



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA MOLÉCULA RECONOCIDA POR LA
LECTINA DE *Amaranthus leucocarpus* EN LINFOCITOS T CD4⁺ MURINOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN ARENAS DEL ÁNGEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FES ZARAGOZA, UNAM
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de abril de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ARENAS DEL ÁNGEL MARÍA DEL CARMEN** con número de cuenta **505016964** con la tesis titulada **"DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA MOLÉCULA RECONOCIDA POR LA LECTINA DE *Amaranthus leucocarpus* EN LINFOCITOS T CD4⁺ MURINOS"**, realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**:

Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ
Vocal: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELAZQUEZ
Secretario: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 09 de junio de 2015



M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo y facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado en el programa de becarios (165388).

Al proyecto UNAM CONACyT CB-2009-01 0129932.

A los miembros del comité tutor, por la paciencia y los aportes realizados a mi trabajo de investigación

Dra. Martha Legorreta Herrera
Dr. Enrique Ortega Soto
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

Agradecimientos

A los miembros del jurado, por las observaciones y asesoramiento para concluir este trabajo

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez
Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez
Dra. Martha Legorreta Herrera
Dr. Abraham Landa Piedra
Dr. Enrique Ortega Soto

A mi tutor el Dr. Ricardo Lascurain...**GRACIAS.**

A mis amigos y compañeros de los diversos laboratorios que me apoyaron y abrieron sus puertas; en especial a la Sra. Rosa Nieto por su gran cariño y amistad.

A mi familia por la paciencia, cariño y confianza.

Dedicatoria

A mis padres, Lorenzo y Eloina.

Índice

Índice de abreviaturas y tablas	i
Abreviaturas	ii
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	4
3.1. Dominios lipídicos y moléculas coestimuladoras	4
3.2. Glicosilación	7
3.3. Lectinas	10
4. Antecedentes	12
5. Hipótesis	16
6. Objetivos	17
7. Material y Métodos	18
7.1. Ratones	18
7.2. Reactivos y anticuerpos	18

7.3. Obtención de linfocitos T CD4⁺ purificados	18
7.4. Cultivo celular, activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺	19
7.5. Cultivo celular, activación y desorganización de las balsas lipídicas en los linfocitos T CD4⁺	20
7.6. Evaluación de los transcritos (ARNm) de las citocinas	21
7.7. Producción de citocinas solubles e intracelulares	22
7.8. Obtención de la muestra proteica	23
7.9. Purificación de dominios lipídicos	24
7.10. Cuantificación proteica mediante el método de Lowry para volúmenes pequeños	24
7.11. Identificación de la molécula reconocida por la lectina de <i>Amaranthus Leucocarpus</i>, mediante electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
7.12. Identificación de la molécula reconocida por la lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>, mediante electroforesis de doble dimensión	25
7.13. Electrotransferencia e Inmunodetección	26
7.14. Espectrometría de masas y comparación de péptidos	27

7.15. Microscopía confocal	28
7.16. Análisis estadístico	29
8. Resultados	30
8.1. Pureza de linfocitos T CD4 ⁺ murinos	30
8.2. Cinética de proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ estimulados con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD ⁺ , anti-CD3/ <i>ALL</i> y <i>ALL</i>	31
8.3. Cinética de proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ a diferentes tiempos y estímulos	33
8.4. Linfocitos T CD4 ⁺ estimulados vía anticuerpo anti-CD3/ <i>ALL</i> producen citocinas	37
8.5. Expresión de la molécula reconocida por <i>ALL</i> en linfocitos T CD4 ⁺ tratados con metil-β-ciclodextrina .	40
8.6. Reconocimiento de <i>ALL</i> mediante Far-western blotting en lisado proteico total de linfocitos T CD4 ⁺ .	41
8.7. Reconocimiento de <i>ALL</i> mediante Far-western blotting en lisado proteico de dominios lipídicos provenientes de linfocitos T CD4 ⁺ .	43
8.8. Identificación de la molécula(s) reconocida por <i>ALL</i> en dominios lipídicos mediante doble dimensión.	44
8.9. Aislamiento y Comparación de la molécula(s) reconocida por <i>ALL</i> .	45

