



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**“Estudio de la O-GlcNAcilación en
fibroblastos de pacientes con PMM2-CDG”**

T E S I S

PARA RECIBIR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ADRIANA WENDOLYN CÁRDENAS ESTRADA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER RAMÍREZ

**LABORATORIO DE GLICOBIOLOGÍA HUMANA Y DIAGNÓSTICO
MOLECULAR**

SINODALES

- **Presidente.** Dr. Fernando Esquivel Guadarrama; Laboratorio de inmunología viral; Facultad de medicina, UAEM.
- **Secretario.** Dr. Nelson Avonce Vergara; Laboratorio de Biología molecular y Biotecnología de plantas, Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM.
- **Vocal.** Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez; Laboratorio de Glicobiología humana y Diagnóstico molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM.
- **Suplente.** Dr. José Antonio Serrato Pérez; Departamento de Bioquímica; Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, CDMX.
- **Suplente.** Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz; Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Medicina, UAEM.

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaría Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **ADRIANA WENDOLYN CÁRDENAS ESTRADA** con número de matrícula **10002811** cuyo título es:

“Estudio de la O-GlcNAcilación en fibroblastos de pacientes con PMM2-CDG”.

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 29 de marzo del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

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

DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA	(PRESIDENTE).
DR. NELSON AVONCE VERGARA	(SECRETARIO).
DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER RAMÍREZ	(VOCAL).
DR. JOSÉ ANTONIO SERRATO PÉREZ	(SUPLENTE).
DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ	(SUPLENTE).



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

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha: 2022-03-29 13:42:44 | Firmante
 DVRVVYY+3yX8B6MqQ83T365X5ZbSMMB44TqDT7LEyXxeVeWu5CcYnFHCyW6RM2WOR+MNK11r/1pZf9ZKyqfCzbaogD3Lpy+WHSGWGo1dmSg395RGHonEKN4QaE8
 q5j8afx6k30galK8RaMFBKDFWQzLCingUMnGQSQpwwVYx5LOT3a3HECWYlgf659qfWkWyFgdLdHglMoaQgDeLrS44T5uvVfPw1LGWm+UVCPN0Jny6KpKYVDDvX
 KHoiNbcQ8E8zpm49r7qGgA/yowd1mxDP88cscv3G5y9mRAVJskbCTp8INMGcibJwA5pPnw==

JOSÉ ANTONIO SERRA TO PÉREZ | Fecha: 2022-03-30 14:53:59 | Firmante
 BFumIG3YmHkFykT5dMdzCdh9GLeLU/pazyUHCpZ8sStx8N7A/2ttYD/sxBNEWK73K3xxOUzqQLHTMmdcdEiOpNhX03RTbK89w+dKwOxBZSTA1pOPJ6m5e08eS6p6o9UjK6
 Lysw7OpmP8WyyE:cOE2NM0PcW9LdGtaQzluxoZC/UFGC3ZLdnRmgXBNONbAK55YcGkzSMDzAR28Pz4MLTMZdO5civSv4Q/Jd9Bv+7SvdlJHdtdPwLXdl7m9h2O
 D6ghCkxK9v5Xp3qJfObi7e492Tev6YhbYTvzSISkUoH1e4c+2CAKU1IUlpmHy45okuXw==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha: 2022-03-31 06:56:08 | Firmante
 ukL4s/5nyWk5AKqlyBjshhx4dubZTTCDf9RN9imMdpR5PQW6R00x0c0nyP+sdPvHLrbuhDXI5PmkIBhalkxIS1HmiNGQLn9OOGxToaggD15VWXKFdgrfidBwY73971m6xK
 zh0Tdm=ftgWNS/r1mMNM3gNAz4ibg1fVwfmTg0e08LF6zqjNDpt3JRS6oPZvRSxtd7LISQDnTNYeMQp9sX12OxEPjWWE2g8+oNsZWYgGqXwJSEwbxU5c8nI28kV9vwhdpatJ
 wR+3yRChLE59gdcVUj5a1x01c0UGqDg2xGOVbBCKEVPVFR9x2osHzXwOc1GDJg==

NELSON AVONCE VERGARA | Fecha: 2022-05-04 13:00:12 | Firmante
 0XIS63m+U+3INkV/+9zMPL6ppZ948FeusTXO56o37ZgNxd+p2WGWcNeEUxftqTSZ+12hw+JlUT566HQNRHj6RDZsM9MbFoP+cHf2nOUzk8F/miQfbbWmsmohcSisQZkrX8
 Ma3+ECKg6NBmMQKjW6T7NOc91xY+jalIT3xJNMKW7FbcVRKbGzwwJ3ZyCGx/mGh11FJjxRixEzUeV1w3dMUGG2G9ZVFSAD+BL5J7cOCS3SLJL05I0481goGR/1QuIm
 WQAsdBvUfj5q4wqXUfU6zWYXrBcbZaP0FMpQv02VJCuinUeTLAarAkQNGcQy4485C SLA==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha: 2022-05-05 17:53:09 | Firmante
 BmrmnaqSfDnc2Mb212im1NFezSQsDO8N+A+ZjyZAMPGms3U+Fw4KYm5B7KgbQ0tsX30206xd+FTHtpU3PNWlyg3Z8qSNVX0HSdiz+PEv5Vhe8zwLAhx2aaTvrpg0IKL
 EUCaVC18KvTpUuDFrak5yMPZp2D0qoyHbf28dYScelRgY8igZhmNoW3PUN7GXdX2R7+szJDupKy5TSL0ptsMTQYCFf4c12grJQsJJ+XPk9vCX4fz9S4WfruMP4Q9U8
 Uy7wELVQrJVVdLQu89RBamqAFCTRvQQlyHsJF9KRx1VrMplUmog7ID00zYkIDZBvOA==

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



lvZWwvj8

<https://efirma.uaem.mx/noRepudioOrk0suh0XVNSA2R85v9N0Z87SLboOT>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
 2017-2023

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Adriana Estrada García, porque sin su apoyo esto no habría sido posible; y a mi hermana, Andrea Naomi Cárdenas Estrada. Gracias a ambas por todo su cariño, su amor y su comprensión.

A mi novio, Francisco Javier Camacho Martínez, por acompañarme en esta etapa tan importante de mi vida. Por su comprensión, su paciencia y por motivarme en todo momento. Gracias por seguir a mi lado aun cuando las cosas se tornaban difíciles.

A mis abuelos, Sara García Piedra y Miguel Ángel Estrada Maldonado, por su cariño y su apoyo incondicional.

A mi Lucas, por acompañarme en mis desvelos, porque siempre sabia como animarme y por esperarme cada que regresaba a casa.

Gracias a mi tutor, a la Dra. Kathy Gutiérrez Huante, a mi comité tutorial y a todo el equipo del laboratorio de glicobiología humana por darse el tiempo de revisar mi trabajo de tesis.

INDICE

1.0 ABREVIACIONES.....	8
2.0 INTRODUCCIÓN	10
3.0 ANTECEDENTES.....	12
3.1 Glicosilación	12
3.2 <i>N</i> -Glicosilación	13
3.3 <i>O</i> -Glicosilación	17
3.4 <i>O</i> -GlcNAcilación	18
3.4.1 Ruta biosintética de las hexosaminas	19
3.4.2 OGT y OGA	22
3.4.3 <i>O</i> -GlcNAcilación y Fosforilación.....	26
3.5 Desordenes congénitos de la glicosilación (CDG)	26
3.5.1 Diagnóstico de CDG	27
3.5.2 PMM2-CDG	29
4.0 JUSTIFICACIÓN.....	34
5.0 HIPÓTESIS.....	35
6.0 OBJETIVOS.....	35
6.1 General	35
6.2 Particulares	35
7.0 MATERIALES Y METODOS.....	36
7.1 Cultivo celular.....	36
7.2 Lisis celular	36
7.3 Cuantificación de Proteínas.....	37
7.4 SDS-PAGE y Western Blot.....	37
7.4.1 Bloqueo e Incubación con anticuerpos (<i>O</i> -GlcNAc)	38
7.4.2 Bloqueo e Incubación con anticuerpos (OGA)	38
7.4.3 Bloqueo e Incubación con anticuerpos (OGT).....	38
7.4.4 Detección.....	39
7.5 Stripping	39
7.6 Extracción de ARN	40
7.7 Síntesis de ADNc	40
7.8 PCR punto final	41
7.9 Análisis desitométrico.....	42

8.0 RESULTADOS	43
8.1 Obtención de lisados celulares totales	43
8.2 Estandarización WB O-GlcNAc y Enzimas	43
8.3 La O-GlcNAcilación de proteínas totales aumenta en el P2.....	45
8.4 La O-GlcNAcilación de proteínas de pesos moleculares específicos cambia de manera heterogénea	46
8.5 El nivel de OGA disminuye en P1, pero aumenta en P2.....	58
8.6 El nivel de OGT aumenta en P1 y paciente 2, el aumento es mayor en P2	59
8.7 Síntesis de ADNc	60
8.8 Estandarización uso de oligos para OGA y OGT.....	60
8.9 El nivel de ARNm de OGA no cambia en pacientes con PMM2-CDG	61
8.10 El nivel de ARNm de OGT no cambia en pacientes con PMM2-CDG.....	62
9.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	64
10.0 PERSPECTIVAS	66
11.0 BIBLIOGRAFÍA.....	68
12.0 ANEXOS.....	76

1.0 ABREVIACIONES

Ac-CoA: Acetil coenzima A

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

CDG: Desordenes congénitos de la glicosilación

C: Control promedio

C1: Control 1

C2: Control 2

ADNc: Ácido desoxirribonucleico codificante

Dol-P-Glc: Dolicol-fosfato- glucosa

Dol-P-Man: Dolicol-fosfato-manosa

F-1-P: Fructosa-1-fosfato

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

GDP: Guanidina difosfato

GDP-Man: Guanidina difosfato manosa

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetil-glucosamina

HBP: Rutabiosintética de las hexosaminas (por sus siglas en inglés “*hexosamine biosynthetic pathway*”)

IEF: Isoelectroenfoque

LLO: Oligosacarido precursor ligado a lípido (por sus siglas en inglés “*lipid linked oligosaccharide*”)

Man-1-P: Manosa-1-fosfato

Man-6-P: Manosa-6-fosfato

Man: Manosa

mOGT: O-GlcNAc transferasa mitocondrial

MPI: Fosfomanosaisomerasa

ncOGT: O-GlcNAc transferasa núcleo-citoplásmica

OGA: O-GlcNAcasa

OGA-L: O-GlcNAcasa larga

OGA-S: O-GlcNAcasa corta

OGT: O-GlcNAc transferasa

OGT-S: O-GlcNAc transferasa corta

P1: Paciente 1

P2: Paciente 2

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés "*polymerase chain reaction*")

PMM2: Fosfomanomutasa 2

PMM2-CDG: Desorden congénito de la glicosilación por fosfomanomutasa 2

RE: Retículo endoplásmico

Ser: Serina

Sia: Ácido siálico

Thr: Treonina

TPR: Tetratricopéptidos

UDP: Uridina difosfato

UDP-GlcNAc: Uridina difosfato N-acetil-glucosamina

WB: Western Blot

Xyl: Xilosa

2.0 INTRODUCCIÓN

Los desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG) son un grupo de síndromes clínicos y genéticamente heterogéneos causados por mutaciones en genes implicados en la glicosilación celular; la cual consiste en la modificación de biomoléculas como proteínas, lípidos y ARN mediante la unión covalente de carbohidratos [1]. Se han identificado más de 137 tipos de CDG [2], siendo PMM2-CDG el trastorno con mayor incidencia en el mundo (más de 1000 casos reportados) [3].

El PMM2-CDG es causado por mutaciones en el gen que codifica para la fosfomanomutasa 2 (PMM2), enzima que cataliza la conversión de manosa-6-fosfato (Man-6-P) a manosa-1-fosfato (Man-1-P) [4]. La Man-1-P que deriva de esta reacción es utilizada para la síntesis de GDP-Manosa (GDP-Man) y dolicol-fosfato-manosa (Dol-P-Man) [4]. En consecuencia, las mutaciones en PMM2 causan defectos en la primera etapa de síntesis de la *N*-glicosilación que requiere de estos sustratos donadores para las manosiltransferasas [4]; sin embargo, en este estudio queremos determinar si los pacientes con PMM2-CDG podrían tener afectaciones en la *O*-GlcNAcilación.

La *O*-GlcNAcilación regula la actividad de diversas proteínas que son modificadas mediante la unión y remoción cíclica de una sola unidad de *N*-acetilglucosamina, la cual es catalizada por las enzimas *O*-GlcNac transferasa (OGT) y *O*-GlcNAcasa, respectivamente (OGA). Esta hipótesis se fundamenta en que la fosfomanosa isomerasa (MPI) compite con PMM2 por la disponibilidad de Man-6-P para sintetizar F-6-P [5]. PMM2 utiliza aproximadamente el 2-5% de la manosa que ingresa a la célula, mientras que el 95-98% restante es catabolizada por MPI [5]. El incremento de F-6-P en pacientes PMM2-CDG causado por el impedimento en el uso de M-6-P, causaría un incremento en el flujo metabólico de F-6-P hacia la ruta biosintética de las hexosaminas hasta convertirse en UDP-GlcNAc, el sustrato donador en la *O*-GlcNAcilación [6]. Lo anterior, resultaría en alteraciones relevantes en la actividad de múltiples proteínas que son reguladas por esta modificación postraduccional.

En este proyecto se evaluó lo antes señalado mediante Western Blot de muestras proteicas obtenidas a partir de lisados celulares totales de fibroblastos, obtenidos tanto de pacientes con PMM2-CDG como de controles sanos, en los que se identificaron los cambios en la O-GlcNAcilación de proteínas. Así como también, se evaluó por PCR punto final el nivel de ARN mensajero de OGT y OGA, el cual se extrajo a partir de cultivo celular primario de fibroblastos control y fibroblastos PMM2-CDG. Es importante mencionar que los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron las muestras son los primeros diagnósticos de PMM2-CDG reportados en México, y fueron identificados en nuestro laboratorio [7,8].

3.0 ANTECEDENTES

3.1 Glicosilación

La glicosilación es un tipo de modificación co- y postraducciona que consiste en la unión covalente de carbohidratos a proteínas, lípidos, ARN u otros glicanos, formando así glicoconjugados. Este proceso ocurre principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi en eucariotas; aunque también puede haber glicosilación de proteínas en núcleo y citoplasma, tal es el caso de la O-GlcNAcificación. Para que el proceso de glicosilación ocurra, es necesaria la actividad de enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas, así como la disponibilidad de sus sustratos donadores; sin embargo, también se requiere la participación de transportadores de glicosilnucleótidos y proteínas que mantienen la homeostasis en el aparato de Golgi y en el RE [9].

Antes de ser transferidos a la molécula aceptora, los monosacáridos son activados en forma de donadores altamente energéticos. Los monosacáridos activados se encuentran en forma de glicosilnucleótidos y también pueden encontrarse acoplados a lípidos. Los glicosilnucleótidos son internalizados desde el citoplasma al lumen del RE o Golgi a través de distintos transportadores de glicosilnucleótidos que son específicos para cada tipo de monosacárido. Los transportadores funcionan mediante un sistema antiportador independiente de energía, en el cual el glicosilnucleótido entra al organelo al mismo tiempo que un nucleótido monofosfato sale [10]. En el lumen, la adición y remoción de los monosacáridos es catalizada por las enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas, respectivamente [9].

Existen diferentes tipos de glicosilación que se clasifican dependiendo del tipo de enlace que se forma entre la molécula aceptora y el primer monosacárido añadido. Esto, en la mayoría de los casos, determina la naturaleza de las unidades de carbohidratos que posteriormente serán formadas por la maquinaria enzimática celular; lo que a su vez influye en la actividad biológica de la proteína [11]. Se han descrito al menos 31 tipos de enlaces glicosídicos diferentes que se distribuyen entre las glicoproteínas que se encuentran en todos los organismos vivos, desde eubacterias hasta eucariotas. Sin embargo, las rutas más descritas en humanos son

la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación. La unión covalente entre una proteína y un carbohidrato a través del grupo amino de un residuo de asparagina (Asn) resulta en la formación de un enlace *N*-glicosídico, a este tipo de modificación se le denomina *N*-Glicosilación. Cuando el monosacárido añadido se une covalentemente al grupo hidroxilo de un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr), se forma un enlace *O*-glicosídico; esto se conoce como *O*-Glicosilación [12].

3.2 *N*-Glicosilación

La *N*-glicosilación es un proceso conservado a través de la evolución, el cual involucra diversas glicosiltransferasas que transfieren monosacáridos específicos desde un donador altamente energético a una proteína en residuos específicos de asparagina (Asn) [11,13]. La *N*-glicosilación inicia en la cara citosólica del RE con la síntesis del oligosacárido precursor ligado a lípido (LLO, por sus ingles "*lipid linked oligosaccharide*"), y continúa con la maduración del *N*-glicano en el aparato de Golgi [13]. El primer paso consiste en la transferencia de GlcNAc-1-P desde el UDP-GlcNAc al Dol-P (el Dol-P es un lípido poli isoprenoide que funciona como un glicosilacarreador en la membrana del RE). Subsecuentemente, se transfieren una GlcNAc y cinco Man (una a una) desde UDP-GlcNAc y GDP-Man, respectivamente. El Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol formado en la cara citoplasmática del RE es translocado al lumen; donde cuatro manosas y cinco glucosas son transferidas desde el Dol-P-Man y Dol-P-Glc, respectivamente [14]. La GDP-Man y el Dol-P-Man utilizados en la síntesis del LLO derivan de la Man-1-P formada por la catálisis de la enzima fosfomanomutasa 2 (PMM2). El Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol formado es transferido en bloque a una proteína aceptora por el complejo oligosacariltransferasa (OST). El complejo OST adiciona el oligosacárido precursor de *N*-glicanos en secuencias específicas Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina debido al impedimento estérico ocasionado por su estructura) [13,14]. La biosíntesis del LLO se ilustra en la Figura 1.

Cerca del 70% de las proteínas en eucariotas contienen la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, y el ~70% de estas secuencias están sujetas a *N*-glicosilación. Los *N*-glicanos están implicados en varios procesos biológicos ya que, definen

propiedades de las glicoproteínas; como su plegamiento conformación, estabilidad, solubilidad y orientación a sitios subcelulares y extracelulares; así como las interacciones célula-matriz, interacciones célula-célula y propiedades antigénicas [13,14]. Cabe resaltar que la manosa es uno de los principales componentes monosacáridicos de los *N*-glicanos; por lo que el suministro de este monosacárido en forma de Man-6-P, Man-1-P, GDP-Man y Dol-P-Man es importante para la formación del oligosacárido precursor en la *N*-glicosilación. La Man-6-P puede ser producida mediante la fosforilación directa de manosa por una hexocinasa, o mediante la conversión de fructosa-6-fosfato (F-6-P) a Man-6-P catalizada por la enzima fosfomanosa isomerasa (MPI). Posteriormente, la enzima PMM2 convierte la Man-6-P en Man-1-P; el cual es utilizado para sintetizar GDP-Man y este, a su vez, se usa para sintetizar Dol-P-Man. No obstante, la deficiencia de PMM2 compromete la disponibilidad de los intermediarios GDP-Man y Dol-P-Man, causando defectos en la biosíntesis del LLO necesario para la *N*-glicosilación [15].

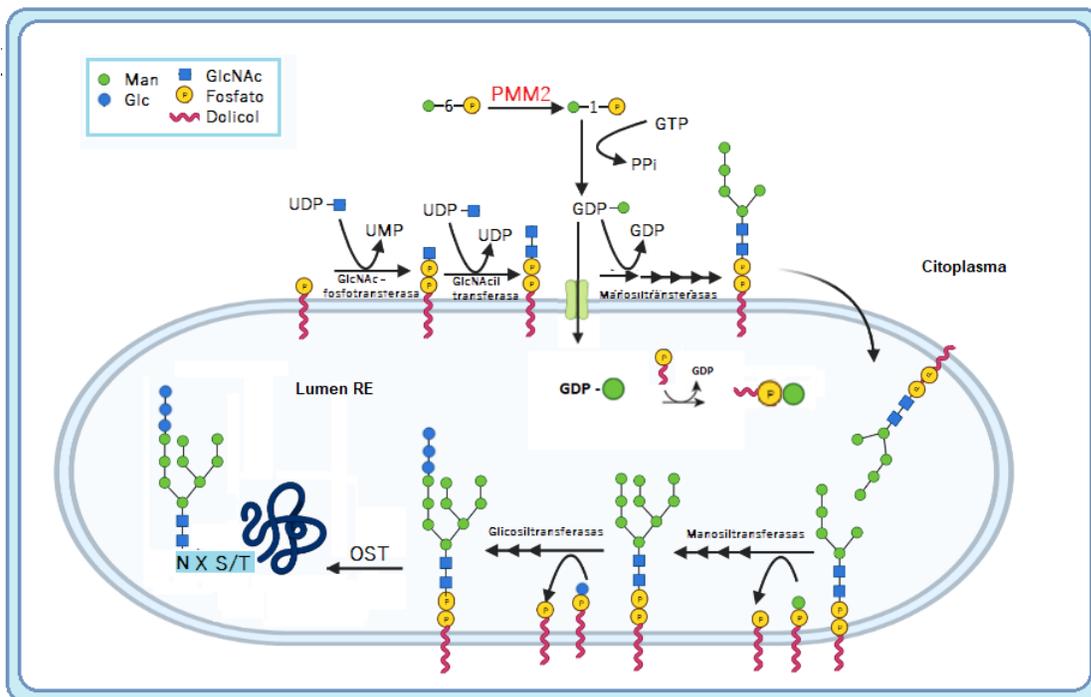


Figura 1. Biosíntesis del oligosacárido precursor de *N*-glicanos ligado a dolicol. La síntesis inicia en la cara citoplasmática del RE con la unión de una GlcNAc-P al dolicol fosfato, y la subsecuente adición de GlcNAc y cinco manosas. La adición de monosacáridos es catalizada por glicosiltransferasas específicas, utilizando UDP-GlcNAc y GDP-Man como donadores. Posteriormente, el oligosacárido es internalizado al lumen de ER y se adicionan cuatro manosas y tres glucosas extras desde Dol-P-Man y Dol-P-Glc, respectivamente. Finalmente, el complejo OST transfiere el oligosacárido precursor a secuencias Asn-X-Ser/Thr. La acción de PMM2 es importante para la disponibilidad de GDP-Man y Dol-P-Man. www.Biorender.com

Una vez sintetizado el $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$, se verifica el correcto plegamiento de la glicoproteína y se inicia su procesamiento en RE y Golgi como se muestra en la figura 2. El *N*-glicano puede ser modificado mediante la remoción de monosacáridos en cis-Golgi, la elongación de ramificaciones iniciadas con GlcNAc en medial-Golgi, y la adición de residuos terminales de galactosa y ácido sialico en trans-Golgi para formar *N*-Glicanos maduros [13].

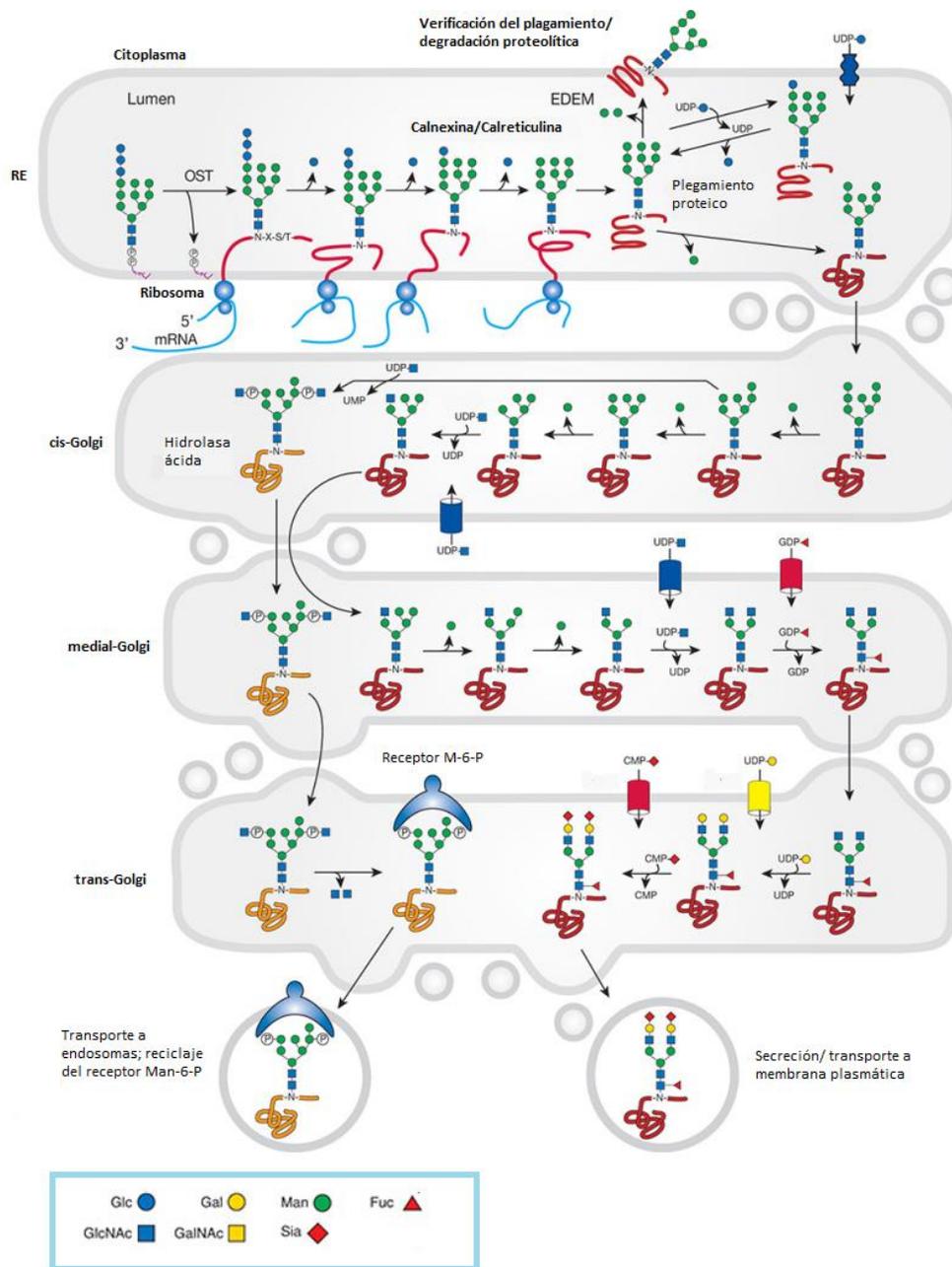


Figura 2. Procesamiento y maduración de N-Glicanos. Después de la transferencia de Glc3Man9GlcNAc2 a la proteína. El precursor N-glicano es modificado en ER y en los diferentes compartimentos del aparato de Golgi mediante la adición y remoción de monosacáridos al “core”, la elongación de los residuos de GlcNAc ramificados y la adición de Fuc y residuos terminales de Gal y Sia (que son característicos de N-glicanos maduros). Modificada de Stanley et al. 2017.

