



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad De Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL GEN *PIGX* Y SU
PROTEÍNA Y SU IMPLICACIÓN EN LOS PROCESOS
CELULARES. Revisión bibliográfica

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciado en Biotecnología

PRESENTA

Angeles Torres Valdetano

Director de tesis

Dra. Lorena Milflores Flores

Co- Director de tesis

Dra. Laura Patricia Martínez Morales

Fecha de examen: Junio/2023

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Glicosilación

La glicosilación es un proceso enzimático fundamental que ocurre en todas células y que consiste en la síntesis de estructuras sacáridas llamadas glicanos (Ramírez, 2021). Estas moléculas se encuentran en la superficie celular de las arqueobacterias, eubacterias y organismos eucariotas (Li et al., 2021) y la secuencia y estructura de los glicanos diferirá dependiendo del organismo (Varki et al., 2022). Los glicanos son moléculas complejas tridimensionales constituidas por sacáridos y polisacáridos (Varki et al., 2022) que se encuentran unidos entre sí por enlaces glicosídicos (Ramírez, 2021). Los glicanos pueden estar en forma libre, como los glicosoaminoglicanos o conjugados por enlaces covalente a proteínas, lípidos y ácido ribonucleico para formar glicoconjugados formando glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos, anclas de GPI y glicoARN (Ramírez, 2021).

Los genes que codifican para proteínas y enzimas involucradas en este proceso se denominan glicogenes (Akase et al., 2019) (Schjoldager et al., 2020) y en humanos existen alrededor de 700 glicogenes (Schjoldager et al., 2020).

En eucariotas, la síntesis y transferencia de glicanos ocurre en el citoplasma, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi y en la superficie celular (Varki et al., 2022). En el caso de los humanos, la glicosilación es crítica, ya que en la etapa embrionaria su ausencia es letal y mutaciones en glicogenes pueden alterar la respuesta inmunitaria, permitir el escape de virus o promover procesos metastásicos en cáncer (Reily et al., 2019).

Debido a la gran diversidad de glicanos, estos tienen diferentes funciones, una de ellas es como barrera permeable solo a determinadas moléculas, también exhiben funciones organizacionales y estabilizadoras ya que proporcionan estabilidad estructural tanto a nivel molecular como celular (Bürgi, et al., 2021), también los glicanos constituyen una herramienta recurrente entre diferentes tipos de virus en

su interacción con las células, así como en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Mora et al., 2021)

1.2 Enzimas que participan en la formación de glicanos

Existen diversas enzimas que participan en las síntesis de glicanos, como enzimas activadoras de monosacáridos que serán transferidos a estructuras glicánicas, así como glicosiltransferasas y glicosidasas que se encargan de sintetizar y remodelar para obtener glicanos maduros (Varki et al.,2022).

1.2.1 Glicosiltransferasas (GTs)

Las glicosiltransferasas son las enzimas responsables de la formación del enlace glicosídico (Cruz, 2019). Son enzimas ubicuas, responsables de toda la diversidad y complejidad de glicanos y glicoconjugados que se encuentran en los diferentes organismos (Cruz, 2019). Hay una gran cantidad y variedad de glicosiltransferasas, y se clasifican según el monosacárido que es transferido, generalmente a partir de un azúcar unido a un nucleótido; y el sustrato sobre el que actúan (Navarro, 2021) que involucran a carbohidratos, proteínas, lípidos, ADN, además de numerosas moléculas pequeñas como antibióticos, flavonoides y esteroides (Cruz, 2019).

Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de azúcares provenientes de moléculas donantes activadas a moléculas aceptoras específicas, para formar un enlace tipo O-, N-, o C- glicósido el cual puede ser parte de un monosacárido, oligosacárido o polisacárido (Cruz, 2019), aunque la mayor parte de ellas intervienen en la glicosilación para la formación de glicoconjugados, figura 1 (Navarro, 2021).

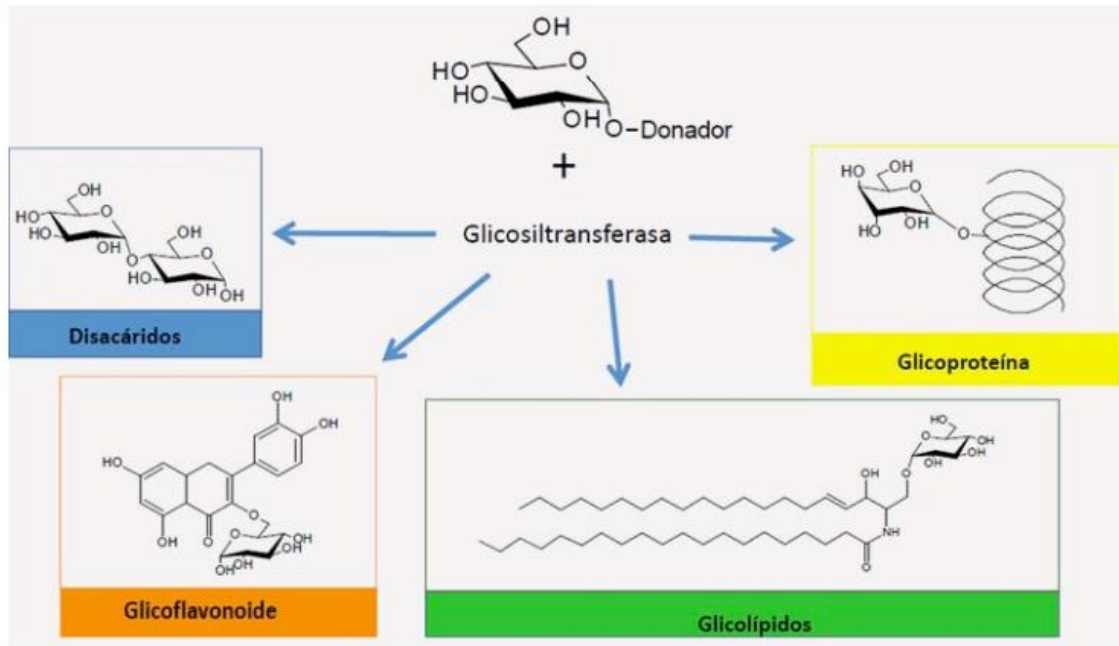


Figura 1: Transferencia de azúcares por las enzimas glicosiltransferasas a moléculas aceptoras en las que se encuentran: proteínas, lípidos y otros monosacáridos

Figura modificada de Cruz, 2019.

1.2.2 Glicosidasas

Las glicosidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico presente en glicanos y glicoconjugados. Sus funciones comprenden desde la degradación de polisacáridos como el almidón, glucógeno o quitina, hasta, el catabolismo lisosomal de glicoconjugados y la biosíntesis de glicoproteínas presentes en las membranas celulares hasta la remodelación de glicanos para la obtención de glicanos maduros (Bailen,2019; Pingitore, 2021).

1.3 Precursores de glicosilación

Como se mencionó anteriormente, para que las glicosiltransferasas puedan sintetizar glicanos se necesitan moléculas donantes activadas, y para ello sus precursores suelen ser monosacáridos, principalmente glucosa y fructosa, ya que mayoría de los organismos pueden sintetizar los otros monosacáridos a partir de estas fuentes (Varki et al., 2022). Los monosacáridos se importan a la célula

mediante diferentes mecanismos, uno de ellos son los transportadores de difusión facilitada independientes o dependientes de energía (Bürgi et al., 2021). Los monosacáridos deben activarse a un donante de alta energía para su uso en la síntesis de glicanos (Varki et al., 2022). Este proceso requiere nucleósidos trifosfatos, típicamente UTP o GTP y un glicosil-1-P (monosacárido con un fosfato en el carbono anomérico). Pueden ser activados por una cinasa o generados a partir de un azúcar nucleótido activado previamente sintetizado (Varki et al., 2022).

En las células eucariotas, la activación de los monosacáridos y las interconversiones ocurren principalmente en el citoplasma (Varki et al., 2022). Los transportadores específicos de azúcares de nucleótidos llevan donantes de azúcares activados al aparato de Golgi y, en menor medida, al ER, tabla 1 (Varki et al., 2022).

Molécula energética a la que se une el carbohidrato

Hexosa	Forma activa
Glucosa	UDP
Galactosa	
N-acetilglucosamina	
N-acetilgalactosamina	
Xilosa	
Manosa	GDP
Fucosa	
Ácido siálico	CMP

Tabla 1: Hexosas y sus formas activadas que participan en la glicosilación de la mayoría de los glicanos

1.4 Glicoconjugados: Proteoglicanos, glicoproteínas y glicolípidos

Los glicoconjugados se forman a través de la glicosilación y son uno de los constituyentes principales de las células de mamíferos (Shivatara, et al., 2022). Son el resultado de la unión covalente entre carbohidratos y otras biomoléculas como proteínas, lípidos, ADN, y otros carbohidratos, en donde el carbohidrato constituyente del complejo se conoce como glicano (Ramirez, 2021). Las tres clases principales de glicoconjugados son los proteoglicanos, las glicoproteínas y glicolípidos (Shivatara, et al., 2022)

1.4.1 Proteoglicanos

Los proteoglicanos se componen de una proteína "central" y una o más cadenas de un tipo especial de polisacáridos denominados glicosoaminoglicanos (GAG), los cuales se encuentran constituidos por un aminoazúcar y ácido urónico (Varky et al., 2022; Bürgi et al., 2021). Específicamente la unión ocurre entre el grupo hidroxilo de un residuo de serina y la xylosa del extremo reductor del polisacárido (Bürgi et al., 2021). Esta familia de glicoconjugados tiene una amplia variedad de funciones, relacionadas tanto con la inflamación como con la fibrosis, la regulación de colágenos, además funciones relacionadas con la adhesión celular y las interacciones de los ligandos, que vinculan la matriz extracelular con la señalización intracelular (Meen et al., 2023). Una característica importante de los proteoglicanos son sus cadenas GAG unidas, que pueden unirse y modular las actividades de una amplia variedad de proteínas, incluidos los factores de crecimiento, las quimiocinas y los inhibidores de la proteasa (Meen et al., 2023).

1.4.2 Glicoproteínas

Las glicoproteínas son compuestos orgánicos formados a partir de proteínas y carbohidratos (Naseri et al., 2020). Cuando las proteínas se unen una o varias cadenas de glicanos forman un enlace covalente, el cual puede clasificarse en varios tipos (Schjoldager et al., 2020), a continuación, se describirán los más comunes:

- **N-enlace:** Se refiere a la unión covalente de un donante de glicano preensamblado al átomo de nitrógeno de una cadena lateral de asparagina (Struwe et al., 2019; Reily et al., 2019). Este tipo de glicoproteínas se encuentran en la mayoría de los organismos vivos donde tienen un papel importante en la regulación de muchas funciones intracelulares y extracelulares (Reily et al., 2019).

Algunos ejemplos de enlaces-N son la galactosilación, GlcNA-silación, sialilación y fucosilación, por lo tanto el tipo de carbohidrato determinan si la estructura final se clasifica como un *N*-glicano con alto contenido de manosa, un *N*-glicano híbrido o un complejo *N*-glicano (Reily et al., 2019).

- **O-enlace:** Ocurre en el aparato de Golgi, (Reily et al., 2019) donde los residuos de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) o *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc) (Struwe et al., 2019) se agregan a los residuos de a los grupos hidroxilo de la serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) (Bürgi et al., 2021). El *O*-glicano se extienden mediante la adición paso a paso de galactosa (Gal), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y *N*-ácido acetilneuramínico (Neu5Ac) (Struwe et al., 2019).
- **C-manosilación:** Es un enlace carbohidrato-proteína que implica la unión de un residuo de α -manosilo al C-2 del Trp a través de un enlace CC. A diferencia de los enlaces *N*-y *O*-glicósilo, este enlace glicopeptídico no implica un grupo funcional aminoácido. (Spiro, 2002).

1.4.3 Glicolípidos

Un glicolípidido es un carbohidrato que está unido covalentemente a un lípido. Los glicolípidos son estructuras biomoleculares en la bicapa de fosfolípidos de la

membrana celular cuyo componente carbohidrato se extiende al exterior de la célula (Bonilla, 2022). Debido a su gran composición los glicolípidos se dividen en 3 grupos:

- **Glicoesfingolípidos:** Se componen de un carbohidrato y un esfingolípido unidos entre sí por un enlace glucosídico (Milla, 2020). Dentro de este grupo de glicolípidos hay una subclasificación donde se encuentran los cerebrósidos, globosidos y gangliósidos
- **Glicoglicerolípidos:** Consisten de un residuo glicosídico y uno o más residuos acilos unidos a través de una molécula de glicerol (Paredes et al., s.f)
- **Glicosilfosfatidilinositol:** Es un glicolípidio complejo sintetizado en el retículo endoplásmico mediante una ruta conservada (Yadav, 2018).

Estos glicoconjugados ofrecen un amplio repertorio de funciones, pues juegan un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos como reguladores de la vida media de proteínas circulantes, agentes de protección, lubricación, favorecedores del funcionamiento del sistema nervioso (del Campo, 2019) y patológicos, como la metástasis celular, la transducción de señales, la adhesión intercelular, la inflamación y la respuesta inmunitaria (Xu et al., 2021)

El conjunto de glicanos que se encuentran en las glicoproteínas, incluidas las proteínas ancladas en glicosilfosfatidilinositol (GPI) y los proteoglicanos, junto con los glicolípidos y los oligosacáridos y polisacáridos libres, constituye el glicoma de una célula, y el conjunto de glicoconjugados en la superficie celular constituye la glicocálix (Schjoldager et al., 2020).

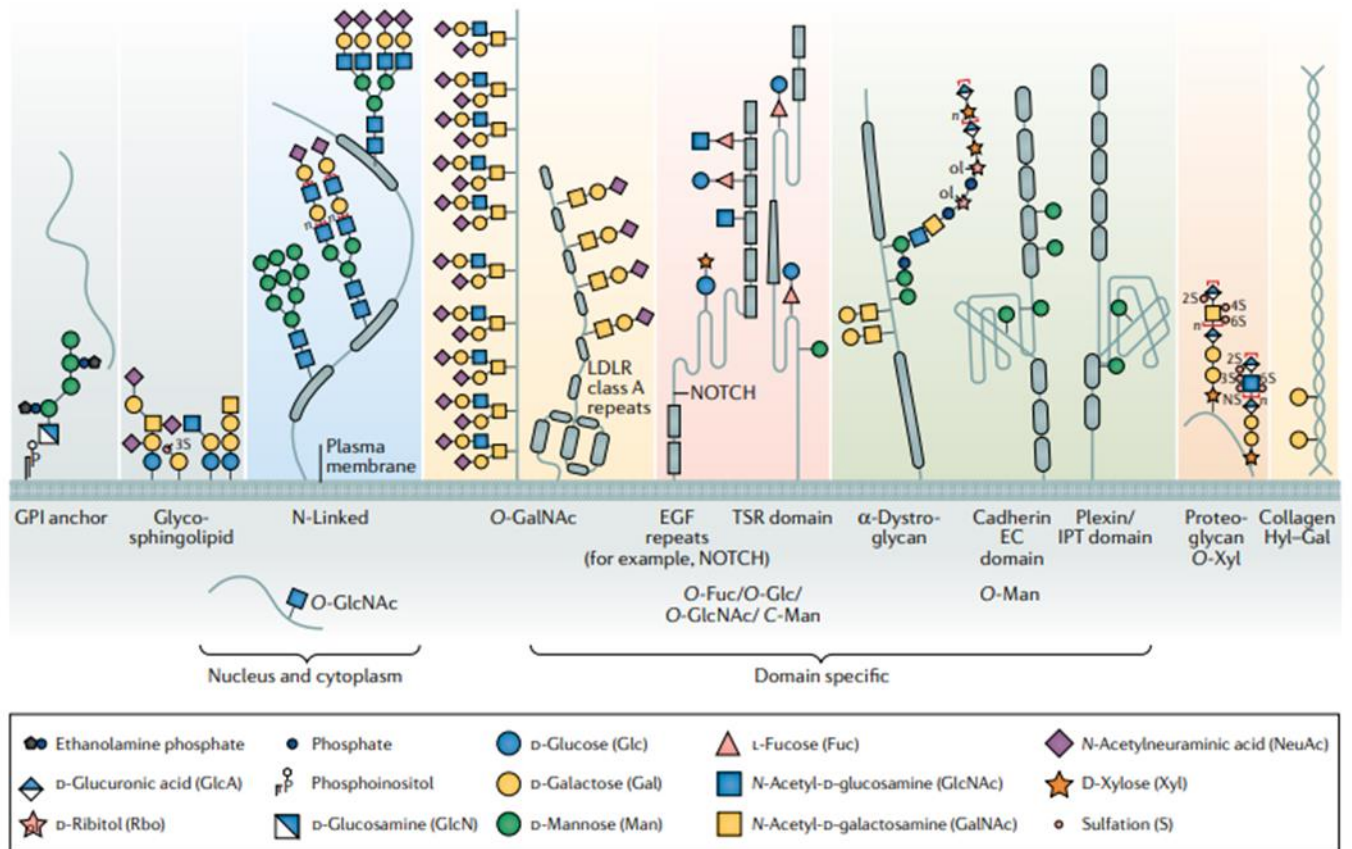


Figura 2: Principales clases de glicoconjugados del glicoma celular humano. Figura modificada de (Xu et al, 2021).

1.5 Estructura general del GPI

El GPI tiene una estructura central altamente conservada en la evolución (18, 19), consiste en una molécula de fosfatidilinositol (PI) que está anclado a la membrana celular y se le une un glicano glucosamina (GlcN), seguido de 3 manosas (Man) y varias unidades de etanolamina-fosfato (EtNP), lugar donde se puede unir la proteína blanco por su extremo C-terminal mediante un enlace amida (2, 18), esta unión ocurre en el RE (Kinoshita, 2020; Liu et al., 2021; Varki et al., 2022;). Existen alrededor de 30 glicogenes implicados en la síntesis de GPI, y entre ellos, las proteínas de la biosíntesis del glicano-fosfatidilinositol (PIG) por sus siglas en inglés *Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis protein* que participan en las primeras

fases de la síntesis del glicolípido (Kinoshita ,2020). Se ha reportado niveles elevados de proteínas ancladas a GPI en plasma de diversos tipos de cáncer (Dolezal et al., 2014).

1.6 Alteración de glicosilación en cáncer

Las alteraciones en las glicoproteínas, glicoesfingolípidos y proteoglucanos son características comunes de las células cancerosas (Pinho, y Reis, 2015). Se ha descrito que las alteraciones ocurren entre los primeros cambios de una célula durante su transición hacia la neoplasia, uno de esos cambios es la modificación de moléculas glicosiladas. (Gorocica et al., 2008). Los cambios de glicanos en las células malignas toman una variedad de formas, que va desde la pérdida de expresión o expresión excesiva, alteración en la actividad de la enzima, aumento de la expresión de glicanos incompletos o truncados y, con menor frecuencia, aparición de nuevos glicanos (Bellis et al., 2022).

Así, el estudio de uno varios genes que participan en la glicosilación ayudarán a comprender si las alteraciones en los glicanos se pueden deber a cambios a nivel transcripcional o traduccional.

2. ANTECEDENTES

2.1 Expresión de glicogenes en cáncer cervicouterino

Un estudio realizado por el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) en el 2017 reveló que el cáncer cervicouterino es diverso desde la perspectiva molecular (TCGA 2017). Además, un estudio reciente del grupo de investigación de biología molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS reveló que la expresión de glicogenes es diversa en cáncer cervicouterino, sugiriendo que el glicoma de este tipo de cáncer puede ser diverso (Martínez-Morales et al.,2021). Asimismo, los resultados de este estudio revelaron que la expresión de un conjunto de glicogenes podría ser útil para identificar pacientes con tumores más agresivos (Martínez-Morales et al., 2021). Entre los glicogenes alterados en cáncer cervicouterino se encuentran aquellos que están implicados en la síntesis de GPI (Martínez-Morales et al., 2021).

