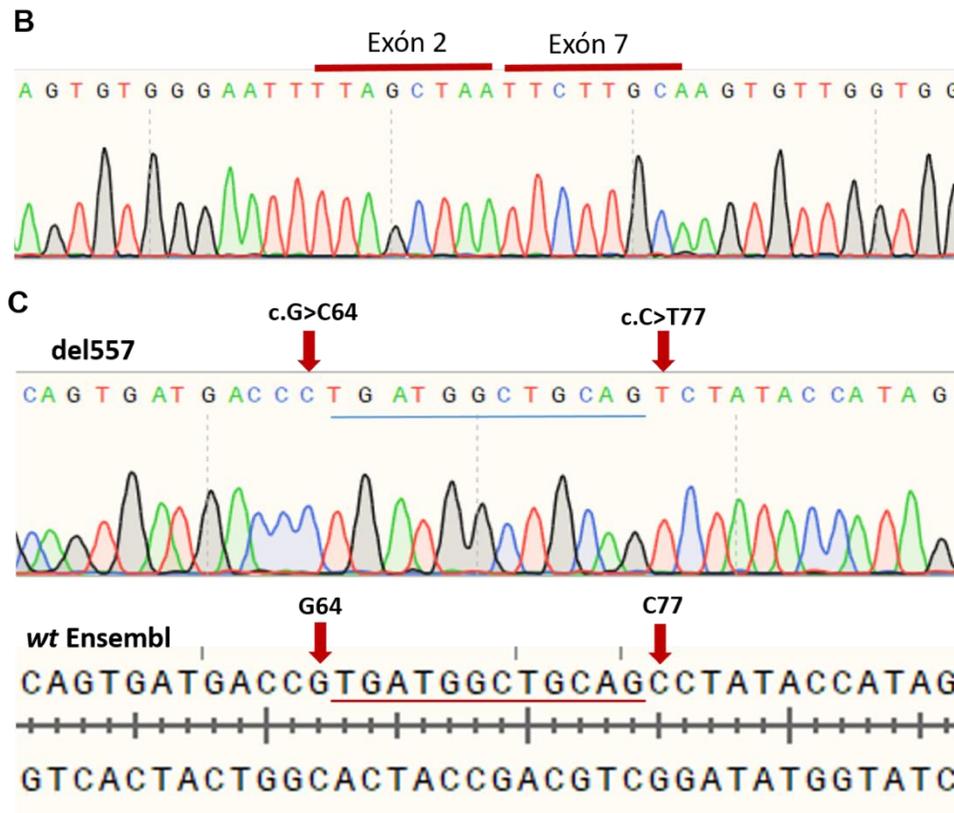


Figura 24. Análisis de la isoforma del557.

A) Alineamiento de la isoforma *wt* reportada en Ensembl (MacacoWT_Ensembl) ([ENSMMUT00000023954.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/ENSMMUT00000023954.4)) y la isoforma del557 de MA-104, indicando en color amarillo las mutaciones puntuales encontradas. B) En el cromatograma se indica el término de la secuencia correspondiente al exón 2 y el inicio de la secuencia correspondiente al exón 7 que se unen por la pérdida del exón 3, 4, 5 y 6. C) Se indican los dos cambios G>C64 y C>T77 encontrados en un resultado del cromatograma.

La construcción de la isoforma del557 se enviará a secuenciar nuevamente para descartar ambos errores mencionados en la figura 24C.

8.6.5 Isoforma del710

La isoforma de 337 pb fue secuenciada utilizando también los oligonucleótidos TOPO MA F y Chlorocebus R. En la figura 25A se muestra el alineamiento de la isoforma *wt* reportado en Ensembl ([ENSMUT00000023954.4](#)) con la isoforma que presenta la ausencia completa del exón 2 (178pb), exón 4 (160pb), exón 5 (153pb), exón 6 (177pb) y del exón 7 (135pb), que suman 710pb, por lo que la isoforma se denominó del710.

En la figura 25A, las bases ausentes se marcan con líneas punteadas. En la figura 25 B se muestra una región del cromatograma de la secuenciación en donde se indica la unión del exón 1 con el exón 3 debido a la ausencia completa del exón 2 (también indicado en el alineamiento con líneas rojas).

En la figura 25 C, se muestra la unión del exón 3 con el exón 8 ocasionada por la ausencia de los exones 4, 5, 6 y 7 (indicados en el alineamiento con líneas rojas).

A

	EXÓN 1	
MacacoWT_Ensembl	ATGGCTGCCCGAGAGacaatgctactttattattcaagttatactgcttggcagtgatg	60
Del710_MA104	ATGGCTGCCCGAGAG-----	16

MacacoWT_Ensembl	accgtgatggctgcagcctataccatagctttaagatacacaaggacatcagacaaagaa	120
Del710_MA104	-----	16
	EXÓN 2	
MacacoWT_Ensembl	ctctacttttcaaccacagcogtgtgatcacagaagtataaagttattgctaagtgtg	180
Del710_MA104	-----	16
MacacoWT_Ensembl	ggaatttagctaaAGAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAAT	240
Del710_MA104	-----AGAACTGGTAGTCTGGGTAGATTCAAAGCATCTTTAAGAGAAAAT	62

	EXÓN 3	
MacacoWT_Ensembl	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAAGTGTGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGTT	300
Del710_MA104	GTCTTGGGGAGCCCCAAGGAAGTGTGAAGTTAAGTGTGCCATCGTTAGTGTATGCTGTT	122

MacacoWT_Ensembl	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAGgtgacc	360
Del710_MA104	CAGAACAACATGGCTTTCCTAGCTCTTAGCAATCTGGATGCAGCAGTGTACCAG-----	176

	EXÓN 4	
MacacoWT_Ensembl	taccagttgaagattccgtgtactgctttatgcaactgttttaagttaaacggacactc	420
Del710_MA-104	-----	176
MacacoWT_Ensembl	agcaaattacagtgggtttcagttttatgctgtgtgctggagttacgcttgacagtg	480
Del710_MA-104	-----	176
MacacoWT_Ensembl	aaaccagcccaagctacaaaagtggtgGTGGAACAAAATCCATTATTAGGGTTGGCGCT	540
Del710_MA-104	-----	176