Los *N*-glicanos comparten una estructura *core* en común, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$, y se clasifican en tres tipos que difieren en sus ramificaciones, tal como se ilustra en la figura 3. Las oligomanosas, u oligosacáridos altos en manosa, suelen tener de dos a seis residuos de manosa adicionales unidos al *core* pentasacárido. Las estructuras de tipo complejo tienen "antenas" iniciadas por GlcNAc que se extienden mediante la adición de monosacáridos extra. Los *N*-glicanos híbridos tienen características tanto de oligosacáridos altos en Man como de oligosacáridos de tipo complejo [13].

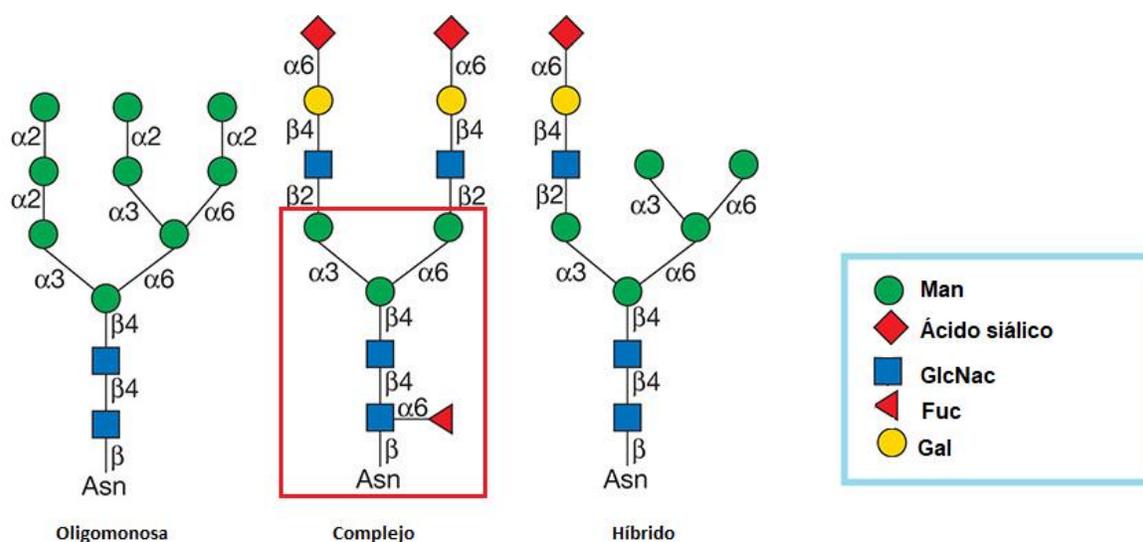


Figura 3. Tipos de N-Glicanos. Los *N*-glicanos se clasifican tres tipos principales: altos en manosa, complejos e híbridos. Estos comparten una estructura *core*, señalada en rojo, pero difieren en sus ramificaciones. La unión de un monosacárido a otro se da a través del grupo hidroxilo del carbono anomérico, generando enlaces α o enlaces β. Modificada de Stanley et al. 2017.

3.3 O-Glicosilación

A diferencia de la *N*-glicosilación, en la *O*-glicosilación no hay síntesis de un oligosacárido precursor ni de intermediarios lipídicos. Los enlaces *O*-glicosídicos se forman entre el carbohidrato y el grupo hidroxilo de una Ser, Thr, Tyr, hidroxiprolina

o hidroxilisina. La O-glicosilación no se limita a un solo tipo de monosacárido para iniciar las cadenas oligosacaridas, como ocurre en la N-glicosilación (que siempre inicia con la adición de GlcNac), ya que los O-glicanos pueden comenzar con residuos de Man, GalNAc, GlcNac, Xyl o Fuc [12]. No obstante, para el desarrollo de este trabajo solo se describe la O-GlcNAcilación.

3.4 O-GlcNAcilación

La O-GlcNAcilación es una modificación postraduccionaI dinámica que consiste en la unión O-glicosídica de una β -N-acetilglucosamina (GlcNac) a residuos específicos de Ser o Thr, como se ilustra en la figura 4 [16]. La modificación de proteínas con O-GlcNac difiere de otros tipos de glicosilación en varios aspectos ya que ocurre en el citoplasma, núcleo y en las mitocondrias, y no se ha descrito en membrana plasmática; además, no hay elongación ni formación de glicanos complejos [17]. No hay una secuencia consenso que determine los sitios de O-GlcNAcilación, sin embargo, se ha observado que ocurre en regiones intrínsecamente desordenadas de las proteínas, donde los sitios O-GlcNAcilados se encuentran flanqueados por residuos de prolina y valina [17,18]. Se estima que alrededor de un 10-20% de las proteínas están O-GlcNaciladas [17]. Sin embargo, la identificación de sitios con O-GlcNac ha resultado complicada y solo se han identificado alrededor de 1000 proteínas en la célula que son modificadas por este carbohidrato. Entre estas se incluyen proteínas del citoesqueleto, proteínas de poros nucleares, ARN polimerasa II (ARN Pol II), factores de transcripción, productos protooncogénicos, supresores de tumores, receptores hormonales, fosfatasas y cinasas. Por lo tanto, la O-GlcNAcilación está implicada en una gran variedad de procesos biológicos que van desde regulación de la transcripción, regulación epigenética, cascadas de señalización, regulación del ciclo celular, desarrollo neuronal y desarrollo embrionario; por mencionar algunos [19].

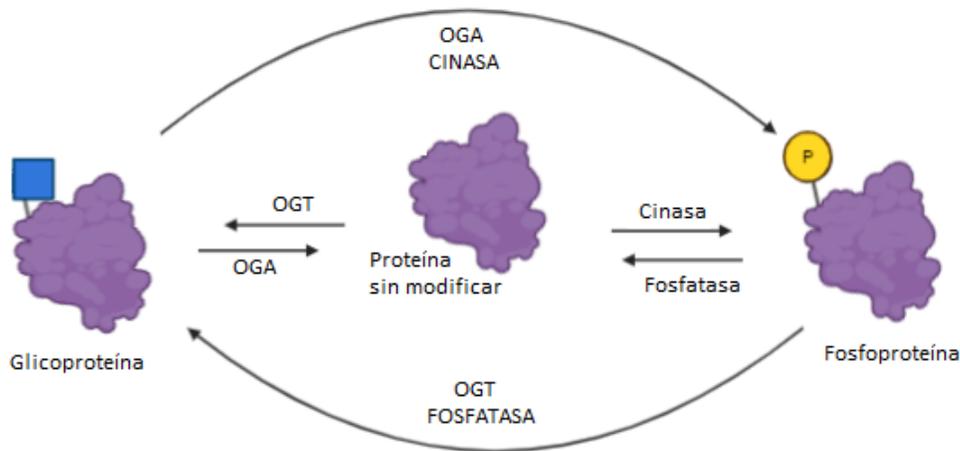


Figura 4. La O-GlcNAcilación es una modificación postraduccional dinámica que consiste en la unión covalente de GlcNAc a residuos de Ser o Thr en regiones intrínsecamente desordenadas de las proteínas en núcleo, citoplasma y mitocondrias. La adición y remoción cíclica de O-GlcNAc es catalizada por las enzimas OGT y OGA, respectivamente. www.Biorender.com

3.4.1 Ruta biosintética de las hexosaminas

El sustrato donador en la O-GlcNacilación es el UDP-GlcNAc, siendo este el producto final de la ruta biosintética de las hexosaminas (HBP, por sus siglas en inglés "*hexosamine biosynthetic pathway*"). La HBP utiliza del 2-5% de la ingesta de glucosa; e integra moléculas derivadas de otras rutas metabólicas celulares como carbohidratos, aminoácidos (glutamina), lípidos (Acetil-Coenzima A, Ac-CoA) y nucleótidos (uridina) para sintetizar UDP-GlcNAc, por lo que es considerada como un sensor metabólico [5, 20]. Los primeros dos pasos de la HPB están compartidos con la glucólisis, y divergen en la fructuosa-6-fosfato (F-6-P). La F-6-P y el glutamato que entran a la HBP son convertidos en glucosamina-6-fosfato por acción de la enzima F-6-P amidotransferasa (GFAT), siendo este el paso limitante de la ruta. La F-6-P utilizada en este paso también se puede obtener a partir de la manosa la que es ingerida. La Man es fosforilada por enzimas cinasas para producir Man-6-P, este último puede ser catabolizado por MPI para producir F-6-P o por PMM2 para formar Man-1-P. La MPI compite con PMM2 por la disponibilidad de Man-6-P para sintetizar F-6-P [5]. PMM2 utiliza aproximadamente el 2-5% de la Man que ingresa a la célula,

mientras que el 95-98% restante es catabolizada por MPI [16]. En el paso siguiente, la glucosamina-6-fosfato y el Ac-CoA son catalizados por la enzima glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa para formar *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-P). Posteriormente, GlcNAc-6-P es isomerizado a GlcNAc-1-P por la GlcNAc fosfomutasa (PGM3). Finalmente, la enzima UDP-GlcNAc pirofosforilasa (UAP1) utiliza UTP y GlcNAc-1P para sintetizar UDP-GlcNAc y que este sea utilizado por la OGT [22], como se muestra en la imagen 5.

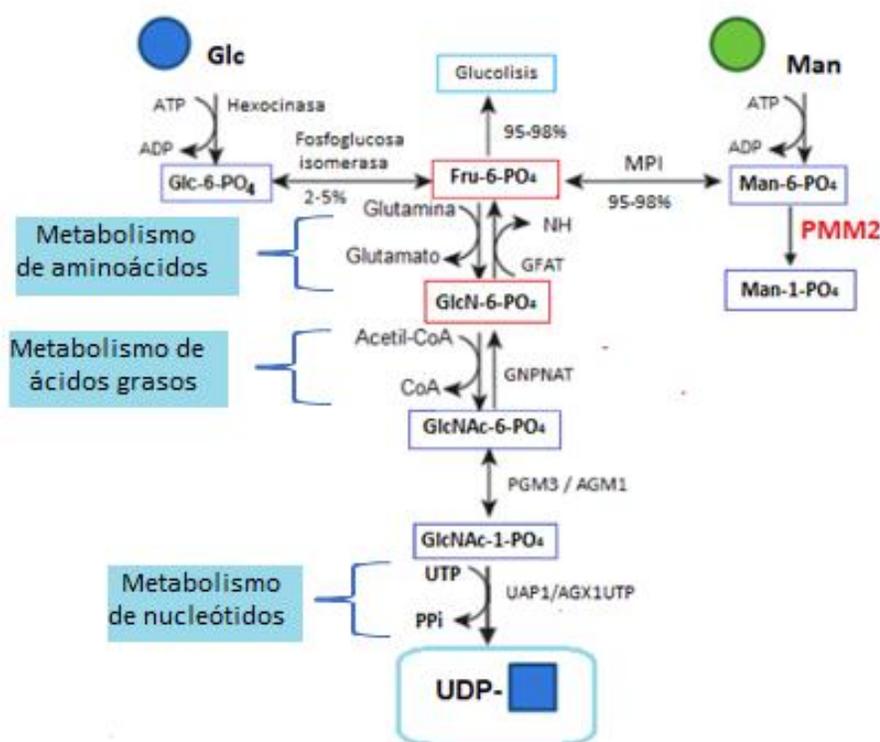


Figura 5. Ruta biosintética de las hexosaminas. La UDP-GlcNAc es el producto final de la ruta biosintética de las hexosaminas. Esta ruta comparte los primeros dos pasos con la glucólisis, y ambas divergen luego de la formación de F-6-P. Únicamente el 2-5% de la F-6-P es destinada a la HBP, pero también se puede obtener F-6-P a partir de Man-6-P (utilizando el 95-98% de la Man que ingresa a la célula). La Fru-6-P se transforma en GlcN-6-P en el paso limitante de la HBP para formar UDP-GlcNAc, el cuál es utilizado en la O-GlcNAcilación, O-glicosilación y N-Glicosilación. www.BioRender.com

La cantidad de UDP-GlcNAc intracelular y el flujo metabólico de HBP se encuentran modulados por los cambios en la concentración de nutrientes. Se ha caracterizado

como los cambios en el flujo a través de la HBP (por una mayor disponibilidad de metabolitos) inducen un incremento de O-GlcNAcilación de proteínas totales debido a un aumento en la síntesis de UDP-GlcNAc en tejido cardiaco murino (Fig. 6), según un estudio publicado por Olson et al. (2019) [23]. Ellos hicieron perfusiones en corazones de ratón con diferentes concentraciones de [U-¹³C₆] glucosamina (1,10,50 y 100 μM) y midieron la concentración de metabolitos que participan tanto en la HBP como en la glucólisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, además comprobaron el incremento en el nivel total de O-GlcNAc por western blot.

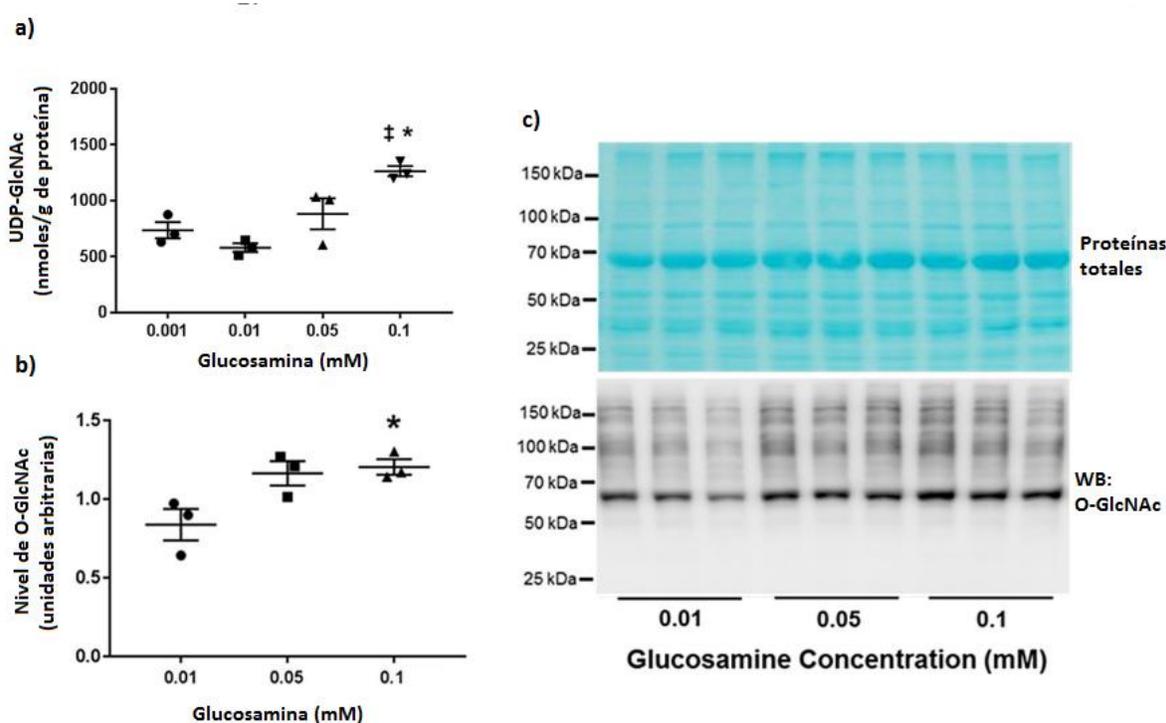


Figura 6. Incremento de la O-GlcNAcilación por aumento en el flujo metabólico a través de la HBP. La alimentación de la ruta biosintética de las hexosaminas con glucosamina resulta en un incremento de la síntesis de UDP-GlcNAc y de la O-GlcNAcilación de proteínas (**b y c**). La concentración de UDP-GlcNAc se midió por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tejido cardiaco murino suplementado con 1,10,50 y 100 μM de glucosamina (**a**); y se analizó el nivel relativo de O-GlcNAc por WB (**b y c**). Modificada de Olson et al.2019

Se han identificado mutaciones en genes que participan en la síntesis de intermediarios en la ruta biosintética de las hexosaminas, descritos en la tabla 1. Como consecuencia de estas mutaciones, las perturbaciones en la HBP también alteran la O-GlcNAcilación de proteínas y el neurodesarrollo [24-29].

Tabla 1. Genes asociados con defectos en la O-GlcNAcilación de proteínas.

Proteína	Simbolo	Función	Afectaciones	Referencia
O-GlcNAc transferasa	OGT	Transfiere GlcNAc desde UDP-GlcNAc al grupo OH de un residuo de Ser/Thr	OGT-CDG, discapacidad intelectual y retraso en el desarrollo	(Pravata et al. 2020)
O-GlcNAcasa	OGA	Elimina O-GlcNAc de las proteínas modificadas		(Muha et al. 2020)
Fructosa-6-fosfato-amidotransferasa	GFAT	Transfiere un grupo amino de la glutamina a la fructosa-6-fosfato para producir glucosamina-6-fosfato	Síndromes miasténicos congénitos, un grupo de afecciones debidas a defectos en la transducción de señales de las células nerviosas a los músculos.	(Senderek et al. 2011)
Glucosamina-6-fosfato-amonitransferasa 1	GNA1	Convierte glucosamina-6-fosfato en GlcNAc-6-fosfato	Defectos en la biosíntesis de UDPGlcNAc, modificación de O-GlcNAc y proliferación celular	(Boehmetl et al. 2000)
Fosfoglucomutasa 3	PGM3	Convierte GlcNAc-6-fosfato en GlcNAc-1-fosfato	Disminución de los niveles de UDP-GlcNAc citoplásmica, alteración de la O-GlcNAcilación de la proteína y finalmente bloqueo del desarrollo mesodérmico.	(Mariappa et al. 2011)
UDP-Nacetilhexosamina pirofosforilasa	UAP1	Utiliza GlcNAc-1-fosfato y UTP como sustratos para la síntesis de UDP-GlcNAc y pirofosfato	Anomalías craneales y esqueléticas y discapacidad intelectual	(Chen et al. 2021)

3.4.2 OGT y OGA

Las enzimas que modulan la adición y remoción cíclica de O-GlcNAc son la O-GlcNAc transferasa (OGT), que cataliza la transferencia de GlcNAc; y la O-GlcNAcasa (OGA), que cataliza la hidrólisis de O-GlcNAc. Se han caracterizado tres isoformas de OGT (Figura 7a): la OGT núcleo-citoplásmica (ncOGT), la OGT

mitocondrial (mOGT) y la OGT corta (OGT-S). Todas las isoformas de OGT tienen un dominio C-terminal con dos regiones catalíticas, pero se distinguen entre sí por sus dominios N-terminales que contienen un número variable de repeticiones tetratricopéptido (TPR). Cada unidad TPR contiene una secuencia de 34 aminoácidos, los cuales funcionan como un dominio de interacción proteína-proteína y median las interacciones de la enzima con sus sustratos. La isoforma ncOGT humana (~ 110 kDa) contiene 13 TPR, mientras que mOGT (~ 103 kDa) y OGT-S (~ 75 kDa) contienen 9 y 3 TPR, respectivamente [30]. Se han identificado dos isoformas de OGA generadas por *splicing* alternativo (Figura 7b): OGA larga (OGA-L), en núcleo y citosol; y OGA corta, en gotas lipídicas (OGA-S). La OGA-L (~130 kDa) contiene un dominio N-acetil- β -D-glucosamindasa N-terminal y, dentro de su dominio C terminal, una región que comparte homología de secuencia con las enzimas acetiltransferasa (dominio pseudo-HAT). La isoforma OGA-S (~75kDa) carece del dominio de pseudo-HAT debido a un evento de *splicing* del intrón 10, pero tiene una secuencia única de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal [30].

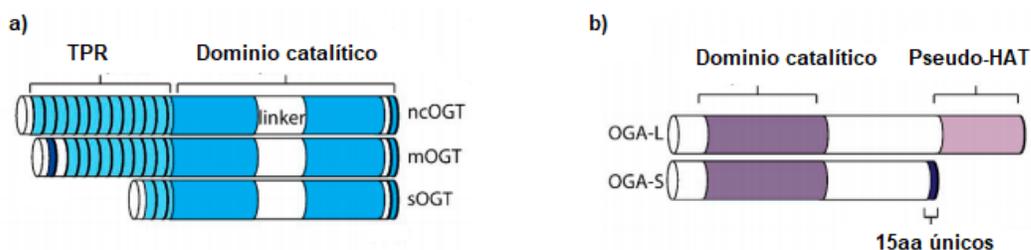


Figura 7. Topología de OGT y OGA. La estructura de OGT (a) consta de un dominio C-terminal con dos regiones catalíticas y dominios repetidos tipo TPR N-terminales que son importantes para el reconocimiento del sustrato y, además, varían en cuanto a secuencia y número de repeticiones entre una isoforma y otra. Las isoformas de OGA (b) tienen un dominio catalítico con actividad N-acetil- β -D-glucosamindasa N-terminal y un dominio C terminal con un dominio pseudo-HAT (en el caso de OGA-L) o una extensión de 15aa (OGA-S). Modificado de Bond et al. 2015.

Diversos estudios han demostrado que la expresión de OGT y OGA se modifica en respuesta a las fluctuaciones en los niveles celulares de O-GlcNAc. Debido a esto,

ambas enzimas están catalogadas como sensores nutricionales. Las alteraciones en el nivel de O-GlcNAc intracelular son consecuencia de distintos factores como lo son: el estado nutricional de la célula, estrés ambiental, cambios en el flujo metabólico a través de la ruta de las hexosaminas, una actividad enzimática reducida de OGT y OGA o defectos en genes que participan en la síntesis de precursores de UDP-GlcNAc [31].

Un ejemplo de cómo la célula modula la expresión de OGT y OGA cuando el nivel de O-GlcNAc se altera se muestra en los estudios de Lin et al. (2021). En dicho trabajo se cultivaron células de adenocarcinoma de pulmón humano (CL1-5 o A549) y se evaluó el comportamiento de OGT y OGA cuando aumenta y cuando disminuye el nivel de O-GlcNAc. En el primer caso, las células se trataron con TMG (un inhibidor de OGA) o glucosamina (GlcN) para elevar la O-GlcNAcilación; este tratamiento dio como resultado un aumento de OGA y una disminución de la proteína OGT (Figura 8a y 8b). No obstante, el nivel de ARNm no presentó un cambio significativo en OGT, pero hubo un aumento en el nivel de ARNm de OGA (Figura 8c). En el segundo caso, las células se trataron con 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), un inhibidor de la enzima GFAT, para bloquear el flujo a través de la HBP y disminuir los niveles intracelulares de UDP-GlcNAc. Esto condujo a una regulación positiva de OGT y una disminución de OGA, que se ve reflejado tanto en el nivel de ARNm como en el nivel proteína [31]. Otros autores han obtenido resultados similares en una variedad de líneas celulares, incluidas las de cáncer de cuello uterino, neuroblastoma, leucemia, cáncer de colon y fibroblastos embrionarios [32-35]. Lo anterior indica que las células son sensibles a los cambios en los niveles de O-GlcNAc, y que las alteraciones por tiempos prolongados harán que la expresión proteica de OGT y OGA cambie en un esfuerzo por restaurar la homeostasis de O-GlcNAc, sin embargo, los mecanismos para coordinar la expresión de OGT y OGA siguen sin conocerse a detalle. Algunos estudios sugieren una regulación a nivel traduccional. Se piensa que el factor 4E-BP1 (el cual está O-GlcNAcificado) regula de manera negativa la transcripción de OGT impidiendo la unión de la subunidad ribosomal 40s en un estado de hiper O-GlcNAcilación [31,36]. Otros estudios muestran de una regulación negativa de la transcripción de los genes

que codifican para OGT y OGA, modulada por el factor transcripcional E2F1 y Rb1 [37].