2.2 Expresión de PIGX en Cáncer cervicouterino (CaCu)

Resultados de un estudio *in silico* de expresión de glicogenes en cáncer cervicouterino sugieren que el glicogen *PIGX*, de la familia *Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis protein*, podría funcionar como biomarcador pronóstico (Caballero Bahena, 2022). Los resultados indican que pacientes con altos niveles del ARNm de *PIGX* tienen mayor probabilidad de supervivencia en comparación con pacientes que tienen niveles bajos del ARNm (Caballero Bahena, 2022; The Human Protein Atlas). Sin embargo, se desconoce cómo podría estar regulada su expresión.

2.3 Participación de PIGX en el cáncer de mama

De forma opuesta a CaCu, la alta expresión del gen PIGX en cáncer de mama está asociada a menor supervivencia de las pacientes y ensayos en líneas celulares indican que la expresión de PIGX promueve la proliferación de las células cancerosas (Nakakido et al., 2016). Además, resultados de ensayos de interacción de proteínas, de silenciamiento de genes y de expresión génica indican que PIGX estaría formando un complejo con las proteínas RCN1 y RCN2 del RE y podrían estar regulando negativamente la expresión de dos genes supresores de tumores, ZIC1 y EHD2, y contribuir así a la carcinogénesis (Nakakido et al., 2016). Estos datos sugieren que PIGX podría estar ejerciendo otras funciones celulares con otras proteínas, además de la ruta de síntesis de GPI.

2.4 Regulación de la expresión de PIGX

Hasta ahora no se han descrito los mecanismos de regulación de *PIGX*, por esta razón, el grupo de investigación identificó la posible región promotora (figura 3) (Xicale et al., 2020) y se realizó un análisis *in silico* de los niveles de metilación de la posible región promotora del gen *PIGX* en pacientes con cáncer cervicouterino (González-García, 2022). Los resultados sugieren que la metilación de dos posiciones del posible promotor de *PIGX* podría tener un papel relevante con los niveles del ARNm del glicogen (González-García, 2022).

Región de la potencial secuencia promotora del gen *PIGX*

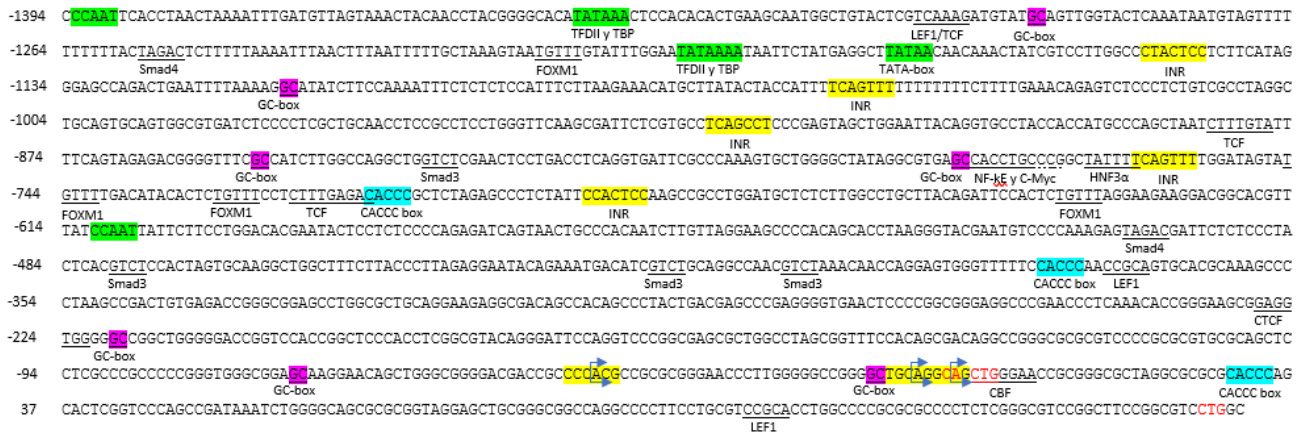


Figura 3: Secuencia promotora del glicogen *PIGX* (Xicale 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de glicogenes se ha vuelto el estudio de interés de varios investigadores, debido a que cambios en su expresión podría provocar glicosilaciones alteradas. Un rasgo común en cáncer es la alteración de la glicosilación donde ciertas glicoproteínas y glicolípidos juegan un papel importante en la progresión, recurrencia y quimio resistencia de esta enfermedad (Armbrister et al., 2023)

PIGX es un glicogen que está involucrado en la síntesis de glicosilfosfatidilinositol y su expresión parece ser relevante para cáncer de mama y cervicouterino. Existen datos que sugieren que podría estar ejerciendo otras funciones además de participar en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol y se desconoce los mecanismos de regulación del gen.

Por lo anterior mencionado, esta investigación se centra en recopilar toda la información del gen *PIGX* y su respectiva proteína, ya que, aunque participa en un proceso de glicosilación, se ha subestimado su importancia y su posible relación con el cáncer cervicouterino.

Es así como, ante la ausencia de investigaciones del gen *PIGX*, este trabajo cobra relevancia, pues se dará a conocer todo un conjunto de datos en donde se resalta el valor del gen, además de un apartado experimental en donde se pretende clonar

de la región promotora y reguladora del gen, y así poder tener más alcance sobre su información y pueda trascender a futuras investigaciones

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar mediante revisión bibliográfica y herramientas bioinformáticas las características del gen *PIGX* y su proteína, así como su implicación en los procesos celulares.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar las características del gen *PIGX* mediante herramientas bioinformáticas y revisión bibliográfica.
- Examinar la expresión de ARNm de *PIGX* y de la proteína en diferentes tejidos.
- Analizar la estructura terciaria de la proteína *PIGX* mediante herramientas bioinformáticas.
- Determinar las diferencias que existen entre las isoformas de la proteína *PIGX* usando alineamientos de aminoácidos.
- Identificar al gen *PIGX* y su proteína en diferentes especies.
- Analizar la relación de la proteína *PIGX* con otras proteínas.
- Determinar la participación del gen *PIGX* en diferentes enfermedades.
- Clonar la posible región promotora del gen *PIGX*.

5. METODOLOGÍA

Parte 1.

5.1 Búsqueda bibliográfica

Se ocuparon varias plataformas como lo fue Google Académico, PudMed, Elsevier, ScienceDirect, Nature, Plos One y Wiley, en donde se recopilaron la mayor parte de artículos tanto de revisiones como experimentales, en donde el criterio de búsqueda fue “Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class X sin discriminación de fechas u otros filtros.

5.2 Localización del gen *PIGX* en el genoma humano

Para obtener la localización del gen *PIGX* se utilizó la base de datos NCBI, en donde a partir de la búsqueda del gen “*PIGX* fosfatidilinositol glicano ancla biosíntesis clase X [*Homo sapiens* (humano)]” con el ID: 54965, se observó en que cromosoma se encuentra, la posición y el tamaño del gen.

5.3 Variantes de ARNm del gen *PIGX*

A partir de la búsqueda de “Gen: *PIGX* ENSG00000163964” en la base de datos Ensembl (se obtuvo el número de variantes que se encuentran descritas para el gen, además de mostrarse los pares de bases, también encontramos el número de aminoácidos y el biotipo

5.4 Isoformas de la proteína *PIGX*

Para hallar las isoformas que se encuentran descritas en la literatura, se ocupó la base de datos UNIPROT, en donde se utilizó la entrada “Q8TBF5 · *PIGX_HUMAN*”, aquí se identificaron las secuencias de aminoácidos de las isoformas, su masa, y las modificaciones postraduccionales que tiene.

5.5 Estructura terciaria de la proteína *PIGX*

Para la observación de la estructura terciaria de la proteína se empleó la plataforma AlphaFold DB (Jumper et al.,2021) con la entrada “Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class X protein”, aquí se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína, datos generales y el nivel de confianza del modelo.

5.6 Gen *PIGX* y su proteína en otros organismos

En el análisis de este apartado se ocuparon 3 bases de datos, las cuales son NCBI, en donde se muestra información sobre el linaje, Ensembl, aquí se da a conocer los ortólogos de la proteína y TreeFarm, una plataforma que muestra un árbol filogenético de la proteína.

5.7 Otras potenciales funciones de *PIGX*

Para el estudio de otras posibles funciones de *PIGX* se utilizó la plataforma BIOGRID (Oughtre et al., 2021) en donde se muestra la interacción física que hay entre la proteína de interés y otras proteínas, también muestra el nombre de la enzima, en que organismo se encuentra y las funciones que tiene.

Por otro lado, se ocupó la plataforma de STRING (Szklarczyk et al., 2023), aquí se recopilarán datos de varios tipos de artículos para dar información de redes de interacción entre proteínas a través de diagramas gráficos.

5.8 Expresión del gen y la proteína *PIGX* en diferentes tejidos de humano

A fin de encontrar en que tejidos se expresa el gen y la proteína se destinaron como búsqueda diferentes plataformas, el primero fue GTexPortal aquí se muestra la expresión génica específica de un tejido a través de gráficos.

Por otra parte, se revisó la plataforma The Human Protein Atlas (Uhle et al., 2017), que da a conocer la expresión de ARNm y de la proteína del gen. En este caso proporciona la información mediante graficas de barras.

5.9 Implicación de *PIGX* en diferentes enfermedades

Se inicio con la base de datos de Genecards (Stelzer et al., 2017), en donde muestra toda la información relevante de el gen, aquí mismo se halló la plataforma Open Targets (Ochoa et al., 2023), que reúne información sobre posibles enfermedades en donde puede estar implicado el gen.

Además de esta base de datos también se usó PudMed, Google Academic, Elsevier, Nature, entre otras, para la búsqueda de los artículos relacionados con las enfermedades.

Parte 2

5.10 Extracción de ADN genómico

Se utilizó el protocolo “DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)” del Kit QIAamp DNA Blood Mini. Este protocolo es para la purificación del ADN total (genómico, mitocondrial y viral) desangre total, plasma, suero, linfocitos y fluidos corporales.

Se inició con el pipeteo de 40 µl de proteasa QIAGEN (o proteinasa K) en el fondo de un tubo eppendorf de 1.5 ml, después se le agrega 400 µl de la muestra de sangre previamente extraído y guardo en un tubo EDTA (tapa lila). Seguido se le agregó 400 µl de buffer AL a la muestra y se mezcló en un vórtex durante 15 s. Se incubó a 56°C durante 10 min. Después se centrifugó brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa. Se añadió 400 µl de etanol (96–100 %) a la muestra y se mezcló de nuevo mediante agitación (vortex) durante 15 s. Después de mezclar, se centrifugó para eliminar gotas desde el interior de la tapa. Se añadió con cuidado la mezcla a una la columna de centrifugación QIAamp Mini (en un tubo de recogida de 2 ml) sin mojar el borde. Después se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min., se desechó el filtrado y se colocó en un tubo de recolección limpio de 2 ml.

Se abrió con cuidado la columna de centrifugación y se añadió 500 µl de buffer AW1 sin mojar el borde. Se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min y see colocó la columna en un tubo de recolección limpio de 2 ml. Se añadió 500 µl de buffer AW2 sin mojar el borde. Se cerró la tapa y se centrifugó a máxima velocidad (14 000 rpm) durante 3 min. Finalmente se colocó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml y se desechó el tubo de recolección que contiene el filtrado. Se añadió 50 µl de buffer de agua destilada e incubo a temperatura ambiente (125 °C) durante 5 min y luego centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Se volvió a repetir el paso de elución, ahora con 30 ml de buffer

AE e se incubó durante 2 min y centrifugo, finalmente se realizó una tercera elución con 20 ml de buffer AE e incubó durante 1 min y se centrifuó.

Después de la última elución se colocó inmediatamente en hielo y se resuspendió muy bien para medir la concentración.

5.11 Reacción de PCR punto final

Para la reacción de PCR se utilizaron dos pares de oligos, unos de 755pb y otros de 1396pb, los cuales fueron dados por el Centro Biomédico de Oriente (CIBIOR), además de MasterMix 2x de la marca Promega, tabla X se muestran los oligos para amplificar 1396 pb y en la tabla X se muestran los oligos para amplificar 755 pb, además se muestran sus condiciones de uso.

Secuencia de oligos para 1396 pb	
FW	GGTACCACACACTGAAGCAATGGC
RV	AAGCTTGGCTGGGACCGAGTGCT

Para una reacción de 25 µl de volumen final

Reactivo	Volumen	Concentración
PCR Master Mix 2X	12.5 µl	1X
Oligo Fw (10mM)	1.25 µl	0.5 mM
Oligo Rv (10mM)	1.25 µl	0.5 mM
ADN (165 ng/µl)	1 µl	<250ng
Agua libre de nucleasas	9 µl	-
Volumen final	25 µl	

Las condiciones de la PCR fue las siguientes:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95° C	2 min
Desnaturalización	95° C	60 s
Alineamiento	65° C	60 s
Extensión	72° C	1:40 min
Extensión final	72° C	7 min
Refrigeración	4° C	∞

La reacción se hizo de 30 ciclos ya que da como resultado una amplificación óptima de los productos deseados

Secuencia de oligos para 755 pb	
FW	CTCGAGATGCTCTCTTGGCCTGCTTA
RV	AAGCTTGCGCGCTGCCCCAGATTTAT

Para una reacción de 25 µl de volumen final

Reactivo	Volumen	Concentración
PCR Master Mix 2X	12.5 µl	1X
Oligo Fw (10mM)	1.25 µl	0.5 mM
Oligo Rv (10mM)	1.25 µl	0.5 mM
ADN (165 ng/µl)	1 µl	<250ng
Agua libre de nucleasas	9 µl	-
Volumen final	25 µl	

Las condiciones de la PCR fue las siguientes:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95° C	2 min
Desnaturalización	95° C	60 s
Alineamiento	65° C	60 s
Extensión	72°C	45 s
Extensión final	72° C	7 min
Refrigeración	4° C	∞

La reacción se hizo de 30 ciclos ya que da como resultado una amplificación óptima de los productos deseados

5.12 Electroforesis

Para la realización de la electroforesis se utilizó buffer TBE el cual se preparó un stock una concentración 5X, para después diluirlo a 1X. Se realizó un gel de agarosa al 1 %. Se corrió con buffer TBE al 1X frio, durante 45 minutos a 75 volts.

Para 1L de TBE 5X

Reactivo	Cantidad
Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA (0.5M, pH8)	20 ml

Disolver uno por uno cada reactivo en agitación, para evitar sedimentos posteriores. Una vez ya disuelto se esterilizó en autoclave a 15 libras por 15 minutos.

Para diluir el TBE 5X se ocupó agua estéril.

5.13 Purificación de banda de electroforesis

La extracción de banda se realizó cortando la banda lo más precisa posible, se utilizó el protocolo del Zymoclean gel DNA Recovery Kit.

Antes de comenzar asegúrese que buffer de lavado esté preparado con 96 ml de etanol al 100 % (104 ml de etanol al 95 %) y los 24 ml de concentrado de buffer de lavado. Además de encender el termoblock a 55°C.

Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 12, 000 x g.

Primero se extrajo el fragmento de ADN del gel de agarosa con una hoja de afeitar, bisturí u otro dispositivo y transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Posteriormente se agregó 3 volúmenes de ADB a cada volumen de agarosa extraído del gel (p. ej., para 100 µl (mg) de rebanada de gel de agarosa, agregue 300 µl de ADB. Se dejó incubando a 55 °C durante 10 y luego se mezcló brevemente la muestra por agitación o inversión. La solución de agarosa derretida se transfirió a una columna Zymo-Spin™ en un tubo de recogida. Se centrifugo durante 1 minuto y se desechó el líquido. Después se agregó 200 µl de buffer de lavado de ADN a la columna y se centrifugo durante 30 segundos, se desechó el líquido y se repitió el paso de lavado. Coloque la columna en un tubo de 1,5 ml

Finalmente se añadió 8 ul de agua inyectable al filtro de la columna, se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente y se centrifugo durante 1 minuto, este paso se repitió 2 veces. Se resuspendió cuidadosamente para homogenizar.

5.14 Vector pGL4.12

Para analizar el promotor del gen PIGX su uso el plásmido pGL4.12 el cual contiene al gen reportero de luciferasa luc2CP de Photinus pyralis (luciérnaga), en la figura 4 se muestran las características del vector, el cual presenta un sitio de multiclonación con diferentes tipos de sitios para enzimas de restricción y un gen de

resistencia a ampicilina para poder seleccionar las clonas. Los sitios que se usaran del vector son *HindIII*, *KpnI* y *XhoI*

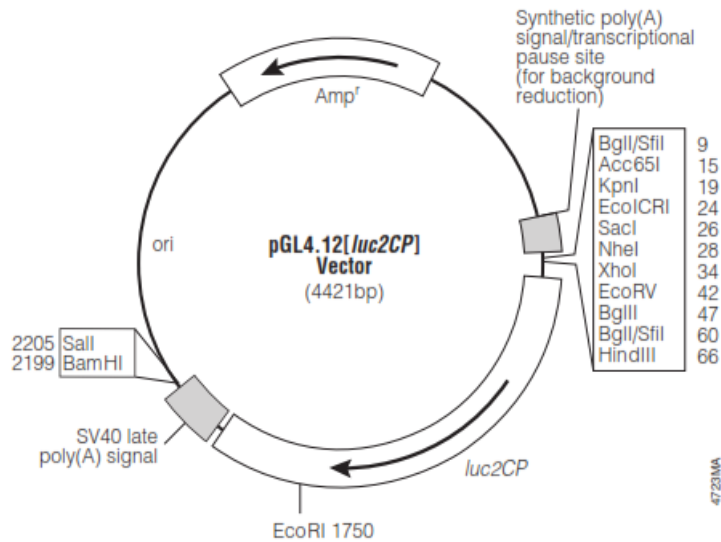


Figura 4. Representación esquemática del vector pGL4.12

5.15 Enzimas de restricción

Se ocuparon las enzimas *HindIII*, *KpnI* y *XhoI* del paquete de FastDigest de la marca Thermo Scientific. El buffer y se sacaba antes del refrigerador y se mantenían en hielo para que se descongelaran gradualmente. Las enzimas se sacaban al momento y se mantenían en hielo, y una vez utilizados se volvían a guardar. A todos los reactivos se les daba un spin para quitar residuos en las tapas. Se realizó una doble digestión ya que las enzimas tenían un buffer único. Se realizó corte tanto para el vector como para los productos de PCR que provienen de la región promotora del gen *PIGX*.

Para una reacción de 20 μ l

Vector pGL4.12	
Vector	0.9 μ g
Buffer 10x	2 μ l

HindIII	10 U
KpnI	10 U
Agua LN	16 µl
Volumen final	20 µl

Fragmento de 1396 pb	
Fragmento	1 µg
Buffer 10x	2 µl
HindIII	10 U
XhoI	10 U
Volumen final	20 µl

Vector pGL4.12	
Vector	0.9 µg
Buffer 10x	2 µl
HindIII	10 U
KpnI	10 U
Agua LN	16 µl
Volumen final	20 µl

Fragmento de 755 pb	
Fragmento	1 µg
Buffer 10x	2 µl
HindIII	10 U
XhoI	10 U
Volumen final	20 µl

La restricción se realizó en un temoblock durante 2hrs a 37°C. Después se corrió en un gel de agarosa al 1 % y se hacía nuevamente extracción de banda siguiendo el protocolo anteriormente mencionado.

5.16 Ligación

Para la ligación se ajustó el protocolo de la T4 ligasa de la marca Thermo Scientific. El buffer se sacaba antes del refrigerador y se mantenían en hielo para que se descongelaran gradualmente. La enzima T4 ligasa se sacaba y se mantenía en hielo solo en el momento que se ocupaba, y después inmediatamente se volvía a guardar. Todos los reactivos recibían un spin para quitar cualquier residuo de la tapa y para homogenizar los reactivos.