EXÓN 5

MacacoWT_Ensembl Del710_MA-104 600
176

EXÓN 6

MacacoWT_Ensembl Del710_MA-104 720
176

EXÓN 7

MacacoWT_Ensembl Del710_MA-104 840
176

MacacoWT_Ensembl Del710_MA-104 900
190

EXÓN 8

MacacoWT_Ensembl Del710_MA-104 960
250

MacacoWT_Ensembl Del710_MA-104 1014
54

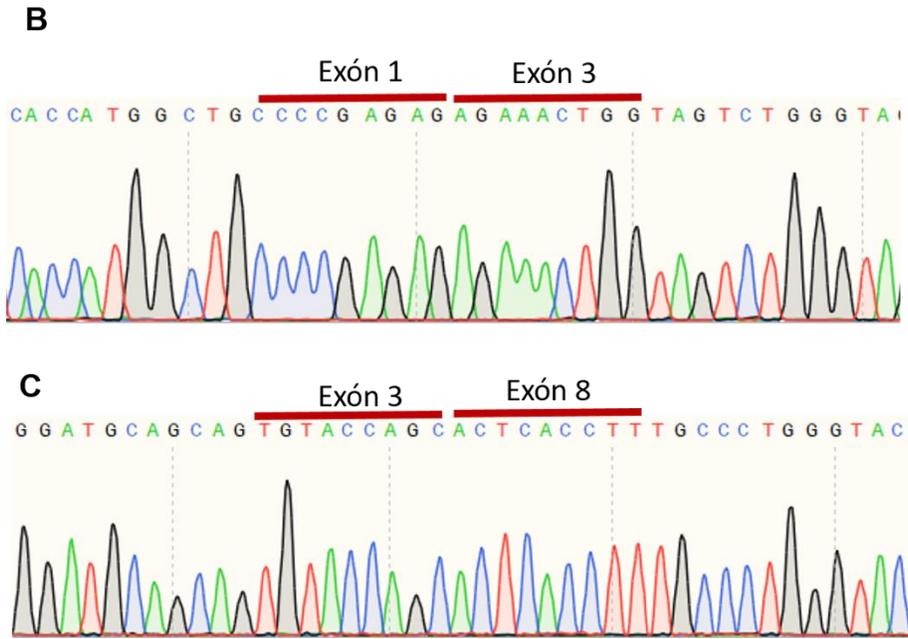


Figura 25. Cromatograma de la isoforma del710. A) Alineamiento de la isoforma *wt* de Ensembl (MacacoWT_Ensembl) ([ENSMMUT00000023954.4](#)) con la isoforma del710. B) En el cromatograma se indica el término de la secuencia correspondiente al exón 1 y el inicio de la secuencia correspondiente al exón 3. C) En el cromatograma se indica el final del exón 3 unido al inicio del exón 8.

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación sentido y antisentido para la isoforma del710 se encuentran en el apartado 11.3.

8.7 Análisis de restricción de las isoformas de *splicing* del *slc35a1* de MA-104.

Para confirmar el tamaño de las isoformas de *splicing* clonadas, se realizó un ensayo de restricción utilizando la enzima KpnI que corta en la posición 912 al vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO. Este análisis permitió observar el producto de clonación de cada una de las isoformas identificadas (pcDNA3.1D/V5-His-TOPO + *slc35a1* de MA-104) y verificar el tamaño correspondiente para cada variante de *splicing*, figura 26.

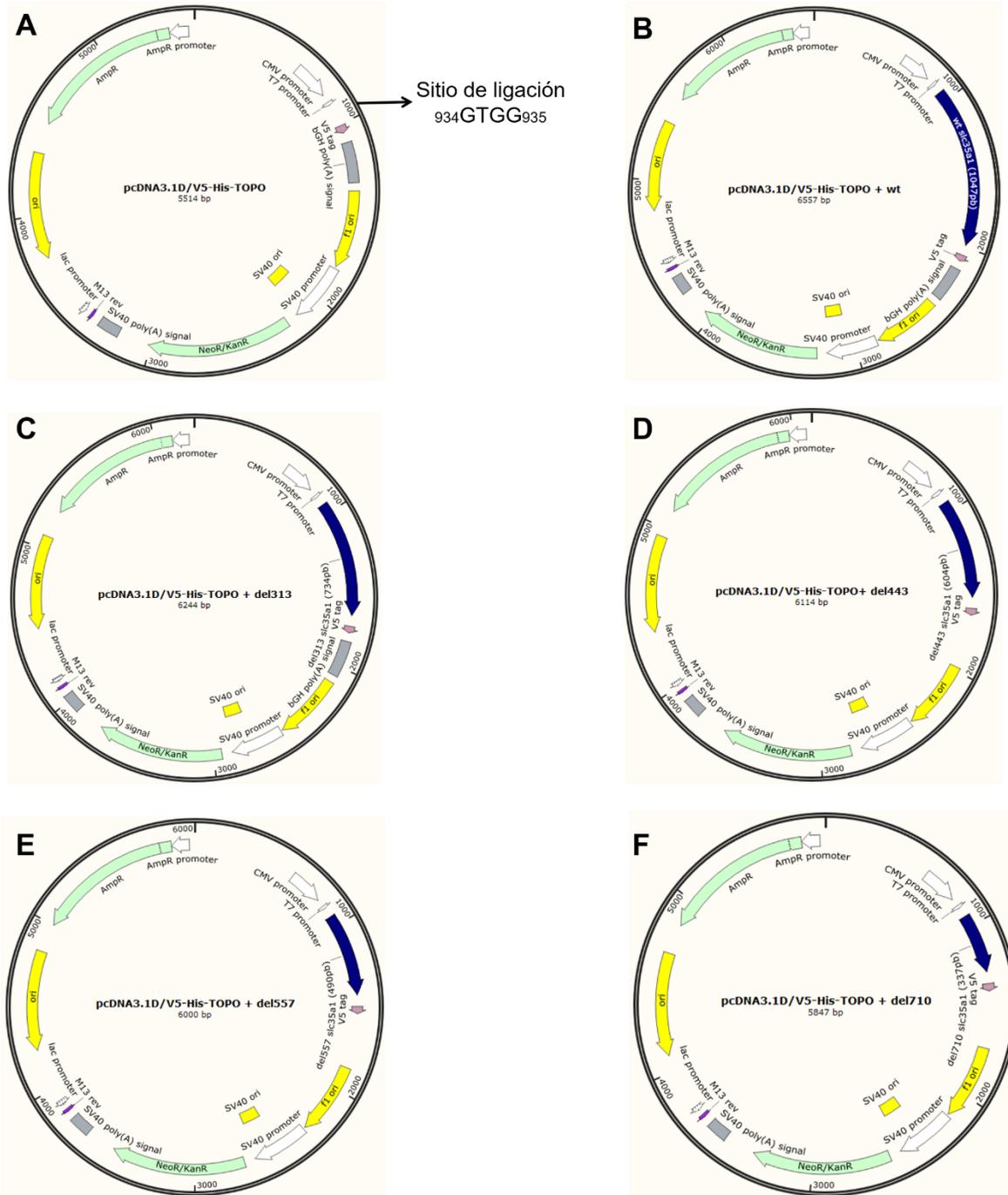


Figura 26. Construcciones de las isoformas encontradas del *slc35a1* en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.