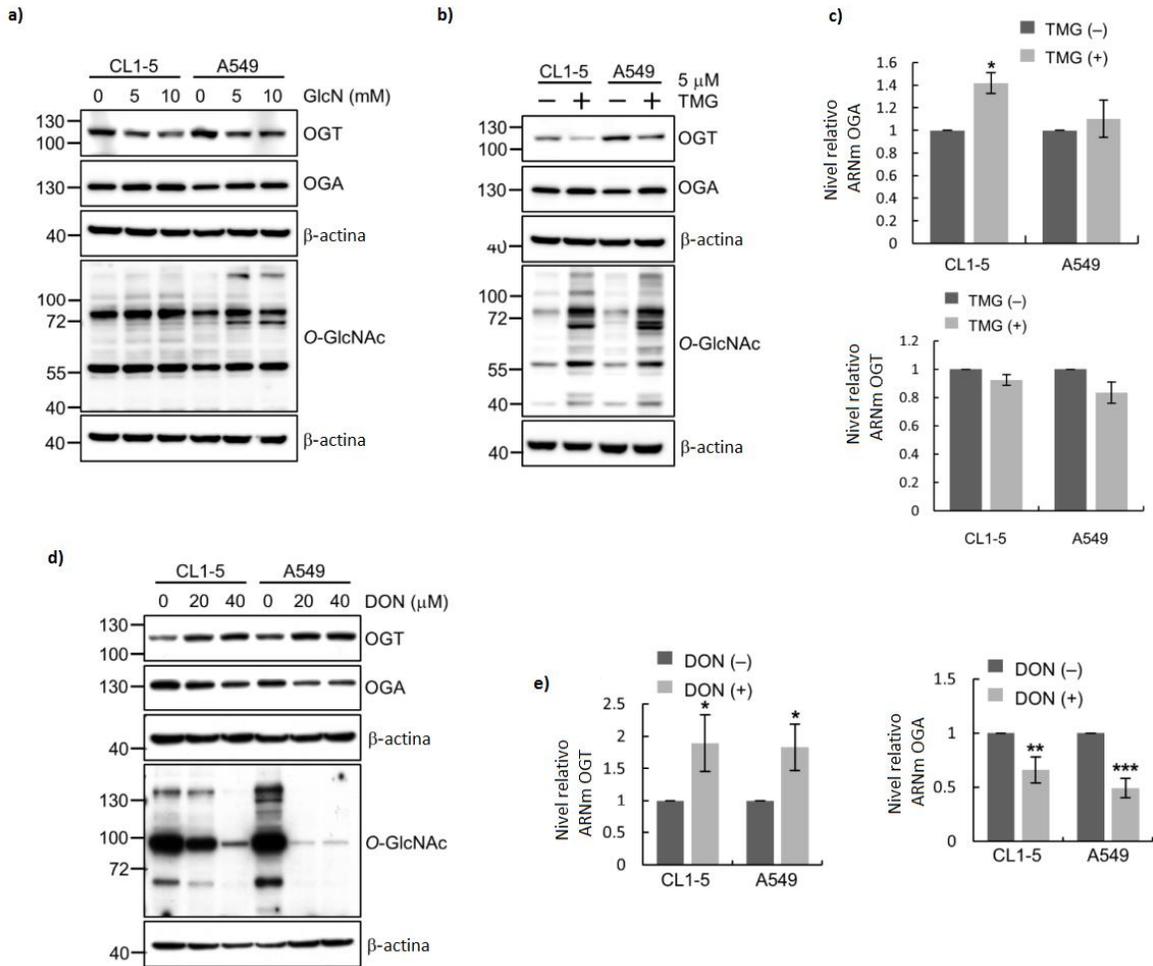


Figura 8. La expresión de OGT y OGA se modifica en respuesta a las fluctuaciones en el nivel de O-GlcNAc intracelular. WB revelado contra O-GlcNAc, OGT y OGA de lisados celulares CL1-5 y A549 suplementado con GlcN o TMG para aumentar el nivel de O-GlcNAc (**a** y **b**), en respuesta a este cambio la proteína OGT disminuye y OGA aumenta. Los resultados luego de incubar con TMG de qPCR (**c**) muestran un aumento en el nivel de ARNm de OGA, pero no hay cambio significativo en OGT. Cuando las células son con DON para reducir la O-GlcNAcilación (**d**) se observa un incremento de OGT y una disminución de OGA, esto mismo se observa en el nivel de ARNm de ambas enzimas (**e**). Modificado de Lin et al (2021).

Además de los cambios en la expresión de OGT y OGA, la afinidad de la OGT por el UDP-GlcNAc exhibe distintas constantes de unión bajo diferentes

concentraciones de UDP-GlcNAc. De modo que, los niveles variables de UDP-GlcNAc también influyen en la incorporación de O-GlcNAc en sustratos específicos. Esto sugiere que las fluctuaciones en las concentraciones globales de UDP-GlcNAc dentro de la célula altera la especificidad del sustrato de OGT [5].

3.4.3 O-GlcNAcilación y Fosforilación

Se ha visto que la O-GlcNAcilación compite con la fosforilación por los sitios en el sustrato. Muchas proteínas se modifican recíprocamente en diferentes condiciones en el mismo sitio mediante la adición de O-GlcNAc o fosfato, algunos ejemplos son la proteína oncogénica c-Myc [38], receptor de estrógeno β [39], algunos sitios en la ARN polimerasa II [40], óxido nítrico sintasa endotelial [41], por mencionar algunas. Otras proteínas son competitivamente modificadas por O-GlcNAc o fosfato en sitios proximales o distales, pero no en el mismo residuo, de tal modo que ambos tipos de modificación pueden influir en la función, la estabilidad, la localización, la actividad enzimática e interacciones de las proteínas blanco [42]. Existe además una regulación cruzada entre ambas vías, puesto que OGT y OGA se encuentran a menudo en complejos de proteínas que contienen tanto cinasas como fosfatasas, lo que indica que el mismo complejo enzimático puede eliminar el fosfato y agregar un residuo O-GlcNAc en algunas proteínas [43,44]. Además, OGT es activada al ser fosforilada por el receptor de insulina, CAMKIV, lo que puede desempeñar un papel en la interacción de la OGT con los sustratos [42].

3.5 Desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG)

Tanto la N- como la O-glicosilación (incluida la O-GlcNAcilación) están reguladas por distintos factores para la correcta síntesis de glicoconjugados. Estos factores incluyen la disponibilidad de sustrato, la actividad enzimática, los niveles de transcripción de genes, la ubicación de las enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas dentro de RE y Golgi, y la homeostasis dentro de estos organelos. Las mutaciones en genes cuyos productos participan en las vías de glicosilación son la causa de enfermedades raras denominadas trastornos congénitos de la glicosilación (CDG) [45].

Los CDG son un grupo de síndromes, clínica y genéticamente heterogéneos, causados por defectos en la biosíntesis y metabolismo de glicanos, que resultan en la formación de estructuras de glicanos aberrantes. Estos defectos derivan de mutaciones en genes implicados en glicosilación [46]. La mayoría de los CDG son enfermedades monogénicas que presentan un patrón de herencia autosómica recesiva, aunque también se han descrito trastornos que siguen un patrón de herencia autosómica dominante y ligada al cromosoma X [47]. Las personas afectadas con algún tipo de CDG presentan manifestaciones multisistémicas que varían entre un paciente y otro, incluso si el gen afectado es el mismo. Algunos de los signos y síntomas más representativos incluyen retraso en el desarrollo, hipotonía, anomalías neurológicas, hepatopatía, y coagulopatías. Las personas afectadas también pueden presentar enfermedades oculares, cutáneas, cardíacas y dismorfismos faciales [46,47].

Los CDG pueden estar relacionados con defectos en la *N*-glicosilación de proteínas, en la *O*-glicosilación de proteínas, en la glicosilación de lípidos o en la biosíntesis de anclas de GPI, o pueden afectar a más de una vía de glicosilación [46]. Esta familia de enfermedades metabólicas sigue creciendo rápidamente, ya que aproximadamente el 17% de los 137 tipos de CDG que han sido descubiertos hasta la fecha fueron reportados en los últimos tres años [47]. Y, en su mayoría, son genes que afectan la *N*-glicosilación [45].

Los CDG que afectan la *N*-glicosilación se clasifican en dos categorías: CDG-I y CDG-II. Los CDG-I son causados por defectos en la biosíntesis y transferencia del oligosacárido precursor ligado a lípido en RE; y los CDG-II son causados por defectos en la maduración de *N*-glicanos en el aparato de Golgi [48].

3.5.1 Diagnóstico de CDG

El primer paso para la detección de CDG en el de laboratorio es hacer un isoelectroenfoque (IEF) de transferrina sérica para detectar defectos en la *N*-glicosilación [49], mientras que para determinar si hay defectos en la *O*-glicosilación se hace un isoelectroenfoque de la apolipoproteína C-III [47,48]. No obstante, para identificar cual es el gen afectado se deben realizar otros análisis como: ensayos enzimáticos, mediciones de metabolitos, HPLC y espectrometría de masas [48].

El IEF es una técnica que consiste en la separación de proteínas con base en su punto isoeléctrico en un gradiente de pH. Los pacientes con CDG presentan una glicosilación anormal de proteínas séricas comunes derivadas del hígado, entre ellas la transferrina sérica (Tf) [49]. La transferrina es la principal glicoproteína de unión a hierro en el plasma sanguíneo humano. Consiste en una sola cadena polipeptídica con dos dominios de unión a hierro N-terminales y C-terminales homólogos, y dos sitios N-glicosilados en la Asn 432 y Asn 630 [51]. Por lo tanto, en una persona sana, el patrón normal de Tf-IEF muestra una prevalencia de la isoforma tetrasialilada. Por el contrario, en personas con algún tipo de CDG, se pueden detectar diferentes glicofomas de transferrina que difieren en la cantidad de ácidos siálicos terminales en sus antenas, como se observa en la figura 9. Un patrón de CDG-I es caracterizado por un aumento de di- y / o asialotransferrina; mientras que un patrón de CDG-II se caracteriza por un aumento de las formas tri-, di-, mono y / o asialotransferrina [50].

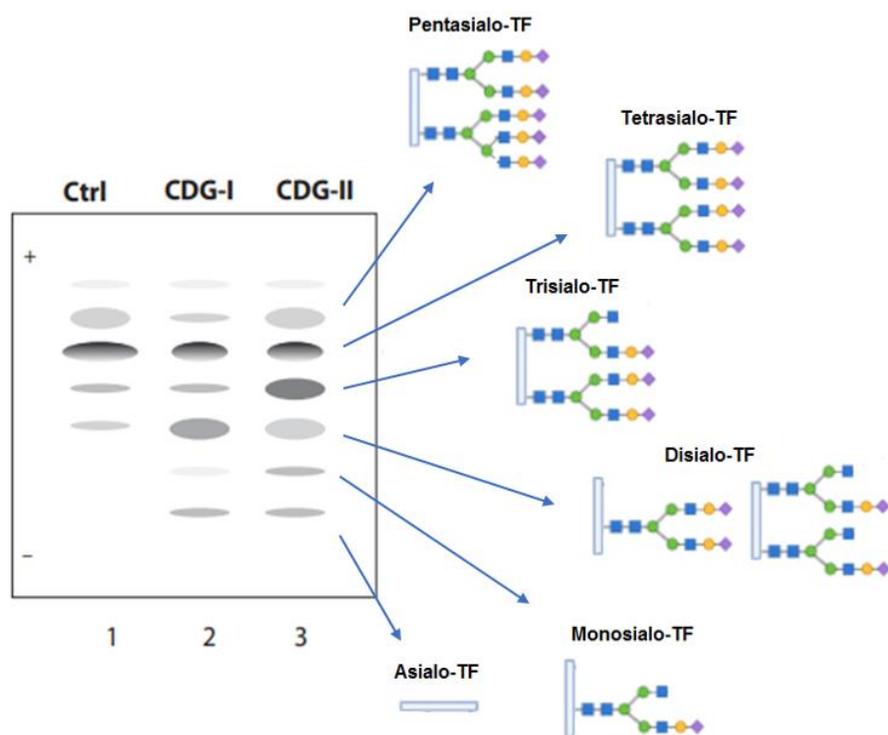


Figura 9. Enfoque isoeléctrico de transferrina. Un paciente sano presenta una prevalencia de la isoforma de transferrina tetra sialilada (cuatro ácidos siálicos). Los pacientes con CDG-I muestran un aumento de las isoformas di- y asialilada. Los pacientes con CDG-II presentan, además, un aumento de la transferrina tri- y monosialilada. Modificado de Goreta et al. 2012.

3.5.2 PMM2-CDG

El PMM2-CDG (o CDG-Ia) es un síndrome causado por mutaciones en el gen que codifica para la enzima fosfomanomutasa 2 (PMM2), el cual sigue un patrón de herencia autosómica recesiva [52]. La enzima PMM2 se encuentra codificada en el cromosoma 16p13 con un marco de lectura abierto de 738 pares de bases, cuyo producto es una proteína de 246 aminoácidos. La PMM2 cataliza la conversión de Man-6-P a Man-1-P. La Man-1-P derivada de esta reacción es utilizada para la síntesis de GDP-Man y Dol-P-Man, que son precursores para la síntesis del oligosacárido precursor ligado a lípido, necesario en la *N*-glicosilación. El LLO es transferido a la proteína receptora por acción del complejo OST, pero la OST tiene una afinidad reducida por los LLO inmaduros [42]. En consecuencia, las mutaciones en PMM2 causan defectos en la primera etapa de síntesis de *N*-glicanos que requiere de estos sustratos donadores para las manosiltransferasas [4].

Las mutaciones en el gen que codifica para PMM2 afectan las propiedades de la proteína al inducir cambios que resultan en: a) defectos de splicing; b) defectos en el plegamiento y estabilidad de la proteína; c) alteraciones en el sitio catalítico de la enzima; d) disminuyen el tiempo de vida media y evitan la formación de dímeros (PMM2 es activa cuando está en su forma dimétrica) [53]. Estos cambios afectan la actividad catalítica de la proteína en diferente medida, ya que algunas mutaciones dan como resultado proteínas sin actividad enzimática o enzimas con actividades residuales que van del 16 al 54% con respecto a proteínas *wild type* [3]. Algunas de las mutaciones más comunes reportadas en PMM2 se describen en la tabla S1 en anexos.

Los pacientes con PMM2-CDG muestran un cuadro clínico variable. Los signos y síntomas característicos incluyen retraso mental, hipoplasia cerebelosa, pezones invertidos, hipotonía, formación de depósitos de grasa en glúteos y pubis, y malformaciones en extremidades [2]. Se han reportado pacientes con PMM2-CDG de distintos orígenes étnicos, especialmente en Europa (Tabla S2 en anexos). Sin embargo, no se habían reportado casos de PMM2-CDG en México hasta junio del 2020. En el laboratorio de Glicobiología humana y diagnóstico molecular se identificaron los primeros dos pacientes con PMM2-CDG en México. Ambos pacientes presentaron signos y síntomas característicos desde su nacimiento, sin embargo, hay diferencias entre el cuadro clínico de cada uno de ellos, las cuales se especifican en la tabla 2. El diagnóstico se hizo mediante un isoelectroenfoque de transferrina sérica y, mediante secuenciación exómica, se identificaron dos mutaciones de pérdida de sentido (una en cada alelo). El primer paciente presentó un cambio c.422G > A (p.R141H) en el exón 5 del gen PMM2, heredada parentalmente (cabe mencionar que este es el tipo de mutación más común); y c.395 T > C (p.I132T) heredada maternalmente [7]. El segundo paciente presentó una mutación c.422G > A (p.R141H) heredada de manera materna, y una mutación c.178G>T (p. V60Cfs*3) en el último nucleótido del exón 2, que fue heredada de manera paterna; está última no había sido reportada en la literatura antes del trabajo de González-Domínguez et al. (2021) Por lo que aún no se caracteriza su efecto en la funcionalidad de PMM2. Se sugiere que la patogenicidad de esta variante podría anular el sitio donador de *splicing* e inducir un empalme alternativo aberrante. Ambos pacientes son importantes para el desarrollo de este proyecto, ya que se cultivaron fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel para analizar si PMM2-CDG afecta la O-GlcNAcilación [8].

Tabla 2. Cuadro clínico de los pacientes 1 y 2 (denominados P1 y P2) identificados en el laboratorio. Las celdas marcadas con “x” indican que el paciente presenta el rasgo especificado.

	P1	P2
Cariotipo	46XY	46Xy
Padres cosanguineos	No	No
Embarazo a termino normal	Si	Si
Mutaciones	c.422G > A (p.R141H) / c.395 T > C (p.I132T)	c.422G > A (p.R141H) / c.178G>T (p.V60Cfs*3)
% Actividad enzimática de PMM2	23-41%	No reportado
Cuadro clínico:		
Hipotonia	x	x
Hipoplasia cerevelosa	x	
Otras anomalias cerebelares		x
Retraso psicomotor	x	x
Problemas audivos	x	
Estrabismo	x	x
Razgos dismórficos	x	x
Pezones invertidos		
Depositos de grasa	x	
Retrasoneurológico		x
Dificultad para caminar	x	x
Problemas de lenguaje	x	x
Caries	x	
Ataxia		
Anomalías cerebrales	x	x

En este trabajo se sugiere que PMM2-CDG podría incidir en la O-GlcNacilación debido a la competencia que existe entre MPI y PMM2 por la disponibilidad de Man-6-P [54]. En condiciones normales, PMM2 cataliza aproximadamente 1.32 mU por minuto, mientras que MPI cataliza 14.6 mU por minuto. No obstante, cuando la actividad enzimática de PMM2 disminuye, los niveles de Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol bajan al 58% en comparación con controles, y la concentración de Man-6-P aumenta hasta 1.9 veces [60]. Subsecuentemente, la cantidad de Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol y Man-6-P vuelve a la normalidad después del rescate mediante la co-inyección de ARNm de PMM2. Esto último se fundamenta según los resultados obtenidos mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) en modelos de PMM2-CDG en morfolinos de embriones de pez cebra (Fig.10) [55]. Lo anterior sugiere una mayor disponibilidad de Man-6-P para

ser procesado por MPI en pacientes con PMM2-CDG. En consecuencia, nosotros teorizamos que el aumento en F-6-P causaría un incremento en el flujo metabólico de F-6-P hacia la ruta biosintética de las hexosaminas hasta convertirse en UDP-GlcNAc, con base en lo antes discutido (Figura 11) [31,49].

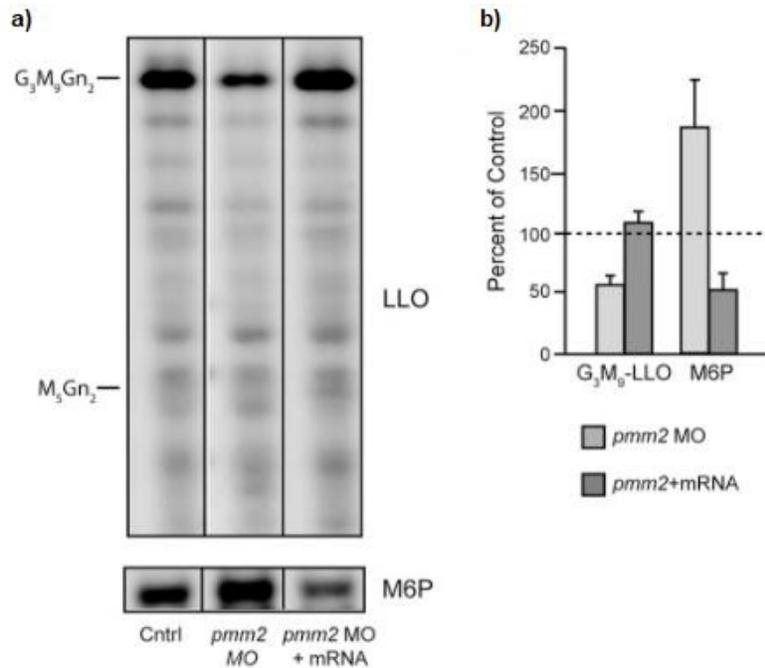


Figura 10. Los defectos en PMM2 resultan en un aumento en la concentración de Man-6-P intracelular. a) Electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) para medir los **b)** niveles de LLO y Man-6-P en modelos de PMM2-CDG en morfornos de pez cebra antes (gris claro) y después (gris) del rescate con ARNm de PMM2. Modificado de Cline et al. 2012.

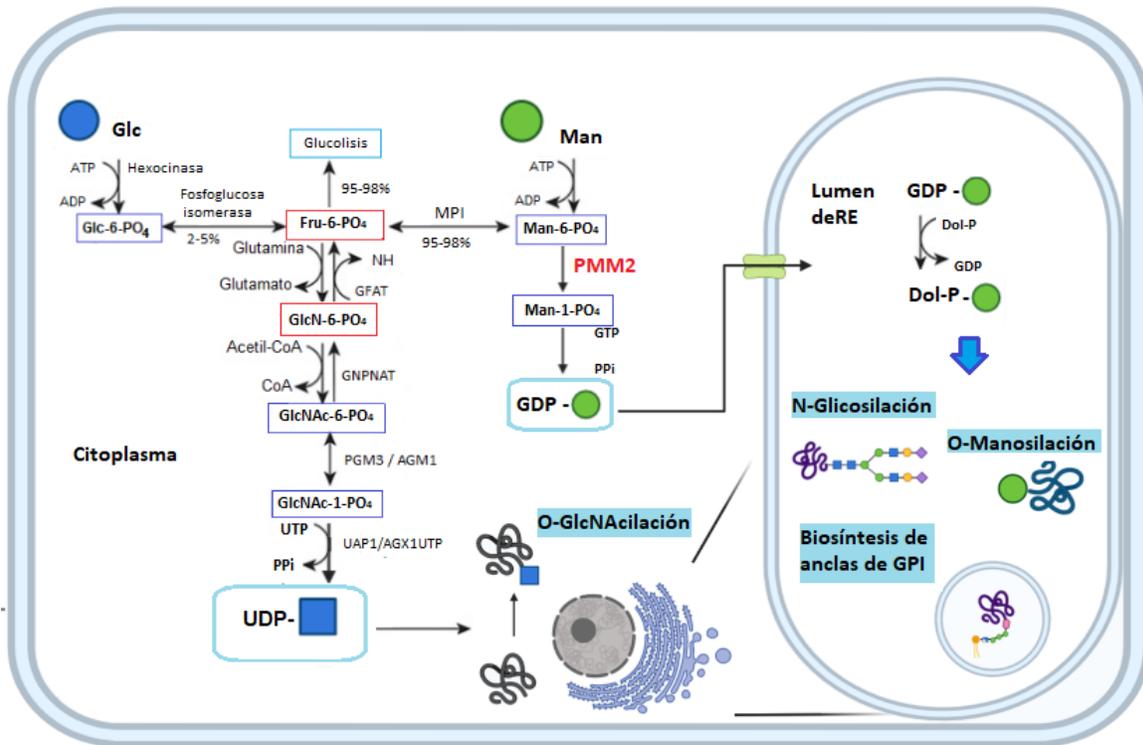


Figura 11. Relación entre rutas metabólicas. El GDP-Man y el Dol-P-Man derivados del Man-1-P generado por PMM2 a partir de Man-6-P son utilizados en la N-glicosilación, la O-manosilación y la biosíntesis de anclas de GPI. PMM2 compite con MPI por la disponibilidad de Man-6-P para convertirlo en F-6-P. La F-6-P es utilizada en la ruta biosintética de las hexosaminas para la síntesis de UDP-GlcNAc. www.BioRender.com

4.0 JUSTIFICACIÓN

Se estima que alrededor de un 10-20% de las proteínas están O-GlcNaciladas [9]. Sin embargo, la identificación de sitios con O-GlcNAc ha resultado complicada y solo se han identificado alrededor de 1000 proteínas en la célula que son modificadas por este carbohidrato. Entre estas se incluyen proteínas del citoesqueleto, proteínas de poros nucleares, ARN polimerasa II, factores de transcripción, productos protooncogénicos, supresores de tumores, receptores hormonales, fosfatasa y cinasas [19]. Por lo tanto, la O-GlcNAcilación está implicada en una gran variedad de procesos biológicos que van desde regulación de la transcripción, regulación epigenética, cascadas de señalización, regulación del ciclo celular, desarrollo neuronal y desarrollo embrionario; entre otros. Además, debido a que las tasas de flujo de la HBP son sensibles a las alteraciones en el metabolismo de cada molécula que la compone (glucosa, F-6-P, GlcNAc, acetil CoA, ATP y glutamina) la OGT y la OGA se han caracterizado como sensores de nutrientes celulares [17,22]; y un desequilibrio en la homeostasis de O-GlcNAc conlleva al desarrollo de enfermedades que incluyen cáncer, diabetes y Alzheimer [5]. Las fluctuaciones en el nivel de O-GlcNAc son consecuencia, entre otras causas, de las mutaciones en los genes que participan en la síntesis de intermediarios en la ruta biosintética de las hexosaminas. Pero debido a la interconexión de esta ruta con el metabolismo de manosa, pensamos que los defectos en PMM2 podrían incidir en la O-GlcNAcilación. Aun no hay reportes en donde se analicen los niveles de O-GlcNAc en pacientes con PMM2-CDG, razón por la cual se estudiará dicho proceso en este proyecto. Se espera que este estudio tenga contribuciones en ciencia básica y clínica, al ampliar el conocimiento que se tiene sobre el impacto de estas modificaciones que de suma importancia para regular la actividad de los sustratos modificados. Además, de permitir comprender mecanismos adicionales de la patología de estos pacientes, lo cual podría ayudar a determinar si hay tratamientos para corregir alteraciones metabólicas generados por los cambios en la O-GlcNAcilación.