La reacción de ligación se ajustó a 20 µl

Fragmento de 1396 pb	16 µl
Vector pGL4. 12 linealizado	0.3 µg
Fragmento de 1396 pb	1 ug

Buffer 10x	2 µl
T4 Ligasa	5 Weiss U/µL
Volumen final	20 µl

Fragmento de 755 pb	16 µl
VectorpPGL4. 12 linealizado	0.3 µg
Fragmento de 755 pb	1 ug
Buffer 10x	2 µl
T4 Ligasa	5 Weiss U/µL
Volumen final	20 µl

Una vez agregados todos los reactivos se resuspende cuidadosamente la reacción para homogenizar. La reacción se llevó a cabo en un termociclador en donde las condiciones se programaron para que la reacción se llevara a cabo durante 3hrs a 21°C y a 4° C toda la noche.

5.17 Preparación de células competentes y transformación

Antes de llevar a cabo la transformación se preparaban las células *E. coli* Top 10 One Shot (F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG) , para poder captar el vector.

El primer día en 10 ml de LB precalentado a 37°C se le añade 2 raspadas o 100 ul de *E. coli* y se incuba por 16 hrs a 37 ° C en agitación.

Al día siguiente del precultivo se toman 500 ul y se pasaron a un tubo con 10 ml de LB precalentado a 37°C (se hace por duplicado). Después se incuban los tubos a 37° C en agitación, dejando un poco abiertas las tapas de los tubos para que pueda entrar oxígeno. Después se mide la densidad óptica (DO), de cada tubo hasta que llegue a los 0.6 - 0.8 de DO. El tubo que haya llegado a la densidad deseada se

pone en hielo inmediatamente para detener el crecimiento, posteriormente se hacen 2 alícuotas de 5 ml cada uno y se centrifuga a 3800 rpm a 4° durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante. Después se le agrega a cada tubo 5 ml de CaCl₂ 1 M frío y se dejan incubando en hielo durante 15 minutos. Luego se volvió a centrifugar a 4000 rpm a 4° C por 10 minutos. Una vez obtenido el paquete celular se le añadió 1 ml de CaCl₂+glicerol al 15% (150 ul de glicerol +850 ul de CaCl₂) y se resuspende perfectamente. Finalmente se hacen 10 alícuotas de 100 ul y se etiquetan.

La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Chang et al., 2017 con unas pequeñas modificaciones.

Primero se descongelaron las alícuotas de 100 ul de *E. coli* competentes que se encontraban a -80°C, una vez descongeladas se le añadió los 20 ul de la reacción de ligación y a la otra alícuota 2µl del vector pGL4.12 diluido 1/100 quedando como el control. Cada alícuota se resuspendió cuidadosamente para poder homogenizar bien las muestras. Después se incubaron en hielo durante 30 minutos, inmediatamente pasado el tiempo se incubaron a 42°C durante 45 segundos (aquí el tiempo debe ser justo). El siguiente paso fue añadir 1 ml de LB precalentado a 37° C en esterilidad, igual se resuspendió para homogenizar, después se llevó a incubar a 37° C durante 1 hora en agitación. Después se centrifugaron las alícuotas a 3900 rpm por 3 minutos a TA, en donde se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Luego en esterilidad se resuspendió el pellet con 100 µl de LB precalentado a 37 °C. Finalmente se sembraron los 100ul de la mezcla en placas de LB con antibiótico ampicilina a una concentración de 50ng/µl, los cuales se dejaron incubando las placas a 37°C durante 16 hrs.

5.18 Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de plásmido se utilizó el protocolo “Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado)” de Alberto Checa Rojas.

Se inicio un día antes inoculando las clonas de *E. coli* con pGL4. *PIGX*1396pb en 3 mL de LB+amp por 16 horas a la temperatura óptima en agitación. Al día siguiente se transfiere 1.5 mL del cultivo a un tubo nuevo estéril y libre de nucleasas y se

centrifugo a 13,000 x g por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se lavó el botón con agua estéril y libre de nucleasas para retirar totalmente el medio de cultivo. Pues el medio de cultivo interfiere con la pureza del ADN. Después se resuspendió el botón celular en 100 µL de RNAsa/TE en un vortex. (TE: 10 mM Tris pH 7.5 y EDTA 1 mM, RNAsa 5 mg/mL). Luego se adiciono 450 µL de NaOH 100 mM/SDS 0.5% y se mezcló por inversión. Se adiciono 225 µL de Acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y se agito por inversión. Se incubo 10 min sobre hielo. Se centrifugo a 14,000 x g a 4°C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se adiciono al sobrenadante 700 µL de etanol frío al 99.9 % y se dio vortex. Se centrifugo a 14,000 x g a 4 °C durante 5 min. Se retiro el sobrenadante y se adiciono 1 mL de etanol al 70 % frio. Se resuspendio con ayuda de un vortex y se centrifugo a temperatura ambiente a máxima velocidad durante 2 min. NOTA: Se repitió 2 veces. Se retiró el sobrenadante y se secó la muestra con una centrífuga con vacío (speed vac). Finalmente, se resuspendio en 50- 100µL de agua ultra pura libre de nucleasas.

6. RESULTADOS y DISCUSIÓN

6.1 Estructura del Glicosilfosfatidilinositol (GPI)

El glicosilfosfatidilinositol (GPI) es un glicolípido anclado a la membrana plasmática, el cual es agregado al extremo C-terminal de una gran variedad de proteínas en eucariotas, lo que permite anclar estas proteínas a la superficie celular (Liu and Fujita, 2020). El GPI tiene una estructura central altamente conservada en la evolución (Liu et al., 2021) que consiste en una molécula de fosfatidilinositol (PI) que está anclado a la membrana celular y que se encuentra unido al glicano glucosamina (GlcN), seguido de 3 manosas (Man) y varias unidades de etanolamina-fosfato (EtNP) (Figura 5, una de las cuales se une a la proteína blanco por su extremo C-terminal mediante un enlace amida (Kinoshita ,2020; Varki et al,

laterales de Man4 y/o GalNAc. Todo el GPI-AP está anclado a la hoja exterior de MP por cadenas de hidrocarburos. Figura modificada de: (Kinoshita, 2020)

6.2 Proteínas que participan en la biosíntesis de GPI

Gen		Función
PIGA	Subunidad A de glicosilfosfatidilinositol-N-acetilglucosaminiltransferasa	Necesario para la síntesis de N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol, el intermediario muy temprano en la biosíntesis del ancla GPI.
PIGC	Subunidad C de glicosilfosfatidilinositol-N-acetilglucosaminiltransferasa	Fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad C; Parte del complejo que cataliza el primer paso de la biosíntesis de GPI.
PIGH	Subunidad H de glicosilfosfatidilinositol-N-acetilglucosaminiltransferasa	Fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad H; Parte del complejo que cataliza el primer paso de la biosíntesis de GPI
PIGP	Subunidad P de glicosilfosfatidilinositol-N-acetilglucosaminiltransferasa	Parte del complejo que cataliza el primer paso de la biosíntesis de GPI.
PIGQ	Subunidad Q de glicosilfosfatidilinositol-N-acetilglucosaminiltransferasa	Parte del complejo que cataliza el primer paso de la biosíntesis de GPI; Pertenece a la familia PIGQ
PIGY	Subunidad Y Fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa	Cataliza la transferencia de N-acetilglucosamina de UDP-N-acetilglucosamina a fosfatidilinositol y participa en el primer paso de la biosíntesis de GPI. Puede actuar regulando la subunidad catalítica PIGA
DPM2	Dodocilfosfato Manosiltransferasa Subunidad 2, Reguladora	Cuando se asocia con el complejo GPI-GnT mejora su actividad, pero no es esencial

PIGL	GPI- desacetilasa	Participa en el segundo paso de la biosíntesis de GPI. Des-N-acetilación de N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol.
PIGW	GPI-Aciltransferasa	Acetila el anillo de inositol del fosfatidilinositol. (504 aa)
PIGM	Manosiltransferasa 1	Involucrada en la biosíntesis de anclaje GPI. Transfiere la primera manosa a GlcN-acil-PI.
PIGX	Manosiltransferasa 1	Transfiere la primera de las 4 manosas en los precursores del anclaje GPI. Probablemente actúa estabilizando la manosiltransferasa PIGM
PIGV	Manosiltransferasa 2	Involucrada en la biosíntesis de anclaje GPI. Transfiere la segunda manosa al glicosilfosfatidilinositol.
PIGN	GPI Etanolamina Fosfato Transferasa 1	Transfiere fosfato de etanolamina a la primera manosa del precursor de glicosilfosfatidilinositol de anclaje GPI
PIGB	Manosiltransferasa 3	Involucrada en la biosíntesis GPI. Transfiere la tercera manosa a Man2-GlcN-acil-PI
PIGF	Fosfatidilinositol Glicano, Clase F	Actúa a través de la transferencia de fosfato de etanolamina a la tercera manosa de GPI
PIGO	Etanolamina fosfato transferasa 1	Implicada en la biosíntesis GPI. Transfiere fosfato de etanolamina a la primera manosa del precursor de GPI.
PIGG	Etanolamina fosfato transferasa 2	Transfiere fosfato de etanolamina a la segunda manosa de GPI.
PIGK	GPI-Transamidasa	Interviene en el anclaje de GPI en el retículo endoplásmico, al reemplazar el péptido señal de unión de GPI C-terminal de una proteína con un GPI preensamblado
GPAA1	Proteína de unión de anclaje GPI 1	Esencial para el anclaje de GPI de proteínas precursoras, pero no para la síntesis de GPI.

		Actúa antes o durante la formación del carbonilo intermedio.
PIGS	Subunidad S GPI Transamidasa	Componente del complejo transamidasa GPI. Esencial para la transferencia de GPI a proteínas, en particular para la formación de intermedios de carbonilo.
PIGT	Subunidad T de GPI-transamidasa	Fosfatidilinositol glicano ancla biosíntesis clase T; Componente del complejo transamidasa GPI. Esencial para la formación de intermedios de carbonilo.
PIGU	Subunidad U GPI Transamidasa	Puede estar involucrado en el reconocimiento de la señal de unión de GPI o la porción lipídica de GPI.

Tabla 2: Función de cada uno de los genes que participan en la biosíntesis del GPI.

Fuente: Gene Cards y Ensembl

6.3 Participación de la proteína **PIGX** en la biosíntesis de GPI

Están descritos 30 genes que codifican para enzimas y proteínas que participan en la síntesis de GPI (Liu et al.,2021) algunos de los cuales pertenecen a la familia de genes Phosphatidylinositol-Glycan Biosynthesis Class identificadas por sus siglas en inglés **PIG** (Tabla 2).

El gen *PIGX* codifica para la proteína GPI-MT-I (glicosilfosfatidilinositol-manosiltransferasa 1) la cual participa en la síntesis del glicolípido GPI, el cual sirve como ancla glico-lipídica para ciertas proteínas de superficie celular. El primer paso de la biosíntesis del glicolípido inicia en el lado citoplásmico del RE por la enzima N-acetilglucosamina transferasa GPI (GPI-GnT), que transfiere el glicano N-acetilglucosamina (GlcNAc) al PI, que se encuentra insertado en la membrana del RE. (Nakamura et al., 2012; Kinoshita, 2020). Posteriormente, en dos pasos independientes, el glicolípido se remodela para generar el glicoconjugado GlcN-(acil) PI, figura 6 (Nakatsukasa, 2021).

En seguida, la molécula se transloca hacia el lado luminal del RE donde se continúa la síntesis del GPI. Así, en los siguientes pasos, se agregan secuencialmente 3 moléculas de Man. La primera Man es añadida por la enzima GPI-MT-I que se encuentra anclado en la membrana del RE y que está formado por dos proteínas: PIGM y PIGX. En este complejo, PIGX actúa como proteína estabilizadora de la enzima PIGM (López et al., 2019 Ashida et al., 2005). Posteriormente en la síntesis de GPI, se añaden la segunda y tercera Man y las moléculas de EtNP (Nakamura et al., 2012; López et al., 2019; Yadav y Khan, 2019; Kinoshita, 2020) y en algunos casos, se adiciona una cuarta Man a la Man3 como una cadena lateral, figura 3 (Kinoshita ,2020)

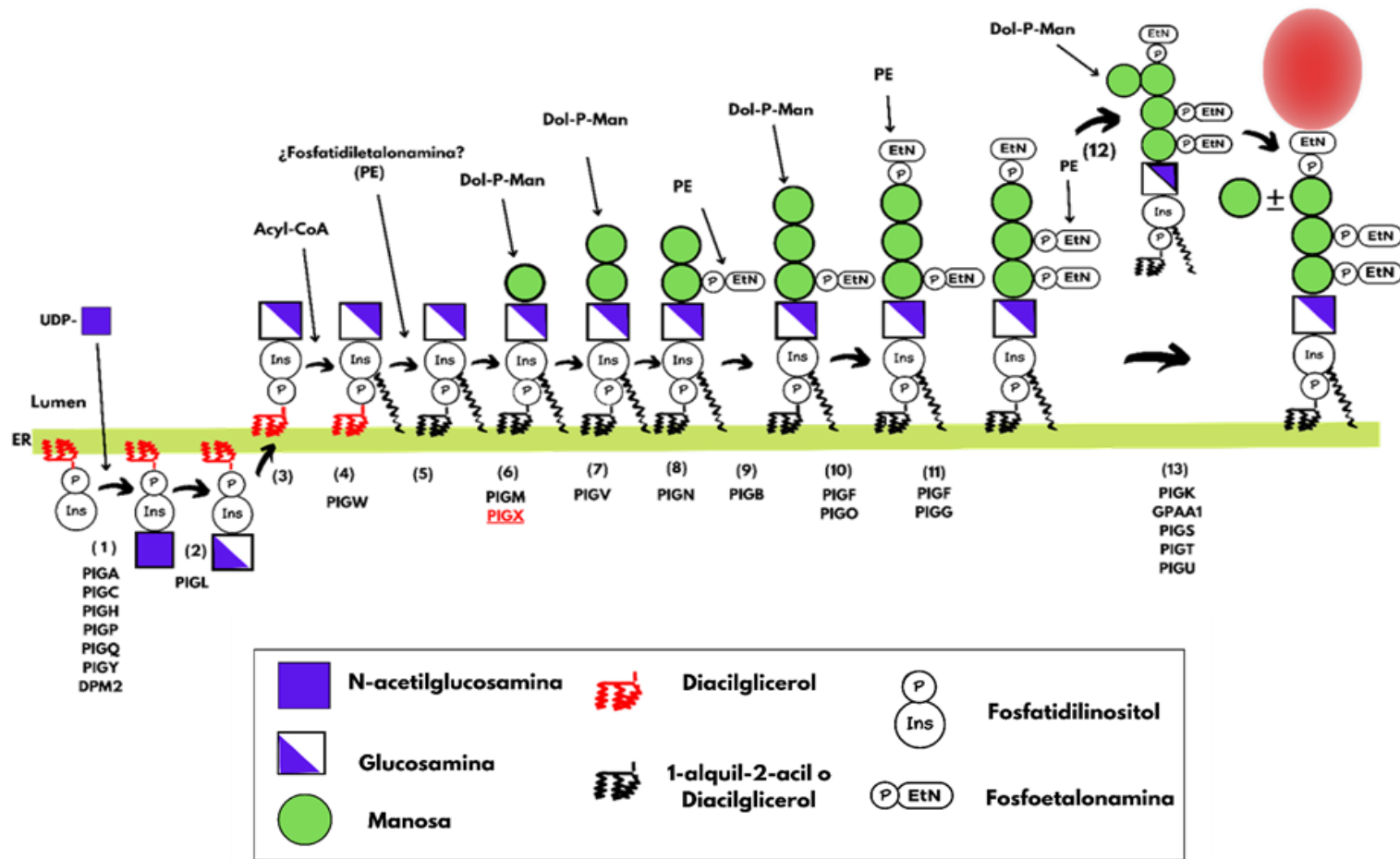


Figura 6: Biosíntesis de GPI de mamíferos en el RE. El precursor de GPI completo competente para unirse a proteínas se sintetiza a partir de PI mediante reacciones paso a paso (1)–(11). El GPI preensamblado se transfiere en bloque a proteínas (paso (13)). Los genes involucrados en estos pasos de reacción se muestran debajo de los números de paso.

Figura modificada de: (Kinoshita, 2020)

Así, la molécula de GPI finalmente madura se une al extremo carboxilo de ciertas proteínas mediante el complejo enzimático GPI-transamidasa (Ashida et al., 2005; Kinoshita ,2020). En seguida, en el aparato de Golgi, el GPI experimenta una remodelación de la región lipídica y una modificación del glicano (Kinoshita ,2020). Finalmente, y siguiendo el transporte vesicular, las proteínas unidas a GPI se transportan a la membrana plasmática donde ejercen su función en balsas lipídicas o donde son liberadas al espacio extracelular (Nakamura et al., 2012).