A) Se muestra el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO vacío, indicando la región 934GTGG938 en donde ocurre la ligación con el inserto. B) Construcción pcDNA3.1D/V5-His-TOPO+ *wt slc35a1* MA-104, indicada (inserto indicado con la flecha color azul). C) Construcción pcDNA3.1D/V5-His-TOPO

+ del313 *slc35a1* MA-104 (inserto indicado con la flecha color azul). D) Construcción pcDNA3.1D/V5-His-TOPO + del443 *slc35a1* MA-104 (inserto indicado con la flecha color azul). E) Construcción pcDNA3.1D/V5-His-TOPO + del557 *slc35a1* MA-104 (inserto indicado con la flecha color azul). F) Construcción pcDNA3.1D/V5-His-TOPO + del710 *slc35a1* MA-104 (inserto indicado con la flecha color azul).

El vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO tiene una longitud de 5514pb y la longitud del amplicón esperado para la isoforma silvestre es de 1047pb, 734pb para la isoforma del313, 604pb para la isoforma del443, 490pb para la isoforma del557 y 337pb para la isoforma del710. En la figura 27, se pueden observar los productos de la digestión con la enzima KpnI, donde se muestra la banda correspondiente para cada construcción de clonación, obteniendo las bandas con los siguientes tamaños: 5514pb (vector) + 1047pb (wt)=6561pb; 5514pb (vector) + 734pb (del313) =6248pb; 5514pb (vector) + 604pb (del443) = 6118pb; 5514pb (vector) + 490pb (del557) = 6004pb; 5514pb (vector) + 337pb (del710) = 5851pb.

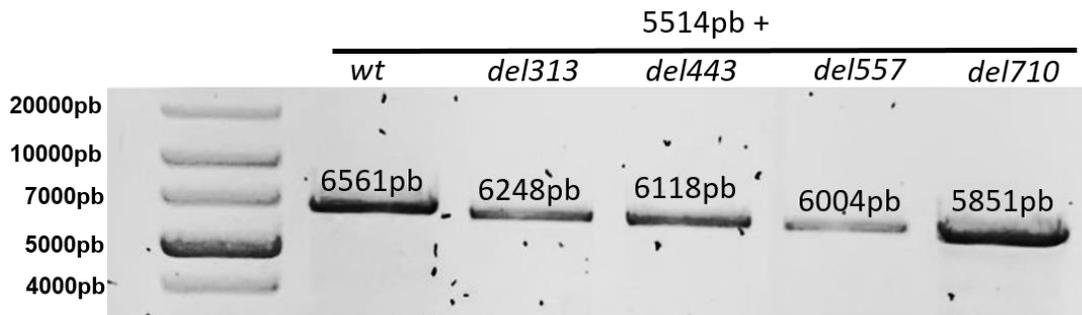


Figura 27. Ensayo de restricción de las construcciones *slc35a1* + pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.

En la figura se muestran los productos del ensayo de restricción de las construcciones del *slc35a1* + pcDNA3.1D/V5-His-TOPO con los pesos correspondientes para cada una de ellas.

A partir de lo observado en el gel de electroforesis, se confirmó que las construcciones del plásmido con los diferentes inserto o isoformas de *splicing* corresponden a los tamaños obtenidos por secuenciación.

8.8 Análisis de isoformas identificadas a nivel de aminoácidos

Una vez analizadas las secuencias de las isoformas a nivel de nucleótidos, se realizó la traducción de las secuencias en el servidor ExPASy y se analizaron las isoformas a nivel de aminoácidos ⁵⁶.

En el caso de la isoforma *wt*, se obtuvo una secuencia de 337aa que coincide con el tamaño de la isoforma *wt* del *SLC35A1* de humano y la isoforma *wt* del *slc35a1* de macaco. Adicionalmente, la silvestre isoforma de macaco contiene la región VGI que funciona como señal de translocación a la cisterna *trans* ⁵⁴ Golgi, confirmando la correcta localización y actividad del CST dentro del modelo MA-104, figura 28

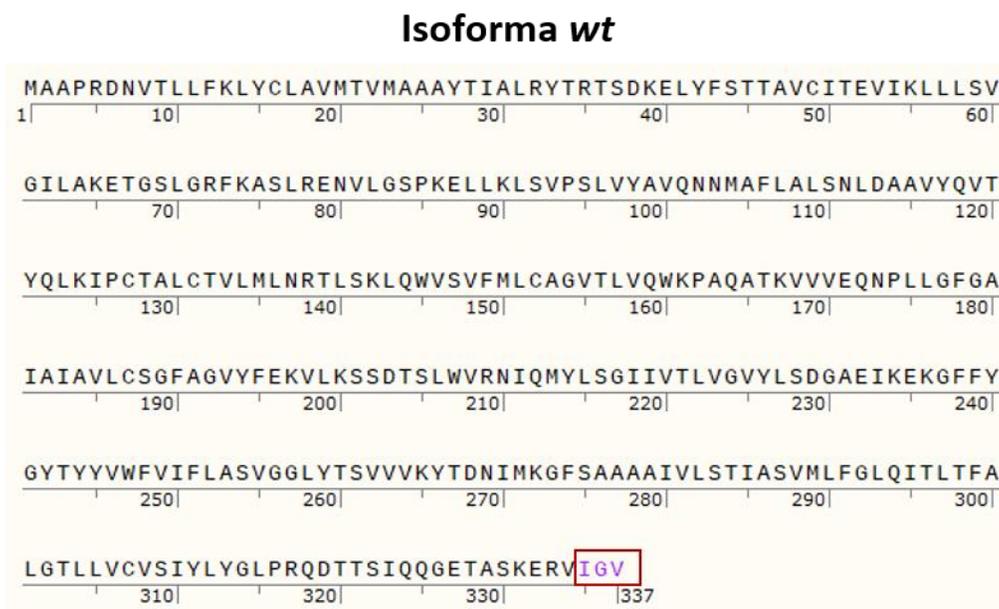


Figura 28. Secuencia peptídica teórica de la isoforma *wt* del CST de macaco.

En el recuadro rojo se indica la secuencia péptido señal VGI para la translocación a *trans* Golgi.

Para la isoforma del313, la secuencia de aa obtenida posterior a la traducción fue de 233aa, longitud suficiente para que la proteína se considere estable. Sin embargo, en la posición 72 se genera el primer codón de paro prematuro, al cual le preceden ocho señales más de paro prematuro, figura 29, impidiendo que se forme

una proteína de 233aa. Adicional a los codones de paro prematuro, después de la traducción, la región VGI no se observa al final de la secuencia, por lo tanto, la isoforma del313, que es la isoforma más cercana en longitud a la isoforma *wt*, no es candidato a ser una proteína funcional considerando el tamaño de 71aa y la ausencia de la región VGI.