5.0 HIPÓTESIS

Los fibroblastos PMM2-CDG presentan un incremento en la O-GlcNAcilación de proteínas.

6.0 OBJETIVOS

6.1 General

- Determinar si la O-GlcNAcilación en fibroblastos de pacientes con PMM2-CDG incrementa con respecto a fibroblastos control.

6.2 Particulares

1. Estandarizar las condiciones para la detección de O-GlcNac por Western Blot.
2. Analizar y comparar el perfil de O-GlcNAcilación de proteínas totales en fibroblastos de pacientes con PMM2-CDG, respecto a controles sanos; así como la expresión de las enzimas OGT y OGA.
3. Determinar si los niveles de ARN mensajero de OGT y OGA, cambian en pacientes con PMM2-CDG con respecto a controles sanos.

7.0 MATERIALES Y METODOS

7.1 Cultivo celular

Se hizo un cultivo primario de fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia de piel de pacientes (pacientes 1 y 2, denominados como P1 y P2) y controles sanos (controles 1 y 2, denominados como C1 y C2). Los fibroblastos fueron cultivados con medio AmnioMAX adicionado con 15% de suplemento (Gibco™ AmnioMAX™ C-100) y 1% de antibiótico estreptomomicina/penicilina (Invitrogen) en frascos de cultivo T-25. Los cultivos de fibroblastos se mantuvieron a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las células se mantuvieron en cultivo por aproximadamente 7 días, hasta tener la confluencia deseada. Posteriormente, fueron procesadas para la obtención de muestras proteicas y de ARN, según el caso. Cabe mencionar que los cultivos se hicieron por duplicado, de modo que se tuvieran dos experimentos independientes para cada procedimiento.

7.2 Lisis celular

Las células se lavaron con PBS para retirar desechos celulares y células muertas. Luego de retirar el PBS, se despegaron de la superficie en que crecieron tras adicionar tripsina 1X (Gibco™ by life technologies) y se incubaron por 2 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó con medio de cultivo suplementado y subsecuentemente se centrifugó a 1750 rpm, por cinco minutos, a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El botón celular obtenido se resuspendió con medio fresco suplementado para hacer subcultivo o bien para lisarse. El botón celular destinado para generar lisados se resuspendió con 150 µL de Buffer RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1.0%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, Tris-base pH=8 50nM, EDTA 1mM, inhibidor de proteasas) y la mezcla se homogeneizó en vortex durante 10 segundos. Enseguida se incubaron las muestras en hielo durante 30 minutos con una agitación de 120 rpm en el orbital (mezclado 10 segundos en vortex luego de los primeros 15 minutos). Posterior al tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se recuperó y se guardó a -80°C hasta su uso.

7.3 Cuantificación de Proteínas

Se prepararon alícuotas con diferentes concentraciones de albumina sérica bovina (1.0 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.2 mg/ml y 0.1 mg/ml respectivamente), las cuales se usaron como escalera de calibración para determinar la concentración de las muestras problema. Se tomaron 10 μ l de cada una de las diluciones seriadas de albúmina, y 10 μ l de las cada una de muestras problemas diluidas 1:5; estas se adicionaron en celdas de plástico con 790 μ l de agua miliQ más 200 μ l de Bradford. Además, se preparó una celda únicamente con 800 μ l de agua mili Q más 200 μ l de Bradford, que se usó como blanco. Las muestras se homogeneizaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante cinco minutos. Concluido el tiempo de incubación, se midió la densidad óptica de cada celda en un espectrofotómetro a 595nm. La absorbancia (eje “y”) se graficó con respecto a la concentración de albúmina (eje “x”) y se obtuvo la ecuación de la recta a partir de la cual se calculó la concentración de proteína de las muestras problema (Tabla S3 y gráfica S1 en anexos).

7.4 SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras proteicas fueron preparadas con buffer Laemmly 5x más 10% de β -mercaptoetanol y se calentaron en un termoblock a 100°C durante 5 minutos. Se cargó la cantidad correspondiente de cada muestra (45 μ g en el caso de O-GlcNAc y OGA, y 75 μ g para OGT) en un gel de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de grosor en condiciones desnaturalizantes y se resolvió aplicando una corriente eléctrica de 45 mA constantes durante una hora. Posterior a la electroforesis, el contenido del gel se transfirió a una membrana de dicloruro de polivinilideno (PVDF) (Merck Millipore Immobilon), previamente activada con metanol. La membrana y el gel se colocan juntos entre papel filtro y esponjas, cuidando que el gel quede orientado hacia el ánodo y la membrana hacia el cátodo, y se dejó transferir a 400 mA constantes durante 2 horas a 4°C. En la sección de anexos (tablas S4 y S5) se especifican los reactivos empleados durante estos procedimientos. A partir de este punto, las membranas se bloquearon e incubaron bajo distintas condiciones dependiendo del anticuerpo utilizado.

7.4.1 Bloqueo e Incubación con anticuerpos (O-GlcNAc)

La membrana se bloqueó durante dos horas a temperatura ambiente con 30 ml de TBS 1x más 5% de leche en polvo Svelty® baja en grasa a 60 rpm. Posteriormente, se hicieron dos lavados de quince minutos con 40 mL de TBS-T al 0.3 %. Al finalizar los lavados, la membrana se incubó durante dieciséis horas con una disolución 1:1000 del anticuerpo primario O-GlcNAc, clona CTD110.6 (Santacruz Biotechnology) en TBS-T 0.2% más leche 0.3% a 4°C, en roscicero. Concluido el tiempo de incubación, la membrana se lavó dos veces a temperatura ambiente con 40 ml de TBS-T al 0.3% a 80 rpm, durante 15 minutos cada lavado. A continuación, se incubó por dos horas a temperatura ambiente con una dilución 1:40,000 del anticuerpo secundario IgM-HRP, clona A90-101P (Bethyl Laboratories) en de TBS-T 0.2% más 0.3% de leche. Finalmente, se hicieron seis lavados de 15 minutos cada uno con TBS-T al 0.3% a 100 rpm.

7.4.2 Bloqueo e Incubación con anticuerpos (OGA)

La membrana se bloqueó durante una hora con PBS-T al 0.1% más 5% de leche a 60 rpm. Posterior al tiempo de bloqueo, la membrana se lavó en tres ocasiones con PBS-T al 0.1% a 85 rpm, durante cinco minutos cada lavado. Al concluir los lavados, se incubó en una dilución 1:1000 del anticuerpo primario OGA, clona NCOAT(G-12) (Santacruz Biotechnology), por dieciséis horas a 4°C en roscicero. Enseguida, se hicieron tres lavados de cinco minutos con PBST al 0.1% a 85 rpm. Al finalizar los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario IgG-mouse HRP, ab6728 (Abcam) 1:10,000 en PBS-T 0.1% más 0.3% de leche durante dos horas a 60 rpm. Posterior a la incubación, se hicieron cuatro lavados con PBS-T al 0.1%, cada lavado fue de diez minutos a 85 rpm.

7.4.3 Bloqueo e Incubación con anticuerpos (OGT)

La membrana se bloqueó durante una hora con PBS 1x más 5% de leche a 60 rpm. Al terminar el bloqueo, la membrana se lavó en dos ocasiones con PBS-T al 0.05% a 80 rpm, durante cinco minutos cada lavado. Después de concluir los lavados, la membrana se incubó en una dilución 1:1000 del anticuerpo primario OGT, clona F12 (Santacruz Biotechnology) en PBS-T 0.05% más 0.3% de leche, por dieciséis horas, a 4°C en roscicero. Enseguida, se hicieron tres lavados de cinco minutos con PBST

al 0.5% a 80 rpm. Al finalizar, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario IgG-mouse HRP, ab6728 (Abcam) 1:10,000 en PBS-T 0.05% más 0.3% de leche durante dos horas a 60 rpm. Posterior a la incubación, se hicieron cuatro lavados de diez minutos con PBS-T al 0.05% a 90 rpm.

7.4.4 Detección

Las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia en filmes de rayos X. Para ello, la membrana se cubrió con 200µl de ECL (GE Healthcare - Life Sciences, RPN2232). Se mezclaron 100 µl de solución A (luminol) más 100 µL de solución B (peróxido de hidrógeno) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, la mezcla se colocó sobre la membrana y se guardó en un cassette. Posteriormente, el cassette se llevó a un cuarto oscuro donde la membrana se expuso con un film de rayos x dentro del cassette durante aproximadamente un minuto. Luego de la exposición, el film se sumergió en solución reveladora (carestream, #5158613) hasta observar el patrón de bandeado, se sumergió un minuto en solución de fijación (carestream, #5158597) y se enjuagó con agua.

7.5 Stripping

Este último procedimiento se hizo con la finalidad de corroborar que se haya cargado la misma cantidad de proteína de cada muestra, utilizando tubulina como control de carga. Las membranas utilizadas para la detección de O-GlcNAc y de las enzimas OGT y OGA se lavaron con PBST al 0.2% y se incubaron con buffer de stripping (Tris-base 0.76%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 0.7%) a 75°C durante 30 minutos. Durante la incubación, el recipiente que contenía la membrana se movió en forma circular cada 5 minutos. Después del tiempo de incubación, se hicieron tres lavados de diez minutos con PBS-T al 0.2%. Enseguida, las membranas se bloquearon durante una hora con PBT-T al 0.1% más 5% de leche, a 60 rpm, a temperatura ambiente. Al terminar de bloquear, se hizo un solo lavado de 5 minutos a 80 rpm con PBS-T al 0.2%. Luego de lavar, se incubó con IgG Anti-α-Tubulin, clona DM1A (Bioscience) 1:6000 en PBST 0.1% con 0.3% de leche durante dieciséis horas a 4°C, y se hicieron tres lavados de cinco minutos con PBS-T al 0.2% a 80 rpm. Posteriormente, la membrana se incubó con anticuerpo secundario

IgG-mouse HRP, ab6728 (Abcam) 1:10,000. Al finalizar la incubación, se hicieron cuatro lavados de diez minutos con PBS-T al 0.2% a 80 rpm. Finalmente, cada membrana se cubrió con ECL (GE Healthcare - Life Sciences, RPN2232) y se reveló en un cuarto oscuro tal como se describió anteriormente.

7.6 Extracción de ARN

Las muestras de ARN se obtuvieron partir de cultivos celulares de controles y pacientes sembrados en frascos T-25. A cada uno se adiciono 1ml de Trizol, cuidando cubrir toda la superficie de la caja, y el total de la muestra se guardó en tubos de 1.5 ml; los cuales fueron incubados 5 minutos a temperatura ambiente, y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para hacer la extracción, se descongelaron los tubos de trizol y a cada uno se les adicionó 200 µl de cloroformo, se homogeneizó en vortex por 20 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13500 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa (en este caso, 500 µl de cada uno). A continuación, se añadieron 500 µl de isopropanol, se homogenizó en vortex por 20 segundos y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 13500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, cuidando no perder el botón. Enseguida, se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se homogeneizó en vortex y se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El tubo se colocó invertido sobre papel toalla para evaporar el exceso de etanol, y el botón se resuspendió en 50 µl de agua libre de ADNsas y ARNsas. Se tomo 1 µl de cada muestra y se cuantifico en un espectrofotómetro (IMPLEN NanoPhotometer® N50/N60).

7.7 Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizo a partir de 1 µ de ARN. Para ello, se preparó un mix para cada muestra: 1) C1, 2) C2, 3) P1, 4) P2, 5) control negativo. Cada mix contenía 1 µg de ARN, 1µl de Oligo dT (Thermoscientific, REF SO131), 1µl de dNTPs (Thermoscientific, REF R0181)10 µM, y la cantidad correspondiente de H₂O libre de ARNsas y ADNsas para un volumen total de 12 µl. El mix 1 se incubó 5 minutos a 65°C en un termociclador (Axygen ® Max gene II). Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo y se incubaron durante 5 minutos. Al concluir el tiempo de

incubación, se adicionaron 7 µl de mix 2 (4 µl de Buffer 5X (Invitrogen, REF 28025-021), 2 µl DTT (Invitrogen, REF 28025-021), 1 µl Ribolock (Thermoscientific, REF EO0381)) a cada tubo. Una vez que la temperatura del termociclador llegó a 37°C, las muestras se incubaron durante 2 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se añadió 1µl de transcriptasa reversa M-LV (Invitrogen, REF 28025-021), y el programa del termociclador continuo con la incubación a 37°C por 50 minutos, y 15 otros minutos de incubación a 70°C. Al terminar el termociclaje, los ADNc se guardaron a -20°C hasta su uso.

7.8 PCR punto final

Se hicieron PCR para β-actina (como gen de referencia), OGT y OGA, utilizando los oligos de la **tabla 3**.

Tabla 3. Oligos empleados para PCR punto final de OGT, OGA y β-actina.

Gen	Oligo 5'- 3'	Oligo 3'- 5'	Amplicón	Tm
OGT	GAGGAACACGTCAGGAGAGG	AGAGGACATCCATCCCTGTG	88 pb	58°C
OGA	AATTGAAGAATGGCGGTAC	GAGAGCCGAGTGAACATTCC	78 pb	58°C
Actina	GCTCCGGCATGTGCAA	AGGATCTTCATGAGGTAGT	571 pb	55°C

Para cada una de las PCR se preparó un mix para 5.5 reacciones: 1) C1, 2) C2, 3) P1, 4) P2, 5) control negativo. Las condiciones del mix para las PCR de actina y OGT y OGA se especifican en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para PCR punto final de actina, OGT y OGA.

Reactivo	Actina (una reacción)	OGT y OGA (una reacción)
H ₂ O libre de DNA/ARNsas	17.0 µl	13.75 µl
NH ₄ (SO ₄) ₂	2.5 µl	2.5 µl
MgCl ₂	2.5 µl	4.5 µl
Mix dNTPs 10 mM	0.5 µl	1 µl
Oligo sentido	0.5 µl	1 µl
Oligo antisentido	0.5 µl	1 µl
Taq-polimerasa	0.5 µl	0.25 µl
ADNc	1 µl	1 µl

En el caso de las PCR de actina, las muestras se incubaron durante 3 minutos a 95°C en el termociclador; seguido de 33 ciclos en los cuales la temperatura de desnaturalización fue de 95°C por 33 segundos, la temperatura de alineamiento (a la cual los oligos se unen a las hebras de DNA) fue de 55°C por 30 segundos, y la temperatura de elongación fue de 72°C por 30 segundos.

En el caso de las PCR de OGT y OGA, el termociclaje consistió en 29 ciclos en los cuales la temperatura de desnaturalización fue de 95°C durante un minuto, la temperatura de alineamiento fue de 58°C por un minuto, y la temperatura de polimerización fue de 72°C por un minuto.

Al finalizar cada reacción. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2% adicionado con 1 µl de Bromuro de etidio 10 mM por cada 10 ml de buffer TAE 1x (A partir de solución 50x: Tris-base 4M, ácido acético glacial 17.5%, EDTA 0.5 M). Las muestras se resolvieron mediante una electroforesis horizontal aplicado un potencial eléctrico de 90 voltios constantes por 40 minutos. Al concluir la electroforesis, los geles se revelaron en un transiluminador de luz UV.

7.9 Análisis desitométrico

Para evaluar el nivel de O-GlcNAc, OGT y OGA de pacientes respecto a controles, se midió la intensidad relativa de cada banda de los resultados obtenidos por WB y PCR punto final en Image J. Los valores obtenidos se normalizaron al dividirlos entre el valor de tubulina (en el caso de los WB) o actina (en el caso de los PCR), y a su vez este resultado se normalizó al dividirse entre el valor de C1 o C2. Sin embargo, debido a las variaciones que puede haber entre un control y otro, se decidió hacer también la normalización con el promedio de ambos controles. Los datos del análisis se encuentran en las tablas S6-S11, en anexos.

8.0 RESULTADOS

8.1 Obtención de lisados celulares totales

Se cargaron 35 μ l de lisados totales obtenidos a partir de cultivo primario de fibroblastos control y de pacientes en un gel de acrilamida al 10%, el cual se resolvió mediante electroforesis y posteriormente se tiñó con azul de coomassie. De este modo se comprobó que las proteínas no estaban degradadas y que las muestras mostraban el mismo patrón de bandeado (Figura 12).

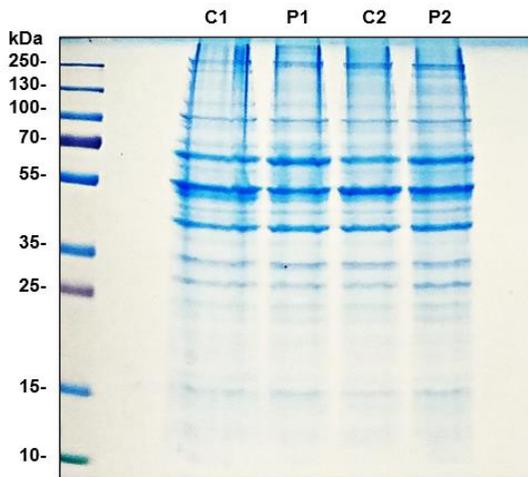


Figura 12. SDS-PAGE de muestras de proteínas obtenidas a partir de lisados celulares de control 1 (C1), control 2 (C2), paciente 1 (P1) y paciente 2 (P2).

8.2 Estandarización WB O-GlcNAc y Enzimas

Para la detección de O-GlcNAc, se hicieron varias pruebas utilizando diferentes diluciones del anticuerpo secundario IgM-HRP, clona A90-101P (Bethyl Laboratories) debido a que este genera ruido de fondo. Se utilizaron diluciones de 1:20,000; 1:30,000 y 1:40,000. Como se observa en la figura 13a, se obtiene un blot más limpio y con un patrón de bandeado más completo la dilución 1:40,000, por lo que se decidió usar esta concentración en experimentos posteriores. Se hizo además una prueba en la cual la membrana se incubó sólo con anticuerpo secundario (sin anticuerpo primario) con el que comprobamos que las bandas que se observan si son proteínas O-GlcNAc y no se trata de inespecificidad del anticuerpo. Cabe mencionar que la obtención de un WB limpio de O-GlcNAc con un perfil de bandeado completo fue uno de los principales retos durante la realización de este proyecto, y aun se puede mejorar.

Para estandarizar la detección de las enzimas OGT y OGA se utilizaron lisados totales de células Jurkat (una línea celular derivada de linfocitos T con leucemia linfoblástica) las cuales habían sido cultivadas previamente en frascos T-75 con medio RPMI 1640 (GIBCO™) suplementado al 10% con suero fetal bovino y 1% de antibiótico. Se decidió utilizar esta línea celular para estandarizar debido a que ya se ha reportado antes como modelo de estudio de la O-GlcNAcilación y además sobre expresa OGT [56,57]. En el caso de la detección de OGA, se probaron diferentes diluciones del anticuerpo primario NCOAT(G-12) (Santacruz Biotechnology). Las diluciones empleadas fueron 1:800, 1:950 y 1:1000. No obstante, se decidió utilizarlo 1:1000 debido a que con esta dilución se obtiene una banda mejor definida y sin ruido de fondo (Figura 13b). Para el caso de OGT, se intentó repetir las mismas pruebas que con OGA sin éxito; por lo que concluyó que la cantidad de proteína que se había estado utilizando (45 µg) no era suficiente, y se decidió aumentar la concentración a 75 µg. De este modo, logramos detectar la enzima como se muestra en la figura 13c.

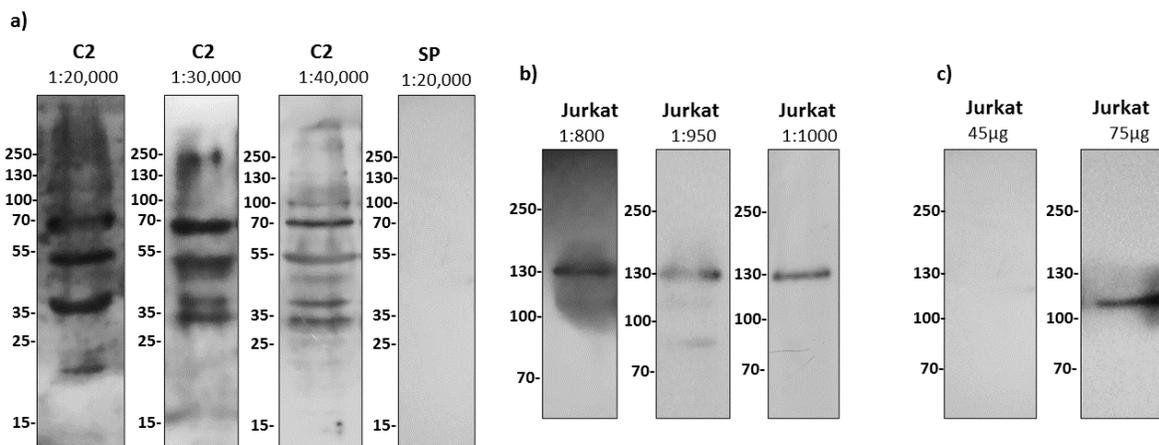


Figura 13. Estandarización de la detección de O-GlcNAc, OGA y OGT por WB. (a) Western blot revelado contra O-GlcNAc a partir de lisados celulares del control 2 (C2) utilizando diferentes diluciones de anticuerpo secundario. El cuarto carril corresponde a la prueba de anticuerpo secundario sin anticuerpo primario (denominado “SP”) **(b)** Western blot de OGA en el que se comparan distintas diluciones de anticuerpo primario. **(c)** Western blot de OGT con 45 y 75 µg de proteínas totales.

8.3 La O-GlcNAcilación de proteínas totales aumenta en el P2

Para determinar si había un cambio en el nivel total de O-GlcNAc en pacientes se hizo un WB utilizando las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos, en el cual se comparó el perfil de bandeo de controles y pacientes (Figura 14 a). Se midió la intensidad relativa de cada una de ellas por separado en Image J, y se hizo la sumatoria para estimar el nivel total de O-GlcNAc. Debido a que los controles mostraban diferencias entre sí, los datos se normalizaron con C1, C2 y con el promedio de ambos. En los 3 casos coincide que el porcentaje de O-GlcNAc del P1 no cambia con respecto a control, pero el P2 presenta un incremento de proteínas O-GlcNAciladas de alrededor del 20% (Fig. 13b y 13c). Observamos que el patrón de bandeo es similar entre todas las muestras (Fig. 13a), no obstante, hay diferencia en la intensidad de algunas bandas. Esto sugiere que si puede haber un cambio selectivo en la O-GlcNAcilación de ciertas proteínas, pero este depende de la condición del paciente.