Notablemente, la falta de función de *PIGX* o *PIGM* provoca la ausencia de expresión de proteínas unidas a GPI en la superficie celular (Ashida et al., 2005; Almeida et al., 2006; Liu et al, 2021). Ensayos de líneas celulares de falta de función de las proteínas implicadas en la ruta biosintética de GPI, revelan que la eliminación de genes de las primeras fases de la síntesis, hasta la adición de la segunda Man, disminuye drásticamente la expresión de proteínas unidas a GPI en la superficie celular (Liu et al., 2021), sugiriendo que la enzima GPI MT-I es esencial para la presencia de estas proteínas en la superficie celular. La ruta biosintética del GPI, descrita anteriormente, está conservada en los organismos eucariotas, sin embargo, existen diferencias sutiles entre mamíferos y otros eucariotas figura 8 (Yadav y Khan, 2018). Por ejemplo, en levaduras y mamíferos, la parte lipídica del GlcN-PI se modifica antes de la adición secuencial de manosas (Cowton et al., 2022), mientras que en el parásito protozoario *T. brucei*, la primera manosa se transfiere antes de la modificación del lípido, (Cowton et al., 2022)

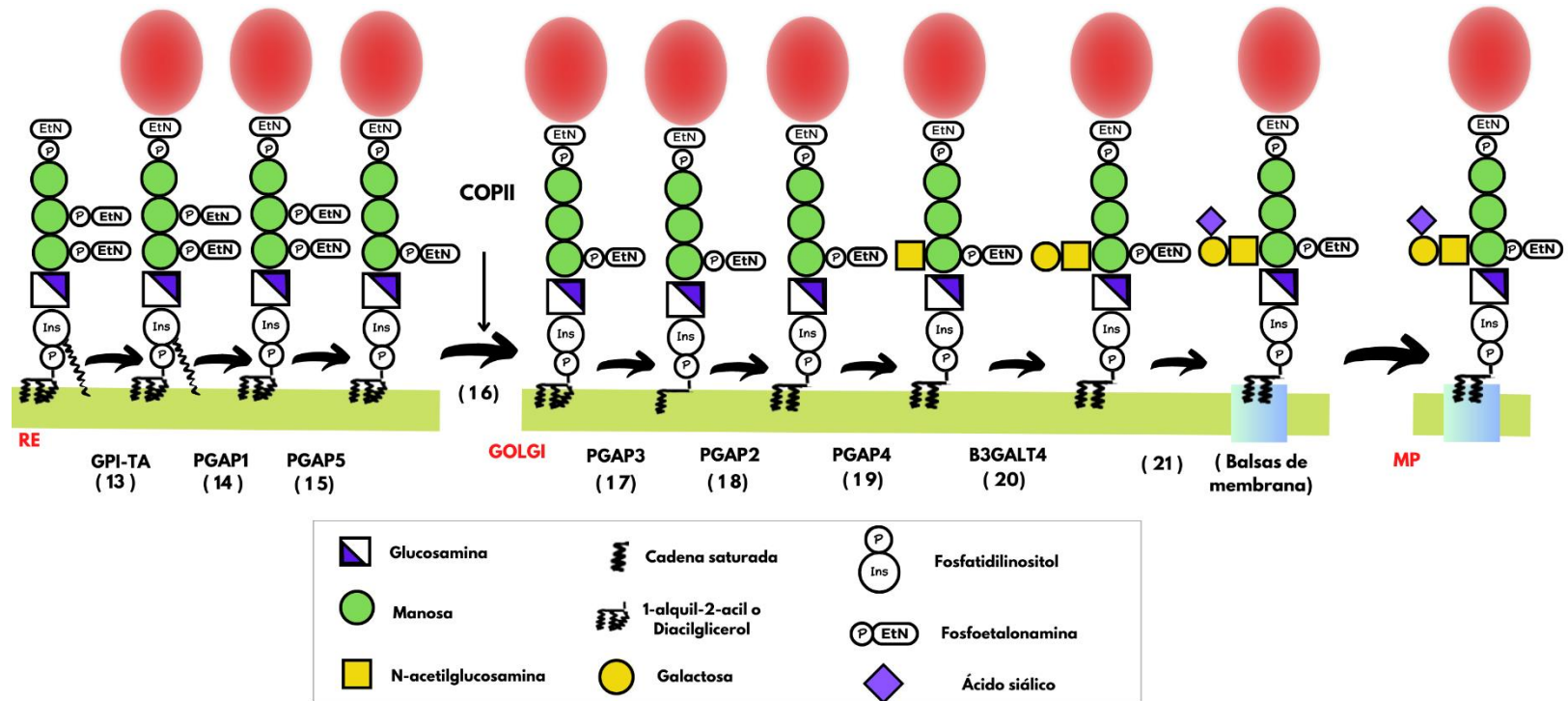


Figura 7: Maduración de GPI-AP de mamíferos durante el transporte RE-MP. Los GPI-AP nacientes generados por la transferencia de GPI a proteínas (paso 12) se someten a dos reacciones, desacilación de inositol (paso 14) y eliminación de la cadena lateral EtNP de Man2 (paso 15) en el retículo endoplasmático (RE). El transporte RE-Golgi de GPI-AP está mediado por vesículas recubiertas de COPII (paso 16). En el aparato de Golgi, los GPI-AP experimentan una remodelación de ácidos grasos (pasos 17 y 18). Algunos GPI-AP son modificados por la cadena lateral de GalNAc (pasos 19 a 21). Los GPI-AP maduros se transportan al MP donde se asocian con microdominios de balsas lipídicas. Figura modificada de: (Kinoshita, 2020)

ejemplo de ello, es la proteína priónica celular patógena (PrPsc) que se expresa en sistema nervioso (Miranzadeh y Taghibiglou, 2020) y que es responsable de las encefalopatías espongiiformes transmisibles (Manni et al., 2020). Además, la interacción mediada por GPI con otros organismos también es relevante para la salud humana. Así, proteínas unidas a GPI de la mucosa intestinal humana median la adhesión a amebas (Yadav and Khan, 2018) y algunas estructuras de GPI de protozoarios y hongos actúan como factores de patogenicidad (Yadav and Khan, 2018). Por ejemplo, en especies de *Plasmodium* se ha identificado un elevado contenido de GPI en la membrana del parásito, siendo esto importante para su supervivencia, adicional a esto, se detectó que expresen lectinas que le ayudan a su ciclo de vida, la adherencia, la invasión y poder evitar el sistema inmunitario de su huésped y por eso que se considera como un factor importante para la patogenicidad del protozoo para provocar malaria. Así mismo la glicocálix y la presencia de lectina por parte del huésped son la primera línea de defensa contra *Plasmodium* (Goerdeler et al., 2021), induciendo una fuerte respuesta humoral y promueve la expresión de genes que participan en la síntesis de moléculas proinflamatorias (Bratting et al., 2008). Asimismo, debido a que puede ser reconocido por anticuerpos presentes en suero (Goerdeler et al., 2021) (Belachew, 2018), una de las aplicaciones biomédicas, ha ido el desarrollo de biomarcadores de exposición y/o inmunidad adquirida a la malaria (Franca et al., 2017). Otras proteínas unidas a GPI con aplicación médica son aquellas que se encuentran en el torrente sanguíneo como el antígeno carcinoembrionario (CEA), mesotelina o la proteína CD52 que son usados actualmente como biomarcadores para cáncer (Liu et al., 2020).

6.5 Localización, variantes de ARNm e isoformas proteicas del gen *PIGX* de humano

El gen *PIGX* se localiza en el cromosoma 3q29, entre las posiciones 196,712,377 y 196,736,007 teniendo un tamaño aproximado de 23,630 bases (NCBI, 2022) (**figura 9**) y están descritas 9 variantes potenciales del ARNm de *PIGX* que provienen de corte y empalme alternativo (Ensembl), sin embargo, solo 2 variantes de ARNm codifican para 2 isoformas proteicas respectivamente (Ensembl, 2022).

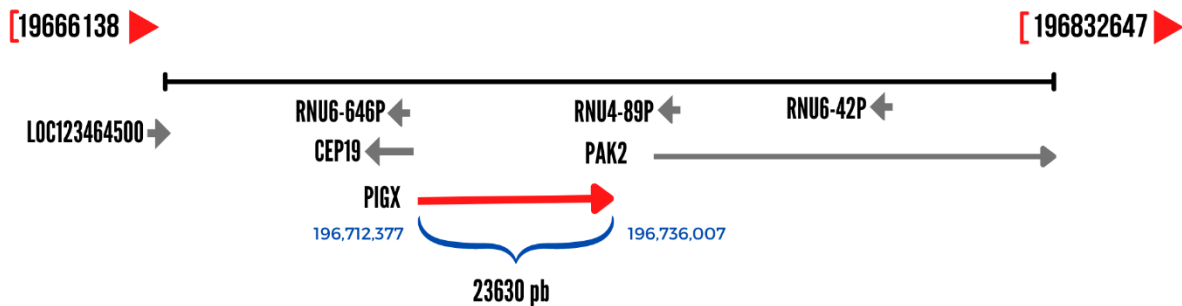


Figura 9: Localización del gen *PIGX*

La isoforma proteica Q8TBF5-1 de *PIGX* es codificada por la variante de ARNm ENST00000392391.9 de *PIGX*; que se caracteriza por tener un tamaño de 258 residuos de aminoácidos y una masa de 28,788 Da (UniProt, 2022). Los aminoácidos 1-21 corresponden al péptido señal, en seguida, los aminoácidos del 22-230 se encuentran solubles en la parte luminal del RE, las posiciones 231-251 están insertadas en la membrana del RE, mientras que los aminoácidos de la región carboxilo terminal del 252-258 se encuentran solubles en el citoplasma ((UniProt, 2022) (Figura 10). Respecto a modificaciones postraduccionales, la proteína *PIGX* puede sufrir una N-glicosilación en la asparagina 103 (UniProt, 2022). Por otra parte, la isoforma Q8TBF5-2 es codificada por la variante de ARNm ENST00000296333.10 de *PIGX*. Esta isoforma tiene un tamaño de 276 aminoácidos y una masa de 30,974 Da y difiere de la variante anterior en las posiciones 177-195 que contiene la secuencia QAGSRRMIRFRFDSFDKTI (UniProt,

2022) (Figura 10) Notablemente, con la clonación del gen PIGX de rata en el 2005, se identificó que el glicogen tiene un codón CTG que actúa como inicio alternativo de la traducción en humanos (Ashida et al., 2005).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp Q8TBF5 PIGX_HUMAN	MAARVAAVRAAAWLLLGAATGLTRGPAAAF TAARSDAGIRAMCSEIILRQEV LKDG FHRD	60
sp Q8TBF5-2 PIGX_HUMAN	MAARVAAVRAAAWLLLGAATGLTRGPAAAF TAARSDAGIRAMCSEIILRQEV LKDG FHRD	60
sp Q8TBF5 PIGX_HUMAN	LLIKVKFGESIEDLHTCRLLIKQDIPAGLYVDPYELASLRERNITEAVMVSENF D IEAPN	120
sp Q8TBF5-2 PIGX_HUMAN	LLIKVKFGESIEDLHTCRLLIKQDIPAGLYVDPYELASLRERNITEAVMVSENF D IEAPN	120
sp Q8TBF5 PIGX_HUMAN	YLSKESEVLIYARRDSQCIDCFQAF LPVHCRYHRPHSE D GEASIVVNNPDLLMFC D Q---	177
sp Q8TBF5-2 PIGX_HUMAN	YLSKESEVLIYARRDSQCIDCFQAF LPVHCRYHRPHSE D GEASIVVNNPDLLMFC D QAGS	180
sp Q8TBF5 PIGX_HUMAN	-----EFPI LK CWAHSEVAAPCALENE D ICQW NKM KYKSVYKNVILQVPV	222
sp Q8TBF5-2 PIGX_HUMAN	RRMIRFRFDSFDKTI EFPI LK CWAHSEVAAPCALENE D ICQW NKM KYKSVYKNVILQVPV	240
sp Q8TBF5 PIGX_HUMAN	GLTVHTSLVCSVTLLITILCSTLILVAVFKYGHFSL	258
sp Q8TBF5-2 PIGX_HUMAN	GLTVHTSLVCSVTLLITILCSTLILVAVFKYGHFSL	276

Figura 10: Alineamiento de las dos isoformas descritas para la proteína de PIGX. Alineamiento múltiple realizado con CLUSTAL. La secuencia canónica de PIGX corresponde a Q8TBF5 y está constituido por 258 residuos de aminoácidos, mientras que la secuencia Q8TBF5-2 está formada por 276 residuos de aminoácidos. La diferencia entre ambas se encuentra en que la isoforma Q8TBF5-2 contiene la secuencia QAGSRRMIRFRFDSFDKTI en las posiciones 177-195. Fuente: EBI (Crustal Omega)

6.6 Estructura terciaria de la isoforma consenso de la proteína PIGX

Respecto a la estructura terciaria de la proteína, su estructura se conoce por predicciones bioinformáticas. La predicción de la estructura se encuentra en la plataforma AlphaFold DB (AlphaFold, 2022), donde se puede concluir que la parte luminal hacia el RE de la proteína consiste en una estructura al azar “random coil” y una región constituida por láminas beta, mientras que la región transmembranal es una única hélice alfa (Figura 11); los datos estructura primaria sugieren que la isoforma de PIGX Q8TBF5-2 podría diferenciarse en la región luminal de láminas beta (Uniprot, 2022).

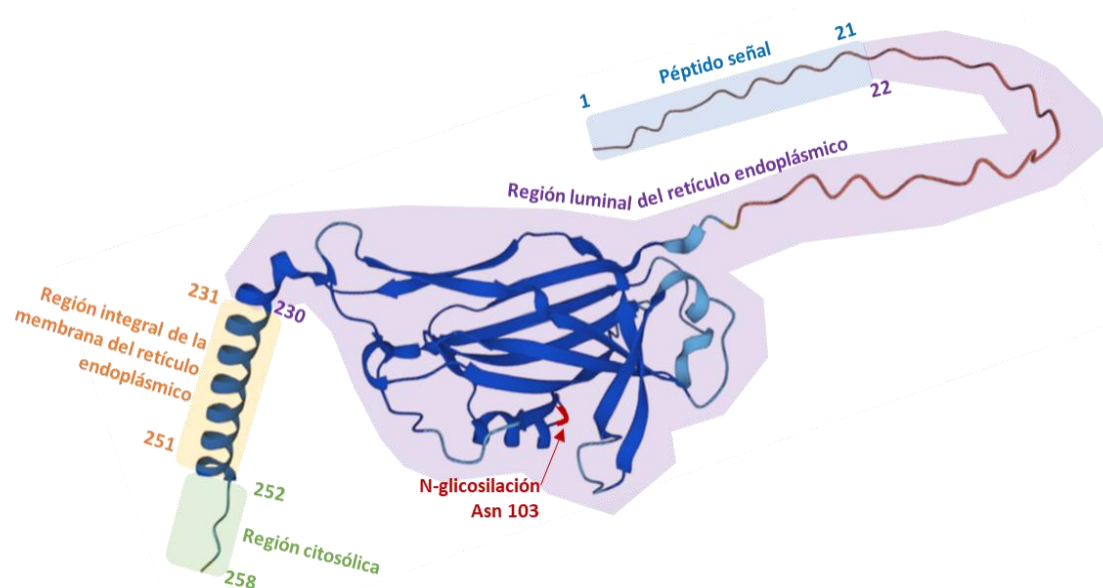


Figura 11: Predicción de la estructura terciaria de la isoforma Q8TBF5 de la proteína PIGX. La proteína se encontraría anclada a la membrana del RE a través de una única hélice alfa formada por los residuos de aminoácidos desde el 231 hasta el 251 (color naranja). En seguida, la región carboxilo terminal desde la posición 252 hasta la 258 estaría localizada en la región citosólica y estaría conformada por una estructura al azar (color verde). La parte luminal hacia el retículo endoplásmico de la proteína estaría formada por una larga región de 308 residuos de aminoácidos, que abarcan desde la posición 22 hasta la 230, y está conformada por una estructura al azar y una región de láminas beta (color morado). La región amino terminal comprende el péptido señal de 21 residuos de aminoácidos (color azul). Figura modificada de: AlphaFold

6.7 Características de la evolución del gen *PIGX* y de la proteína

Con relación a la evolución del gen en el reino animal, la literatura reporta que el gen *PIGX* está presente en el ancestro común de los cordados (Gene Cards, 2022) (NCBI, 2022), sin embargo, la base de datos de Ensembl reporta 192 genes ortólogos, que incluyen invertebrados (Ensembl, 2022) Además, la plataforma TreeFam, que provee información de la evolución de familia de genes (Li et al., 2006), muestra que existen ortólogos de *PIGX* en la mosca de la fruta, el mosquito de *Anopheles gambiae* e incluso en el reino vegetal como es en la planta *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2006) (figura 12). De todos los ortólogos reportados, el gen *PIGX* de orangután tiene una identidad del 96.5 % con el gen humano (Tabla 3) (Ensembl, 2022), mientras que con Pbn1 (*PIGX*) de *S. cerevisiae*, homólogo funcional de *PIGX* y uno de los modelos animales más estudiados como potencial inhibidor de la vía biosintética de GPI, la identidad es del 21.6% con el humano (Protein BLAST, 2022).

Tabla 3: Ortólogos del gen *PIGX* en vertebrados y porcentaje de identidad con el humano.

GRUPO TAXONÓMICO	NÚMERO DE ESPECIES	ESPECIE CON MAYOR IDENTIDAD	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
Mamíferos placentarios	86	Orangután de Sumatra	96.51%
Laurasiatheria	38	Vaca	85.33%
Sauropsida	25	Tortuga gigante de la isla Abingdon	52.07%
Roedores y especies afines	22	Marmota alpina	82.49%
Peces	62	Bacalao	32.52%

Número de especies con genes ortólogos al *PIGX* y organismo de cada grupo taxonómico con mayor identidad con el gen humano. Fuente: Ensembl

Organismo

Dominios proteicos

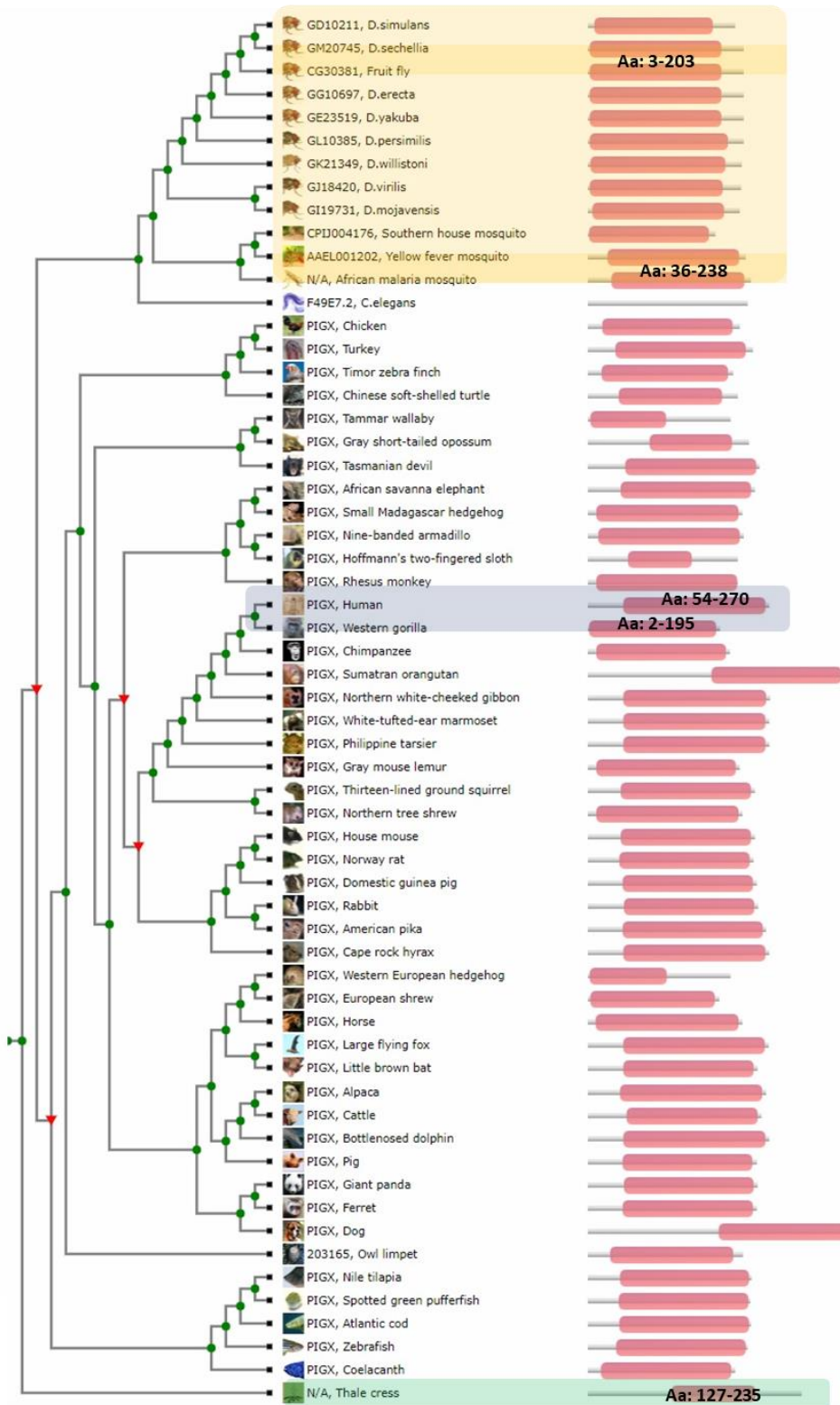


Figura 12. Cladograma TreeFam de la proteína PIGX mostrando la relación entre las diferentes especies. Las barras en rosa en la columna derecha muestran los alineamientos de las secuencias homólogas que corresponderían al dominio luminal de PIGX en humanos. La comparación muestra que existe mayor similitud entre la proteína PIGX de humanos y de orangután con respecto al resto de los organismos (color azul), donde la región conservada comprende las regiones desde del aminoácido 54 al 270 en humano y del 2 al 195 en orangután. Además, la cladograma de TreeFam muestra que estas regiones están conservadas en los invertebrados, específicamente en los insectos (color amarillo). Adicionalmente la cladograma muestra que existe una proteína PIGX en la planta *Arabidopsis thaliana* donde la región conservada abarca los residuos de aminoácidos 127-255 (color verde) y que provendría de un grupo externo distinto al del reino animal. a: aminoácidos. Figura modificada de: TreeFarm

6.8 Características de la enzima GPI-MT-I de diferentes organismos

Estudios realizados sobre la expresión de PIGM de humanos, plasmodium y tripanosoma en *S. Cerevisiae*, que carece de la expresión de PIGM no se reestablece la función de este, sin embargo, cuando si expresa junto con PIGX (de rata) se restablece la función que forma el complejo GPI-MT-I., sugiriendo que la actividad, al menos, de PIGM en la enzima GPI MT-I podría ser redundante. Respecto a la regulación del enzima GPI-MT-I de mamíferos, solo se ha descrito que PIGX es necesaria para la estabilidad de PIGM y por lo tanto de la actividad de la enzima (Ashida et al., 2005; López et al., 2019). Caso contrario para la enzima GPI-MT-I de *Tripanosoma brucei*, que tiene inhibidores específicos que no afectan a la actividad de la enzima humana (Smith et al., 1997; Cowton et al., 2022; Fenollar et al., 2022).