Isoforma del313

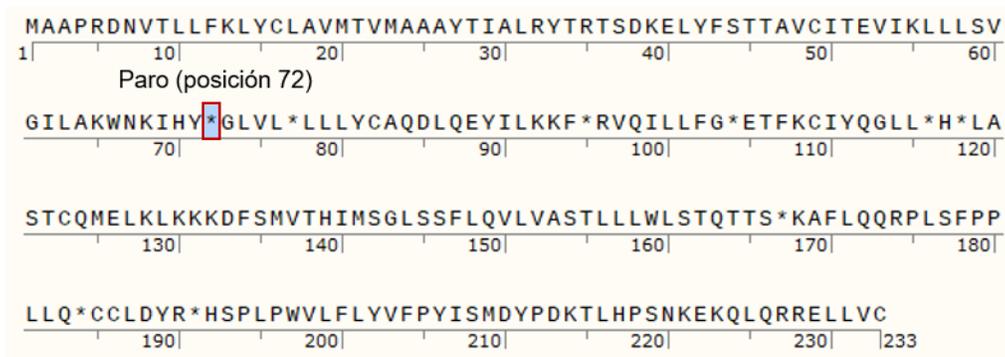


Figura 29. Secuencia peptídica teórica de la isoforma *del313* del CST de macaco.

La isoforma del443 originaría una secuencia de 190aa posterior a la traducción, sin embargo, al igual que la isoforma del313, se observó la presencia de una señal de paro prematuro en la posición 72, lo que daría lugar a un péptido de 71aa con la ausencia de la región VGI. Por lo tanto, la isoforma del443 no proporciona las características suficientes para considerarla una isoforma funcional, figura 30.

Isoforma del443

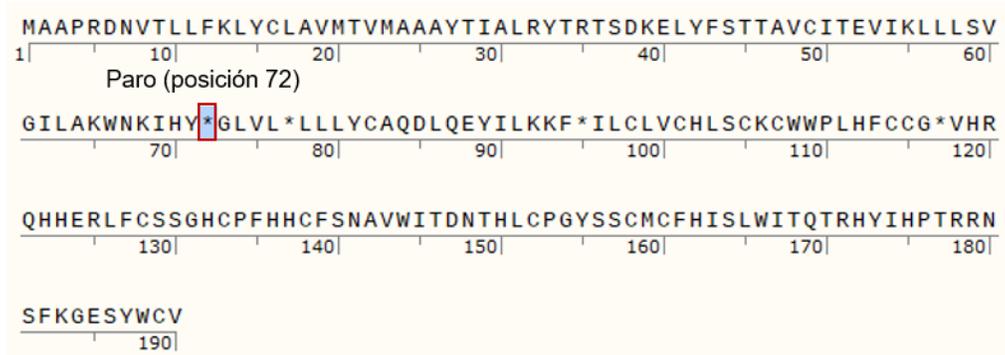


Figura 30. Secuencia peptídica teórica de la isoforma *del443* del CST de macaco.

La isoforma del557 originaría una secuencia de 152aa después de la traducción, pero presenta dos codones de paro prematuro. La primera señal se encuentra en la posición número 15, lo que daría lugar a un péptido de 14aa, lo cual no es viable para considerarse como un polipéptido funcional. Adicionalmente, al igual que en las isoformas anteriores, tampoco se observó la presencia de la región VGI en el extremo N-terminal, figura 31.

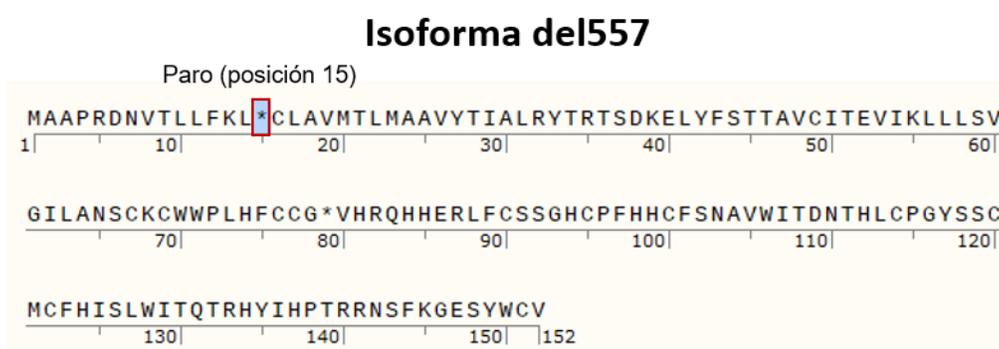


Figura 31. Secuencia peptídica teórica de la isoforma del557 del CST de macaco.

Por último, la isoforma del710 originó una secuencia de 101aa después de su traducción, que presenta una señal de paro prematuro en la posición número 18. Al igual que en las isoformas anteriores, la del710 tampoco preservó la péptido señal VGI, figura 32.

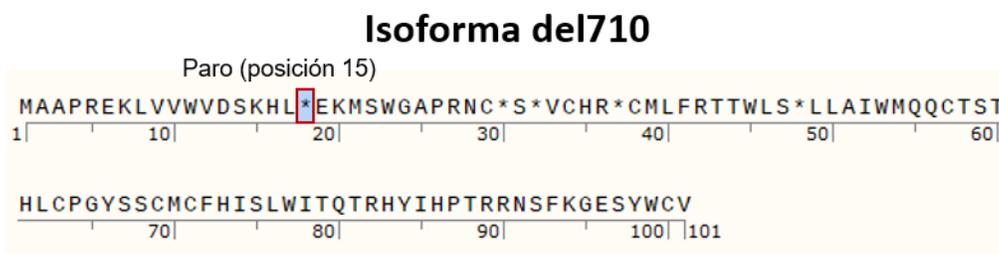


Figura 32. Secuencia peptídica teórica de la isoforma del710 del CST de macaco.

En la figura 33 se muestra el resumen de las isoformas identificadas y caracterizadas molecularmente, en donde se observan las regiones de los exones que se pierden, y los marcos de lectura abiertos en donde se presentan los codones de paro prematuro para las isoformas del313, del443, del557 y del710.