8.10. La tinción de <i>ALL</i> colocaliza con el anticuerpo anti-dominio FERM de la moesina en la superficie celular de linfocitos T CD4 ⁺ activados	48
8.11. Linfocitos T CD4 ⁺ activados con anticuerpos anti-CD3/anti-moesina secretan citocinas.	50
9. Discusión	52
10. Conclusiones	57
11. Literatura citada	58
12. Apéndice	68

i. Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Tipos de enlace de oligosacáridos a proteínas	8
Figura 2. Biosíntesis de core en O-glicanos	9
Figura 3. Porcentaje de pureza de linfocitos T CD4 ⁺	30
Figura 4. Los linfocitos T CD4 ⁺ proliferan en respuesta a los anticuerpos anti-CD3 con la coestimulación de <i>ALL</i>	32
Figura 5. La molécula reconocida por <i>ALL</i> coestimula la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺	33
Figura 6. Imágenes representativas de la activación de linfocitos T CD4 ⁺ mediante diferentes estímulos	35
Figura 7. La molécula reconocida por <i>ALL</i> genera coestimulación comparable a la obtenida por el anticuerpo anti-CD28	36
Figura 8. La molécula reconocida por <i>ALL</i> provee coestimulación similar a la obtenida por CD28	37
Figura 9. Comparación de la producción de citocinas en linfocitos T CD4 ⁺ activados por CD3/ <i>ALL</i> y por CD3/CD28	39
Figura 10. La molécula reconocida por <i>ALL</i> se localiza en las balsas lipídicas de los linfocitos T CD4 ⁺	41
Figura 11. <i>ALL</i> reconoce varias bandas proteicas en el lisado total de linfocitos T CD4 ⁺	42
Figura 12. La molécula(s) reconocida por <i>ALL</i> se localiza en los dominios lipídicos	44
Figura 13. Aislamiento de la molécula(s) reconocida por <i>ALL</i> mediante doble dimensión	46
Figura 14. Glicoproteína reconocida por la lectina de <i>A. leucocarpus</i> colocaliza con el anticuerpo anti-dominio FERM de la proteína moesina en la superficie celular de linfocitos T CD4 ⁺ activados	49

Tabla 1. Principales Familias de Moléculas Coestimuladoras en Linfocitos T	7
Tabla 2. Análisis comparativo de la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ estimulados bajo las condiciones indicadas	36
Tabla 3. Análisis de péptidos trípticos de la(s) molécula(s) reconocida por <i>ALL</i> , determinada por espectrometría de masas	47
Tabla 4. Citocinas detectadas en el sobrenadante de linfocitos T CD4 ⁺ activadas bajo las condiciones mencionadas a 48h de cultivo	51
Tabla 5. Expresión de citocinas intracelulares en linfocitos T CD4 ⁺ estimulados bajo las condiciones mencionadas a 48h de cultivo	51

ii. Abreviaturas

ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
Galβ1,3GalNAc	Galactosa β 1,3N-Acetil -D-Galactosamina
MβCD	Metil β -ciclodextrina
FERM	Familia de proteínas 4.1, ezrina, radixina y moesina
CFSE	Carboxifluoresceína succimidil ester
DTT	Ditiotreitol
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
TBS	Tris- amortiguador salino
2-DE	Electroforesis de doble dimensión
[3H]TdR	Timidina tritiada
MACS	Separación de células mediante anticuerpos conjugados a perlas magnéticas
NanoLC-ESI-MS/MS	Espectrometría de masas en tandem-ionización por electrospray-cromatografía Nano Líquida

1. Resumen

En las últimas décadas, se le ha dado relevancia a los glicoconjugados de la superficie celular porque son clave para entender los procesos biológicos involucrados en la activación celular. Los glicoconjugados se han estudiado mediante lectinas, las cuales son proteínas que reconocen carbohidratos. En este sentido, la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) específica para el antígeno Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr, reconoce una glicoproteína de ~70 kDa sobre la superficie de los linfocitos T. Dicha molécula tiene un papel coestimulador que promueve la proliferación celular. El objetivo de este trabajo fue identificar a la molécula reconocida por *ALL* y evaluar su función en linfocitos T CD4⁺ murinos.

A partir de células provenientes de ganglios linfáticos axiales de ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad, se aislaron linfocitos T CD4⁺ en un sistema de separación negativa mediante anticuerpos conjugados a perlas magnéticas. Los linfocitos se estimularon en las siguientes condiciones; con anticuerpos anti-CD3 y *ALL*, anticuerpos anti-CD3 a dosis subóptima, anti-CD3/anti-CD28 y *ALL*/anti-CD28 durante 48 h de cultivo. Para identificar la molécula reconocida por *ALL*, los linfocitos T CD4⁺ se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 48 h. Después del cultivo, se lisaron, se sometieron a electroforesis, Far-western blot y espectrometría de masas. Los linfocitos T CD4⁺ activados con anticuerpo anti-CD3 y *ALL* muestra una proliferación celular incrementada de manera similar a aquellas activadas vía anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 a 48 horas de cultivo. Además, *ALL* indujo la producción de IL-4, IL-10, TNF-alfa y TGF-beta en linfocitos T activados vía CD3. Respecto a la caracterización de la molécula reconocida por *ALL*,