6.9 Potenciales funciones de PIGX junto a otras proteínas

El análisis de red de interacción proteína-proteína (PPI) juega un papel importante en la predicción de la funcionalidad, interacción y brindan una idea de las relaciones funcionales y la conservación evolutiva (Miryala et al., 2018). La plataforma BIOGRID, que recopila información de interacción física entre proteínas, indica que PIGX testa relacionada con las proteínas como FBXW11, GPR45, CHRM3, ZPLD1

de humano, pero además con las proteínas M, ORF7A y E del virus SARS-CoV2 (BioGRID, 2022). Aunque hasta ahora no se ha descrito las consecuencias funcionales de la interacción con estas proteínas, PIGX podría estar implicada en otros procesos, ya que, por ejemplo, la proteína FBXW11 es parte de una ubiquitina ligasa y participa en estrés oxidativo (Uniprot, 2022), mientras que CHRM3 es un receptor colinérgico (BioGRID, 2022) y GPR45 es una proteína asociada a proteína G (BioGRID, 2022). En la siguiente tabla se muestra las proteínas con las que puede interactuar físicamente.

Nombre	Organismo	Función
GPR45	<i>H. sapiens</i>	Esta proteína es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Esta proteína puede funcionar en el sistema nervioso central
FBXW11	<i>H. sapiens</i>	Proteína que forma parte de la familia de proteínas F-box. Las proteínas F-box constituyen una de las cuatro subunidades del complejo ubiquitina proteína ligasa llamado SCF (SKP1-cullin-F-box), que funcionan en la ubiquitinación dependiente de la fosforilación.
ZPLD1	<i>H. sapiens</i>	Glicoproteína que es un componente de la matriz extracelular gelatinosa en las cúpulas del órgano vestibular. Se prevé que sea un constituyente estructural de la matriz extracelular.
CHRM3	H sapiens	Los receptores colinérgicos muscarínicos pertenecen a una familia más grande de receptores acoplados a proteína G. La diversidad funcional de estos receptores está definida por la unión de acetilcolina e incluye respuestas celulares como la inhibición del adenilato ciclasa, la degeneración de fosfoinosítidos y la mediación de los canales de potasio. Controla la contracción del músculo liso y su estimulación provoca la secreción de tejido glandular.

E	SARS-CoV-2	La actividad de la proteína E sirve como transportadora de iones promoviendo las lesiones pulmonares en el humano
M	SARS-CoV	Durante el ensamblaje, proporciona un andamio para las partículas virales, estabiliza a la proteína N y al núcleo interno de los viriones; además es necesaria para la retención de la proteína S en el compartimento intermedio ER-Golgi y su incorporación a nuevos viriones.
ORF7A	SARS-CoV-2	Se han descrito varias funciones posibles para la proteína ORF7A. Se cree que la función principal es la inmunomodulación y el antagonismo de los interferones humanos. La proteína no es esencial para la replicación viral
M	SARS-CoV-2	Responsable del transporte transmembrana de nutrientes, liberación de la partícula viral y la formación de su envoltura

Tabla 4: Proteínas relacionadas físicamente con PIGX. Fuente: BioGRID, GeneCards y Ensembl

Por otro lado resultados de un análisis de IPP en la plataforma de STRING, se muestran tres redes de interacción con PIGX; por una parte, la proteína forma una red de interacción con las proteínas PIGM, PIGB, PIGV, PIGW, DPM1 y DPM2 que participan en la ruta síntesis de GPI; por otro lado, PIGX forma parte de las enzimas manosiltransferasas de la misma ruta biosintética junto con PIGM, PIGB, PIGV y DPM1 y finalmente, PIGX puede interactuar físicamente con las proteínas RCN1 y RCN2 del RE, figura 13 (String, 2022). RCN1 y RCN2 son proteínas con sitios de unión a Ca^{2+} y se proponen reguladoras de las actividades dependientes del calcio en el RE (Uniprot, 2022), sugiriendo su participación en otras funciones celulares. Estas son las únicas evidencias de interacción con otras proteínas, y se desconoce si pueden interactuar con otras proteínas, como aquellas que modulen su actividad.

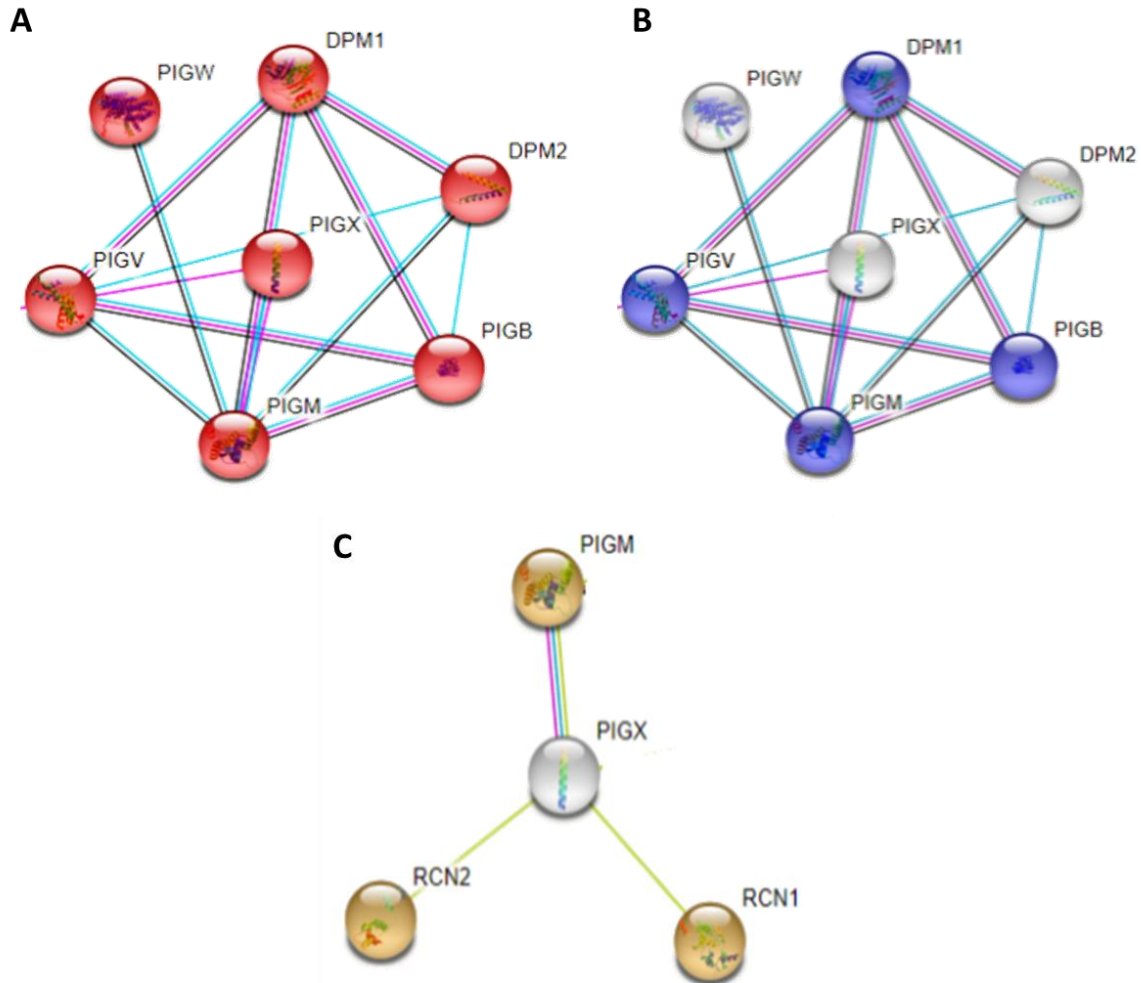


Figura 13: Red STRING de interacción proteína-proteína (IPP) entre la proteína PIGX y otras proteínas. La red de interacción muestra la relación (líneas que unen los círculos), entre cada una de las proteínas representadas (círculos de colores). El análisis de IPP muestran tres redes, por una parte, (A) la proteína PIGX está implicada en la síntesis de GPI junto con las proteínas PIGM, PIGB, PIGV, PIGW, DPM1 y DPM2 descrita en color rojo, por otra parte, (B) PIGX forma parte de las enzimas mannosiltransferasas de la misma ruta biosintética junto con PIGM, PIGB, PIGV y DPM1 descrito en color azul; y finalmente, (C) PIGX junto con RCN1 y RCN2 interactúan en el retículo endoplásmico. De acuerdo a la base de datos las proteínas se encuentran representadas por círculos o nodos, las cuales tienen diferentes clasificaciones. Primero se están los nodos coloreados que son las proteínas que interactúan estrechamente con la proteína de interés, y los no coloreados son los que tienen una interacción baja. De allí también se observan nodos vacíos en las

cuales su estructura 3D aún es desconocida y las llenas que se conoce su estructura 3D. La interacciones IPP están descritas por líneas de colores , las líneas azul cielo indican que la información fue obtenida de bases de datos conocidas, las moradas las obtenidas de experimentos, las verdes son interacciones con genes vecinos , las rojas significa una fusión de genes, las líneas azul marino significa una co-ocurrencia de genes, las amarillas son las interacciones sacadas de textos, las líneas negras significan coexpresion y finalmente las azul rey significan homología de proteínas. Fuente: STRING

6.10 Expresión del gen y de enzima PIGX en tejidos que en donde se lleva a cabo la biosíntesis de GPI

Los resultados de GTEx (genotype-tissue expression), que muestra la expresión del ARNm de genes humanos en diferentes tejidos (GTEx Portal), indican que el glicogen se expresa en gran parte de los tejidos (GTEx Portal, 2022; GTEx Consortium, 2022). Por ejemplo, la expresión del ARNm de PIGX está presente en células del sistema inmunitario, nódulos linfáticos, en distintas partes del sistema nervioso; también en otros tejidos como corazón, músculo esquelético, intestino delgado, hígado, riñón, pulmón, estómago, páncreas, tiroides, próstata, mama, ovario y cérvix, entre otros (Figura 14) (GTEx Portal, 2022; The human Protein Atlas, 2022). Con relación a la expresión de la proteína PIGX, la plataforma The Human Protein Atlas muestra que la proteína se encuentra presente en nódulos linfáticos, corteza, cerebelo, intestino delgado, hígado, riñón, pulmón, estómago, páncreas, tiroides, próstata y cérvix (Uhlen et al., 2017) (Figura 14). Excepcionalmente, no se ha reportado la expresión de la proteína en corazón, músculo esquelético, mamá y ovario, tejidos donde sí se ha reportado el ARNm. Respecto a PIGM, la expresión del ARNm está presente en los mismos tejidos que PIGX (GTEx Portal) y no se tienen datos de la expresión de la proteína (Uhlen et al., 2017). En general, estos datos sugieren que la ruta de síntesis de GPI está presente en diversos tejidos independientemente de las funciones especializadas.

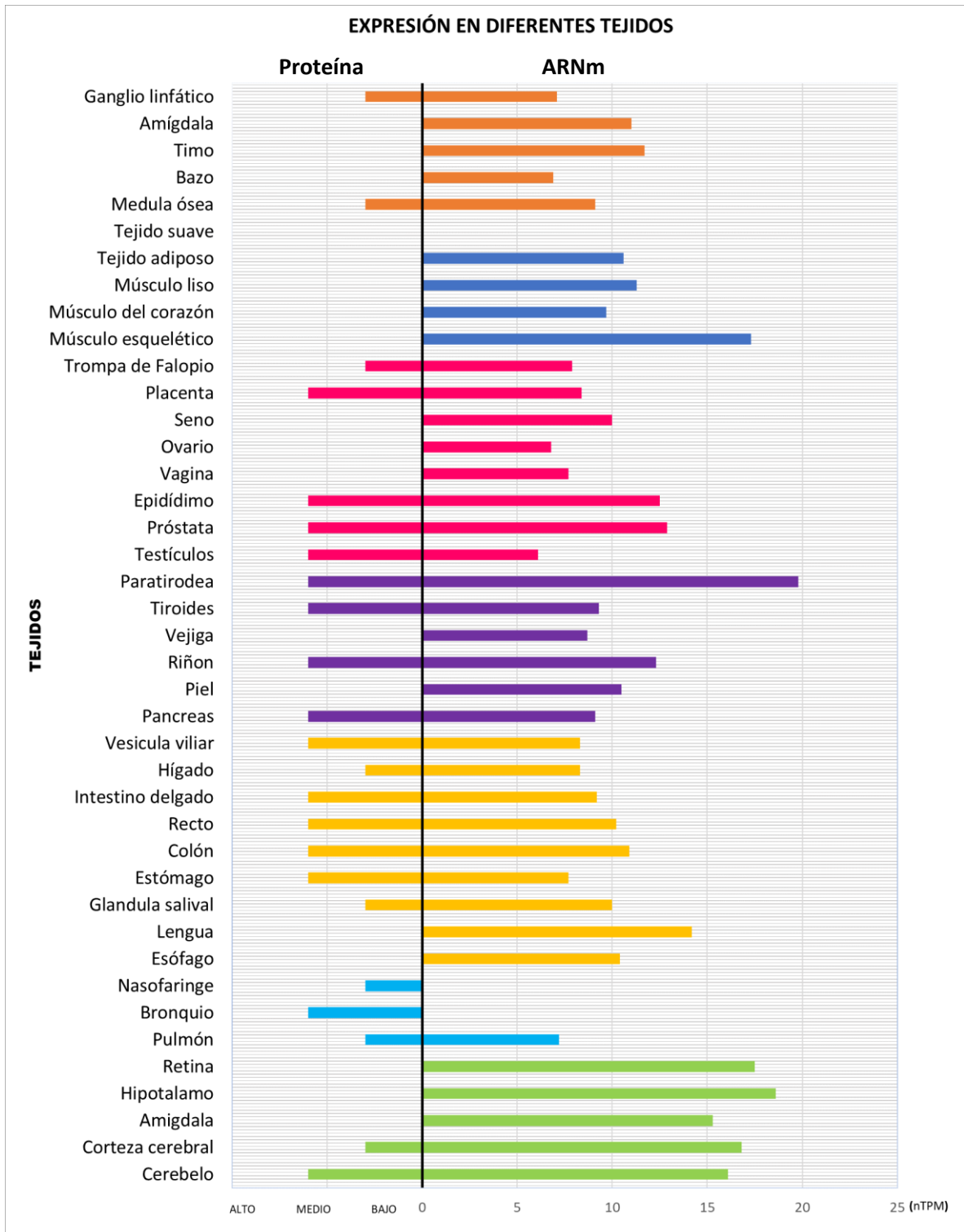


Figura 14: Expresión del gen PIGX y la proteína PIGX en diferentes tejidos

La expresión de ARNm muestra los datos de consenso basados en valores de expresión normalizada (nTPM) de dos fuentes diferentes: datos de secuencia de ARN del Atlas de proteínas humanas (HPA) generados internamente y datos de secuencia de ARN del proyecto Genotype-Tissue Expression (GTEx). La codificación por colores se basa en grupos de tejidos, cada uno de los cuales consta de tejidos con características funcionales en común. En total, RNA-seq analizó 69 líneas celulares, 51 tejidos humanos y 18 tipos de células sanguíneas. Para la expresión de la proteína se hizo mediante inmunohistoquímica/inmunofluorescencia indirecta (ICC-IF), donde se muestran imágenes multicolores de alta resolución de proteínas marcadas. Esto proporciona información espacial sobre los patrones de expresión de proteínas para definir la localización subcelular en orgánulos y estructuras celulares a nivel de una sola célula. Para proporcionar una interpretación de los patrones de tinción, todas las imágenes generadas por ICC-IF se anotan manualmente. Para cada línea celular y anticuerpo, la tinción se describe en términos de intensidad, ubicación subcelular y variabilidad unicelular (SCV). La intensidad de tinción se clasifica como negativa, bajo, medio o alto. Fuente: The Human Protein Atlas

6.11 Implicación de PIGX en diferentes enfermedades

6.11.1 Cáncer

La desregulación de los genes principalmente en células de cáncer ha llevado a la búsqueda de blancos potenciales para poder desarrollar terapias con una buena eficiencia y con riesgos bajos o nulos (Nakakido et al., 2016). El gen *PIGX* se ha observado incrementado significativamente en tejidos de cáncer de mama y se asocia con la proliferación celular. Su participación del producto de este gen, no es solo en la vía biosintética del GPI, sino que también se le ha visto formando complejos con las proteínas reticulocalbina 1 (RCN1) y reticulocalbina 2 (RCN2), localizadas al igual que *PIGX*, en el RE regulando actividades dependientes de calcio (Nakakido et al., 2016). La formación de este complejo proteico funciona regulando genes que tienen que ver con la supresión de tumores, como *ZIC1* (Zic family member 1) y *EHD2* (EH domain containing 2) y de esta manera contribuir con la proliferación en cáncer de seno de humano. Es por este motivo que los autores proponen que *PIGX* puede ser una buena molécula para desarrollar medicamentos anticáncer para cáncer de seno (Nakakido et al., 2016)

6.11.2 Síndrome de retraso mental por hiperfosfatasa

El síndrome de retraso mental por hiperfosfatasa (HPMRS) también conocido como síndrome de Mabry, es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por retraso mental y niveles elevados de fosfatasa alcalina (ALP) sérica (Wu *et al.*, 2020). La enfermedad está asociada a mutaciones de genes que participan en síntesis y remodelación del GPI (Horn *et al.*, 2014). Uno de los casos más estudiados es el gen *PIGV*, cuyo producto proteico es la enzima que se encarga en transferir la segunda manosa al glicolípido Man-GlcN-(acil)-PI (Fu *et al.*, 2019). La falta de función de *PIGV* tiene en consecuencia la secreción de ALP al suero, una proteína anclada a GPI que normalmente se expresa en la superficie celular (Fu *et al.*, 2019). Algunos estudios indican que mutaciones en gen *PIGV* pero no en *PIGM* da lugar al HPMR (Murakami *et al.*, 2012). Estudios en líneas celulares con mutaciones en los genes que participan en la síntesis de GPI y en la unión del GPI, como en *PIGL*, *PIGX*, *DPM2*, *PIGV*, *PIGB*, *PIGF*, *PIGK* y *PIGU*, indican que la ALP es degradada cuando las células son deficientes en enzimas de las fases tempranas de la síntesis, como *PIGX*, y que tiene como consecuencia que proteínas con GPI carentes de manosas se acumulen y sean degradadas (Murakami *et al.*, 2012). En contraste, la falta de función en genes que participan en fases más tardías, incluyendo *PIGV*, resulta en la secreción de la enzima ALP (Murakami *et al.*, 2012). En este caso, se ha propuesto que las proteínas unidas a GPI, pero con manosas incompletas, son escindidas enzimáticamente y liberadas al espacio extracelular (Murakami *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que existe un paso crítico durante las síntesis de GPI que involucra a las enzimas *PIGM-PIGX* y *PIGV* para el correcto funcionamiento celular.