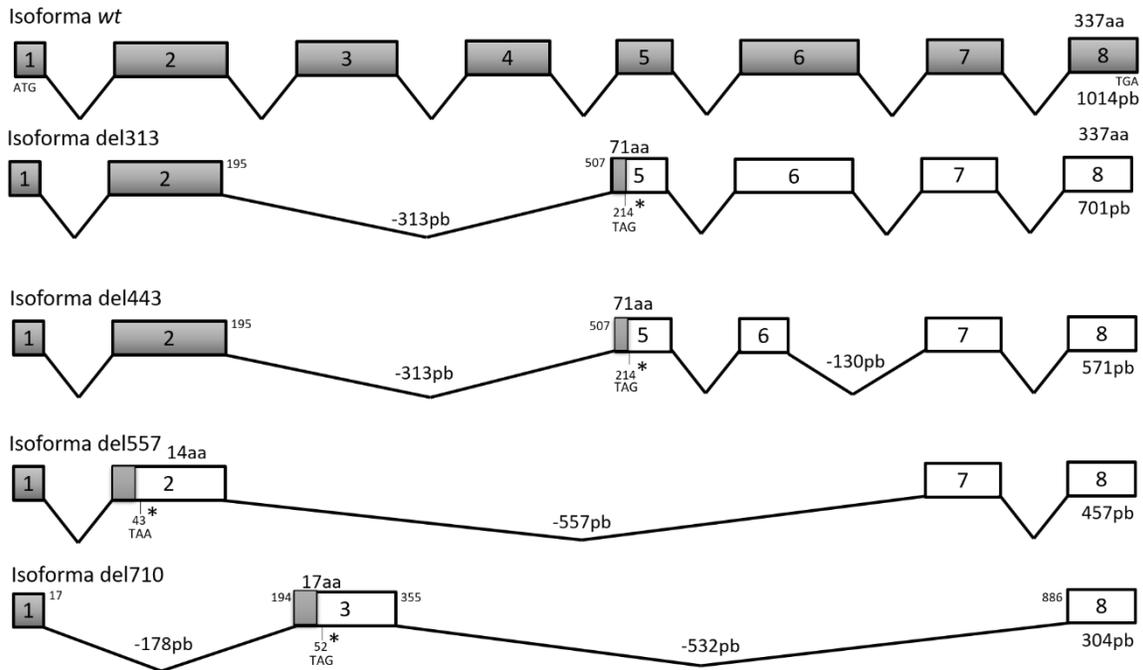


Figura 33. Resumen de isoformas identificadas.

En la figura se muestran los exones de las isoformas identificadas, a manera de recuadros. Adicionalmente, se marcan en color gris las regiones traducidas, y en color blanco, las regiones no traducidas debido a los codones de paro prematuro.

Basado en la secuenciación obtenida a partir de las isoformas clonadas en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, se puede observar que, si bien las isoformas pierden exones en la secuencia codificante del *slc35a1*, el exón 1 y 8 se conserva en todas ellas. Respecto a la preservación del exón 8, en esta primera etapa se determinó que ninguna isoforma a excepción de la isoforma *wt*, logra codificar una proteína funcional.

La traducción de las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante secuenciación de Sanger, permitió observar que existen corrimientos de bases que provocan codones de paro prematuro que originan secuencias de 71aa, 17aa y 14aa correspondientemente, sin mencionar que ninguna de ellas conserva la secuencia péptido señal de localización en la cisterna *trans* Golgi, región VGI.

A pesar de que las isoformas que se presentan en el *SLC35A1* de humano (del130, del177, del244 y del290) no lograron identificarse en el modelo de macaco, se pudo determinar que en las células MA-104 ocurre *splicing* alternativo que genera isoformas del *slc35a1*.

Adicionalmente, es necesario señalar que aún existe la posibilidad de clonar las isoformas del130 y del177 de acuerdo con los tamaños de bandas observados por PCR convencional, así como otras dos isoformas reportadas en el servidor Ensembl ([ENSMMUT00000040288.3](#) y [ENSMMUT00000040289.3](#)) que tienen una longitud mayor a la isoforma *wt* y que se observaron en la electroforesis de PCR.

Cabe mencionar que las isoformas encontradas del313, del443, del557 y del710 no se han reportado previamente, y considerando que a nivel de aminoácidos no codifican para una proteína funcional, esto nos lleva a considerar que las isoformas identificadas podrían expresarse para regular el porcentaje de expresión de la isoforma *wt*⁵⁷.

Las isoformas identificadas podrían ser degradadas mediante un proceso de decaimiento de ARNm o NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*), que consiste en una asociación de los mecanismos de *splicing* alternativo y la degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras. Algunos reportes respaldan que ambos mecanismos regulan la expresión de proteínas en las que los ARNm que las codifican son modificados por *splicing* alternativo^{57,58}.

9.0 CONCLUSIONES

- Se amplificaron, clonaron e identificaron cinco isoformas del *slc35a1* de células MA-104: la isoforma *wt*, la isoforma del313, la isoforma del443, la isoforma del557 y la isoforma del710.
- La isoforma *wt* del *slc35a1* de *Macaco mulatta* es la única isoforma que codifica para una proteína funcional de 337aa, mientras que los resultados teóricos indican que las isoformas del313, del443, del557 y del710 son secuencias peptídicas truncas no funcionales.
- La isoforma del443 presenta la eliminación de 130 pb del exón 6 de forma similar a la isoforma del130 de humano.
- Este es el primer reporte de la presencia de las isoformas del313, del443, del557 y del710 en *Macaco mulatta*.
- La identificación de estas isoformas contribuye al conocimiento de la regulación de la expresión del CST y abre la puerta a conjeturas acerca de la posible regulación por NMD del gen *slc35a1*.

10.0 PERSPECTIVAS

- Expresar en un modelo de complementación CHO-Lec2 o KO del CST las isoformas encontradas en la línea MA-104 y confirmar su funcionalidad.
- Amplificar, clonar y secuenciar las isoforma del130 y del177 faltantes de la línea celular MA-104.
- Realizar un modelo teórico de la isoforma del130 y del177 de la línea celular MA-104 basado en la secuencia experimental de la isoforma.
- Confirmar el papel de las isoformas de splicing identificadas en la expresión del *slc35a1*.

11.0 ANEXOS

11.1 Preparación de soluciones de lisis alcalina

Solución de lisis alcalina I

La solución de lisis alcalina se preparó con 0.180g de glucosa 50mM, 0.0607g de Tris-HCl 25mM y 0.05845g de EDTA 10mM disueltos en 20mL de agua destilada, obteniendo las siguientes concentraciones finales para cada reactivo: glucosa 5mM, Tris-HCl 2.5mM y EDTA 1mM.

La solución fue esterilizada mediante autoclave y almacenada a 4°C para su uso posterior.

Solución de lisis alcalina II

La solución de lisis alcalina II se preparó con 90µL de NaOH 10N, 450µL de SDS 10% y se llevó a un volumen final de 4.5mL con agua destilada, obteniendo las siguientes concentraciones finales para cada reactivo: NaOH 0.02N y SDS 1%.