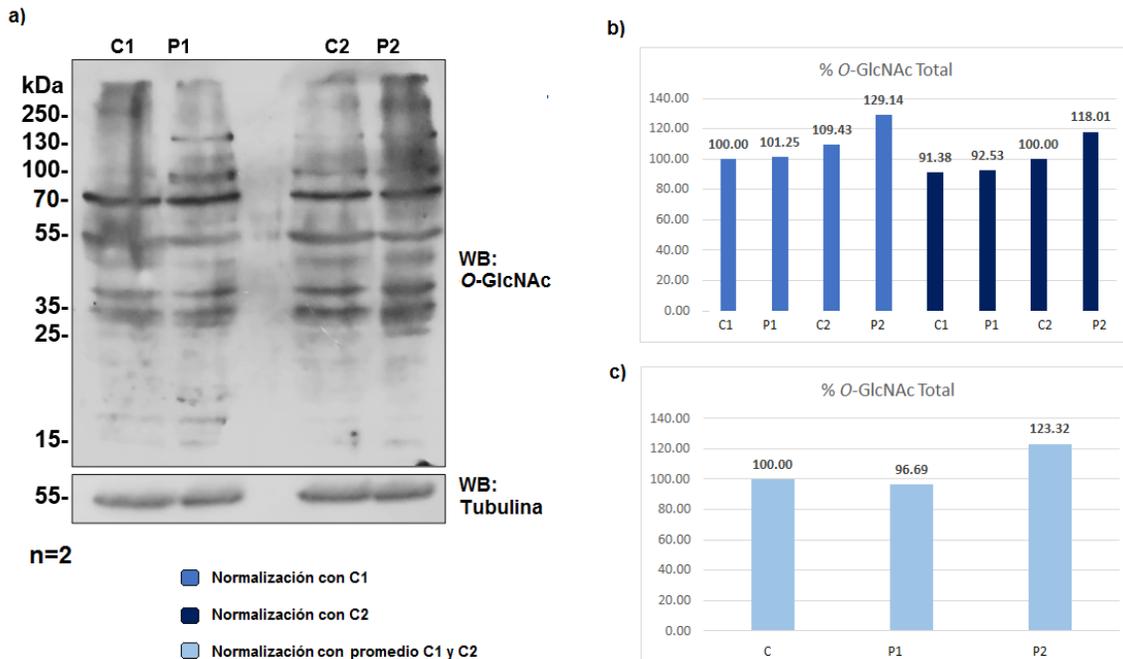


Figura 14. Comparación del perfil de O-GlcNacilación de proteínas totales de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot **(a)**. **(b)** Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1(azul medio) y C2 (azul oscuro). **(c)** Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

8.4 La O-GlcNAcación de proteínas de pesos moleculares específicos cambia de manera heterogénea

Debido a la diferencia de intensidad de las bandas a distintos pesos moleculares entre las muestras, se decidió hacer el análisis individual de cada banda en Image J. La primera banda se observa a 250 kDa (Figura 15), esta es más visible en C1 y P2, pero apenas se percibe en C2 y P1. Pese a la diferencia entre ambos controles, la forma de la gráfica es la misma haciendo la normalización con cada control (Fig.15b). En ambos casos se tiene una disminución de la reactividad del anticuerpo en P1 y un aumento de más del doble en P2 y esto mismo coincide con la normalización hecha con el promedio de los controles (Fig. 15c). La segunda banda es de 130 kDa (Figura 16) es poco visible en los controles, pero muestra un aumento significativo en ambos pacientes (de alrededor del 40% en P1), el cual es aún mayor en P2 (hasta el 200%). La tercera banda tiene un peso molecular de 100 kDa, es más intensa en el C2 que en C1; no obstante, tanto P1 y P2 presentan un aumento de O-GlcNAc en comparación de ambos controles y este incremento es mayor en P2 (Fig.17). La cuarta banda pesa 70 kDa y a diferencia de las anteriores, el nivel de O-GlcNAc no cambia de manera significativa; puesto que, la diferencia en la reactividad del anticuerpo es de alrededor del 5% entre cada muestra (Fig. 18). La quinta banda está a 55 kDa, y en este caso hay una disminución de O-GlcNAc de entre el 30-40% en ambos pacientes en relación con los controles (Fig.19). La siguiente banda tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa. Esta última presenta un descenso del nivel de O-GlcNAc de alrededor del 30% en P1; por el contrario, en P2 presenta un incremento de entre el 10-15% pero debido a que solo se están analizando 2 muestras, no podemos inferir si este cambio es estadísticamente significativo (Fig.20). Se observa una banda siguiente de aproximadamente 38 kDa, en la cual la reactividad del anticuerpo varía para ambos controles (Fig.21a). En el P1 se muestra un nivel de O-GlcNAc intermedio entre C1

y C2, mientras que en el P2 aumenta (Fig.21b). No obstante, al hacer la comparación con el promedio de controles podemos deducir que la O-GlcNAcilación de estas proteínas en específico no cambia en P1, pero aumenta alrededor del 25% en P2 (Fig.21c). A continuación, se observan dos bandas muy juntas que denominamos como 35 y <35 kDa (Fig. 22 y 23). En 35 kDa hay una diferencia entre la intensidad de C1 y C2 del 50%, mientras que los pacientes presentan valores intermedios (Fig. 22b y 22c). Con estos datos se podría suponer que no hay un cambio en O-GlcNAc para estas proteínas, sin embargo, para que sea estadísticamente significativo se necesitaría analizar un mayor número de muestras. Por su parte, a <35 kDa se observa un aumento en la reactividad del anticuerpo contra O-GlcNAc de P1 y P2, comparado con ambos controles (Fig 23b y 23c). La última banda que se analizó es la de 25 kDa, en este último caso no hay un cambio significativo de intensidad en P1, no obstante, el P2 aumenta su intensidad alrededor de un 50% en comparación con controles (Fig.24).

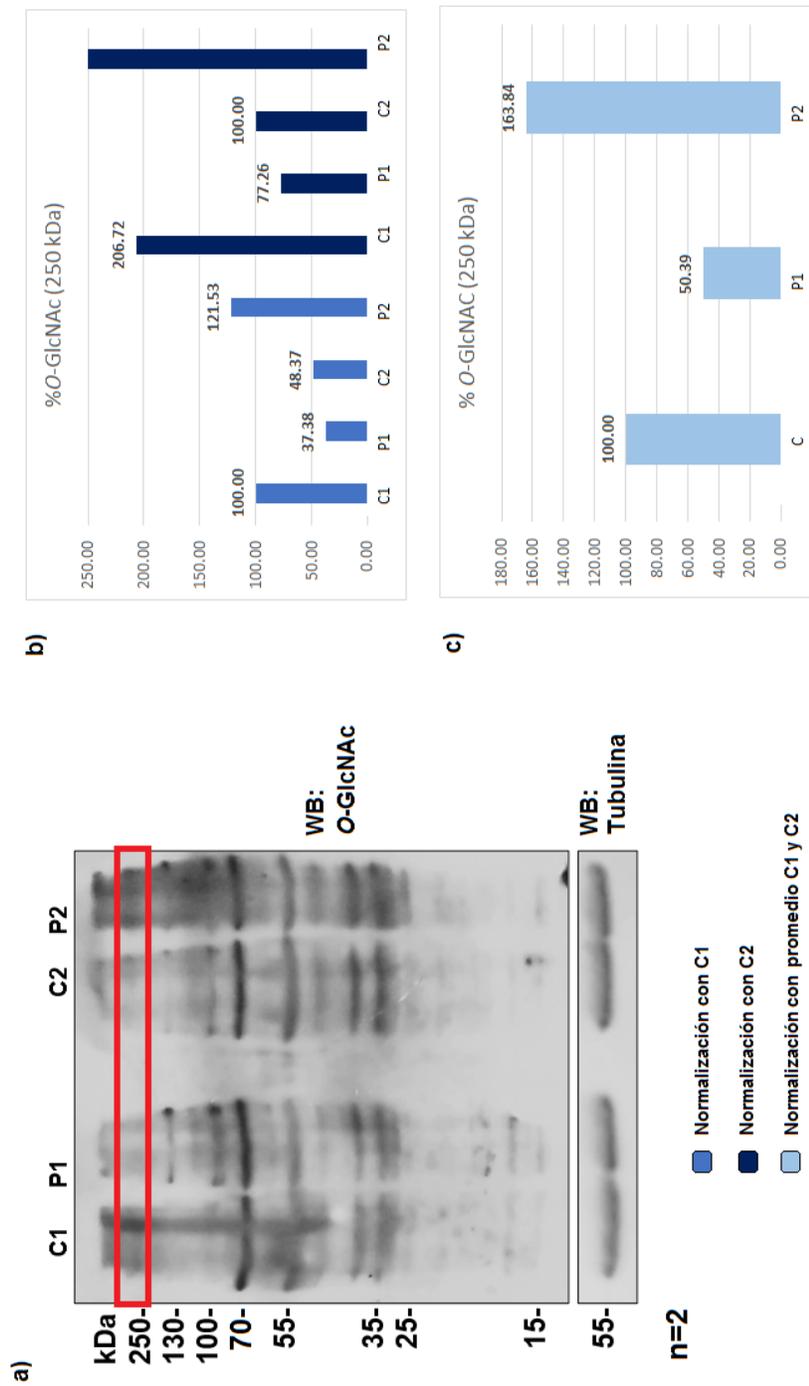


Figura 15. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 250 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

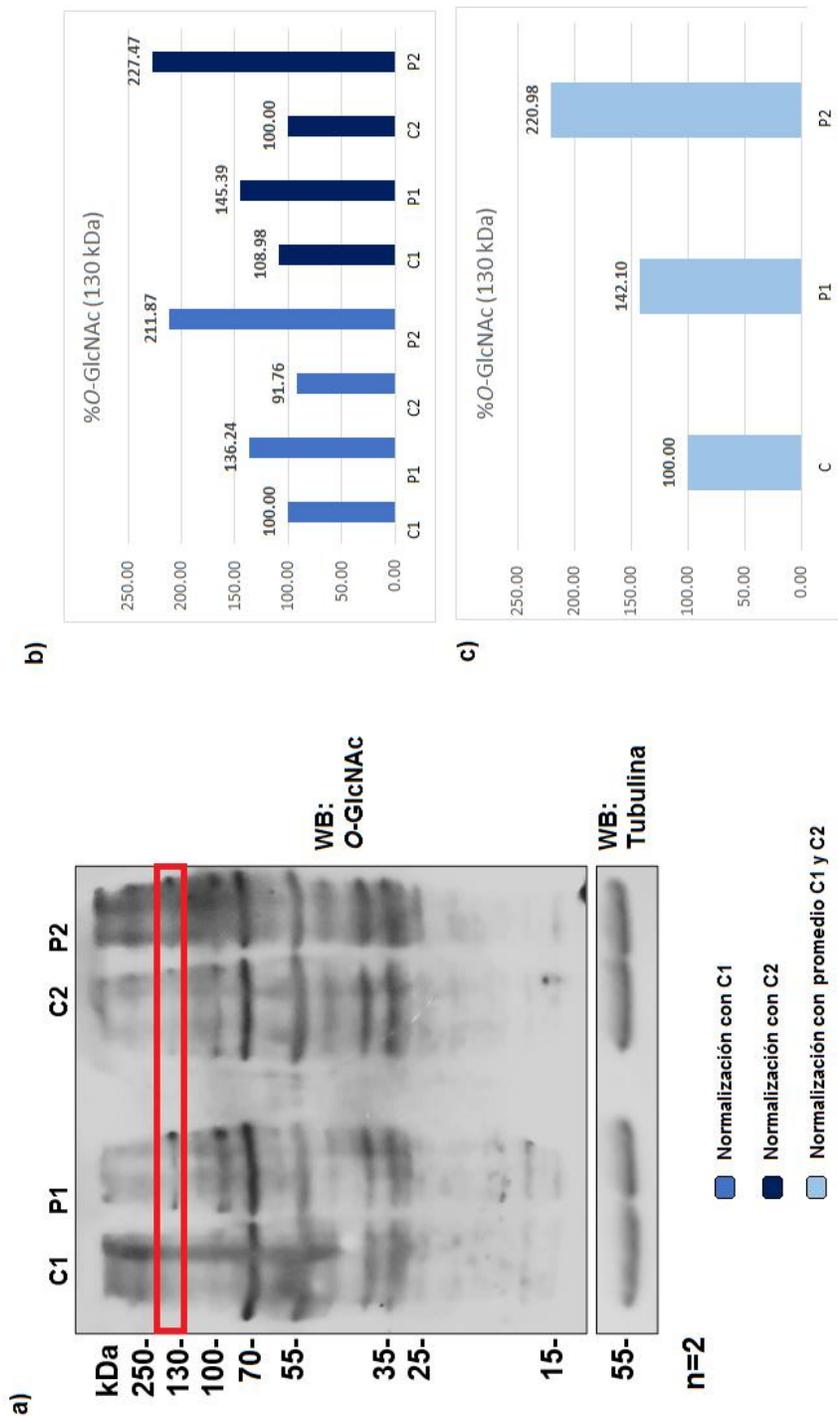


Figura 16. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 130 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

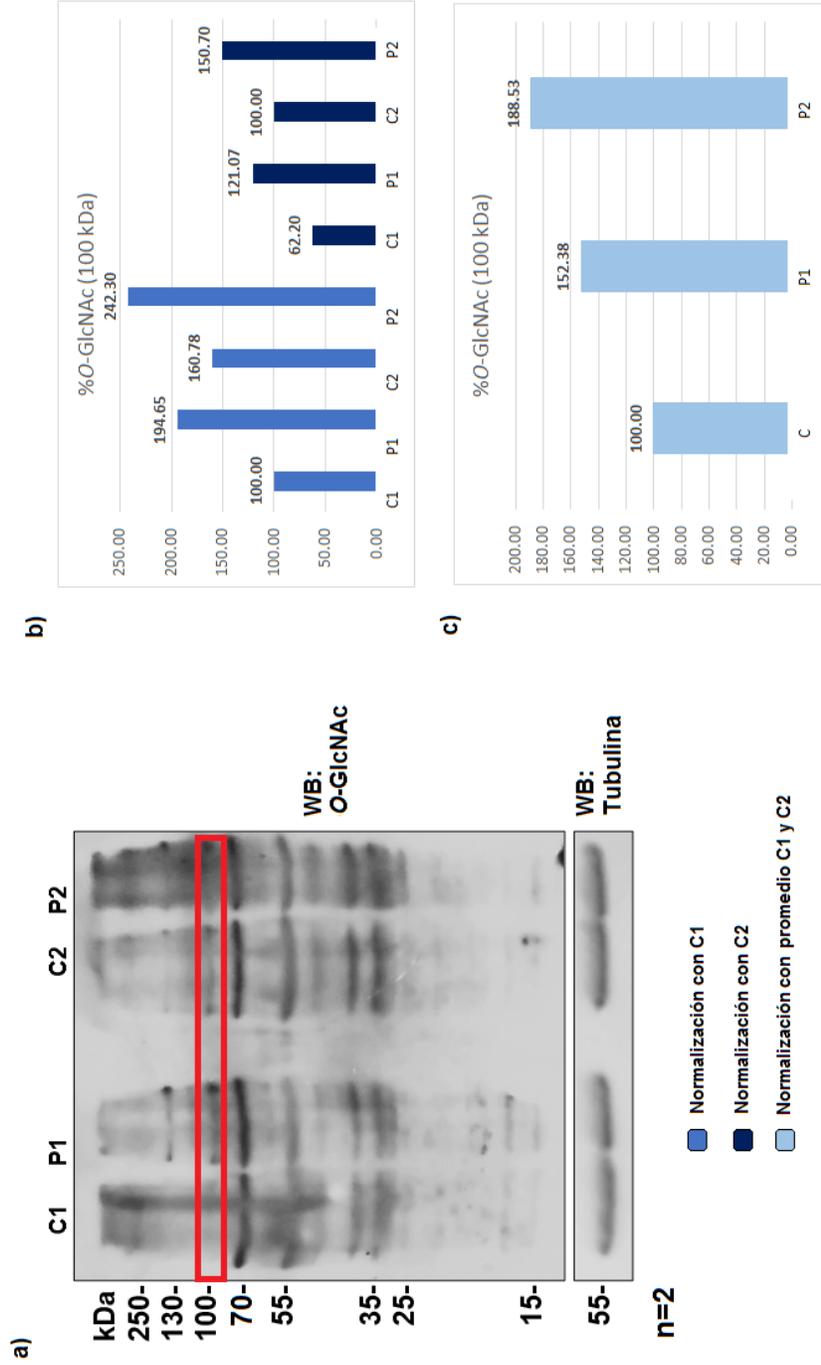


Figura 17. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 100 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

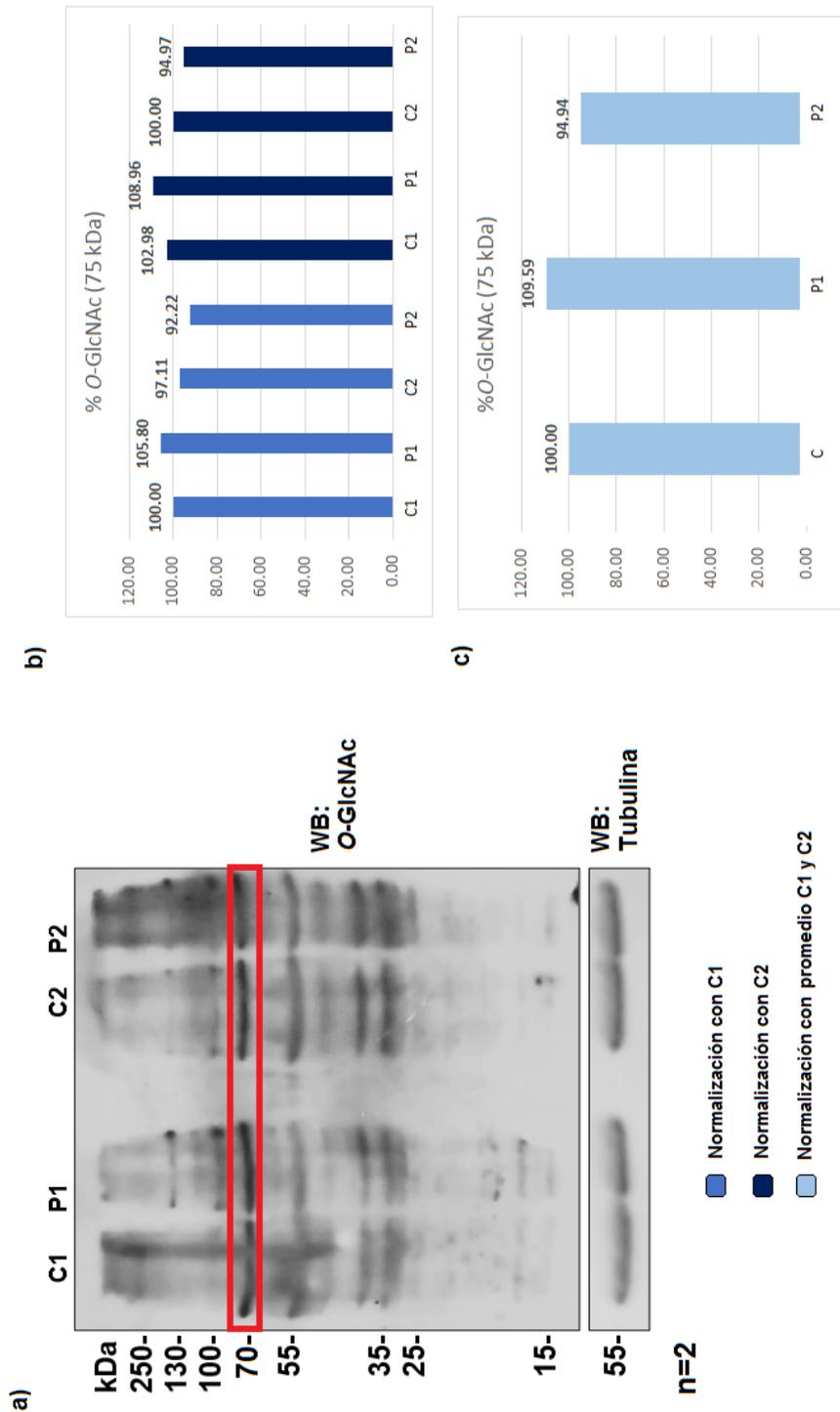


Figura 18. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 70 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

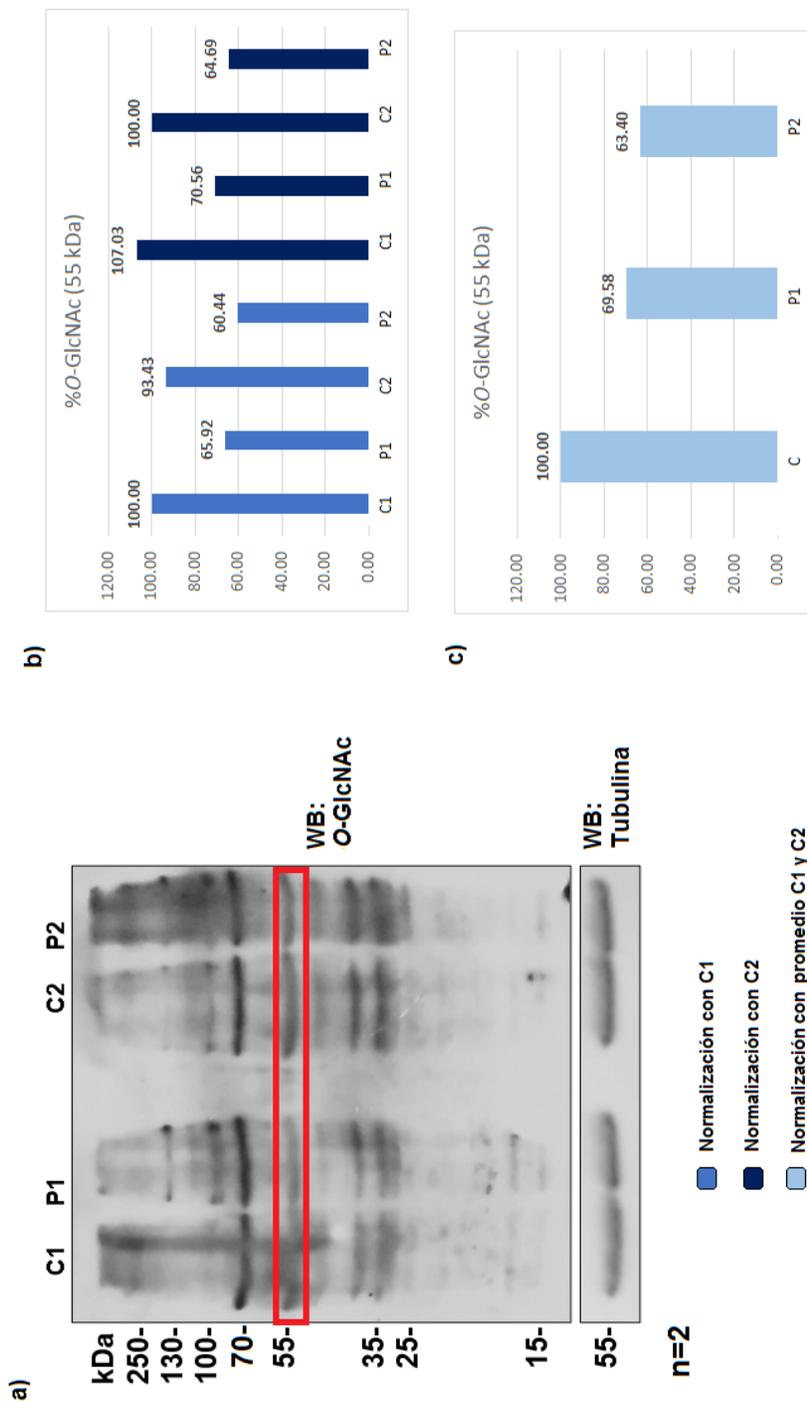


Figura 19. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 55 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

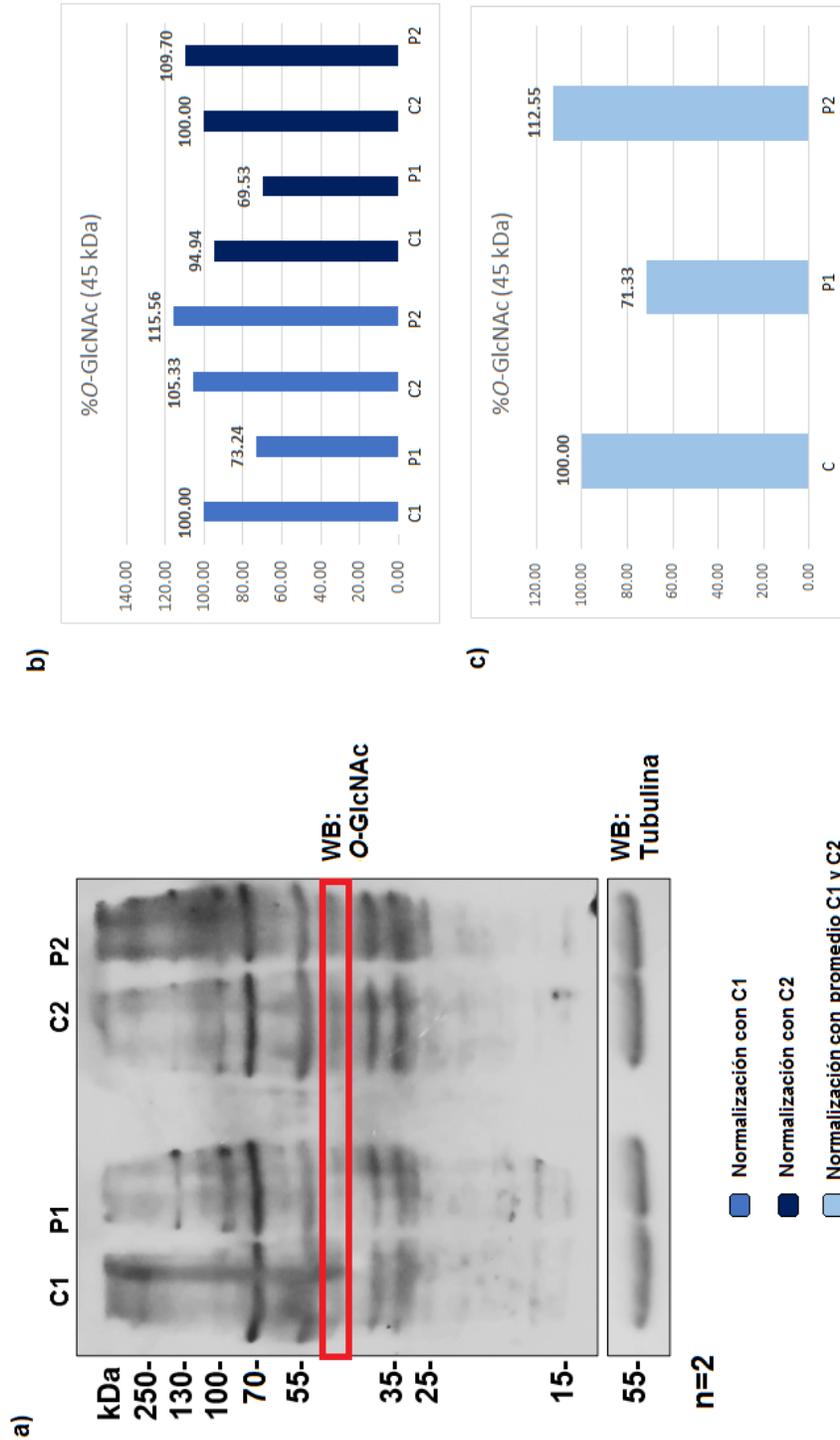


Figura 20. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de ~45 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