mediante electroforesis de doble dimensión y far-Western blotting, se demostró que *ALL* reconoce dos proteínas prominentes asociadas a microdominios de balsas lipídicas en linfocitos T CD4⁺ activados con anticuerpos anti-CD3/CD28. Por espectrometría de masas, los fragmentos peptídicos de las proteínas reconocidas por *ALL* muestran secuencias con 33% de homología a matricina (gi|347839 NCBI) y 41% de identidad con una proteína sin nombre relacionada a moesina (gi|74186081 NCBI). El análisis por microscopia confocal de linfocitos T CD4⁺ activados vía CD3/CD28 confirma que la tinción por *ALL* colocaliza con el dominio FERM de la molécula moesina sobre la membrana plasmática y en los sitios de contacto intercelular. Para corroborar la función coestimuladora de la proteína tipo moesina, linfocitos T CD4⁺ se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-moesina, observándose un comportamiento similar a aquellas activadas vía CD3/*ALL*. Nuestros hallazgos sugieren que una O-glicoproteína tipo moesina es la molécula reconocida por *ALL* en las balsas lipídicas, la cual parece participar en la inducción de señales coestimuladoras sobre linfocitos T CD4⁺ murinos, sin embargo, se requiere la caracterización total de la(s) molécula(s), así como, identificar la ruta de señalización que sigue dicha activación celular para poder comprender mejor la activación de linfocitos T y su modulación por moléculas co-receptoras.

2. Abstract

The Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr specific lectin from *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) binds a ~70 kDa glycoprotein on murine T cell surface. We show that in the absence of antigen presenting cells, murine CD4⁺ T cells activated by an anti-CD3 antibody plus *ALL* show enhanced cell proliferation similar to cells activated via CD3/CD28 at 48 h of culture. Moreover, *ALL* induced the production of IL-4, IL-10, TNF-alpha, and TGF-beta in CD3-activated cells. Proteomic analysis using two-dimensional electrophoresis and far-Western blotting, showed that *ALL* recognized two prominent proteins associated to the lipid raft microdomains in CD3/CD28-activated CD4⁺ T cells. By mass spectrometry, the peptide fragments from *ALL*-recognized proteins showed sequences with 33% homology to matricin (gi|347839 NCBI) and 41% identity to an unnamed protein related to moesin (gi|74186081 NCBI). Confocal microscopy analysis of CD3/CD28-activated CD4⁺ T cells confirmed that staining by *ALL* colocalized with anti-moesin FERM domain antibody along the plasma membrane and in the intercellular contact sites. Our findings suggest that a moesin-like O-glycoprotein is the *ALL*-recognized molecule in lipid rafts, and that this molecule is capable to give costimulatory signals on CD4⁺ T cells.

3. Introducción

Todos los seres vivos están formados por el mismo tipo de macromoléculas y éstas rigen cada una de sus funciones. Una de estas macromoléculas, los glicanos, tienen la capacidad de formar compuestos mediante uniones covalentes de distintos carbohidratos a lípidos o proteínas, llamados glicoconjugados [1]. Estos glicoconjugados forman parte de elaborados complejos en la superficie celular que son clave para entender diversos procesos biológicos [1]. En este sentido, la respuesta inmunológica depende de la interacción de diferentes clases de células, por ejemplo, los linfocitos T presentan en su superficie, moléculas como CD4 o CD8, TCR, CD2, CD3, CD28 y CD40L entre otras, mientras que los macrófagos, las células de Langerhans y los linfocitos B presentan MHC-I, MHC-II, CD1, LFA-3 y CD80/CD86, y sus interacciones se involucran en los procesos de comunicación celular [2-3]. El estudio y caracterización de las moléculas de superficie, como las mencionadas anteriormente, permiten un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la cooperación célula con célula [2].

3.1. Dominios lipídicos y moléculas coestimuladoras.

Las moléculas implicadas en la activación celular se encuentran en compartimentos de membrana llamados dominios lipídicos o "lipid rafts" [4]. Los dominios lipídicos son regiones pequeñas (10-200 nm de diámetro), heterogéneas y muy dinámicas, que presentan un gran contenido de colesterol y glicosfingolípidos [5]. Estos dominios, favorecen la sinapsis inmunológica, reorganizando y restringiendo el acceso de proteínas, de tal manera que sólo aquéllas ancladas a glicolípidos de la membrana, con dominios transmembranales

o proteínas citosólicas aciladas, pueden residir en dichos dominios; sin embargo, algunas proteínas integrales quedan excluidas [4-5].