6.11. 3 Hemoglobina Paroxística Nocturna

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno de las células madre hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea (Horn *et al.*, 2011). Esta enfermedad es causada por una mutación somática en uno de los genes de las primeras etapas de la síntesis de GPI, específicamente en el gen *PIGA* que se

localiza en el cromosoma X (Bektas et al., 2020). Se caracteriza por hemólisis intravascular crónica, trombosis e insuficiencia de la médula ósea, que puede provocar citopenia. La hemólisis crónica en pacientes con HPN se atribuye a la ausencia o deficiencia de proteínas unidas a GPI en los glóbulos rojos y células del sistema inmunitario, en particular en las proteínas CD55 y CD59, que en consecuencia interrumpe la activación de sistema del complemento y provoca que las células del sistema inmunitario y/o glóbulos rojos entren en lisis celular (Bektas et al., 2020). Algunas mutaciones en *PIGM* también están asociadas a HPN o desordenes de sangre periférica. Por ejemplo, pacientes con HPN pueden presentar mutaciones en regiones codificantes de *PIGM* que provocan proteínas truncas en células de sangre periférica (Jeong et al., 2021), mientras que pacientes con trombosis, pero sin hemólisis, pueden presentar mutaciones en el promotor del gen *PIGM* que resulta en la disminución de su expresión (Almeida et al., 2006). Respecto a otros glicogenes de la ruta de síntesis de GPI, se han identificado mutaciones en las regiones codificante de los genes *PIGT* y *PIGX* en células de sangre periférica, pero sin estar asociadas a HPN (Jeong et al., 2021).

6.11.4 Hipertensión

En un modelo de ratón que presentaba alteración en la tensión arterial se realizaron ensayos de expresión con el objetivo de identificar posibles blancos terapéuticos, (Zhu et al., 2017). Dentro de los 10 genes con mayor cambio en la expresión génica se identificaron en riñón, corazón e hígado, detectándose a los genes *SEPT6* y *PIGX*, sugiriendo que ambos genes podrían estar participando en la patogénesis de la enfermedad (Zhu et al., 2017). Estudios funcionales serán importantes para conocer qué función pueden estar ejerciendo en la hipertensión.

6.11.5 Enfermedades parasitarias

Trypanosoma brucei es un parásito protozoario que causa la Tripanosomiasis humana africana (THA) (Carvalho et al., 2018). En el huésped mamífero, el parásito vive por completo de forma extracelular, tanto en la sangre como en los espacios intersticiales de los tejidos (Zhu et al., 2018). La alta densidad de estructuras GPI en todas las etapas del ciclo de vida de los tripanosomas africanos y *Leishmania*

sugiere que la vía biosintética GPI podría ser un objetivo razonable para el desarrollo de medicamentos antiparasitarios (Smith et al., 1997). Se han investigado inhibidores utilizando sistemas libres de células y una serie de análogos de GlcN-PI sintéticos. Dentro de estos inhibidores se encuentran GlcN-(2-O-metil) PI, GlcN-(2-O-hexadecil) PI, GlcN-(2-O-octil) PI y GlcNAc-(2-O-octil) PI, que demostraron ser un buen sustrato para la enzima GPI-MT-I de *T. brucei* MT-I, pero no para la versión de la enzima humana (Crilly y Mugnier, 2021) (Koeller y Heise, 2011). Estos resultados sugieren que se puede inhibir de forma selectiva a enzimas de la síntesis de GPI de *Leishmania* sin afectar la vía del ser humano.

Parte 2

6.12 Análisis de la región promotora del gen *PIGX*

En el grupo de trabajo se realizó la búsqueda de la región promotora del gen *PIGX*, usando programas bioinformáticos (figura x), en el análisis se observa que carece de caja TATA, pero si presenta secuencia de iniciación (INR), múltiples sitios de cajas GC, cerca del sitio de inicio de la transcripción que pudieran estar participando en el reclutamiento de los factores de transcripción, así como a la polimerasa III para realizar la transcripción de este gen. Este análisis detallado de la posible región promotora indica que el promotor central, proximal y distal de *PIGX* de 1300 pb, aproximadamente, el cual contiene varias cajas GC, sitio para TFIID y sitios de reconocimiento a proteínas Smad que podrían estar regulando su actividad (Figura X) (Xicale 2020). A partir de análisis se diseñaron los oligos para amplificar la región promotora. Por otro lado, el diseño de oligos para la región de aproximadamente 700 pb es para ver si esos sitios como la caja TATA, participan o no en la transcripción.

5'
-1727 CAACACAGCGAGACCATGCATGTCTCTACAAAAAATTTAAAAATTTGGCCAGGCATGGCAGCATGCACCTGTAGTCCCAGCCACACAAAGGCCAAGTGGGAGAATCGCCTGAACCCAGGAGTTTGGGGC
-1597 TGCAGTGTAGTTGAGATGGTGGCCACTGCACAACAGCCTCTCCAAAGCATGATACGCCTATTCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTACTTTAAAAAATTAAGTGTCTACCTCTAAATCTGATGC
-1467 AATGAGCTCACACCAATTTCTCTCTTTCTCTCTTTCTGCTTTTTTTTTTTTTTAAACGAATACTATCCCAATTCACCTAACTAAAATTTGATGTTAGTAAACTACAACCTACGGGGCACATAT
-1337 AAACCT **CACACACTGAAGCAATGGCTGTACTCGTCAAAGATGTATGCAGTTGGTACTCAAAATATGTAGTTTTTTTTTTACTAGACTCTTTTAAAAATTTAACTTTAATTTTTGCTAAAGTAATGTTTGT** TFIIID y TBP
-1207 ATTTGGAATATAAAAAAATTTCTATGAGGCTTATAACAACAACATATCGTCTCTGGCCCTACTCCTCTTCATAGGGAGCCAGACTGAATTTAAAAAGGCATATCTCCAAAAATTTCTCTCTCCATTTCTTT
-1077 AGAAACATGCTTATACTACCATTTTCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAACAGAGTCTCCCTCTGTCGCTAGGCTGAGCTGCAGTGCAGTGGGGTGAICTCCCTCGCTGCAACCTCGCCCTCTGGTTCAAGCG
-947 ATTTCTGTCCTCAGCCCTCCGAGTAGCTGGAATACAGGTCCTACCACTGCCAGCTAATCTTTGATGTTAGTAACTACAACCTACGGGGCACATATCTCCAAAAATTTCTCTCTCCATTTCTTT
-817 AGGTGATTCGCCCAAAAGTCTGGGCTATAGGCTGAGCCACTGCCCGCTATTTTCAGTTTTGGATAGTATGTTTTGACATACACTCTGTTTCTCTTTGAGACACCCCGCTCTAGAGCCCTCTATTCC
-687 ACTCCAAAGCCGCTGATGCTCTCTGGCTTACAGATTTCCACTCTGTTTAGGAAGAAGGACGGCAGTATATCCAAATTAATCTTTCTGGAACAGAACTCTCTCCCCAGAGATCAGTAAGTCC
-557 CACAATCTTGTAGGAAGCCCCACAGCAGCTAAGGGTACGAATGTCCCAAGAGTAGACGATTTCTCTCCACTACAGCTCTCCACTAGTGCAGGCTGGCTTTCTTACCCTTAGAGGAATACAGAAATC
-427 ACATCGTCTGCAGCCCAAGCTCTAACAACACAGGAGTGGGTTTTCCCAACCAACCCAGCTGCACGCAAAAGCCCTAAGCCGACTGTGAGACCGGGGGAGCTGGGCTGCAGGAAGAGGGACAGCCAC
-297 AGCCCTACTGACGAGCCCGAGGGTGAATCTCCCGCGGGAGCCCGCAACCTCAACACCCGGAGCGAGGTTGGGGCCCGCTGGGGACCGGCTCCCACTCGGCTACAGGGATTCC
-167 GGTCCCGCGAGCGCTGGCTTAGCGGTTTCCACAGCGACAGGCGGGCGCGCTCCCGCGCTGGCAGCTCTCCCGCCCGGGTGGCGGAGCAAGGAACAGCTGGGGGGGACGACCGCCCA
-37 GCGCGCGGGGAACCTTTGGGGCCCGGGCTGAGGAGCTGGGAGCCCGGGCTAGGCGCGGCACT **ATTAATCTGGGGCAGCGCG** GC-box AP-4 GC-box Sp1 INR
94 GGCCCCCTCTCGCTCCGACCTGGCCCGCGCCCTCTCGGGCGTCCGGCTTCCGGCGCTCGGGCGCTGGGGTGGCGCGGCTTCCGGCGCGCCCTGGCTGCTCTCCGGGGCGGCGACCGGGCTCA
224 CCGCGGGCCCGCGCGCTTACCGCCCGCGCTCTGACCGCGTAAGGGGGCGGGGCTTGGGGGGCCAGAGCGTGGGAGCGGTCCTCCGCTCCGGGCTCTCGGGGTTGCGGGATGTGGGGAC
354 CCGCGCGGGACCTAGATCAGTAGGGCGAGCCGGAGGAGTTCAGACACTAGAGCGGTGTGCCCTCTTCCCTCCCGTGGCGCTTGTCTCTGCGCGGATCCCGGGTCTCCGGAGAGTGGGCTCGGGCCC
484 TCGGTTCCAGGCTGGACTGGCCGCTTTACTAAAGTTC 3'

Figura 15: Región promotora del gen *PIGX* de 1396. En color azul se muestra la región que se desea amplificar con el primer par de oligos (color verde) el cual se encuentra a unos 1337 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción.

5'
-1727 CAACACAGCGAGACCATGCATGTCTCTACAAAAAATTTAAAAATTTGGCCAGGCATGGCAGCATGCACCTGTAGTCCCAGCCACACAAAGGCCAAGTGGGAGAATCGCCTGAACCCAGGAGTTTGGGGC
-1597 TGCAGTGTAGTTGAGATGGTGGCCACTGCACAACAGCCTCTCCAAAGCATGATACGCCTATTCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTACTTTAAAAAATTAAGTGTCTACCTCTAAATCTGATGC
-1467 AATGAGCTCACACCAATTTCTCTCTTTCTCTCTTTCTGCTTTTTTTTTTTTTTAAACGAATACTATCCCAATTCACCTAACTAAAATTTGATGTTAGTAAACTACAACCTACGGGGCACATAT
-1337 AAACCT **CACACACTGAAGCAATGGCTGTACTCGTCAAAGATGTATGCAGTTGGTACTCAAAATATGTAGTTTTTTTTTTACTAGACTCTTTTAAAAATTTAACTTTAATTTTTGCTAAAGTAATGTTTGT** TFIIID y TBP
-1207 ATTTGGAATATAAAAAAATTTCTATGAGGCTTATAACAACAACATATCGTCTCTGGCCCTACTCCTCTTCATAGGGAGCCAGACTGAATTTAAAAAGGCATATCTCCAAAAATTTCTCTCTCCATTTCTTT
-1077 AGAAACATGCTTATACTACCATTTTCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAACAGAGTCTCCCTCTGTCGCTAGGCTGAGCTGCAGTGGGGTGAICTCCCTCGCTGCAACCTCCGCCCTCTGGTTCAAGCG
-947 ATTTCTGTCCTCAGCCCTCCGAGTAGCTGGAATACAGGTCCTACCACTGCCAGCTAATCTTTGATGTTAGTAACTACAACCTACGGGGCACATATCTCCAAAAATTTCTCTCTCCATTTCTTT
-817 AGGTGATTCGCCCAAAAGTCTGGGCTATAGGCTGAGCCACTGCCCGCTATTTTCAGTTTTGGATAGTATGTTTTGACATACACTCTGTTTCTCTTTGAGACACCCCGCTCTAGAGCCCTCTATTCC
-687 ACTCCAAAGCCGCTGATGCTCTCTGGCTTACAGATTTCCACTCTGTTTAGGAAGAAGGACGGCAGTATATCCAAATTAATCTTTCTGGAACAGAACTCTCTCCCCAGAGATCAGTAAGTCC
-557 CACAATCTTGTAGGAAGCCCCACAGCAGCTAAGGGTACGAATGTCCCAAGAGTAGACGATTTCTCTCCACTACAGCTCTCCACTAGTGCAGGCTGGCTTTCTTACCCTTAGAGGAATACAGAAATC
-427 ACATCGTCTGCAGCCCAAGCTCTAACAACACAGGAGTGGGTTTTCCCAACCAACCCAGCTGCACGCAAAAGCCCTAAGCCGACTGTGAGACCGGGGGAGCTGGGCTGCAGGAAGAGGGACAGCCAC
-297 AGCCCTACTGACGAGCCCGAGGGTGAATCTCCCGCGGGAGCCCGCAACCTCAACACCCGGAGCGAGGTTGGGGCCCGCTGGGGACCGGCTCCCACTCGGCTACAGGGATTCC
-167 GGTCCCGCGAGCGCTGGCTTAGCGGTTTCCACAGCGACAGGCGGGCGCGCTCCCGCGCTGGCAGCTCTCCCGCCCGGGTGGCGGAGCAAGGAACAGCTGGGGGGGACGACCGCCCA
-37 GCGCGCGGGGAACCTTTGGGGCCCGGGCTGAGGAGCTGGGAGCCCGGGCTAGGCGCGGCACT **ATTAATCTGGGGCAGCGCG** GC-box AP-4 GC-box Sp1 INR
94 GGCCCCCTCTCGCTCCGACCTGGCCCGCGCCCTCTCGGGCGTCCGGCTTCCGGCGCTCGGGCGCTGGGGTGGCGCGGCTTCCGGCGCGCCCTGGCTGCTCTCCGGGGCGGCGACCGGGCTCA
224 CCGCGGGCCCGCGCGCTTACCGCCCGCGCTCTGACCGCGTAAGGGGGCGGGGCTTGGGGGGCCAGAGCGTGGGAGCGGTCCTCCGCTCCGGGCTCTCGGGGTTGCGGGATGTGGGGAC
354 CCGCGCGGGACCTAGATCAGTAGGGCGAGCCGGAGGAGTTCAGACACTAGAGCGGTGTGCCCTCTTCCCTCCCGTGGCGCTTGTCTCTGCGCGGATCCCGGGTCTCCGGAGAGTGGGCTCGGGCCC
484 TCGGTTCCAGGCTGGACTGGCCGCTTTACTAAAGTTC 3'

Figura 16: Región promotora del gen *PIGX* de 755 pb. En color rosa se muestra la región que se desea amplificar con el primer par de oligos (color amarillo) el cual se encuentra a unos 687 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción.

6.13 Amplificación de los fragmentos del promotor del gen *PIGX* a partir de ADN genómico

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico humano a partir de sangre, obteniéndose un ADN genómico de calidad pues se sabe que una relación absorbancias A260/280 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Además, fue evaluado en geles de agarosa al 1% y se midió su concentración y pureza con un analizador de ADN, pues se obtuvo una relación 260/280 de 1.9 (imagen 1). Con el ADN genómico obtenido se procedió a amplificar un fragmento del promotor del gen *PIGX* de 1396 pb y de 755 pb, mediante PCR con los oligos diseñados (tabla x). Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1%. En la imagen 2 se puede observar un producto de 1396 pb y en la Imagen 3 un producto de 755pb los cuales corresponden con la región a amplificar por los oligos diseñados y la cual abarca una parte de la región del promotor *PIGX*.

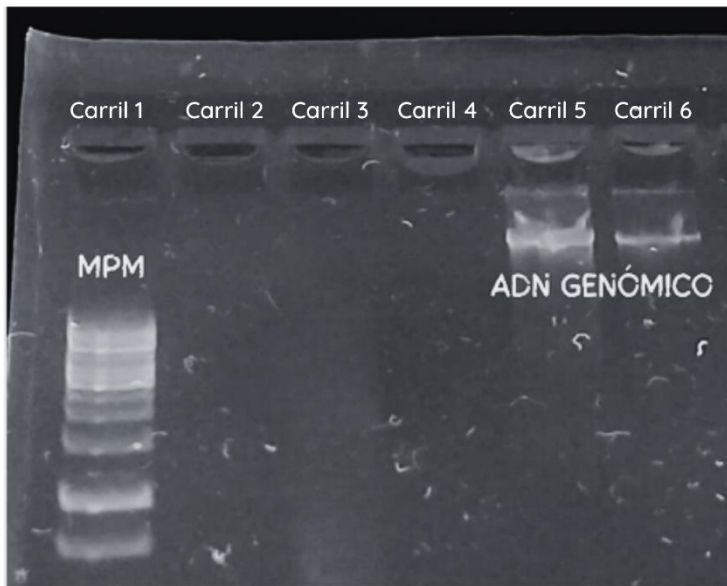


Imagen 1: Evaluación de la concentración del ADN genómico extraído de sangre humana. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular de 1Kb SM0311 de GeneRuler y en los carriles 5 y 6 se muestra el corrimiento de 1 ul del ADN genómico.