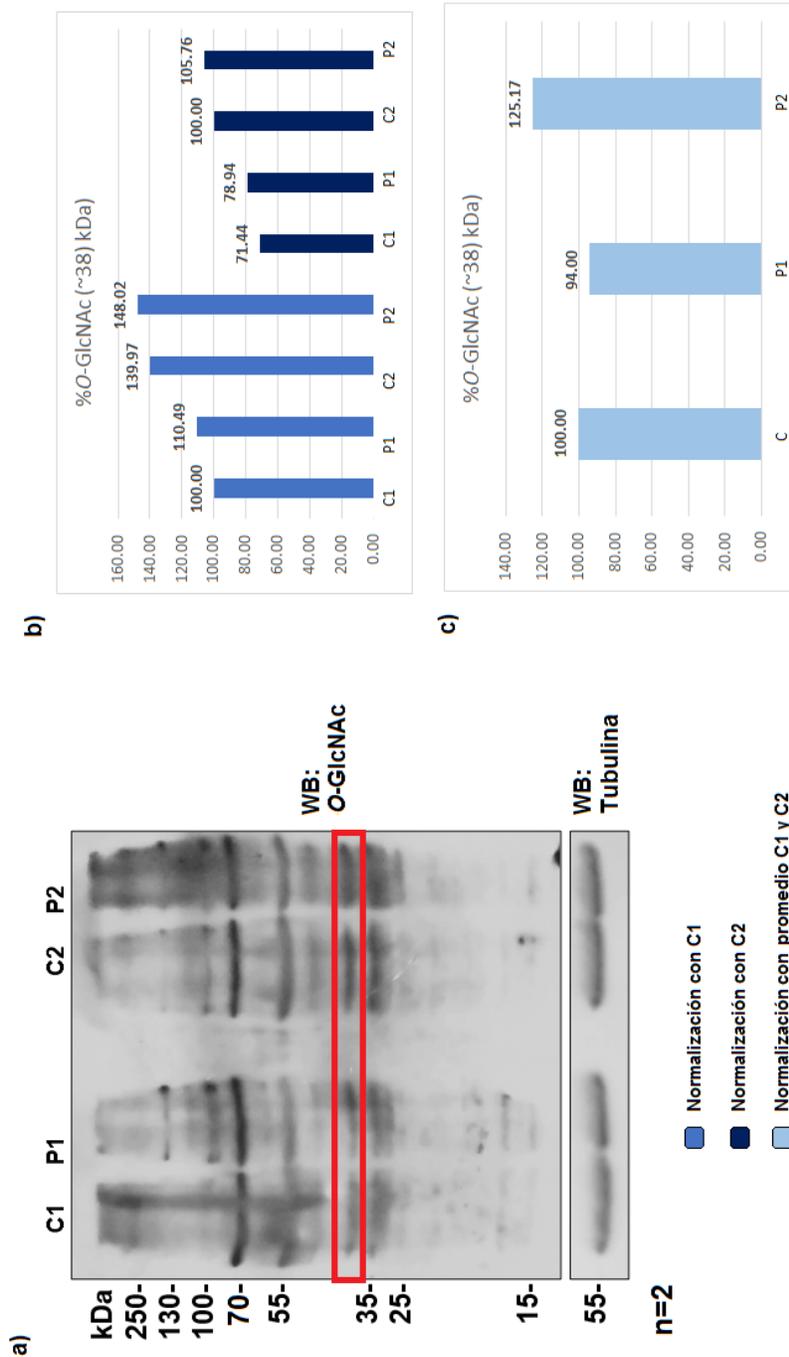


Figura 21. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de ~38 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

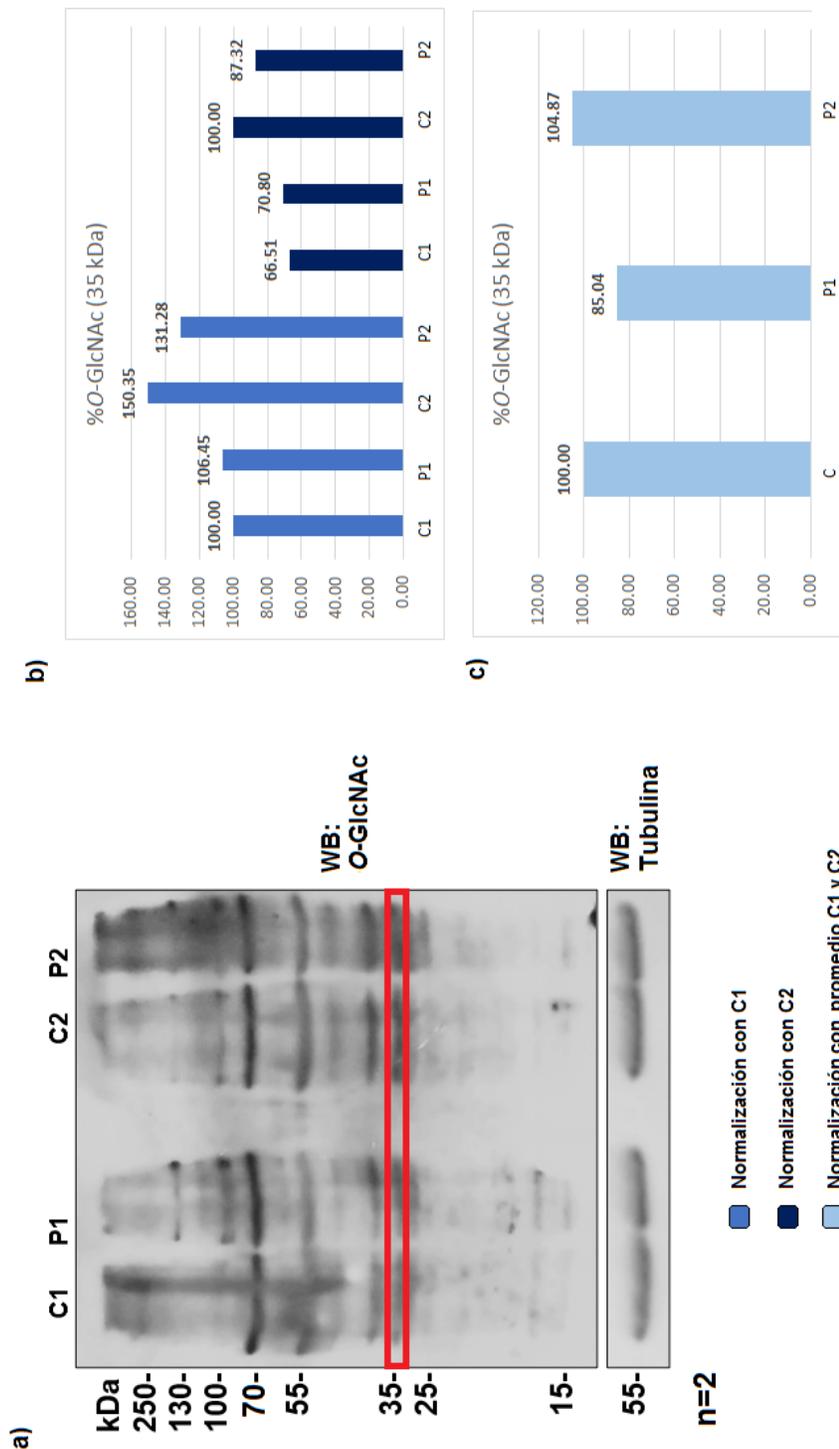


Figura 22. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 35 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

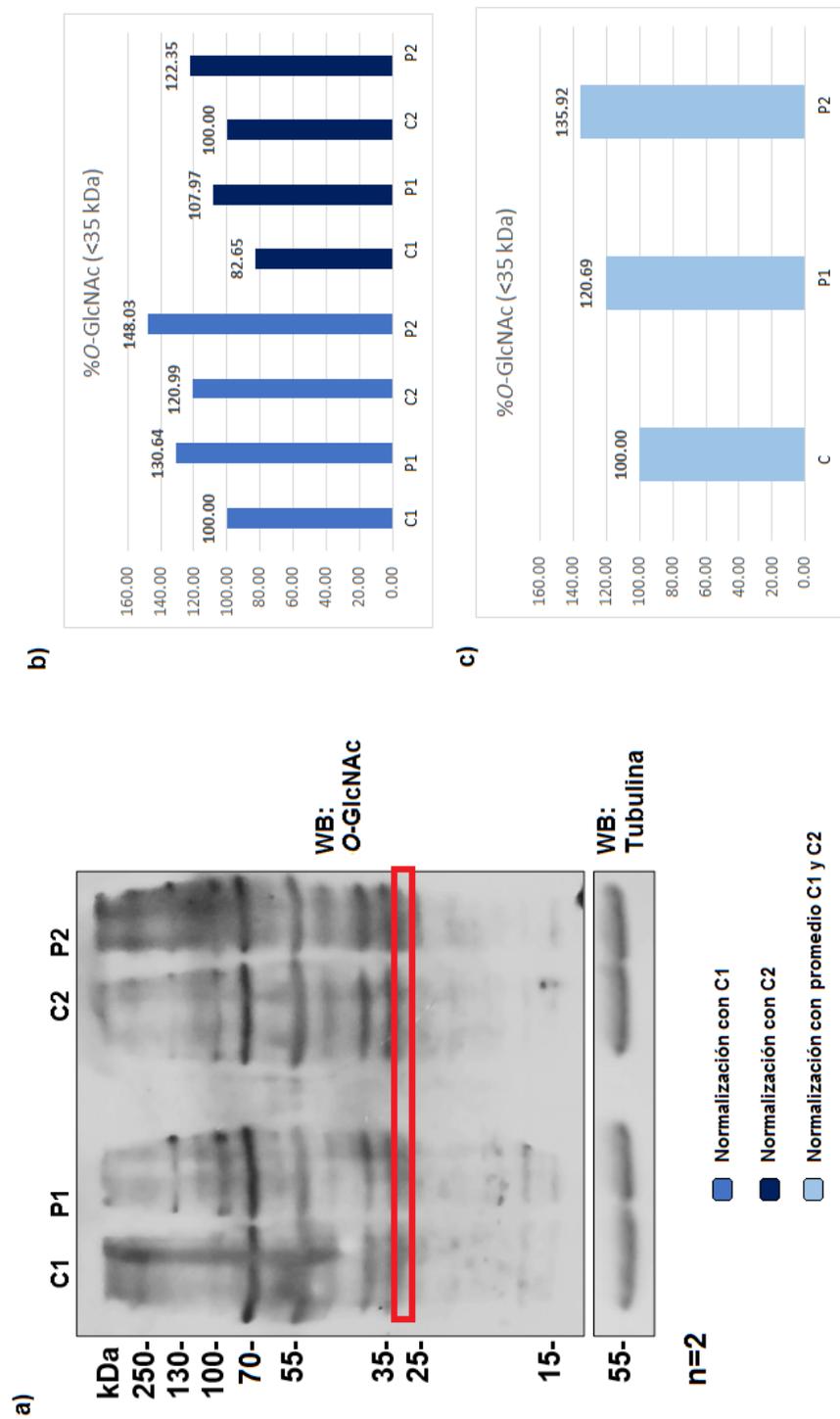


Figura 23. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de <35 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot **(a)**. **(b)** Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). **(c)** Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

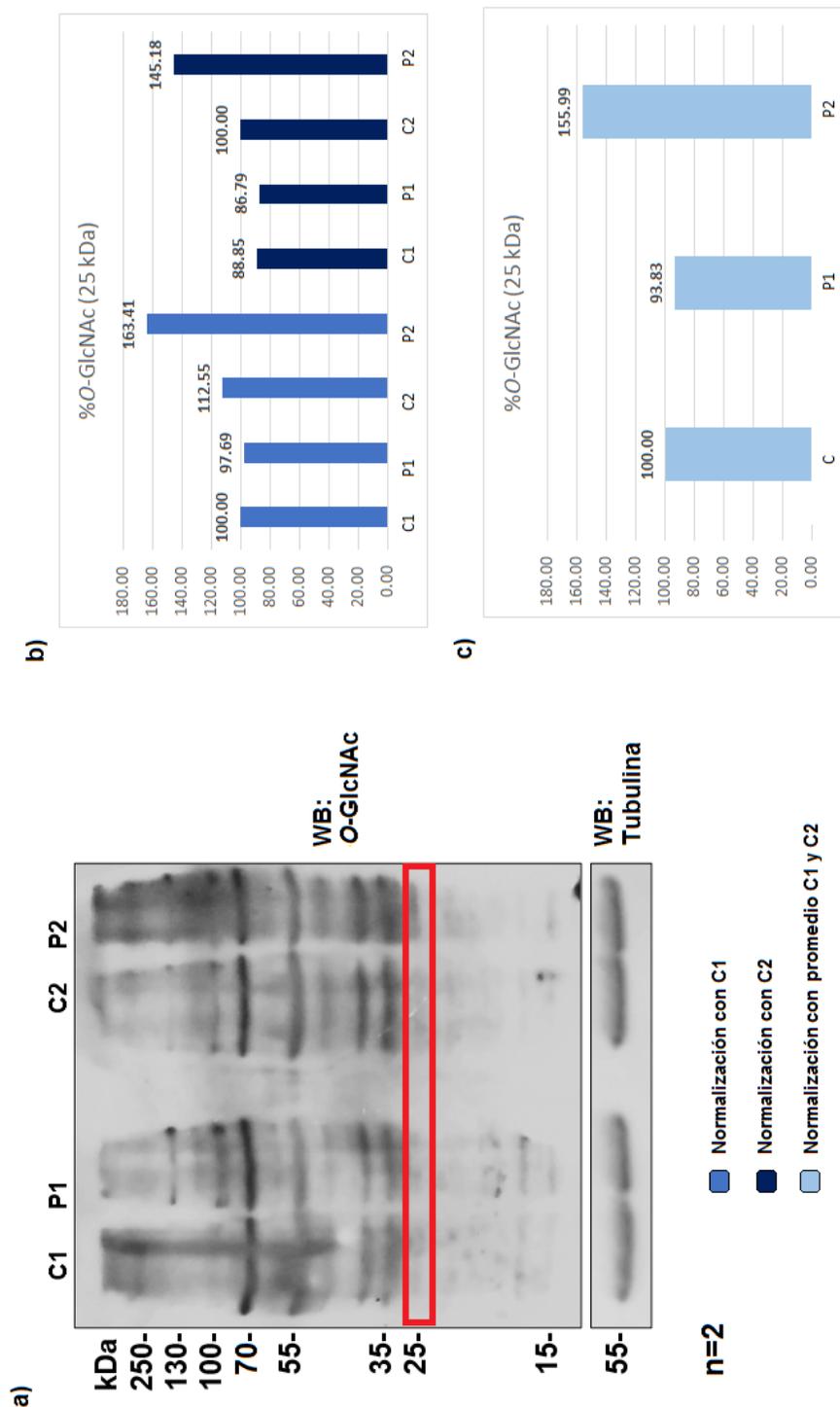


Figura 24. Análisis de la O-GlcNacilación de proteínas de 25 kDa de lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot (a). (b) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). (c) Nivel relativo de O-GlcNAc normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

8.5 El nivel de OGA disminuye en P1, pero aumenta en P2

Se comparó el nivel relativo de OGA en fibroblastos de piel de pacientes (P1 y 2) con respecto a controles (C1 y C2) por Western Blot (Figura 25a). El comportamiento de OGA en los controles es diferente, por lo que se hizo la normalización con cada control por separado (Fig. 24b) y con el promedio de ambos (Fig.25c). Pese a la diferencia de expresión de OGA entre los dos controles, el análisis densitométrico coincide en que la expresión de la enzima se reduce más de la mitad en P1, pero aumenta más del doble en P2. Esto coincide con lo antes discutido en antecedentes, en donde se mostró que la expresión de OGA se modificaba para contrarrestar los cambios en O-GlcNac. En este caso la disminución de OGA en P1 podría ser una respuesta a la disminución de la O-GlcNAcilación de proteínas de 250, 55, y 45 kDa que se observó en el WB de O-GlcNac. Por el contrario, el aumento de OGA en P2 se puede explicar debido al incremento de O-GlcNAcilación de proteínas totales; al haber una mayor concentración de O-GlcNac, hay una mayor expresión de OGA en un intento de la célula para regresar a los niveles homeostáticos.

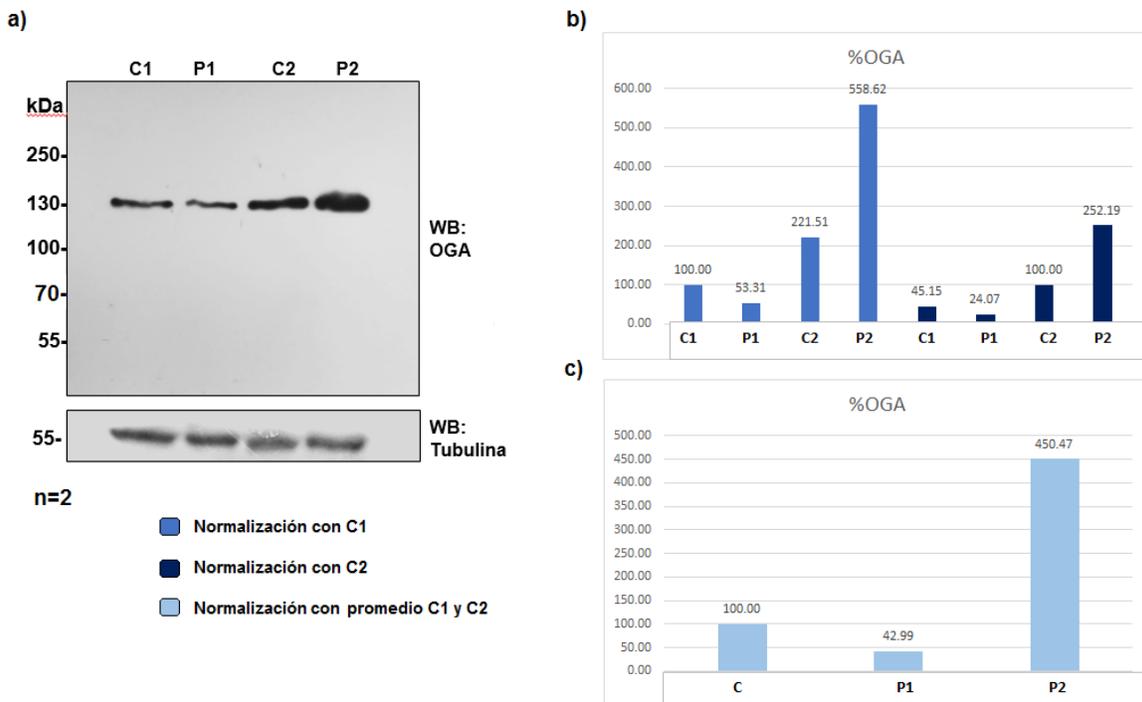


Figura 25. Comparación del nivel de OGA en lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot **(a)**. **(b)** Nivel relativo de OGA normalizado con C1(azul medio) y C2 (azul oscuro). **(c)** Nivel relativo de OGA normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

8.6 El nivel de OGT aumenta en P1 y paciente 2, el aumento es mayor en P2

Para el análisis de la expresión de OGT se hizo un WB en que se comparó el nivel de expresión de esta enzima en pacientes PMM2-CDG (P1 y P2) con un control sano (C2) (Figura 26). Se decidió utilizar este único control debido a que era el que mejor crecía en cultivo. Los resultados muestran que el nivel de OGT en P1 aumenta el doble, mientras que en P2 el incremento es de casi el triple. En el caso del P1 justificamos este incremento como una forma de contrarrestar la disminución de O-GlcNAc de proteínas con pesos moleculares de 250, 55, y 45 kDa, siendo este un efecto contrario a lo que ocurre con OGA, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura en otras líneas celulares. No obstante, para entender lo que ocurre P2 y el por qué ambas enzimas se encuentran aumentadas se necesitaría de más procesos experimentales.

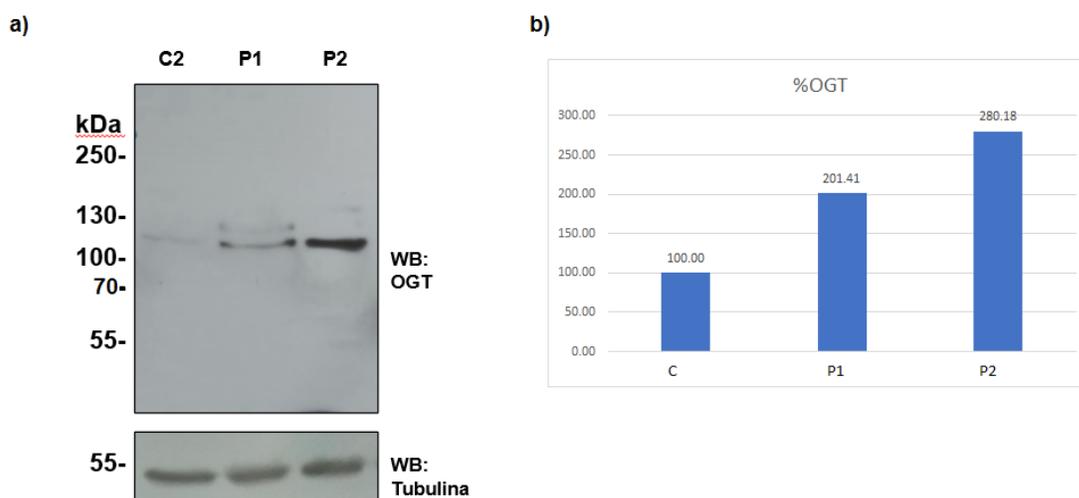


Figura 26. Comparación del nivel de OGT en lisados celulares de fibroblastos PMM2-CDG (P1 y P2) y control (C1 y C2) por Western Blot **(a)**. **(b)** Nivel relativo de OGT normalizado con C1 (azul medio) y C2 (azul oscuro). **(c)** Nivel relativo de OGT normalizado con el promedio de ambos controles (azul claro).

8.7 Síntesis de ADNc

Además del análisis a de O-GlcNAc a nivel tradicional, también se estudió si había un cambio en el nivel de ARN mensajero de OGT y OGA. Puesto que, como se mencionó en antecedentes, también puede haber regulación de la expresión de OGT y OGA a nivel transcripcional. Para ello se emplearon dos juegos de muestras de control y pacientes (pacientes) a partir de los cuales se sintetizó ADN codificante (ADNc) bajo las condiciones establecidas en la metodología. La figura 27 corresponde un PCR punto final de β -actina a través del cual se corroboró que el ADNc se había sintetizado correctamente.

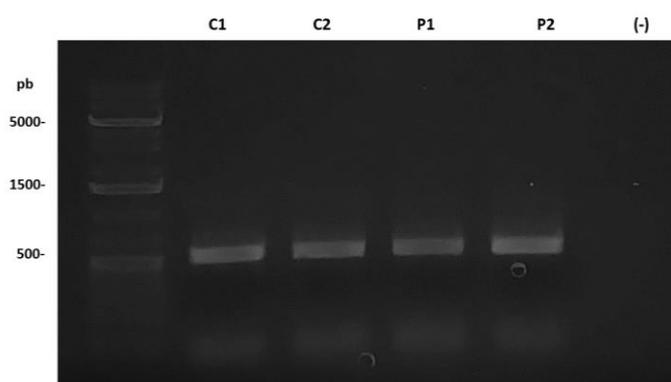


Figura 27. ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de fibroblastos control (C1 y C2) y de pacientes PMM2-CDG (P1 y P2). (-) = Control negativo de la transcriptasa reversa para corroborar que el material genético observado se trata de ADNc y no de una contaminación.

8.8 Estandarización uso de oligos para OGA y OGT

Una vez que se comprobó que la síntesis de ADNc fue exitosa. Se procedió a buscar las condiciones óptimas para la amplificación de los genes OGT y OGA. Se probaron dos condiciones que diferían en la cantidad de KCl, ambas PCR se hicieron utilizando una T_m de 58°C y 29 ciclos. Se encontró que tanto para OGA como para OGT había una mejor amplificación con la condición 2.

