



Caracterización de Desórdenes Congénitos de la Glicosilación

Carreto Leandro Grecia, ICBA y Aplicadas. Pérez Castillo Marco Antonio, FCB.

RESUMEN:

Los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG) son enfermedades genéticas multisistémicas causadas por una síntesis deficiente de glicanos. Establecimos el diagnóstico de PMM2-CDG en un niño, desarrollando software y utilizando técnicas bioquímicas y genéticas. Adicionalmente, identificamos estrés en el Golgi de sus fibroblastos, profundizando con ello en la comprensión de los mecanismos patogénicos asociados.

INTRODUCCIÓN:

La glicosilación es un proceso enzimático que sintetiza y une carbohidratos (glicanos) a lípidos, proteínas y ARN, modulando la actividad biológica de estas macromoléculas y definiendo la dinámica de múltiples procesos biológicos. La presencia de variantes patogénicas en genes relacionados con este proceso desencadenan enfermedades conocidas como CDG.

Los tipos de CDG más prevalentes afectan la vía de la *N*-glicosilación, un proceso donde los glicanos se unen a secuencias receptoras específicas (Asn-X-Ser/Thr) de proteínas. Un ejemplo destacado es el PMM2-CDG, causado por variantes patogénicas en *PMM2*, el cual codifica la fosfomanomutasa 2 que convierte Man-6-P a Man-1-P, indispensable para la síntesis de manosa activada en forma de GDP-Man y Dol-P-Man, sustratos donadores de las manosiltransferasas que participan en la síntesis de *N*-glicanos.

Para el diagnóstico de estas enfermedades se comienza generalmente con el análisis de las glicofomas de sialotransferrina a través del isoelectroenfoco de transferrina para identificar

hipoglicosilación, sin embargo, para alcanzar un diagnóstico definitivo, se requieren estudios moleculares adicionales para identificar variantes patogénicas causales.

Debido a la participación de la *N*-glicosilación en el plegamiento proteico las variantes patogénicas en esta vía también tienen como consecuencia la acumulación de proteínas mal plegadas y por consiguiente estrés en el retículo endoplásmico y posiblemente en aparato de Golgi, un tema poco explorado en pacientes PMM2-CDG pero con relevancia por su posible objetivo terapéutico.

OBJETIVO:

Establecer el diagnóstico genético en un niño con enfermedad multisistémica y profundizar en la comprensión de los mecanismos patogénicos.

METODOLOGÍA:

Programa de orientación de diagnóstico con R:

Se construyó una aplicación interactiva utilizando R, empleando una base de datos de genes y sus fenotipos. La interfaz de usuario (UI) se diseñó para introducir datos médicos. Al hacer clic en "Calcular Similitud", activa una función que compara los datos con la base de genes y calcula la similitud. La UI también muestra los resultados: si hay una similitud significativa, se presenta el gen correspondiente.

Isoelectroenfoque de Transferrina sérica (IETf):

El suero del paciente fue sujeto fue migrado por electroforesis en geles de poliacrilamida con anfolitas (pH 5-7) y se realizó electroforesis. Posteriormente se incubó el gel con antitransferrina, se lavó, tiñó y fotografió para el análisis.

Cultivo Celular:

A partir de una biopsia de piel del paciente, se obtuvieron fibroblastos que fueron cultivados en cajas T25 en medio D-MEM a temperatura 37°C.

Extracción de RNA:

A partir de la muestra de células del paciente, se hizo una extracción de ARN con TriZol (TRIzol® Reagent, Ambion® by life technologies) según indica el proveedor. Se cuantificó el RNA utilizando el equipo NanoDrop 2000/2000c a longitudes de onda de 260nm y 280nm.

Síntesis de ADNc:

A partir del ARN extraído se hizo la síntesis de ADNc con el Kit (Thermo Scientific 00342481) metodológicamente.

Amplificación por PCR de *PMM2*, *ACTB* y *ARF4*:

Se realizó una PCR, para amplificar los genes *PMM2*, *ACTB* y *ARF4* haciendo un mix de reacción y la Phusion-fidelity DNA polymerase. El programa de termociclado fue: 98°C desnaturalización, 63°C alineamiento, y 72°C elongación. Para amplificar el gen beta-actina se usó la taq polimerasa convencional el programa de termociclado fue: 95°C desnaturalización, 55°C alineamiento, y 72°C elong. La evaluación de la elongación se realizó en un gel de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron en buffer TAE 1X durante 30 min a 110 V constantes. Se adquirieron imágenes expuestas a luz ultravioleta.