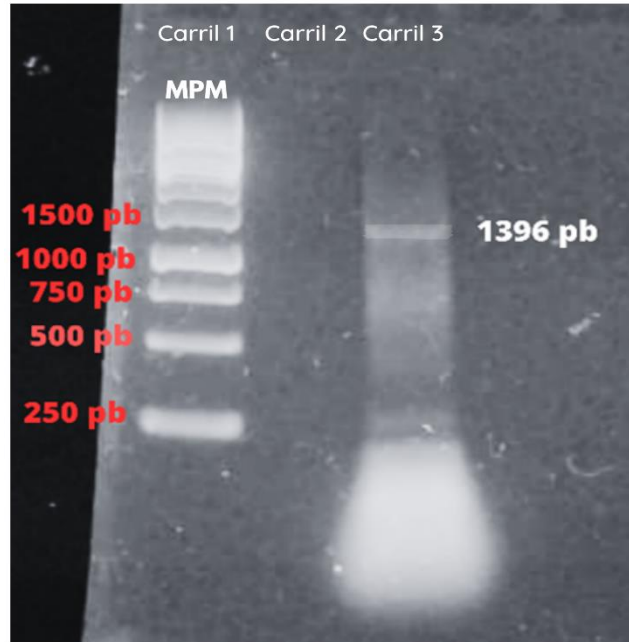


Imagen 2: PCR de la región promotora del gen PIGX de 1396 pb. En la imagen se puede observar que en el primer carril se ve el corrimiento del MPM de 1Kb y en el carril 3 el producto de PCR de la región promotora de PIGX de 1396 pb

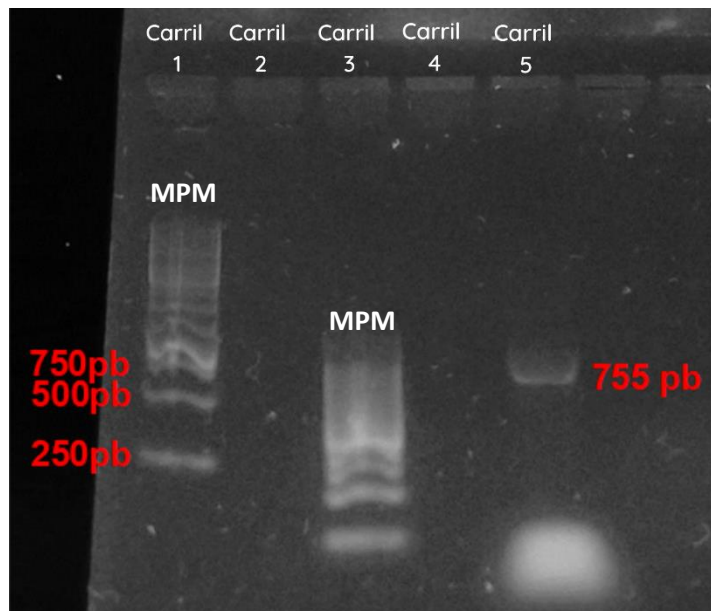


Imagen 3: PCR de la región promotora del gen PIGX de 755 pb. En la imagen se puede observar que en el primer carril se ve el corrimiento del MPM de 1Kb, en el carril 3 se observa el corrimiento de otro MPM, pero de 100 pb y por último en el carril 5 se observa el producto de PCR de la región promotora de PIGX de 755 pb

6.14 Corte con las enzimas de restricción

Para la clonación se escogió el plásmido pGL4.12 ya que este vector no tiene promotor y codifica al gen de la luciferasa lo que nos permitiría medir la actividad de las secuencias promotoras que se iban a clonar. Para purificar el fragmento de 1396 pb del gen *PIGX* y linealizar el vector pGL4.12 se hizo una doble restricción con las endonucleasas *KpnI* y *HindIII* y se purificó utilizando columnas del Zymoclean gel DNA Recovery Kit. Lo mismo se hizo con el fragmento de 755 pb, aquí se ocuparon las enzimas *XhoI* y *HindII*. El vector linealizado se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y observando un producto de 4376 pb correspondiente al vector linealizado. (Figura 17)

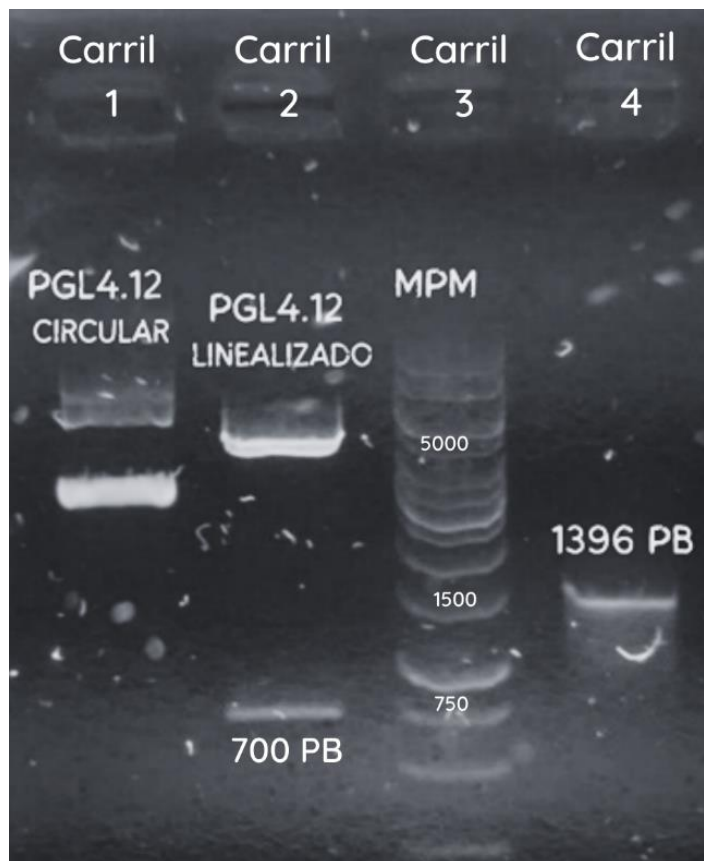


Imagen 4: Electroforesis de las restricciones del vector y el fragmento de 1396 pb

En esta imagen se puede observar que en el carril 1 se corrió el vector pGL4.12 de forma circular y en el carril 2 de forma linealizada, además en la forma linealizada se obtuvo un fragmento de 700 pb ya que el vector que se ocupó ya había sido clonado, así también se comprobó la eficacia de las enzimas.

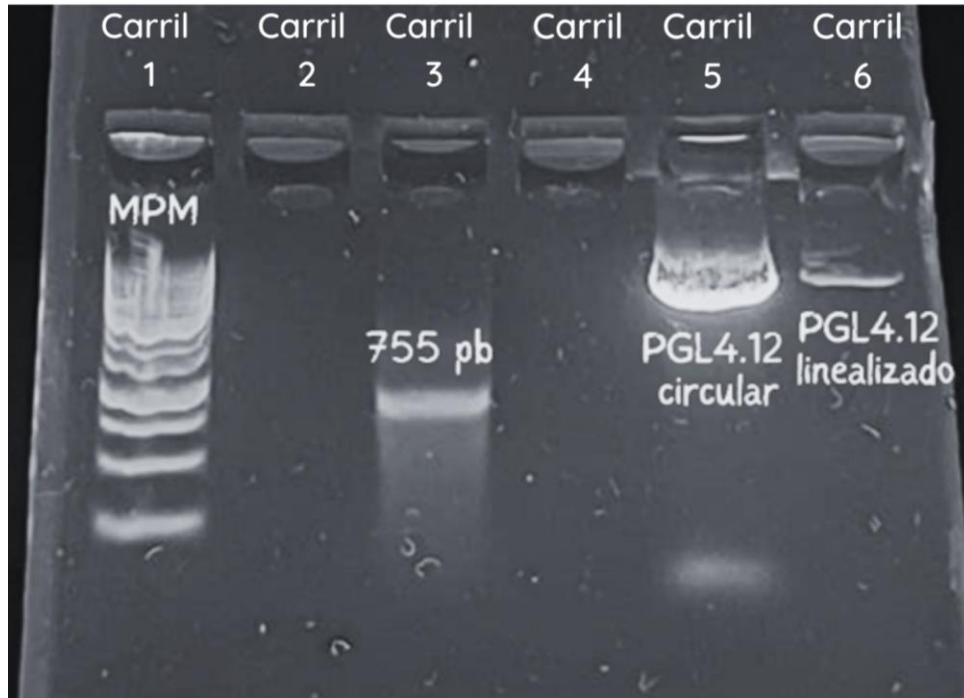


Imagen 5: Electroforesis de las restricciones del vector y el fragmento de 755 pb

En esta imagen se puede observar que en carril 1 se corrió el MPM de 1Kb, en el carril 3 la restricción del fragmento de 755 pb, en el carril 5 el vector PGL4.12 circular y en el carril 6 el que el vector PGL4.12 y linealizado.

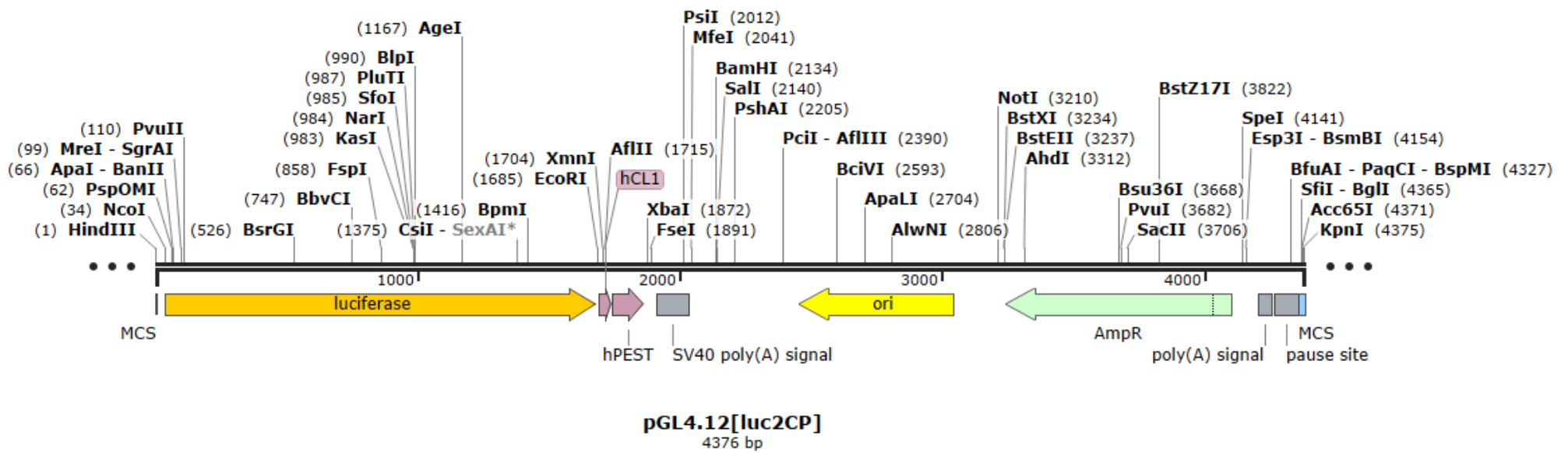


Figura 17: Vector pGL4.12 linealizado

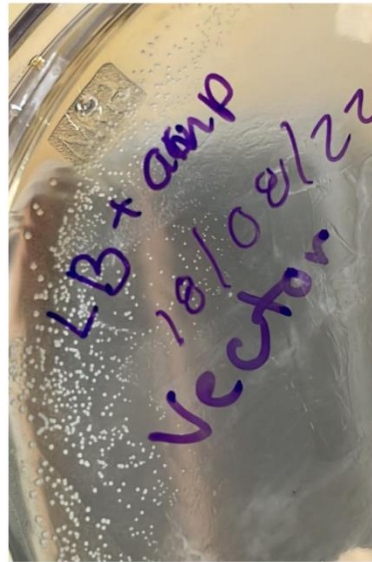
6.15 Clonación de los fragmentos del promotor del gen *PIGX* en el vector PGL4.12

Una vez obtenidos los fragmentos purificados y el vector linealizado se hizo la reacción de ligación de acuerdo con las concentraciones requeridas por el manual, con la ligasa y buffer de la T4 DNA ligasa de Thermo Scientific™.

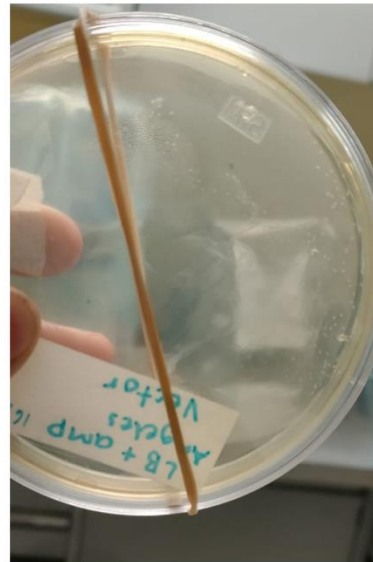
Después se procedió a transformar las reacciones de ligación en células competentes de *Escherichia coli* Top10 mediante la técnica de choque térmico con el plásmido pGL4.12. Al día siguiente se observaron las colonias, sin embargo, solo se crecieron en el plásmido con el fragmento de 1396 pb, por lo tanto, las cepas de *E. coli* con pGL4. *PIGX*1396pb se sembraron en agar LB+amp 50 ng/ul y también se crecieron en caldo selectivo LB-amp donde se les realizó la técnica de lisis alcalina mencionada anteriormente para obtener DNA plasmídico.

Los plásmidos construidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y también se caracterizaron las muestras con las mismas enzimas de digestión que se ocuparon inicialmente, donde se tenía que digerir el DNA plasmídico y producto amplificado de PCR.

Control positivo



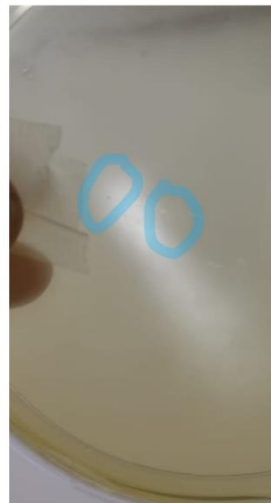
Placa 1



Placa 2



Placa 3: Transformación del fragmento del promotor de 755 pb del gen *PIGX*



Placa 4: Transformación del fragmento del promotor de 1396 pb del gen *PIGX*

Imagen 6: Fotografías representativas de las placas obtenidas de la transformación el plásmido PGL4.12 con el fragmento de la región promotora del gen *PIGX* de 1396 pb (placa 4) en donde se ve el crecimiento de cepas y la de 755 pb (placa 3) de la región promotora del gen *PIGX* en donde no se ve crecimiento de ninguna cepa y el control positivo, el cual solo contiene el plásmido sin transformar.

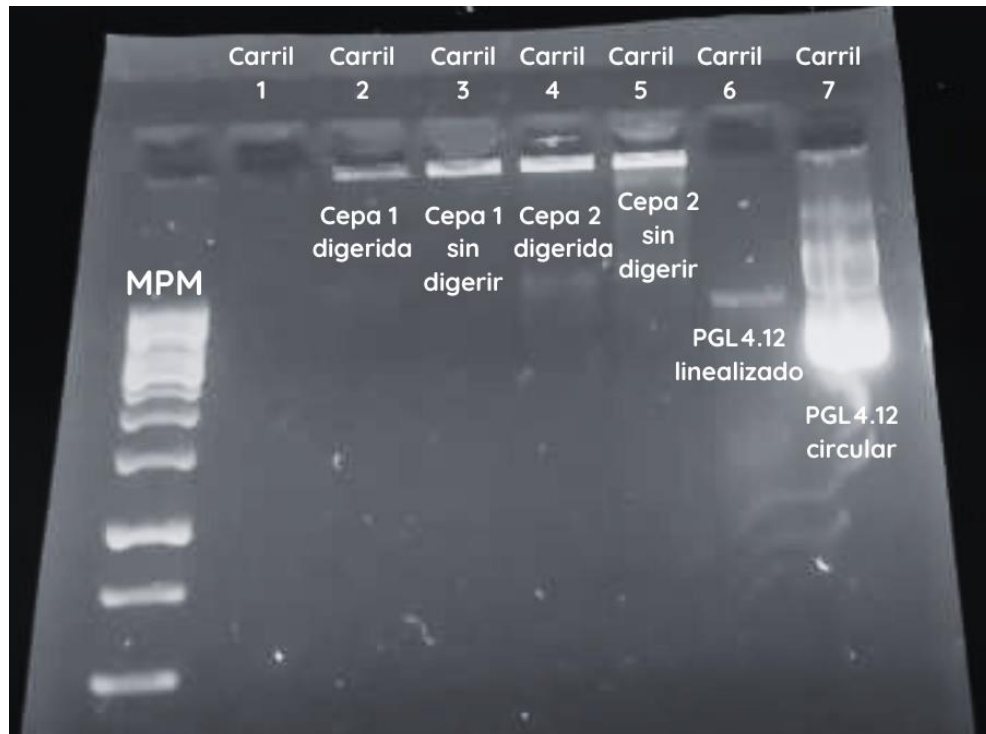


Imagen 6: Electroforesis de las extracciones de ADN plasmídico de las cepas obtenidas de la transformación

7. Discusión

Esta investigación tuvo como propósito identificar y describir las características del gen *PIGX* a través de una búsqueda bibliográfica, pues como se mencionó anteriormente, *PIGX* juega un papel importante en diferentes procesos celulares. Sobre todo, se procuró examinar todas aquellas funciones que hace que el gen y su proteína sea un gran tema de estudio. Además, se pretendió clonar la región promotora del gen *PIGX*. A continuación, se estarán discutiendo los principales hallazgos de este estudio.

De los resultados obtenidos en esta investigación, se puede deducir que el gen *PIGX* codifica para la proteína GPI-MT-I junto a *PIGM*, por lo tanto, tiene una participación importante en la biosíntesis del glicolípido GPI, y la falta de función de *PIGX* provoca la ausencia de expresión de proteínas unidas a GPI, lo que repercute en la salud humana, ya que el funcionan como enzimas de superficie, antígenos, receptores, moléculas de adhesión y de respuesta inmunitaria.

Por otro lado, se identificaron 2 isoformas proteicas de *PIGX*, en donde la secuencia canónica corresponde a Q8TBF5 y está constituido por 258 residuos de aminoácidos, mientras que la secuencia Q8TBF5-2 está formada por 276 residuos de aminoácidos, además esta proteína se distingue por tener un codón CGT que actúa como inicio alternativo de la traducción en humanos.

A través de predicciones bioinformáticas se dio a conocer la estructura terciaria de la isoforma canónica de *PIGX* donde se puede concluir que la parte luminal hacia el RE de la proteína consiste en una estructura al azar "random coil" y una región constituida por láminas beta, mientras que la región transmembranal es una única hélice alfa; además los datos estructura primaria sugieren que la isoforma de *PIGX* Q8TBF5-2 podría diferenciarse en la región luminal de láminas beta.

Los datos obtenidos sobre la evolución parecen confirmar que el gen *PIGX* esta conservada en los organismos eucariotas, sin embargo, también se encontró información sobre genes homólogos en la mosca de la fruta, el mosquito de

Anopheles gambiae e incluso en el reino vegetal como es en la planta *Arabidopsis thaliana*.

Por otra parte, se obtuvo evidencia de redes de interacción de PIGX con otras proteínas, que van desde aquellas que participan en la ruta síntesis de GPI (PIGM, PIGB, PIGV, PIGW, DPM1 y DPM2), hasta las proteínas M, ORF7A y E del virus SARS-CoV2, lo que sugiere la participación de PIGX en otras funciones celulares.

Entre los resultados más destacados se encontró que no se ha reportado la expresión de la proteína en corazón, músculo esquelético, mamá y ovario, tejidos donde sí se ha reportado el ARNm y con respecto a PIGM, la expresión del ARNm está presente en los mismos tejidos que PIGX.

Uno de los hallazgos principales de esta investigación es la participación de PIGX en diferentes enfermedades, como lo es el síndrome de retraso mental por hiperfosfatasa en donde los datos sugieren que existe un paso crítico durante las síntesis de GPI que involucra a las enzimas PIGM-PIGX y PIGV para el correcto funcionamiento celular. De igual manera sucede con la hemoglobinuria paroxística nocturna, que, aunque no se ve una participación directa de *PIGX*, se han identificado mutaciones en las regiones codificante del gen en células de sangre periférica, igual que *PIGM*, el cual se ha estudiado que participa activamente en esta enfermedad. Otra enfermedad en donde se ha observado mutaciones en *PIGX* es la hipertensión, lo que ha sugerido que podría estar participando en la patogénesis de la enfermedad. Por otra parte, se ha estudiado el posible desarrollo de medicamentos antiparasitarios, pues se ha dado a conocer que de la enzima GPI-MT-I del ser humano utiliza diferentes sustratos que el de parásitos como *Leishmania*, lo que sugiere que se puede inhibir de forma selectiva a enzimas de la síntesis de GPI de *Leishmania* sin afectar la vía del ser humano.

Por último, se obtuvo información de la implicación del gen *PIGX* en el cáncer de mama pues se ha observado una alta expresión en sus tejidos y se ha visto que la proteína forma complejos con las proteínas RCN1 y RCN2 contribuyendo con la proliferación del cáncer de seno de humano. Además, resultados de investigaciones anteriores indican que pacientes de cáncer cervicouterino con altos niveles del

ARNm de *PIGX* tienen mayor probabilidad de supervivencia en comparación con pacientes que tienen niveles bajos del ARNm.

Debido a la información obtenida de *PIGX* y su posible participación en el cáncer cervicouterino se planeó clonar la posible región promotora del gen y ver su actividad mediante la reacción de luciferasa, sin embargo, a pesar de que se modificaron los posibles pasos que parecían dificultar el proceso, ninguno fue acertado, pues seguían apareciendo placas con falsos-positivos.

En la segunda parte, para aislar la región de la posible región promotora, una de las posibles razones que pudo dificultar el proceso de clonación es el paso de PCR, ya que la región promotora del gen *PIGX* tiene un porcentaje muy alto de citosinas y guaninas, por lo tanto, requiere temperaturas de desnaturalización más altas, lo que pudo ocasionar que las bandas que se veían en las PCRs estuvieran muy tueses, es decir que se obtuviera una baja concentración de ADN.

Otro motivo pudo ser que los sitios de restricción de las enzimas dentro de los oligos, estaban justo al inicio de la secuencia de estos, y se las investigaciones sugieren que para una mayor eficacia en la actividad de las enzimas de restricción los sitios de restricción deben estar en medio o a unos 5-6 nucleótidos después del inicio de los oligos (Checa, 2020). Y aunque se elaboraron nuevos oligos con estas sugerencias, estos no amplificaron la región seseada.