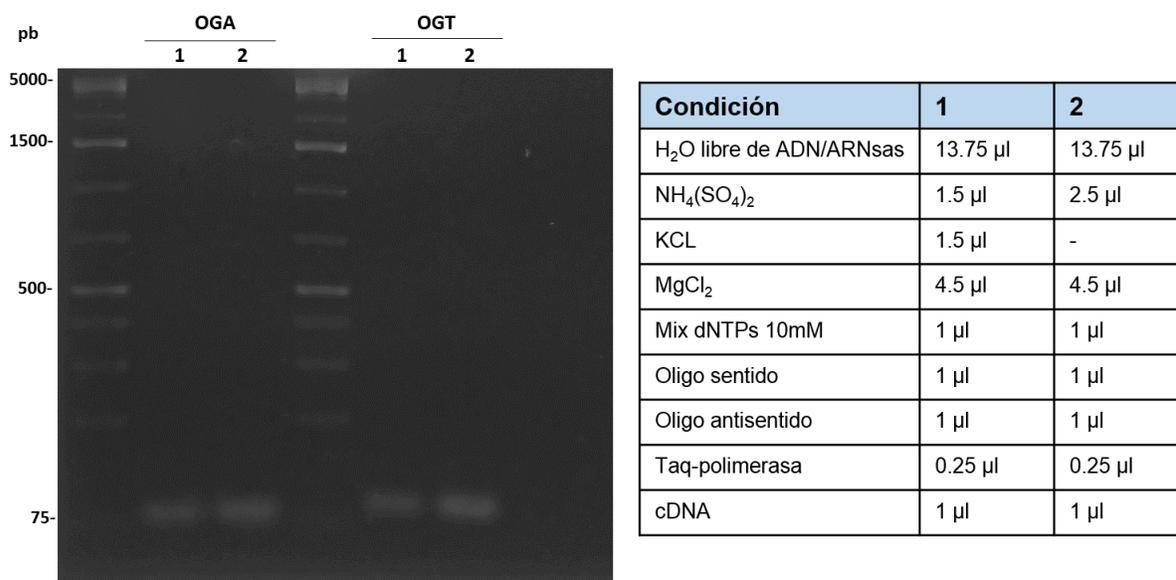


Figura 28. Estandarización uso de oligos OGT y OGA. PCR punto final de OGT y OGA utilizando dos condiciones diferentes (especificadas en panel derecho). La estandarización se hizo con ADNc de C1.

8.9 El nivel de ARNm de OGA no cambia en pacientes con PMM2-CDG

Se hizo una PCR punto final de β -actina (como gen de referencia) y OGA a partir de ADNc de controles (C1 y C2) y pacientes (P1 y P2), los cuales se resolvieron en un solo gel de agarosa al 2% (Fig. 29a). Los productos de ambas PCR se resolvieron por electroforesis como se especifica en la metodología. Los resultados se analizaron en Image J, para comparar la intensidad relativa de cada banda (Fig.29b). No obstante, se encontró que el nivel de ARNm de OGA no cambia en ninguna de las muestras.

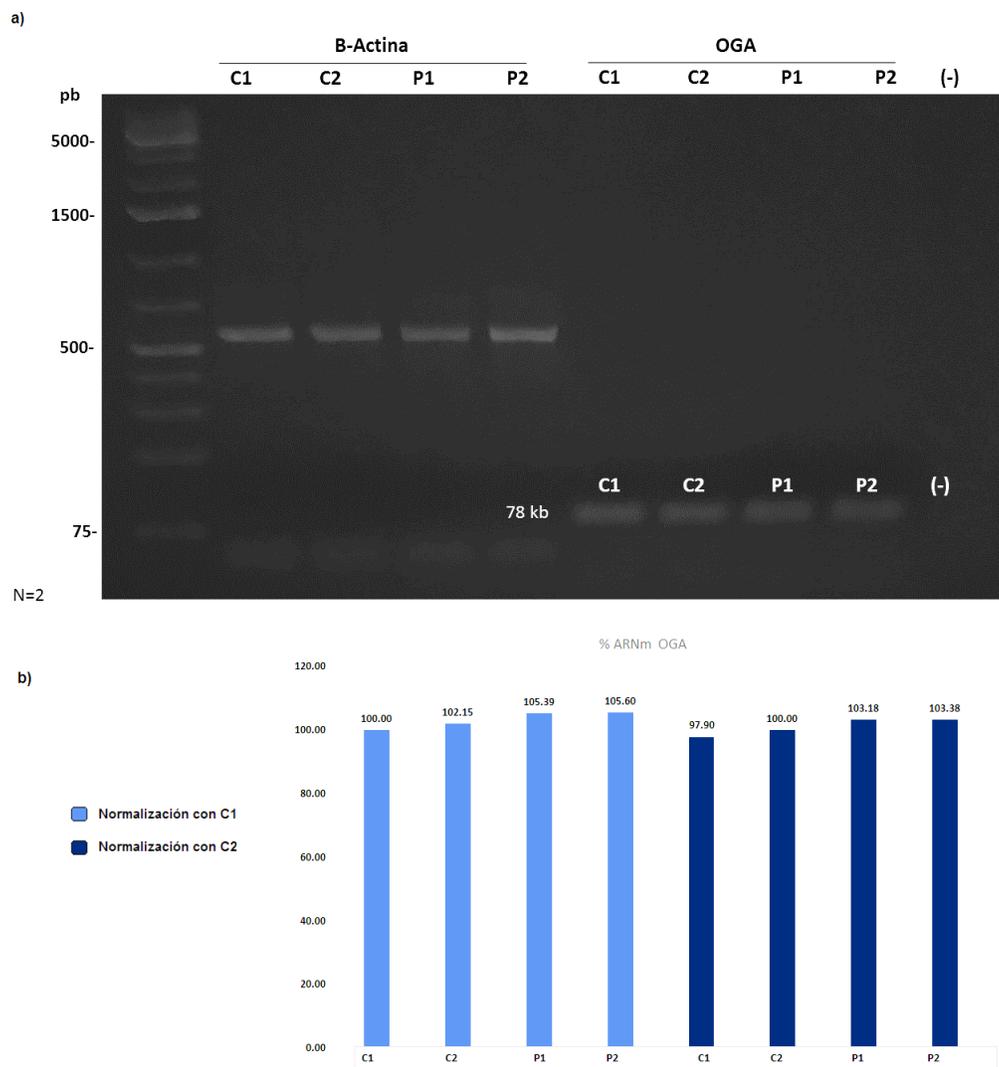


Figura 29. PCR punto final OGA. Las PCR se hicieron con ADNc de controles (C1 y C2) y pacientes PMM2-CDG (C1 y C2) y se usó actina como gen de referencia (a). (b) Nivel relativo de ARNm de OGA.

8.10 El nivel de ARNm de OGT no cambia en pacientes con PMM2-CDG

Se analizó el nivel de ARNm de OGT por PCR punto. Se hicieron PCR de β -actina (como gen de referencia) y OGT a partir de ADNc de controles (C1 y C2) y pacientes (P1 y P2), los cuales se resolvieron en un mismo gel de agarosa al 2% (Fig. 30a). Se midió la intensidad relativa de cada banda con la herramienta Image J (Fig. 29b). Sin embargo, se encontró que el nivel de ARNm de OGT no cambia en ninguna de las muestras.

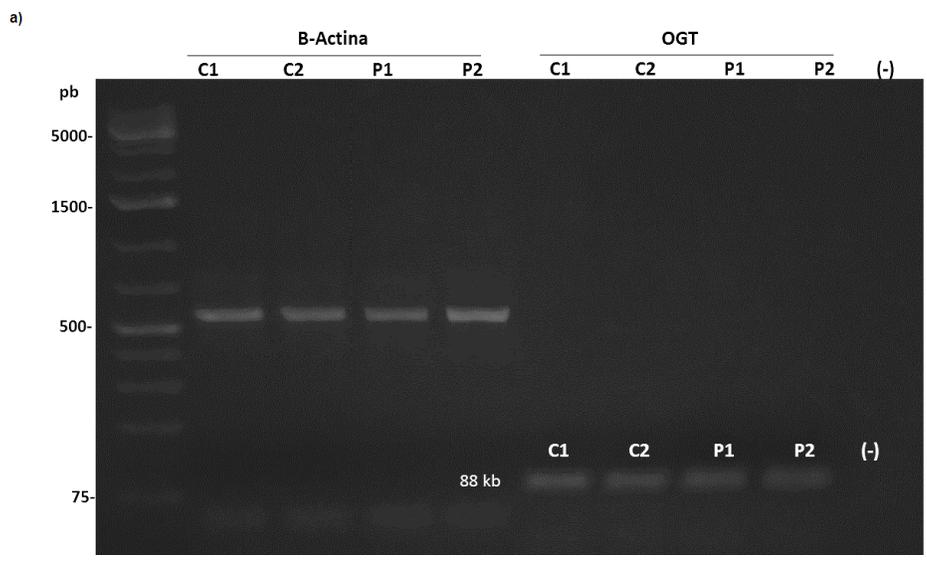


Figura 30. PCR punto final OGT. Las PCR se hicieron con ADNc de controles (C1 y C2) y pacientes PMM2-CDG (C1 y C2) y se usó actina como gen de referencia (a). (b) Nivel relativo de ARNm de OGT.

9.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El nivel total de proteínas O-GlcNAcizadas, así como el perfil de bandeo, es similar entre controles y pacientes, con excepción del P2 en donde notamos un aumento de aproximadamente el 20% en la reactividad del anticuerpo CTD110.6 contra O-GlcNAc.

En el P1, el nivel total de O-GlcNAc parece no cambiar, sin embargo, hay diferencia en la intensidad de bandas específicas. En algunos casos la reactividad del anticuerpo por ciertas proteínas con determinado peso molecular es mayor mientras que para otras es menor, en contraste con los controles.

En P2 también se observa variación en la intensidad de algunas bandas ya que, aunque la mayoría presenta un incremento, también hay bandas que disminuyen su intensidad.

Lo anterior sugiere un cambio selectivo en la O-GlcNAcización de ciertas proteínas, pero este podría depender de la condición del paciente. Se sabe que la variante patológica de PMM2 presente en P1 (p.R141H / p.I132T) disminuye la actividad de la enzima de 23-41% [7, 58]. En este caso, la actividad residual de la enzima podría contribuir a que su impacto en la O-GlcNAcización sea menor en comparación del P2 [aporte personal]. Por su parte, la variante patológica del P2 (p.R141H / p.V60Cfs*3), que da lugar a dos isoformas PMM2 y PMM3 por splicing alternativo, aún no ha sido caracterizada funcionalmente. Se sugiere que la proteína resultante no tendría actividad ya que los aminoácidos Arg123, Arg134 y Arg141 necesarios para la unión de GDP-manosa se verían afectados [8,59]. Como consecuencia, la falta de actividad de PMM2 conduciría a un aumento de Man-6-P que al entrar a la HBP en forma de F-6-P incrementaría el flujo metabólico a través de la ruta, resultando en el aumento de O-GlcNAc total observado en el WB [aporte personal]. También es posible que las variaciones en la reactividad del anticuerpo por O-GlcNAc estén relacionadas con fluctuaciones en la expresión de las proteínas que están siendo modificadas por este carbohidrato puesto que la O-GlcNAcización está relacionada con la regulación de la transcripción [17]. El estado de fosforilación

es otro factor que influye en la O-GlcNAcilación debido a la competencia que existe entre ambos tipos de modificación por los sitios Ser/Thr [42]; por lo que, aunque el nivel de UDP-GlcNAc aumente, este no puede ser adicionado a las proteínas si el sitio se encuentra ocupado por fosfato.

Además de los cambios en el nivel de O-GlcNAc intracelular, la expresión de OGA y OGT también se modifica en ambos pacientes.

En P1 se encontró una disminución de OGA y un aumento de OGT, esto podría ser una respuesta a la disminución de la O-GlcNAcilación de proteínas de 250, 55, y 45 kDa en un intento por restaurar los niveles homeostáticos de O-GlcNAc, tal como se ha observado que ocurre en otras líneas celulares como [32-34]. Por el contrario, no hay cambio en el nivel de ARNm de OGA y OGT en P1 lo que sugiere que la regulación de la expresión de las enzimas ocurre a nivel traduccional, aunque también es probable que la técnica empleada para medir el nivel de expresión de los ARNm no sea lo suficientemente sensible para detectar cambios.

Lo que ocurre P2 es más difícil de explicar puesto que, se esperaba encontrar una disminución de OGT y un aumento de OGA en respuesta de la célula para contrarrestar el incremento de O-GlcNAc total. Sin embargo, el P2 presenta un aumento en el nivel de ambas enzimas, pero no hay cambio en el nivel de ARNm. Se necesita llevar a cabo otros procedimientos experimentales para entender cómo se regula la expresión de OGA y OGT en este paciente, así como la caracterización funcional de PMM2 y su impacto en la O-GlcNAcilación.

En conclusión, este trabajo demuestra que la O-GlcNAcilación, así como la expresión de las enzimas OGA y OGT, cambia de manera heterogénea en pacientes PMM2-CDG sin alterar el nivel del ARN mensajero, dependiendo de la gravedad de la enfermedad.

10.0 PERSPECTIVAS

Hay algunas estrategias que se podrían implementar para optimizar los resultados presentados en esta tesis. Tal es el caso de las diferencias que los controles mostraron entre sí en los resultados de WB. Dichas variaciones se pueden deber al estado metabólico de las células al momento de la lisis. Esto se puede solucionar haciendo un arresto del ciclo celular y reactivando los fibroblastos al incubarlos con medio por periodos de tiempo específicos. De este modo se asegura que todas las células se encuentran en la misma fase del ciclo celular.

Durante la realización de esta tesis se hicieron cultivos simultáneos de controles y pacientes. No obstante, los procesos experimentales para WB y PCR se hicieron por separado. Es recomendable que las células destinadas para WB y para PCR se pongan en cultivo al mismo tiempo, asegurando así que se tengan exactamente las mismas condiciones en cada caso.

El protocolo para la detección de O-GlcNAc por WB también es mejorable, una estrategia que propongo para obtener un blot más limpio es cambiar el agente de bloqueo por PVP.

Por su parte, se podría aumentar la sensibilidad de la detección de los ARN mensajeros de OGT y PGA, si en lugar de hacer PCR punto final se hace una PCR cuantitativa.

Una forma de complementar los resultados que aquí se presentan suplementando el medio de cultivo con un exceso de glucosa o glucosamina. De este modo, la entrada de estos sustratos a la HBP facilitaría la identificación de cambios en el nivel de O-GlcNAc, tal como se ha hecho en otros estudios con adipocitos y fibroblastos de rata [60,61].

También sería interesante implementar el uso de inhibidores de OGT y OGA o hacer un silenciamiento de genes que se sabe están relacionados con la expresión de estas enzimas (tales son los casos de E2F1 y Rb1), con el propósito de entender cómo se coordina la expresión de estas enzimas en los Pacientes PMM2-CDG.

Adicionalmente, se podría hacer una espectrometría de masas para identificar cuáles son las proteínas que están siendo modificadas por O-GlcNAc.

11.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Seeberger, P. H. (2017). Genetic Disorders of Glycosylation. In *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition (Chapter 45). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press: [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01855-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01855-9).
2. Chang, I. J., He, M., & Lam, C. T. (2018). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of translational medicine*, 6(24), 477. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.45>
3. Vals, M. A., Pajusalu, S., Kals, M., Mägi, R., & Õunap, K. (2018). The Prevalence of PMM2-CDG in Estonia Based on Population Carrier Frequencies and Diagnosed Patients. *JIMD reports*, 39, 13–17. https://doi.org/10.1007/8904_2017_41
4. Chan, B., Clasquin, M., Smolen, G. A., Histen, G., Powe, J., Chen, Y., Lin, Z., Lu, C., Liu, Y., Cang, Y., Yan, Z., Xia, Y., Thompson, R., Singleton, C., Dorsch, M., Silverman, L., Su, S. M., Freeze, H. H., & Jin, S. (2016). A mouse model of a human congenital disorder of glycosylation caused by loss of PMM2. *Human molecular genetics*, 25(11), 2182– 2193. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw085>
5. Akella, N. M., Ciraku, L., & Reginato, M. J. (2019). Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC biology*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0671-3>
6. Chiaradonna, F., Ricciardiello, F., & Palorini, R. (2018). The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *Cells*, 7(6), 53. <https://doi.org/10.3390/cells7060053>
7. González-Domínguez, C. A., Raya-Trigueros, A., Manrique-Hernández, S., González Jaimes, A., Salinas-Marín, R., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez, K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Dehesa-Caballero, C., Alaez-Versón, C., & Martínez-Duncker, I. (2020). Identification through exome sequencing of the first PMM2-CDG individual of Mexican mestizo origin. *Molecular genetics and metabolism reports*, 25, 100637. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100637>
8. González-Domínguez, C. A., Villarroel, C. E., Rodríguez-Morales, M., Manrique-Hernández, S., González-Jaimes, A., Olvera-Rodriguez, F., Beutelspacher, K., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez, K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Muñoz-Rivas, A., Cruz-Muñoz, M. E., Mora-Montes, H. M., Salinas-Marín, R., Alaez-Verson, C., & Martínez-Duncker, I. (2021). Non-functional alternative splicing caused by a Latino pathogenic variant in a case of PMM2-CDG. *Molecular genetics and metabolism reports*, 28, 100781. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100781>
9. Varki A., Kornfeld S. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. (2017). Historical Background and Overview. *Essentials of Glycobiology* 3rd edition (Chapter 1). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316258/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.001.

10. Freeze H.H., Hart G.W., Schnaar R.L. In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., et al., editors. (2017). Glycosylation Precursors. Essentials of Glycobiology 3rd edition (Chapter 5). Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453043/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.005.
11. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Dec;21(12):729-749. doi: 10.1038/s41580-020-00294-x. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33087899.
12. Spiro R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R–56R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43r>
13. Stanley P., Taniguchi N., Aebi M. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. (2017). N-Glycans. Essentials of Glycobiology 3rd edition (Chapter 9). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.009.
14. Kornfeld, R., & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54, 631–664. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.003215>
15. Sharma, V., Ichikawa, M., & Freeze, H. H. (2014). Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.021>
16. Lefebvre, T., & Issad, T. (2015). 30 Years Old: O-GlcNAc Reaches the Age of Reason - Regulation of Cell Signaling and Metabolism by O-GlcNAcylation. *Frontiers in endocrinology*, 6, 17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00017>
17. Bond, M. R., & Hanover, J. A. (2015). A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of cell biology*, 208(7), 869–880. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501101>
18. Zachara N, Akimoto Y, Hart GW. The O-GlcNAc Modification. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor
19. Parker, M. P., Peterson, K. R., & Slawson, C. (2021). O-GlcNAcylation and O-GlcNAc Cycling Regulate Gene Transcription: Emerging Roles in Cancer. *Cancers*, 13(7), 1666. <https://doi.org/10.3390/cancers13071666>
20. Jínek, M., Rehwinkel, J., Lazarus, B. D., Izaurralde, E., Hanover, J. A., & Conti, E. (2004). The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nature structural & molecular biology*, 11(10), 1001–1007. <https://doi.org/10.1038/nsmb833>
21. Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1755-61. doi: 10.1074/jbc.m109656200. PMID: 11788610.

22. Hardivillé, S., & Hart, G. W. (2014). Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell metabolism*, 20(2), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.014>
23. Olson, A. K., Bouchard, B., Zhu, W. Z., Chatham, J. C., & Des Rosiers, C. (2020). First characterization of glucose flux through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) in *ex vivo* mouse heart. *The Journal of biological chemistry*, 295(7), 2018–2033. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010565>
24. Pravata, V. M., Omelková, M., Stavridis, M. P., Desbiens, C. M., Stephen, H. M., Lefeber, D. J., Gecz, J., Gundogdu, M., Öunap, K., Joss, S., Schwartz, C. E., Wells, L., & van Aalten, D. (2020). An intellectual disability syndrome with single-nucleotide variants in O-GlcNAc transferase. *European journal of human genetics : EJHG*, 28(6), 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0589-9>
25. Muha, V., Fenckova, M., Ferenbach, A. T., Catinozzi, M., Eidhof, I., Storkebaum, E., Schenck, A., & van Aalten, D. (2020). O-GlcNAcase contributes to cognitive function in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*, 295(26), 8636–8646. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010312>
26. Senderek, J., Müller, J. S., Dusl, M., Strom, T. M., Guergueltcheva, V., Diepolder, I., Laval, S. H., Maxwell, S., Cossins, J., Krause, S., Muelas, N., Vilchez, J. J., Colomer, J., Mallebrera, C. J., Nascimento, A., Nafissi, S., Kariminejad, A., Nilipour, Y., Bozorgmehr, B., Najmabadi, H., ... Lochmüller, H. (2011). Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *American journal of human genetics*, 88(2), 162–172.
27. Boehmelt, G., Wakeham, A., Elia, A., Sasaki, T., Plyte, S., Potter, J., Yang, Y., Tsang, E., Ruland, J., Iscove, N. N., Dennis, J. W., & Mak, T. W. (2000). Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *The EMBO journal*, 19(19), 5092–5104. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5092>
28. Mariappa, D., Sauert, K., Mariño, K., Turnock, D., Webster, R., van Aalten, D. M., Ferguson, M. A., & Müller, H. A. (2011). Protein O-GlcNAcylation is required for fibroblast growth factor signaling in *Drosophila*. *Science signaling*, 4(204), ra89. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002335>
29. Chen, X., Raimi, O. G., Ferenbach, A. T., & van Aalten, D. (2021). A missense mutation in a patient with developmental delay affects the activity and structure of the hexosamine biosynthetic pathway enzyme AGX1. *FEBS letters*, 595(1), 110–122. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13968>
30. Nagel, A. K., & Ball, L. E. (2014). O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino acids*, 46(10), 2305–2316. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1827-7>
31. Lin, C. H., Liao, C. C., Chen, M. Y., & Chou, T. Y. (2021). Feedback Regulation of O-GlcNAc Transferase through Translation Control to Maintain Intracellular O-GlcNAc Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3463. <https://doi.org/10.3390/ijms22073463>
32. Zhang, Z., Tan, E. P., VandenHull, N. J., Peterson, K. R., & Slawson, C. (2014). O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc

- Homeostasis. *Frontiers in endocrinology*, 5, 206.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00206>
33. Slawson, C., Zachara, N. E., Vosseller, K., Cheung, W. D., Lane, M. D., & Hart, G. W. (2005). Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *The Journal of biological chemistry*, 280(38), 32944–32956.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M503396200>
34. Park, S. K., Zhou, X., Pendleton, K. E., Hunter, O. V., Kohler, J. J., O'Donnell, K. A., & Conrad, N. K. (2017). A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell reports*, 20(5), 1088–1099.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.017>
35. Decourcelle, A., Loison, I., Baldini, S., Leprince, D., & Dehennaut, V. (2020). Evidence of a compensatory regulation of colonic O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase expression in response to disruption of O-GlcNAc homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*, 521(1), 125–130.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.090>
36. Dennis, M. D., Shenberger, J. S., Stanley, B. A., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2013). Hyperglycemia mediates a shift from cap-dependent to cap-independent translation via a 4E-BP1-dependent mechanism. *Diabetes*, 62(7), 2204–2214. <https://doi.org/10.2337/db12-1453>
37. Muthusamy, S., Hong, K. U., Dassanayaka, S., Hamid, T., & Jones, S. P. (2015). E2F1 Transcription Factor Regulates O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase and O-GlcNAcase Expression. *The Journal of biological chemistry*, 290(52), 31013–31024.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677534>
38. Chou, T. Y., Hart, G. W., & Dang, C. V. (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *The Journal of biological chemistry*, 270(32), 18961–18965.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.18961>
39. Cheng, X., & Hart, G. W. (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of biological chemistry*, 276(13), 10570–10575.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010411200>
40. Kelly, W. G., Dahmus, M. E., & Hart, G. W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *The Journal of biological chemistry*, 268(14), 10416–10424.
41. Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., & Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of clinical investigation*, 108(9), 1341–1348. <https://doi.org/10.1172/JCI11235>
42. Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., & Lagerlof, O. (2011). Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling,