Solución de lisis alcalina III

La solución de lisis alcalina III se preparó con 15mL de acetato de potasio 5M, 2.9mL de ácido acético glacial y 7.1mL de agua destilada, obteniendo un volumen final de 25mL, obteniendo una solución del 60% de acetato de potasio 5M, 11.6% de ácido acético glacial y 28.4% de agua destilada.

11.2 Geles de electroforesis de PCR de colonia

Clonación del *slc35a2* en pJET 1.2/Blunt

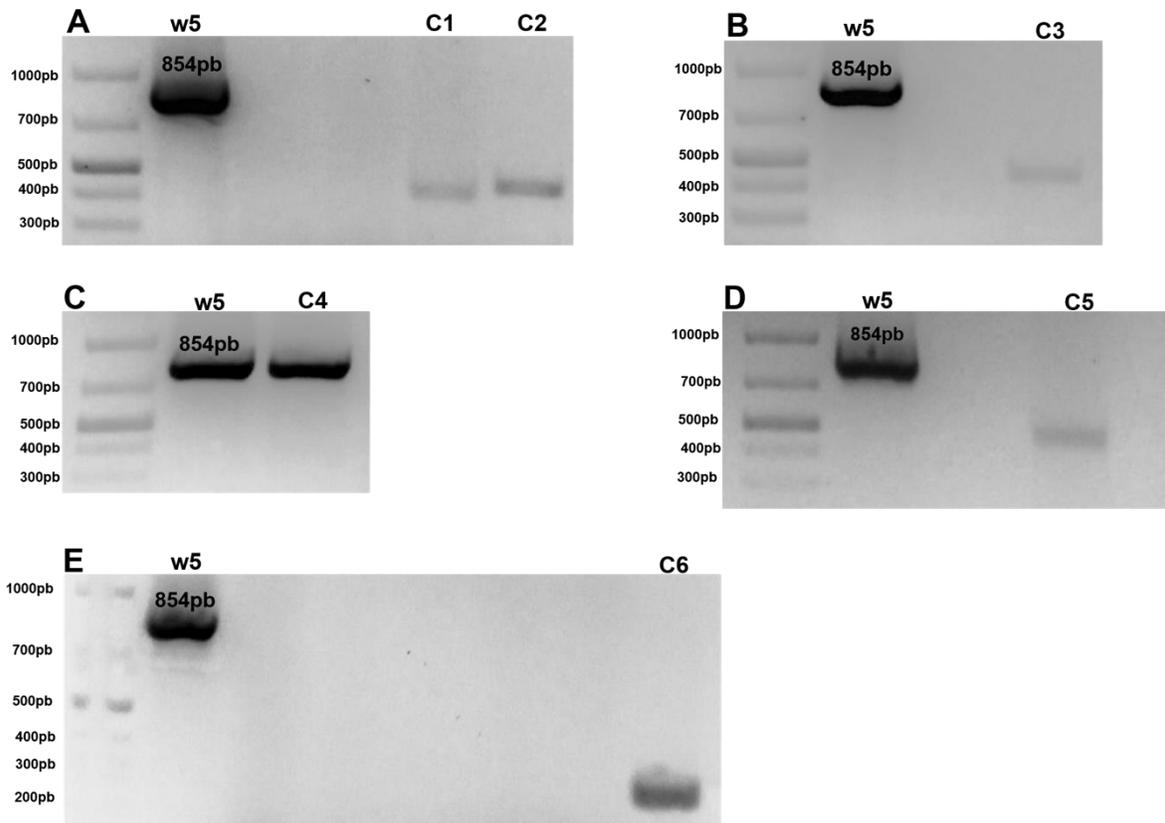


Figura 34. Geles de electroforesis de los productos de PCR obtenidos durante la clonación del *slc35a1* en el vector pJET1.2/Blunt.

En la figura se muestran los geles de electroforesis donde se identificaron colonias positivas después de la transfección con la construcción *slc35a1* + pJET1.2/Blunt. w5= Control positivo (*slc35a1* humano).

Clonación del *slc35a1* en pcDNA3.1D/V5-His-TOPO

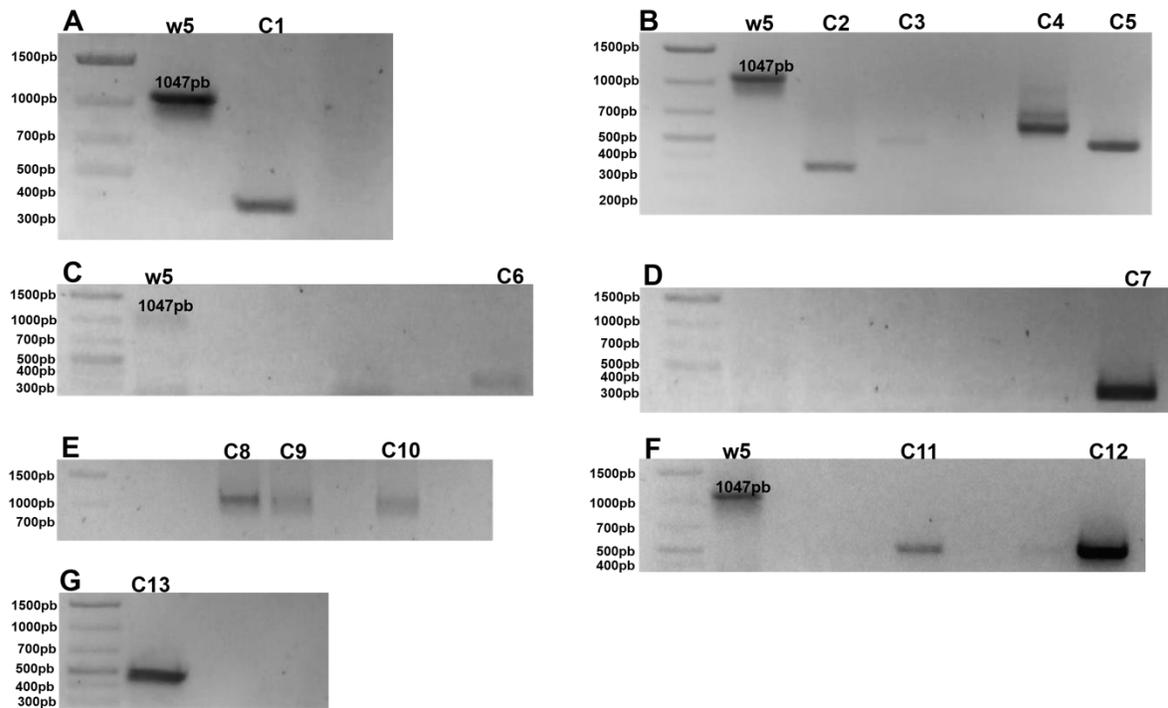


Figura 35. Geles de electroforésis de los productos de PCR obtenidos durante la clonación del *slc35a1* en el vectorpcDNA3.1D/V5-His-TOPO.