Agregando otra causa, podría ser que el vector se estuviera recircularizando dando como resultados falsos positivos, ya que se obtuvieron clones de *E. coli* con pGL4. *PIGX*1396pb, pero al momento de verificar si el inserto estaba presente mediante varios métodos como PCR de colonia, extracción de ADN plasmídico y corte con enzimas, en ninguna se percibió que lo tuviera.

En resumen, existen muchos factores que pudieron haber influido para que el procesos de clonación no se pudiera llevar a cabo, sin embargo también existe la posibilidad que el gen en si sea muy difícil de clonar y que necesite condiciones muy específicas, un ejemplo de ello fue que para poder obtener una banda en los productos de PCR solo aparecía si se utilizaba MasterMix2X de la marca Promega,

pues aunque se intentó con otras marcas y hasta con los reactivos por separado no salió ninguna banda.

Finalmente, todos estos resultados nos permitieron conocer todas las características importantes del gen *PIGX* y su proteína y que debido a su implicación en diferentes enfermedades es necesario que se continúe investigando, además los resultados obtenidos en estudio puedan dar pauta para futuras investigaciones.

8. Conclusiones

El estudio de la glicosilación en condiciones normales y alteradas han tenido gran avance a lo largo de los años y el estudio del glicolípido GPI y de los glicogenes implicados parecen ser de relevante importancia médica. Las mutaciones tanto en *PIGX* como los productos de los glicogenes relacionados en la primera fase de la biosíntesis de GPI parecen ser cruciales en algunas de las enfermedades como el cáncer, el síndrome de retraso mental por hiperfosfatasa, la HPN, enfermedades parasitarias e incluso hipertensión. Actualmente se sabe muy claramente que la mayoría de las enfermedades son multifactoriales, es decir, se debe al efecto combinado de factores genéticos, ambientales, epigenéticos, alimenticios, estrés, entre otras. Por lo tanto, es importante conocer cómo se regula *PIGX* desde el punto de la actividad transcripcional hasta su actividad proteica, para comprender su participación en varios procesos celulares y así comprender como sus alteraciones están relacionadas a estas enfermedades.

9. Referencias

- Almeida, A. M., Murakami, Y., Layton, D. M., Hillmen, P., Sellick, G. S., Maeda, Y., Richards, S., Patterson, S., Kotsianidis, I., Mollica, L., Crawford, D. H., Baker, A., Ferguson, M., Roberts, I., Houlston, R., Kinoshita, T., & Karadimitris, A. (2006). Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nature medicine*, *12*(7), 846–851. <https://doi.org/10.1038/nm1410>
- AlphaFold Protein Structure Database". AlphaFold Protein Structure Database. [Consultado 26 septiembre 2022]. Disponible en: alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8TBF5.
- Armbrister, R., Ochoa, L., & Abbott, K. L. (2023). The clinical role of glycobiology on ovarian cancer progression. *Advances in cancer research*, *157*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2022.07.004>
- Ashida, H., Hong, Y., Murakami, Y., Shishioh, N., Sugimoto, N., Kim, Y. U., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2005). Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. *Molecular biology of the cell*, *16*(3), 1439–1448. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0802>
- Bailen, M. M. (2019). Diseño y síntesis de derivados mono-y multivalentes de 1, 4-iminociclitoles: Estudio de sus propiedades como inhibidores de glicosidasas (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
- Bektas, M., Copley-Merriman, C., Khan, S., Sarda, S. P., & Shammo, J. M. (2020). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: role of the complement system, pathogenesis, and pathophysiology. *Journal of managed care & specialty pharmacy*, *26*(12-b Suppl), S3–S8. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2020.26.12-b.s3>
- Belachew E. B. (2018). Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *Journal of immunology research*, *2018*, 6529681. <https://doi.org/10.1155/2018/6529681>
- Bonilla, D. M. (2022). Comportamiento termotrópico de los fosfolípidos, revisión bibliográfica.
- Brattig, N. W., Kowalsky, K., Liu, X., Burchard, G. D., Kamena, F., & Seeberger, P. H. (2008). *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol toxin interacts with the membrane of non-parasitized red blood cells: a putative mechanism contributing to

malaria anemia. *Microbes and infection*, 10(8), 885–891.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.05.002>

Bürgi, M. D. L. M., Perelmuter, K., Cutine, A., Attallah, C., Oggero, M., Fontana, D., ... & Mohana–Borges, R. (2021). Glicoproteínas terapéuticas: diseño, expresión en células de mamífero y análisis de sus glicanos.

Carvalho, T., Trindade, S., Pimenta, S., Santos, A. B., Rijo-Ferreira, F., & Figueiredo, L. M. (2018). Trypanosoma brucei triggers a marked immune response in male reproductive organs. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(8), e0006690.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006690>

Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1(22-25).

Checa R, A., Orlando Santillan, Andres Andrade-Dominguez (2017) Método: Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado). Conogasi, Conocimiento para la vida. Fecha de consulta: Septiembre, 2022

Checa R, A . (2020). Método: Diseño de primers con sitios de corte para clonación. 2023, Mayo 10, Conogasi.org Sitio web: <https://conogasi.org/articulos/metodo-diseno-de-primers-con-sitios-de-corte-para-clonacion/>

Cowton, A., Bütikofer, P., Häner, R., & Menon, A. K. (2022). Identification of TbPBN1 in Trypanosoma brucei reveals a conserved heterodimeric architecture for glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase-I. *Molecular microbiology*, 117(2), 450–461. <https://doi.org/10.1111/mmi.14859>

Crilly, N. P., & Mugnier, M. R. (2021). Thinking outside the blood: Perspectives on tissue-resident Trypanosoma brucei. *PLoS pathogens*, 17(9), e1009866.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009866>

Cruz, L. M. G., Juárez, J. H., Rojas, B. F., Cruz, P. A. H., Mayoral, E. P. C., & Velasco, I. B. G. (2019). El papel de las GalNac-Transferasas en el desarrollo del cáncer de mama. *Revista de Educación Bioquímica*, 38(2), 48-56.

Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin

- Fioretto, L., Davidson, C., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic acids research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- del Campo, J. A. C. F. (2019, April). Glicoconjugados (estructura, funciones biológicas, actividad patológica, utilización terapéutica). In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 85, No. 1).
- Dolezal S, Hester S, Kirby PS, Nairn A, Pierce M, Abbott KL. Elevated levels of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins in plasma from human cancers detected by C. septicum alpha toxin. *Cancer Biomark*. 2014 Jan 1;14(1):55-62. doi: 10.3233/CBM-130377.
- Fenollar, À., Ros-Lucas, A., Pía Alberione, M., Martínez-Peinado, N., Ramírez, M., Ángel Rosales-Motos, M., Y Lee, L., Alonso-Padilla, J., & Izquierdo, L. (2022). Compounds targeting GPI biosynthesis or *N*-glycosylation are active against *Plasmodium falciparum*. *Computational and structural biotechnology journal*, 20, 850–863. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.01.029>
- França, C. T., Li Wai Suen, C. S. N., Carmagnac, A., Lin, E., Kiniboro, B., Siba, P., Schofield, L., & Mueller, I. (2017). IgG antibodies to synthetic GPI are biomarkers of immune-status to both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in young children. *Malaria journal*, 16(1), 386. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2042-2>
- Fu, L., Liu, Y., Chen, Y., Yuan, Y., & Wei, W. (2019). Mutations in the PIGW gene associated with hyperphosphatasia and mental retardation syndrome: a case report. *BMC pediatrics*, 19(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1440-8>
- Goerdeler, F., Seeberger, P. H., & Moscovitz, O. (2021). Unveiling the Sugary Secrets of *Plasmodium* Parasites. *Frontiers in microbiology*, 12, 712538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712538>
- Gorocica RP, Atzín JA, Saldaña AK, et al. (2008) Comportamiento tumoral y glicosilación. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. Bellis, S. L., Reis, C. A., Varki, A., Kannagi, R., & Stanley, P. (2022). Glycosylation Changes in Cancer. In A. Varki (Eds.) et al., *Essentials of Glycobiology*. (4th ed., pp. 631–644). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gray, C. J., Thomas, B., Upton, R., Migas, L. G., Evers, C. E., Barran, P. E., & Flitsch, S. L. (2016). Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high

- resolution glycan analysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1860(8), 1688–1709. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.003>
- Horn, D., Krawitz, P., Mannhardt, A., Korenke, G. C., & Meinecke, P. (2011). Hyperphosphatasia-mental retardation syndrome due to PIGV mutations: expanded clinical spectrum. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(8), 1917–1922. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34102>
- Horn, D., Wieczorek, D., Metcalfe, K., Barić, I., Paležac, L., Cuk, M., Petković Ramadža, D., Krüger, U., Demuth, S., Heinritz, W., Linden, T., Koenig, J., Robinson, P. N., & Krawitz, P. (2014). Delineation of PIGV mutation spectrum and associated phenotypes in hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, 22(6), 762–767. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.241>
- Jeong, D., Park, H. S., Kim, S. M., Im, K., Yun, J., Lee, Y. E., Ryu, S., Ahn, Y. O., Yoon, S. S., & Lee, D. S. (2021). Ultradeep Sequencing Analysis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones Detected by Flow Cytometry: PIG Mutation in Small PNH Clones. *American journal of clinical pathology*, 156(1), 72–85. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa211>
- Jiménez Chávez, P. C. (2019). *Caracterización del promotor del gen que codifica para una proteína de membrana de Phaseolus Vulgaris con modificaciones del tipo GP* (Doctoral dissertation).
- Jumper, J et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* (2021).
- Kim, Y. U., Ashida, H., Mori, K., Maeda, Y., Hong, Y., & Kinoshita, T. (2007). Both mammalian PIG-M and PIG-X are required for growth of GPI14-disrupted yeast. *Journal of biochemistry*, 142(1), 123–129. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm113>
- Kim, Y. U., Ashida, H., Mori, K., Maeda, Y., Hong, Y., & Kinoshita, T. (2007). Both mammalian PIG-M and PIG-X are required for growth of GPI14-disrupted yeast. *Journal of biochemistry*, 142(1), 123–129. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm113>
- Kinoshita T. (2020). Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Open biology*, 10(3), 190290. <https://doi.org/10.1098/rsob.190290>

- Koeller, C. M., & Heise, N. (2011). The Sphingolipid Biosynthetic Pathway Is a Potential Target for Chemotherapy against Chagas Disease. *Enzyme research*, 2011, 648159. <https://doi.org/10.4061/2011/648159>
- Lebreton, S., Zurzolo, C., & Paladino, S. (2018). Organization of GPI-anchored proteins at the cell surface and its physiopathological relevance. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 53(4), 403–419. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1485627>
- Li, H., Coghlan, A., Ruan, J., Coin, L. J., Hériché, J. K., Osmotherly, L., Li, R., Liu, T., Zhang, Z., Bolund, L., Wong, G. K., Zheng, W., Dehal, P., Wang, J., & Durbin, R. (2006). TreeFam: a curated database of phylogenetic trees of animal gene families. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D572–D580. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj118>
- Li, Y., Liu, D., Wang, Y., Su, W., Liu, G., & Dong, W. (2021). The Importance of Glycans of Viral and Host Proteins in Enveloped Virus Infection. *Frontiers in immunology*, 12, 638573. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638573>
- Liu YS, Fujita M. Mammalian GPI-anchor modifications and the enzymes involved. *Biochem Soc Trans*. 2020 Jun 30;48(3):1129-1138. doi: 10.1042/BST20191142. PMID: 32573677
- Liu, S. S., Liu, Y. S., Guo, X. Y., Murakami, Y., Yang, G., Gao, X. D., Kinoshita, T., & Fujita, M. (2021). A knockout cell library of GPI biosynthetic genes for functional studies of GPI-anchored proteins. *Communications biology*, 4(1), 777. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02337-1>
- Lopez, S., Rodriguez-Gallardo, S., Sabido-Bozo, S., & Muñoz, M. (2019). Endoplasmic Reticulum Export of GPI-Anchored Proteins. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3506. <https://doi.org/10.3390/ijms20143506>
- Manni, G., Lewis, V., Senesi, M., Spagnolli, G., Fallarino, F., Collins, S. J., Mouillet-Richard, S., & Biasini, E. (2020). The cellular prion protein beyond prion diseases. *Swiss medical weekly*, 150, w20222. <https://doi.org/10.4414/smw.2020.20222>
- Martinez-Morales P, Morán Cruz I, Roa-de la Cruz L, Maycotte P, Reyes Salinas JS, Vazquez Zamora VJ, Gutierrez Quiroz CT, Montiel-Jarquín AJ, Vallejo-Ruiz V. Hallmarks of glycogene expression and glycosylation pathways in squamous and

adenocarcinoma cervical cancer. PeerJ. 2021 Aug 31;9:e12081. doi: 10.7717/peerj.12081.

Meen, A. J., Doncheva, A. I., Böttcher, Y., Dankel, S. N., Hoffmann, A., Blüher, M., Fernø, J., Mellgren, G., Ghosh, A., Sun, W., Dong, H., Noé, F., Wolfrum, C., Pejler, G., Dalen, K. T., & Kolset, S. O. (2023). Obesity Is Associated with Distorted Proteoglycan Expression in Adipose Tissue. *International journal of molecular sciences*, 24(8), 6884. <https://doi.org/10.3390/ijms24086884>

Milla N, (2020) Design of a new biological platform for the production of glycolycerolipids

Miranzadeh Mahabadi, H., & Taghibiglou, C. (2020). Cellular Prion Protein (PrPc): Putative Interacting Partners and Consequences of the Interaction. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7058. <https://doi.org/10.3390/ijms21197058>

Miryala, S. K., Anbarasu, A., & Ramaiah, S. (2018). Discerning molecular interactions: A comprehensive review on biomolecular interaction databases and network analysis tools. *Gene*, 642, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.028>

Murakami, Y., Kanzawa, N., Saito, K., Krawitz, P. M., Mundlos, S., Robinson, P. N., Karadimitris, A., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2012). Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *The Journal of biological chemistry*, 287(9), 6318–6325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331090>

Nakakido, M., Tamura, K., Chung, S., Ueda, K., Fujii, R., Kiyotani, K., & Nakamura, Y. (2016). Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class X containing complex promotes cancer cell proliferation through suppression of EHD2 and ZIC1, putative tumor suppressors. *International journal of oncology*, 49(3), 868–876. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3607>

Nakakido, M., Tamura, K., Chung, S., Ueda, K., Fujii, R., Kiyotani, K., & Nakamura, Y. (2016). Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class X containing complex promotes cancer cell proliferation through suppression of EHD2 and ZIC1, putative tumor suppressors. *International journal of oncology*, 49(3), 868–876. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3607>

Nakamura, J., Gul, H., Tian, X., Bultman, S. J., & Swenberg, J. A. (2012). Detection of PIGO-deficient cells using proaerolysin: a valuable tool to investigate mechanisms of

mutagenesis in the DT40 cell system. *PLoS one*, 7(3), e33563.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033563>

Nakatsukasa K. (2021). Potential Physiological Relevance of ERAD to the Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins in Yeast. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1061. <https://doi.org/10.3390/ijms22031061>

Naseri, R., Navabi, S. J., Samimi, Z., Mishra, A. P., Nigam, M., Chandra, H., Olatunde, A., Tijjani, H., Morais-Urano, R. P., & Farzaei, M. H. (2020). Targeting Glycoproteins as a therapeutic strategy for diabetes mellitus and its complications. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 28(1), 333–358. <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00327-y>

National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Navarro, D. S. (2021) Estudio computacional de interacciones ligando-proteína en glicosiltransferasas mediante dinámica molecular.

Ochoa, D., Hercules, A., Carmona, M., Suveges, D., Baker, J., Malangone, C., Lopez, I., Miranda, A., Cruz-Castillo, C., Fumis, L., Bernal-Llinares, M., Tsukanov, K., Cornu, H., Tsigos, K., Razuvayevskaya, O., Buniello, A., Schwartzenuber, J., Karim, M., Ariano, B., Martinez Osorio, R. E., ... McDonagh, E. M. (2023). The next-generation Open Targets Platform: reimaged, redesigned, rebuilt. *Nucleic acids research*, 51(D1), D1353–D1359. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1046>

Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, Boucher L, Leung G, Kolas N, Zhang F, Dolma S, Coulombe-Huntington J, Chatr-Aryamontri A, Dolinski K, Tyers M. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci.* 2021 Jan;30(1):187-200. doi: 10.1002/pro.3978

Pingitore, V. (2021). Reacciones Clic y evaluación in situ para la identificación de inhibidores de glicosidasas.

Pinho, S., Reis, C. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15, 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>

Protein BLAST: search protein databases using a protein query". BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. [Consultado 27 de septiembre de 2022]. blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins.

Ramirez, I. M. D. (2021). Los desórdenes congénitos de la glicosilación.

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>

Ruiz Martínez, M. A., Peralta Galisteo, S., Castán, H., & Morales Hernández, M. E. (2020). Role of proteoglycans on skin ageing: a review. *International journal of cosmetic science*, 42(6), 529–535. <https://doi.org/10.1111/ics.12660>

Schjoldager, K. T., Narimatsu, Y., Joshi, H. J., & Clausen, H. (2020). Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(12), 729–749. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00294-x>

Shivatara, S. S., Shivatara, V. S., & Wong, C. H. (2022). Glycoconjugates: Synthesis, Functional Studies, and Therapeutic Developments. *Chemical reviews*, 122(20), 15603–15671. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01032>

Smith, T. K., Sharma, D. K., Crossman, A., Dix, A., Brimacombe, J. S., & Ferguson, M. A. (1997). Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *The EMBO journal*, 16(22), 6667–6675. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6667>

Spiro R, (2002).Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology*, Volume 12, Issue 4, , Pages 43R–56R, <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>

Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current protocols in bioinformatics*, 54, 1.30.1–1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>

Struwe, W. B., & Robinson, C. V. (2019). Relating glycoprotein structural heterogeneity to function - insights from native mass spectrometry. *Current opinion in structural biology*, 58, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.019>

Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D638-D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000.

The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. The data used for the analyses described in this manuscript were obtained from: [insert, where appropriate] the GTEx Portal on MM/DD/YY and/or dbGaP accession number phs000424.vN.pN on MM/DD/YYYY.

The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue D1, 6 January 2023, Pages D523–D531, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>

Thomas, D., Rathinavel, A. K., & Radhakrishnan, P. (2021). Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1875(1), 188464. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188464>

Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk JM, Brunnström H, Glimelius B, Sjöblom T, Edqvist PH, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Ponten F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017 Aug 18;357(6352):eaan2507. doi: 10.1126/science.aan2507

Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnström, H., Glimelius, B., ... Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6352), eaan2507. <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>

- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., & Seeberger, P. H. (Eds.). (2022). *Essentials of Glycobiology*. (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wu T, Yin F, Guang S, He F, Yang L, Peng J.(2020). The Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis pathway in human diseases. *Orphanet J Rare Dis*; 28;15(1):129. DOI: 10.1186/s13023-020-01401-z.
- Xu, H., Shen, B., Qiao, M., Linhardt, R. J., & Zhang, X. (2021). Recent advances on the one-pot synthesis to assemble size-controlled glycans and glycoconjugates and polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 258, 117672. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117672>
- Yadav, U., & Khan, M. A. (2018). Targeting the GPI biosynthetic pathway. *Pathogens and global health*, 112(3), 115–122. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1442764>
- Zhu, Y., Zhuo, J., Li, C., Wang, Q., Liu, X., & Ye, L. (2018). Regulatory network analysis of hypertension and hypotension microarray data from mouse model. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y.: 1993)*, 40(7), 631–636. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1416120>