- transcription, and chronic disease. *Annual review of biochemistry*, 80, 825–858. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>
43. Zeidan, Q., & Hart, G. W. (2010). The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *Journal of cell science*, 123(Pt 1), 13–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.053678>
 44. Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S., & Hart, G. W. (2008). A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Molecular biology of the cell*, 19(10), 4130–4140. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-11-1146>
 45. Freeze H.H., Schachter H., Kinoshita T. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. (2017). Genetic Disorders of Glycosylation. Essentials of Glycobiology 3rd edition (Chapter 45). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453041/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.045
 46. Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature reviews. Nephrology*, 15(6), 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>
 47. Ondruskova, N., Cechova, A., Hansikova, H., Honzik, T., & Jaeken, J. (2021). Congenital disorders of glycosylation: Still "hot" in 2020. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1865(1), 129751. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129751>
 48. Goreta, S. S., Dabelic, S., & Dumic, J. (2012). Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochimica medica*, 22(2), 156–170. <https://doi.org/10.11613/bm.2012.019>
 49. Lefeber, D. J., Morava, E., & Jaeken, J. (2011). How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *JouARNI of inherited metabolic disease*, 34(4), 849–852. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9370-0>
 50. Marklová, E., & Albahri, Z. (2009). Transferrin D protein variants in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG). *JouARNI of clinical laboratory analysis*, 23(2), 77–81. <https://doi.org/10.1002/jcla.20293>
 51. Guillard, M., Wada, Y., Hansikova, H., Yuasa, I., Vesela, K., Ondruskova, N., Kadoya, M., Janssen, A., Van den Heuvel, L. P., Morava, E., Zeman, J., Wevers, R. A., & Lefeber, D. J. (2011). Transferrin mutations at the glycosylation site complicate diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I. *JouARNI of inherited metabolic disease*, 34(4), 901–906. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9311-y>
 52. Citro, V., Cimmaruta, C., Monticelli, M., Riccio, G., Hay Mele, B., Cubellis, M. V., & Andreotti, G. (2018). The Analysis of Variants in the General Population Reveals That *PMM2* Is Extremely Tolerant to Missense Mutations and That Diagnosis of *PMM2*-CDG Can Benefit from the Identification of Modifiers. *InteARNtional jouARNI of molecular sciences*, 19(8), 2218. <https://doi.org/10.3390/ijms19082218>
 53. Schiff, M., Roda, C., Monin, M. L., Arion, A., Barth, M., Bednarek, N., Bidet, M., Bloch, C., Boddaert, N., Borgel, D., Brassier, A., Brice, A., Bruneel, A., Buissonnière, R., Chabrol, B., Chevalier, M. C., Cormier-Daire, V., De Barace, C., De Maistre, E., De Saint-Martin, A., De Lonlay, P. (2017). Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French

- patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *JouARNI of medical genetics*, 54(12), 843–851. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104903>
54. Love, D. C., & Hanover, J. A. (2005). The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(312), re13. <https://doi.org/10.1126/stke.3122005re13>
55. Cline, A., Gao, N., Flanagan-Steet, H., Sharma, V., Rosa, S., Sonon, R., Azadi, P., Sadler, K. C., Freeze, H. H., Lehrman, M. A., & Steet, R. (2012). A zebrafish model of PMM2-CDG reveals altered neurogenesis and a substrate-accumulation mechanism for N-linked glycosylation deficiency. *Molecular biology of the cell*, 23(21), 4175–4187. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0411>
56. Nagy, T., Balasa, A., Frank, D., Rab, A., Rideg, O., Kotek, G., Magyarlaki, T., Bogner, P., Kovács, G. L., & Miseta, A. (2010). O-GlcNAc modification of proteins affects volume regulation in Jurkat cells. *European biophysics journal : EBJ*, 39(8), 1207–1217. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0573-3>
57. Huang, J. B., Clark, A. J., & Petty, H. R. (2007). The hexosamine biosynthesis pathway negatively regulates IL-2 production by Jurkat T cells. *Cellular immunology*, 245(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.03.006>
58. Vuillaumier-Barrot, S., Hetet, G., Barnier, A., Dupré, T., Cuer, M., de Lonlay, P., Cormier-Daire, V., Durand, G., Grandchamp, B., & Seta, N. (2000). Identification of four novel PMM2 mutations in congenital disorders of glycosylation (CDG) la French patients. *JouARNI of medical genetics*, 37(8), 579–580. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.8.579>
59. Andreotti, G., Cabeza de Vaca, I., Poziello, A., Monti, M. C., Guallar, V., & Cubellis, M. V. (2014). Conformational response to ligand binding in phosphomannomutase2: insights into inborn glycosylation disorder. *The Journal of biological chemistry*, 289(50), 34900–34910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586362>
60. Aguilar, H., Fricovsky, E., Ihm, S., Schimke, M., Maya-Ramos, L., Aroonsakool, N., Ceballos, G., Dillmann, W., Villarreal, F., & Ramirez-Sanchez, I. (2014). Role for high-glucose-induced protein O-GlcNAcylation in stimulating cardiac fibroblast collagen synthesis. *American jouARNI of physiology. Cell physiology*, 306(9), C794–C804. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00251.2013>
61. Marshall, S., Nadeau, O., & Yamasaki, K. (2004). Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels. *The JouARNI of biological chemistry*, 279(34), 35313–35319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404133200>
62. Schleicher, E. D., & Weigert, C. (2000). Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney inteARNtional. Supplement*, 77, S13–S18. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x>
63. Vasconcelos-Dos-Santos, A., Loponte, H. F., Mantuano, N. R., Oliveira, I. A., de Paula, I. F., Teixeira, L. K., de-Freitas-Junior, J. C., Gondim, K. C., Heise, N., Mohana-Borges, R., Morgado-Díaz, J. A., Dias, W. B., & Todeschini, A.

- R. (2017). Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway. *Oncogenesis*, 6(3), e306. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.2>
64. Vega, A. I., Pérez-Cerdá, C., Abia, D., Gámez, A., Briones, P., Artuch, R., Desviat, L. R., Ugarte, M., & Pérez, B. (2011). Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations. *JouARNI of inherited metabolic disease*, 34(4), 929–939. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9328-2>
65. Serrano, M., de Diego, V., Muchart, J., Cuadras, D., Felipe, A., Macaya, A., Velázquez, R., Poo, M. P., Fons, C., O'Callaghan, M. M., García-Cazorla, A., Boix, C., Robles, B., Carratalá, F., Girós, M., Briones, P., Gort, L., Artuch, R., Pérez-Cerdá, C., Jaeken, J., ... Pérez-Dueñas, B. (2015). Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment. *Orphanet jouARNI of rare diseases*, 10, 138. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0358-y>
66. Yuste-Checa, P., Gámez, A., Brasil, S., Desviat, L. R., Ugarte, M., Pérez-Cerdá, C., & Pérez, B. (2015). The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein. *Human mutation*, 36(9), 851–860. <https://doi.org/10.1002/humu.22817>
67. Andreotti, G., Monti, M. C., Citro, V., & Cubellis, M. V. (2015). Heterodimerization of Two Pathological Mutants Enhances the Activity of Human Phosphomannomutase2. *PLoS one*, 10(10), e0139882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139882>
68. Schollen, E., Keldermans, L., Foulquier, F., Briones, P., Chabas, A., Sánchez-Valverde, F., Adamowicz, M., Pronicka, E., Wevers, R., & Matthijs, G. (2007). Characterization of two unusual truncating PMM2 mutations in two CDG-Ia patients. *Molecular genetics and metabolism*, 90(4), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.01.003>
69. Vuillaumier-Barrot, S., Barnier, A., Cuer, M., Durand, G., Grandchamp, B., & Seta, N. (1999). Characterization of the 415G>A (E139K) PMM2 mutation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia disrupting a splicing enhancer resulting in exon 5 skipping. *Human mutation*, 14(6), 543–544. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(199912\)14:6<543::AID-HUMU17>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(199912)14:6<543::AID-HUMU17>3.0.CO;2-S)
70. Van Schaftingen, E., & Jaeken, J. (1995). Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS letters*, 377(3), 318–320. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01357-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01357-1)
71. Grünwald, S., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Jaeken, J., & Matthijs, G. (2001). High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *American jouARNI of human genetics*, 68(2), 347–354. <https://doi.org/10.1086/318199>
72. Chan, B., et al (2016). A mouse model of a human congenital disorder of glycosylation caused by loss of PMM2. *Human molecular genetics*, 25(11), 2182–2193. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw085>
73. Matthijs, G., Schollen, E., Pardon, E., Veiga-Da-Cunha, M., Jaeken, J., Cassiman, J. J., & Van Schaftingen, E. (1997). Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-

- deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature genetics*, 16(1), 88–92. <https://doi.org/10.1038/ng0597-88>
74. Westphal, V., Enns, G. M., McCracken, M. F., & Freeze, H. H. (2001). Functional analysis of novel mutations in a congenital disorder of glycosylation Ia patient with mixed Asian ancestry. *Molecular genetics and metabolism*, 73(1), 71–76. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3174>

12.0 ANEXOS

12.1 Reportes de pacientes con PMM2-CDG y mutaciones más comunes

Tabla S1. Efecto de algunas mutaciones frecuentes en pacientes con PMM2-CDG en la actividad enzimática de la proteína.

Mutación	Efecto	Actividad enzimática	Referencia
p.R123Q	Afecta la actividad catalítica de la enzima	Nula	(Vega et al. 2011)
p.R141H			
p.D209G			
p.P113L	Afecta la formación de dímeros	Residual	(Andreotti et al. 2015)
p.T118S		Residual	
p.F119L		Residual	
p.E93A		NR	
p.V44A	Delección en exón 8	Residual	(Schollen et al. 2007)
p.D65Y	Afecta estabilidad estructural	Residual	(Vega et al. 2011)
p.F157S		Nula	
p.F207S		Nula	
p.C241S		Residual	
p.V231M	Afecta plegamiento y estabilidad estructural	Residual	(Schollen et al. 2007, Lao et al 2019)
p.E139K	Delección del exón 5	Residual	(Vuillaumier-Barrot et al. 1999)
p.L32R	Afecta propiedades estructurales y catalíticas	Residual	(Vega et al. 2011)
p.P184T		Nula	
p.T237M		Residual	
p.E197A	NR	normal	(Vega et al. 2011)

Tabla S2. Estudios realizados en PMM2 donde se muestra el número de casos reportados y las mutaciones encontradas, así como la metodología empleada para su diagnóstico.

Casos reportados	País de origen del paciente	Mutaciones	Metodología	Células/tejido analizados	Molécula analizada (DNA, cDNA)	Referencia
13	España	E93A/R141H, .R123Q/C241S, .F157S/C241S, L32R/R141H, R162W/c.523 +3A > G, F157S/R162W, .P113L/D209G, C241S/R141H, T237M/c.640-9T>G, .P113L/c.353C > T +c.550C > A, R123X/I153T, P113L/P113L, E139K/E139K	Resonancia magnética cerebral, medición del diámetro relativo del vermis sagital medio, prueba U de Mann-Whitney, análisis Mutacional	Sangre venosa	cDNA	(Serrano et al.2015)
22	España	IVS3-1 G>C/L32R, R141H/V44A, F207S/V44A, V44A /D65Y, R141H/D65Y, IVS7-9 T>G/D65Y, P113L/P113L, R141H/R162W, F157S/R162W, R123Q /F183S, R141H/T226S, R141H/T237M, F157S/T237M, T237M/T237M, R123Q/C241S, R141H/C241S, F157S/C241S	RT-PCR, secuenciación, mutagénesis sitio puntual, expresión heteróloga, western blot, densitometría	Fibroblastos	cDNA	(Vega et al. 2011)
9	España	V44A, D65Y, P113L, R123Q, R141H, R162W, F207S, T237M, C241S	Cromatografía de exclusión de tamaño, fluorimetría diferencial de barrido, western blot, ensayos de actividad enzimática en un sistema de expresión heteróloga, modelo murino	Fibroblastos	cDNA	(Yuste-Checa et al. 2015)
54	Bélgica	R141H/C241S, L32R/R141H, R123Q/T226S, F157S/C241S, R141H/T237M, R239W/F157S, R141H/H195R, E151G/R141H, R141H/R162W, R239W/F157S, R141H/E197A, R141H/D65Y, R141H/V231M, N216W/N216I, P113L/F157S, D65Y/D65Y, I132T/R141H, F119L/F119L, F157S/T237M, IVS3+2>T/H218L, R123Q/I153T, V44A/R123Q, R141H/V231M, P69S/R141H, V44A/R141H, V129M, F119L/R141H, P113L/T237M, R141H/V231M, P113L/R141H, D188G/R141H, P113L/R123Q, Y76C/F206T, D65Y/R123Q, D65Y/F157S,	Tf-IEF, análisis de SSCP, secuenciación directa.	Fibroblastos y leucocitos	DNA genómico	(Grünwald et al. 2001)
6	Belgica	ND	Enzayo enzimático	Fibroblastos, leucocitos, hígado	ND	(Van et al. 1995)
16	Diversos	R141H/N216I, V129M/R162W, F119L/R162W, R141H/T237M, R141H/V231M, Y106C/R141H, P113L/R141H, A108V/R141H, F119L/R141H, R141H/R162W	Clonación, Northern blot, Southern blot, Hibridación in situ, análisis de mutaciones por SSCP	Fibroblasto, linfoblastos, línea células BB99	cDNA	(Matthijs et al 1997)

1	Filipinas/ Camboya	L104V, IVS1-1G>A	Tf-IEF, ensayos enzimáticos, Secuenciación, expresión exógena en <i>S.Cerevisiae</i>	Secuenciación	cDNA y DNA genómico	(Westphal et al. 2001)
96	Francia	D65Y, L32R, 139K, R141H/V129M, R141H/C9Y, R141H/V231M, R141H/Gly214S, R141H/C241S, V231M/R141H, E65Y/R141H, E65Y/F157S, V231M/F207S, F119L/R141H, D139K/R141H	Isoelectroenfoque de transferrina, secuenciación de Sanger	Leucocitos mononucleados, fibroblastos de piel	ND	(Schiff et al. 2017)
19	Estonia	R141H, V231M, R239W, V67M, T237R	Secuenciación de genoma completo por Illumina HiSeq X Ten, isoelectroenfoque de transferrina	NR	gDNA	(Vals et al. 2018)
11	Francia	T226S, C9Y, L32R, C241S	Secuenciación exómica, ensayo de restricción, RT-PCR	Fibroblastos de piel, sangre	cDNA	(Vuillaumier-Barrot et al. 2000)
2	Francia	E139K, R141H	Secuenciación exómica, ensayo de restricción, RT-PCR	Fibroblastos de piel, sangre	cDNA	(Vuillaumier-Barrot et al. 1999)
2	España	V231M, V44A	Secuenciación directa, RT-PCR, Western Blot	Fibroblastos	DNA genómico y cDNA	(Schollen et al. 2007)

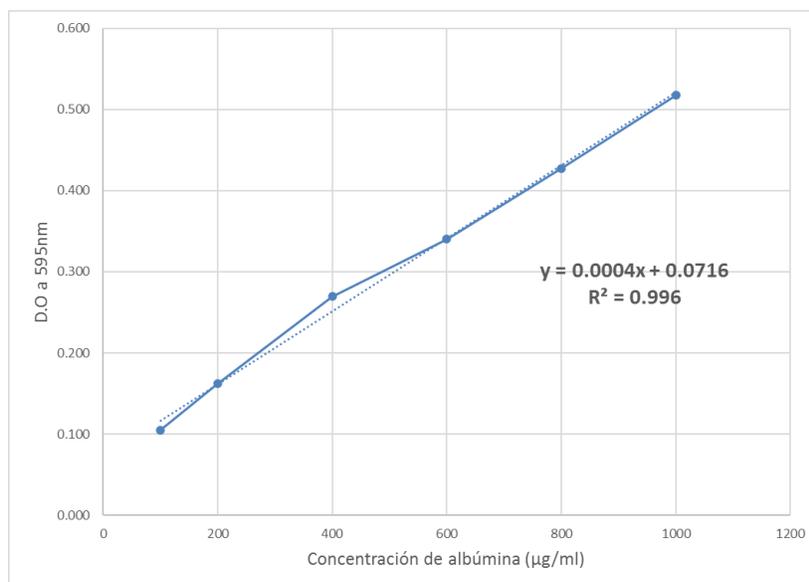
12.2 Ensayo Bradford.

Se disoluciones seriadas de albúmina sérica bovina a partir de un stock 10mg/ml. Cada una de las alícuotas contenía una concentración de 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.2 mg/ml, y fueron preparadas como se describe en la sección de metodología. La medición de la densidad óptica de cada muestra se hizo por triplicado y se graficó el promedio de las tres mediciones para obtener la curva de calibración. A partir de esta se obtuvo la ecuación de la recta con la que se determinó la concentración proteica de las muestras problema.

Tabla S3. Medición de la densidad óptica (D.O.). S.D= Desviación estándar

BSA (ug/ml)	D.O. 1	D.O. 2	D.O. 3	Promedio	S.D.
0	0.000	0.000	0	0.000	0.000
100	0.109	0.101	0.104	0.105	0.003
200	0.162	0.162	0.161	0.162	0.001
400	0.272	0.267	0.267	0.270	0.002
600	0.34	0.34	0.347	0.340	0.003
800	0.436	0.419	0.418	0.428	0.008
1000	0.518	0.517	0.518	0.518	0.00047871

Gráfica S1. Curva de Calibración de BSA,



12.3 Condiciones SDS-PAGE

El gel que se usó para resolver las muestras de proteína constaba de dos partes: 1) gel stacking, que corresponde a la parte superior y permite la formación de bandas definidas y 2) gel de resolución, que corresponde a la parte inferior y separa las proteínas con base en su tamaño. Los componentes del gel stacking y del gel de resolución se enlistan en la tabla S4; y los componentes del buffer laemmly y el buffer de corrida se enlistan en la tabla S5.

Tabla S4. Composición del gel de electroforesis.

Reactivo	Resolución	Stacking
H ₂ O mQ,	3.33 mL	3.100 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	3.33 mL	650 µL
Buffer Tris 1.5 mM, pH 8.8	3.33 mL	-
Buffer Tris pH 0.5 mM, pH 6.8	-	1.250 mL
Ácido persulfónico (APS) 10%	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL
Composición Buffer Tris		
Buffer Tris 1.5 mM, pH 8.8	22.714 g de Tris más 0.5 g de SDS (0,4%) disueltos en 125mL de agua destilada.	
Buffer Tris pH 0.5 mM, pH 6.8	6.0579 g de Tris más 0.4 g de SDS (0,4%) disueltos en 100mL de agua destilada.	

Tabla S5. Composición de los buffers a utilizar durante la electroforesis y la transferencia.

Buffer Laemmly	Buffer de corrida	Buffer de Transferencia
<ul style="list-style-type: none"> • 4% SDS • 10% β-Mercaptoetanol • 20% Glicerol • 0.004% Azul de bromofenol • Tris-HCl 0.125 M 	<ul style="list-style-type: none"> • Tris base 25 mM • Glicina 190 mM • 0.1% SDS 	<ul style="list-style-type: none"> • Tris base 25 mM • Glicina 190 mM • 20% Metanol

12.4 Análisis densitométrico

Tabla S6. Nivel de OGA

Tubulina (intensidad)	Muestra	Intensidad (OGA)	Normalización con tubulina	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto a C1)	% (Respecto a C1)
36003.924	C1	10230.388	0.284146472	1	0.451451284	100.00	45.15
29034.439	P1	4397.853	0.151470225	0.533070931	0.240655556	53.31	24.07
8865.803	C2	5580.196	0.629406722	2.215078428	1	221.51	100.00
19254.631	P2	30562.681	1.587289884	5.58616783	2.521882639	558.62	252.19
Intensidad promedio							
Muestra	Tubulina	OGA	Normalización con tubulina	Proporción	%		
Control	22434.864	7905.292	0.352366396	1	100.00		
P1	29034.439	4397.853	0.151470225	0.429865692	42.99		
P2	19254.631	30562.681	1.587289884	4.504657371	450.47		

Tabla S7. Nivel de OGT

Muestra	Tubulina	Normalización	OGT	Proporción respecto a C1	%
C1	38185.158	12637.175	0.330944683	1	100.00
P1	36820.078	24543.179	0.666570533	2.014144862	201.41
P2	45225.794	41934.673	0.927229116	2.801764659	280.18

Tabla S8. O-GlcNAc total

Muestra	Intensidad (tubulina)	Sumatoria	Normalización	Proporción (con C1)	Proporción (con C2)	% Respecto C1	% Respecto C2
C1	63794.593	206099.268	3.230669847	1	0.913829757	100.00	91.38
P1	62525.522	204531.858	3.271173938	1.012537366	0.925286775	101.25	92.53
C2	63853.3	225741.096	3.535308214	1.094295729	1	109.43	100.00
P2	62907.936	262447.234	4.171925685	1.291350055	1.180074107	129.14	118.01
INTENSIDAD							
MUESTRA	C1	P1	C2	P2			
250 kDa	20266.175	7424.146	9812.752	24286.903			
130 kDa	10908.154	14565.924	10018.48	22789.497			
100 kDa	12934.024	25175.752	20794.894	31338.803			
75 kDa	34704.995	36718.874	33700.945	32005.246			
55 kDa	34140.669	22506.685	31897.48	20634.974			
~45 kDa	14078.589	10105.359	14843.125	16042.53			
>35 kDa	19596.882	21653.317	27429.388	29008.267			
35 kDa	22593.116	23572.874	34000.702	29248.317			
<35 kDa	20588.468	26896.752	24910.196	30476.773			
25 kDa	16288.196	15912.175	18333.134	26615.924			
Sumatoria	206099.268	204531.858	225741.10	262447.23			
	Intensidad	Tubulina	Normalización	Proporción	%		

Tabla S9. Análisis de bandas individuales O-GlcNAc

100 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
100 kDa	C1	12934.024	1.00	0.62	100.00	62.20	16864.459	63823.9465	0.264234036	1.00	100.00
	P1	25175.752	1.95	1.21	194.65	121.07	25175.752	62525.522	0.40264761	1.52	152.38
	C2	20794.894	1.61	1.00	160.78	100.00	31338.803	62907.936	0.498169309	1.885333607	188.53
	P2	31338.803	2.42	1.51	242.30	150.70					
75 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	34704.995	1.00	1.03	100.00	102.98	34202.97	63823.9465	0.335895567	1	100.00
	P1	36718.874	1.06	1.09	105.80	108.96	36718.874	62525.522	0.587262174	1.095851898	109.59
	P2	32005.246	0.92	0.95	92.22	94.97	32005.246	62907.936	0.50876325	0.949370142	94.94
55 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	34140.669	1.00	1.07	100.00	107.03	33019.075	63823.9465	0.517346174	1	100.00
	P1	22506.685	0.66	0.71	65.92	70.56	22506.685	62525.522	0.35995997	0.695781641	69.58
	P2	31897.48	0.93	1.00	93.43	100.00	20634.974	62907.936	0.328018614	0.634040863	63.40
45 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	14078.589	1	0.949365098	100.00	94.94	14460.857	63823.9465	0.226574159	1	100.00
	P1	10105.359	0.723250801	0.69526829	73.24	69.53	10105.359	62525.522	0.161619746	0.713319414	71.33
	P2	16042.53	1.155559106	1.097047484	115.56	109.70	16042.53	62907.936	0.255015997	1.125529927	112.55
>35 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	19596.882	1.00	0.71	100.00	71.44	23513.135	63823.9465	0.368406159	1	100.00
	P1	21653.317	1.10	0.79	110.49	78.94	21653.317	62525.522	0.346311655	0.940026778	94.00
	P2	29008.267	1.48	1.06	148.02	105.76	29008.267	62907.936	0.461122536	1.251668911	125.17
35 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	22593.116	1	0.65101189	100.00	66.51	28296.909	63823.9465	0.44335881	1	100.00
	P1	23572.874	1.06454236	0.70802839	106.45	70.80	23572.874	62525.522	0.37701203	0.850354209	85.04
	P2	34000.702	1.503530616	1	150.35	100.00	29248.317	62907.936	0.46493843	1.048673036	104.87
<35 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	29248.317	1.312813952	0.873154121	131.28	87.32	22749.332	63823.9465	0.356438817	1	100.00
	P1	20588.468	1.00	0.83	100.00	82.65	26896.752	62525.522	0.43017237	1.206861738	120.69
	P2	30476.773	1.48	1.22	148.03	122.35	30476.773	62907.936	0.484466268	1.359184929	135.92
25 kDa	Muestra	Intensidad	Proporción respecto C1	Proporción respecto C2	% (Respecto C1)	% (Respecto C2)	Intensidad promedio	Tubulina (Promedio)	Normalización	Proporción	%
	C1	16288.196	1.00	0.89	100.00	88.85	17310.665	63823.9465	0.271225237	1	100.00
	P1	15912.175	0.98	0.87	97.69	86.79	15912.175	62525.522	0.254490878	0.938300879	93.83
	P2	18333.134	1.13	1.00	112.55	100.00	26615.924	62907.936	0.423093264	1.559933248	155.99

Tabla S10. Nivel de ARNm de OGA

Intensidad (OGA)	Normalización	Proporción(respecto C1)	Proporción(respecto C2)	% (respecto C1)	% (respecto C2)
67813.831	0.925752484	1	0.978989738	100.00	97.8989738
68678.831	0.945620212	1.021461167	1	102.15	100
71503.709	0.975652737	1.05390237	1.031759605	105.39	103.1759605
71519.002	0.977561881	1.055964632	1.033778538	105.60	103.3778538

Tabla S11. Nivel de ARNm de OGT

Muestra	Intensidad (Actina)	Intensidad (OGA)	Normalización	Proporción(respecto C1)	Proporción(respecto C2)	% (respecto C1)	% (respecto C2)
C1	74340.739	69315.718	0.932405555	1	0.932208387	100.00	93.2208387
C2	74640.81	74656.597	1.000211506	1.072721522	1	107.27	100
P1	74565.395	71596.103	0.960178686	1.029786536	0.959975645	102.98	95.99756452
P2	74746.931	70039.567	0.937022645	1.004951805	0.936824501	100.50	93.68245009