En la figura se muestran los geles de electroforésis en los que se encontraron colonias positivas después de la transfección con la construcción *slc35a1* +pcDNA3.1D/V5-His-TOPO. w5= Control positivo (*slc35a1* humano).

11.3 Cromatogramas de isoformas encontradas en macaco



Figura 36. Cromatograma de isoforma wt del *slc35a1*.



Figura 37. Cromatograma de isoforma del313 del *slc35a1*.

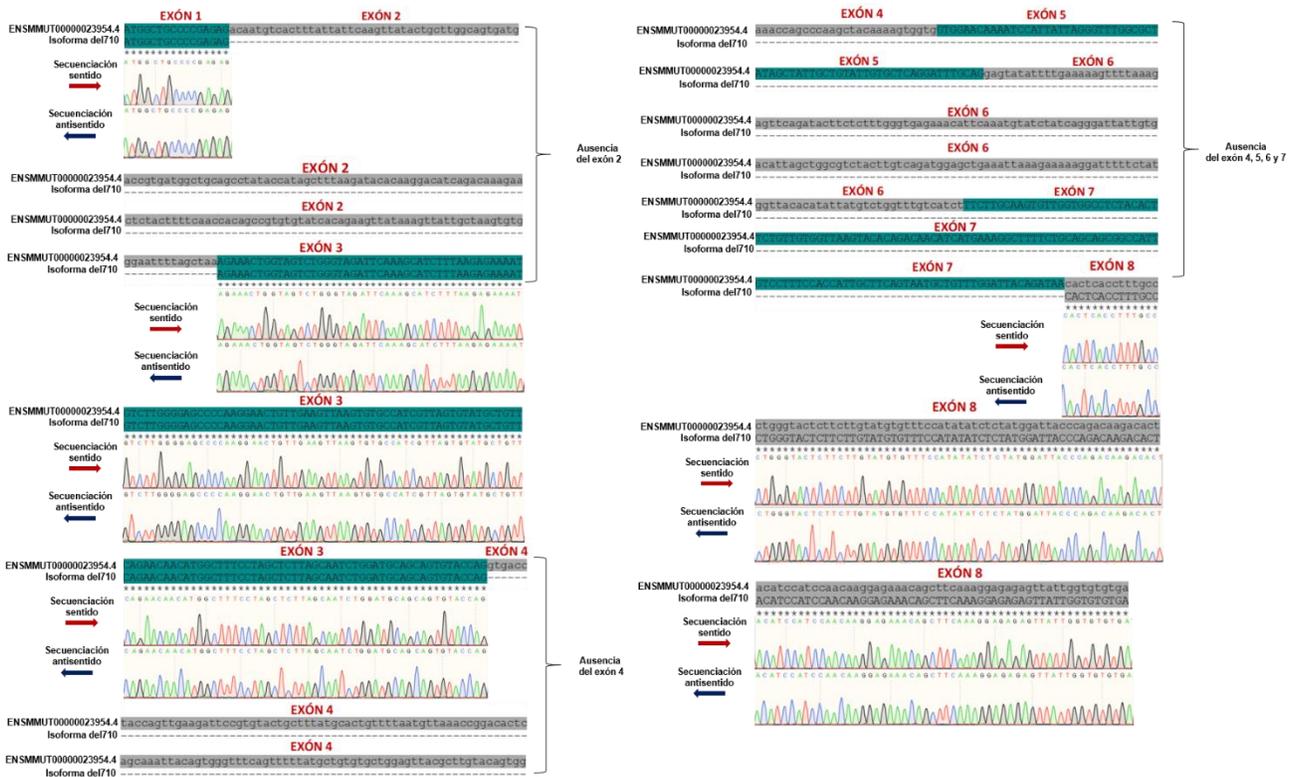


Figura 39. Cromatograma de isoforma del710 del *slc35a1*.

12.0 REFERENCIAS

1. Essentials of Glycobiology - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>.
2. Troy, F. A. Polysialylation: From bacteria to brains. *Glycobiology* vol. 2 5–23 (1992).
3. Petit, D., Teppa, E., Cenci, U., Ball, S. & Harduin-Lepers, A. Reconstruction of the sialylation pathway in the ancestor of eukaryotes OPEN. *Sci. REPoRTS* / **8**, 2946 (2018).
4. Flynn, R. A. *et al.* Mammalian Y RNAs are modified at discrete guanosine residues with N-glycans. doi:10.1101/787614.
5. SLC35A1 solute carrier family 35 member A1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=10559>.
6. Schauer, R. & Kamerling, J. P. Exploration of the Sialic Acid World.

doi:10.1016/bs.accb.2018.09.001.

7. Willig, T. N. *et al.* Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigen in leukocytes - A new syndrome? *Blood* **97**, 826–828 (2001).
8. Brun, J. *et al.* Analysis of SARS-CoV-2 spike glycosylation reveals shedding of a vaccine candidate. doi:10.1101/2020.11.16.384594.
9. MacAuley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 14 653–666 (2014).
10. Sperandio, M. *et al.* a2,3-Sialyltransferase-IV is essential for L-selectin ligand function in inflammation. doi:10.1002/eji.200636157.
11. Bhide, G. P. & Colley, K. J. Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 149–174 (2017).
12. Hadley, B. *et al.* Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. *Computational and Structural Biotechnology Journal* vol. 17 1123–1134 (2019).
13. Eckhardt, M., Gotza, B. & Gerardy-Schahn, R. *Membrane Topology of the Mammalian CMP-Sialic Acid Transporter**. <http://www.jbc.org/> (1999).
14. Hadley, B. *et al.* Mini Review Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress. *CSBJ* **10**, 23–32 (2014).
15. Nji, E., Gulati, A., Qureshi, A. A., Coincon, M. & Drew, D. Structural basis for the delivery of activated sialic acid into Golgi for sialylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 415–423 (2019).
16. Boudker, O., Ahuja, S. & Whorton, M. R. Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport. doi:10.7554/eLife.45221.001.
17. Martinez-Duncker, I. *et al.* Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. (2005) doi:10.1182/blood.
18. Ng, B. G. *et al.* Encephalopathy caused by novel mutations in the CMP-sialic acid transporter, SLC35A1. *Am. J. Med. Genet. Part A* **173**, 2906–2911 (2017).
19. Mohamed, M. *et al.* Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport. *Neurology* **81**, 681–687 (2013).
20. Riemersma, M. *et al.* Disease mutations in CMP-sialic acid transporter SLC35A1 result in abnormal α -dystroglycan O-mannosylation, independent from sialic acid. (2014)

doi:10.1093/hmg/ddu742.