Predictores de SNP:

Se evaluaron diversos predictores de SNP, incluyendo Align-GVGD, que utiliza un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) para caracterizar propiedades bioquímicas de aminoácidos en posiciones; PolyPhen-2, que pronostica el impacto en función y estructura de proteínas humanas por cambios de aminoácidos; y SIFT, que utiliza una matriz de posiciones y evalúa la patogenicidad en base a la conservación de la posición.

Microscopía confocal:

A partir del cultivo de fibroblastos del paciente fueron pasadas a una placa con cubreobjetos estériles; 24 horas después las células fueron preparadas siguiendo la metodología del proveedor para ser incubadas por 12 horas a 4° con una dilución 1:100 del anticuerpo primario GOLGA2. Posteriormente las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 en una dilución 1:1500 y por último con Hoescht para marcar el núcleo celular y se montaron en portaobjetos para ser visualizadas en microscopio confocal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Datos clínicos del Paciente
Discapacidad Intelectual
Atrofia Subcortical
Convulsiones generalizadas
Pezones Invertidos
Bajo tono muscular



Figura 1. Cuadro clínico del paciente junto QR de página web. El QR se dirige a la página web en la cual se colocó el cuadro clínico del paciente. Dando como posible variante patogénica a PMM2-CDG.

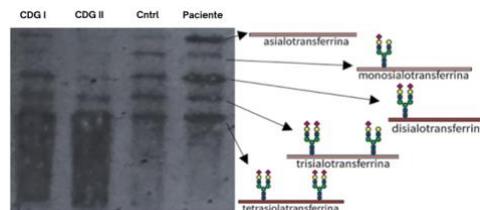


Figura 2. Gel de isoelectroenfoque de transferrina.(1) CDG tipo I (2) CDG tipo II, (3) paciente, (4) Muestra control de paciente sano.

El paciente presentó un isoelectroenfoque de transferrina anormal correspondiente a un CDG tipo I. Debido a su correspondencia clínica con PMM2-CDG, el CDG más frecuente, se

procedió a amplificar y secuenciar *PMM2* a partir de ADNc, el cual fue sintetizado a partir de ARN extraído de cultivos celulares.

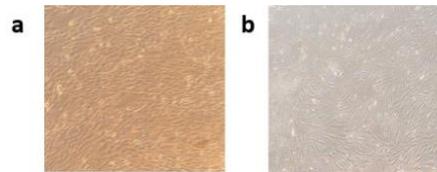


Figura 3. Establecimiento de cultivo de fibroblastos. Muestra del paciente con PMM2-CDG (b) y control sano (a), cultivados en medio D-MEM. La fotografía fue tomada a 10X/0.25 Ph1. Se obtuvo un cultivo de fibroblastos de una persona sana y el paciente, en los cuales se obtuvo un buen crecimiento y confluencia del 90-100%.

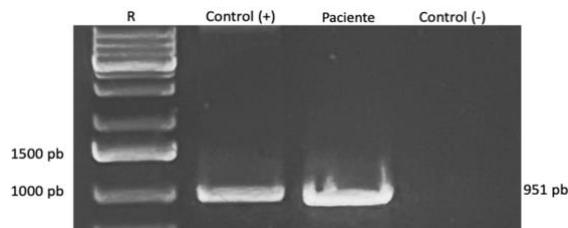


Figura 4. Gel de amplificación por PCR.(1) Control positivo. (2) Muestra de PMM2 del Paciente . (3) Control negativo. Se observa que la banda correspondiente a *PMM2* (951 pb) tiene el mismo peso molecular que el control positivo. Posteriormente, se secuenció y se identificaron variantes patológicas de *PMM2* en ambos alelos.

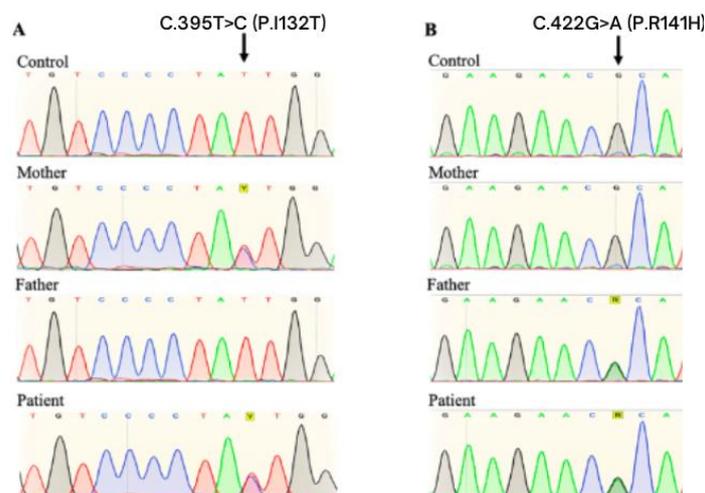


Imagen 5. Cromatogramas. Resultados de la secuenciación exómica, encontrando a dos genes con las variantes patogénicas R141H y I132T.

Las mutaciones c.395T>C (p.I132T) y c.422G>A (p.R141H) reducen la actividad de la proteína hasta en 20%, lo cual es confirmado por los predictores.

Predictor	R141H	I132T
Align GVGD	C25	C65
Poliphen-2	Patologica	Patologica
SIFT	Pérdida de función	Pérdida de función

Tabla 2. Predictores de SNP. Resultados de tres predictores diferentes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

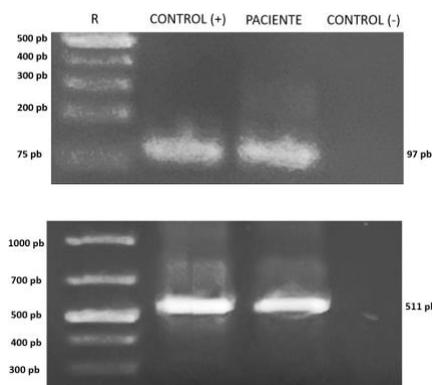


Figura 6. Expresión de *ARF4*. Amplificación del gen beta-actina para normalización (511 pb) y de *ARF4*, marcador de estrés en Golgi (97 pb) a partir del ADNc del paciente.

Para caracterizar el estrés de Golgi se amplificó *ARF4* a partir de ADNc del paciente y de control. Se observó una mayor expresión de *ARF4* en el paciente, sugiriendo que presenta estrés en Golgi.

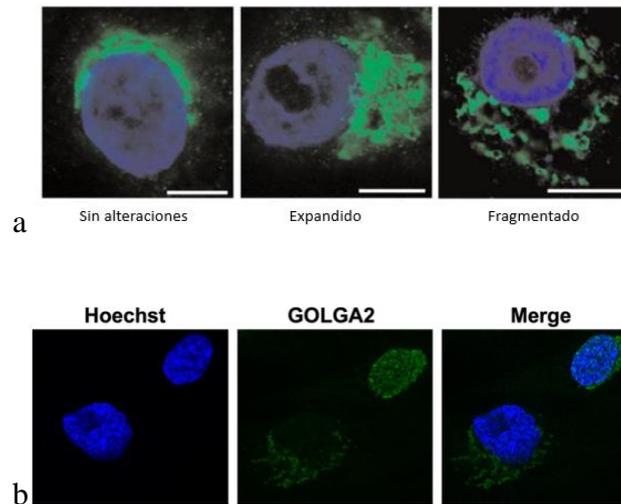


Figura 7. Microscopía confocal. Tinción de núcleo (Hoechst) y aparato de Golgi (GOL.GA2) en fibroblastos del paciente (b), DOI: 10.1134/S0006297919120083 (a).

Se realizó inmunotinción para visualizar el aparato de Golgi por medio de microscopía confocal. Se observa una aparente fragmentación del Golgi en fibroblastos del paciente, indicando estrés en el organelo.

CONCLUSIONES:

- Se desarrolló un software predictivo de diagnóstico que sugirió PMM2-CDG como etiología de la enfermedad multisistémica en un niño.
- Se identificaron dos variantes patogénicas en PMM2 confirmando el diagnóstico.
- Se identificó un mayor nivel de expresión en el paciente de *ARF4*, marcador de estrés en Golgi, asociado a fragmentación en el organelo, sugiriendo que el estrés en Golgi es un mecanismo patogénico en PMM2-CDG.

BIBLIOGRAFÍA:

- Pérez-Aguilar, et al. (2013). O-glicosilación incompleta en células cancerígenas y parásitos: Importancia biomédica. *Salus*, 17(2), 58-67. Recuperado el 17 de julio de 2023.
- Manrique-Hernandez, S. et al. (2021, September). Los Desórdenes congénitos de la Glicosilación.

- Sarkar, R. et al. Essentials of glycobiology - NCBI bookshelf. National Library of medicine.
- Machamer, CE (2015). El complejo de Golgi en el estrés y la muerte. *Fronteras en neurociencia* , 9 , 421
- Martínez-Duncker, I, et al. (2014). ATP6V0A2 mutations present in two Mexican Mestizo children with an autosomal recessive cutis laxa syndrome type IIA. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 1 (1), 203–212.
- Reiling, J. H. et al. (2013). A CREB3-ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1473–1485.
- González-Domínguez, C. A. et al. (2020). Identification through exome sequencing of the first PMM2-CDG individual of Mexican mestizo origin. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*.