21. Salinas-Marín, R., Mollicone, R. & Martínez-Duncker, I. A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter. *Glycoconj. J.* doi:10.1007/s10719-016-9697-8.
22. 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).
23. Fai Chan, K., Zhang, P. & Song, Z. Identification of essential amino acid residues in the hydrophilic loop regions of the CMP-sialic acid transporter and UDP-galactose transporter. *Glycobiology* **20**, 689–701 (2010).
24. Takeshima-Futagami, T. *et al.* Amino acid residues important for CMP-sialic acid recognition by the CMP-sialic acid transporter: Analysis of the substrate specificity of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras. *Glycobiology* **22**, 1731–1740 (2012).
25. Eckhardt, M., Gotza, B. & Gerardy-Schahn, R. *Mutants of the CMP-sialic Acid Transporter Causing the Lec2 Phenotype**. <http://www.jbc.org/> (1998).
26. Mexicana, A. F. & México, A. C. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*.
27. Lin, N. *et al.* Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cell Engineering to Increase Sialylation of Recombinant Therapeutic Proteins by Modulating Sialyltransferase Expression HHS Public Access. *Biotechnol Prog* **31**, 334–346 (2015).
28. SUGIYAMA, M. *et al.* Attachment and Infection to MA104 Cells of Avian Rotaviruses Require the Presence of Sialic Acid on the Cell Surface. *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 461–463 (2004).
29. Beaty, S. M. *et al.* Genome-wide transposon mutagenesis of paramyxoviruses reveals constraints on genomic plasticity Satoshi Ikegame ID 1. (2020)
doi:10.1371/journal.ppat.1008877.
30. Influenza Virus | Elsevier Enhanced Reader.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0966842X18301318?token=973BA6DEACD50C88D1CE7D2F902EC07C94F6EEDC418EFB59B8ABF624D56E5E00A4EDC0A455CE311F387E731EB0405906&originRegion=us-east-1&originCreation=20210614022207>.
31. Alejandra Tortorici, M. *et al.* Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* doi:10.1038/s41594-019-0233-y.
32. 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. (2021)
doi:10.1016/j.jbc.2021.100789.

33. Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6709370/>.
34. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells | Elsevier Enhanced Reader.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867421005031?token=1D8C8AD52FF24991030291F254D8EDAEAAA58283E4DED7814908E4B1DAFB7D0060F2114C5CDA0C70158E35909E9BEBFD&originRegion=us-east-1&originCreation=20210624171758>.
35. Ortólogos SLC35A1 - NCBI.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10559/ortholog/?scope=89593>.
36. Muhlenhoff, M., Bethe, A. & Gerardy-Schahn, R. *Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter (complementation cloning/Lec2 mutant/nucleotide sugar transport/polysialic acid)*. *Biochemistry* vol. 93 (1996).
37. Zhao, W., Chen, T. L. L., Vertel, B. M. & Colley, K. J. The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **281**, 31106–31118 (2006).
38. Lee, M. M., Zhang, P. & Song, Z. The Golgi CMP-sialic acid transporter: A new CHO mutant provides functional insights Sing Fee Lim. *Glycobiology* **18**, 851–860 (2008).
39. Maggioni, A. *et al.* Characterisation of CMP-sialic acid transporter substrate recognition. *ChemBioChem* **14**, 1936–1942 (2013).
40. Hadley, B. *et al.* Mini Review Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress. *CSBJ* **10**, 23–32 (2014).
41. Mohamed, M. *et al.* Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport. *Neurology* **81**, 681–687 (2013).
42. Gene: Slc35a1 (ENSMUSG00000028293) - Splice variants - Mus musculus - Ensembl genome browser 100.
https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Splice?db=core;g=ENSMUSG00000028293;r=4:34663257-34687438.
43. Gene: Slc35a1 (ENSMUSG00000028293) - Splice variants - Mus_musculus - Ensembl genome browser 104.
https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Splice?db=core;g=ENSMUSG00000028293;r=4:34663257-34687438.
44. Zimin, A. V *et al.* *A new rhesus macaque assembly and annotation for next-generation*

- sequencing analyses*. vol. 9 <http://www.biologydirect.com/content/9/1/20> (2014).
45. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids - Essentials of Glycobiology - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453082/#!po=5.68182>.
 46. Kawanishi, K. *et al.* Human species-specific loss of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase enhances atherosclerosis via intrinsic and extrinsic mechanisms. doi:10.1073/pnas.1902902116.
 47. Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. & Suzuki, A. *The Molecular Basis for the Absence of N-Glycolylneuraminic Acid in Humans**. *Journal of Biological Chemistry* vol. 273 <http://www.jbc.org> (1998).
 48. Sialiltransferasa: una visión general | Temas de ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/sialyltransferase>.
 49. Ácido siálico: estructura, funciones y enfermedades - Lifeder. <https://www.lifeder.com/acido-sialico/>.
 50. Higuera, N., Vázquez, S. & Palencia, R. *Trastornos congénitos de la glicosilación de las proteínas. Patogenia y aspectos clínicos*. (2011).
 51. MA-104 Clone 1 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-2378.1>.
 52. Salinas-Marín, R. EFECTO DEL KNOCK DOWN DEL TRANSPORTADOR DE CMP-ÁCIDO SIÁLICO SOBRE EL PERFIL DE SIALILACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA DE HEPATOCARCINOMA (HEPG2). (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2016).
 53. Gene: SLC35A1 (ENSMMUG00000017028) - Summary - Macaca mulatta - Ensembl genome browser 100. http://www.ensembl.org/Macaca_mulatta/Gene/Summary?db=core;g=ENSMMUG00000017028;r=4:85818727-85847747;t=ENSMMUT00000040289.
 54. Zhao, W., Chen, T. L. L., Vertel, B. M. & Colley, K. J. The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **281**, 31106–31118 (2006).
 55. Transcript: SLC35A1-202 (ENSMMUT00000023954.4) - Summary - Macaca_mulatta - Ensembl genome browser 104. http://www.ensembl.org/Macaca_mulatta/Transcript/Summary?db=core;g=ENSMMUG00000017028;r=4:85818727-85847747;t=ENSMMUT00000023954.
 56. ExpASY - Translate tool. <https://web.expasy.org/translate/>.
 57. Lareau, L. F., Brooks, A. N. & Soergel, D. A. Publication Date.

58. Brogna, S. & Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009 162 **16**, 107–113 (2009).