En los linfocitos T se ha descrito que algunos de los componentes mayoritarios de los dominios lipídicos poseen capacidad coestimuladora [5]. Dentro de las principales moléculas se encuentra el miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas CD28, el cual se expresa en todos los linfocitos CD4 y aproximadamente en el 50% de los linfocitos CD8 [6-7]. La coestimulación de CD28 promueve la traslocación de los dominios lipídicos, activando la vía de transporte de moléculas de superficie al lugar de la sinapsis inmunológica [7-8]; además, induce el movimiento de receptores unidos al citoesqueleto de actina a la zona TCR/MHC y produce un aumento de la fosforilación de varias proteínas implicadas en la activación celular [9].

En la actualidad se han identificado una gran variedad de moléculas coestimuladoras para los linfocitos T, las cuales, se agrupan por familias y patrón de expresión en la tabla 1. La relevancia del estudio de estas moléculas ha permitido comprender los mecanismos que conllevan a la activación celular.

Familia	Molécula	Virgen		Activada		Efector	
		CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
CD28-B7 [7, 10-15]	CD28	+++	++	++	++	++	++
	ICOS/CD278	-	-	+++	+++	+	+
	B7H3	-	-	+++	+++	?	?
	PD-1	+	+	++	++	?	?
TNF/TNFR [16-17]	CD27/S152	+	+	++	++	+	+
	4-1BB/CD137	-	-	+++	+++	++	+++
	OX-40/CD134	+	+	+++	++	+	
	GITR	+	+	+++	+++	+	?
	CD30	+	+	++	++	+	+
	HVEM/CD270	++	++	+	+	?	?
	LIGHT/CD258	+++	+++	+	+	++	?
CD40L/CD154	-	-	+++	+	?	?	
CD2 [18-19]	CD2/OX34	++	++	?	?	?	?
	CD2R	-	-	++	++	?	?
	SLAM/CD150	+	++	+++	+	+	+
Integrinas [20]	CD11a-CD18/LFA-1	+	+	++	++	+++	?
	VLA-4/CD29-CD49d	+	+	+	?	?	?
	VLA-5/CD29-CD49e	+	+	++	+	?	?
	VLA-6/CD29-CD49f	+	+	++	+	?	?
	ICAM-1	-	-	++	++	?	?
Tetraspaninas [21-22]	CD9	+	+	++	++	+	?
	CD63/LAMP-3	+	+	++	++	+	+
	CD81	+	+	++	++	+	+
	CD82	+	+	++	++	?	?
TIM [23]	TIM-1	-	-	++	++	-/+	?

Receptor con dominio SCRC [24-25]	CD5	+	+				
	CD6	+	+	+	+	+	?
	CD27	+	-	-	-	?	?
	CD70	-	-	-	-	+	?
Otros [25- 28]	CD99	+	+	++	++	?	?
	CD100	-	-	+	+	?	?
	CD101/V7	+	+	++	++	?	?
	BTLA/CD272	-	-	++	+	+	?
	CD40	?	?	+	+	?	?
	CD44	+	+	+++	++	?	?
	CD152	-	-	++	++	?	?

Tabla 1. **Principales Familias de Moléculas Coestimuladoras en Linfocitos T.** Expresión: +++ (alta); ++ (media); + (baja); - (nula); ? (desconocida).

3.2. Glicosilación

Prácticamente, todas las moléculas de superficie celular están glicosiladas. La glicosilación es un proceso pos-traducciona que consiste en la adición enzimática de oligosacáridos a proteínas, confiriendo diferentes cualidades estructurales y funcionales [29]. La relevancia fisiológica de la glicosilación se observa en el correcto plegamiento de proteínas o en la estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio. Por otra parte, los carbohidratos cumplen funciones importantes en el reconocimiento biológico, por ejemplo en las interacciones de célula con célula y célula con matriz extracelular [29]. Existen principalmente 3 tipos de glicosilación de proteínas: 1) la N-glicosilación que consiste en la unión de oligosacáridos a la proteína mediante el enlace entre una

N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparagina; 2) la C-glicosilación que es la unión de un residuo de α -manopiranosil con un carbono 2 del grupo indol del triptófano vía unión C-C; y 3) la O-glicosilación que es la unión de oligosacáridos unidos a proteínas mediante un enlace alfa formado por la N-acetilgalactosamina (GalNAc) y un residuo de la serina o treonina, por ejemplo, GalNAc α 1-O-ser/Thr (Fig. 1) [29-30]. Las cadenas de oligosacáridos, están constituidas estructuralmente por tres secciones principales: a) el *core* o región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena peptídica, b) el *esqueleto*, que determina la longitud de la cadena del oligosacárido, y c) la región periférica, donde habitualmente se encuentra galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. La primera reacción de la O-glicosilación (adición de GalNAc a la cadena peptídica) la cataliza una N-acetilgalactosaminiltransferasa (GalNAc-T), que forman el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) [30].

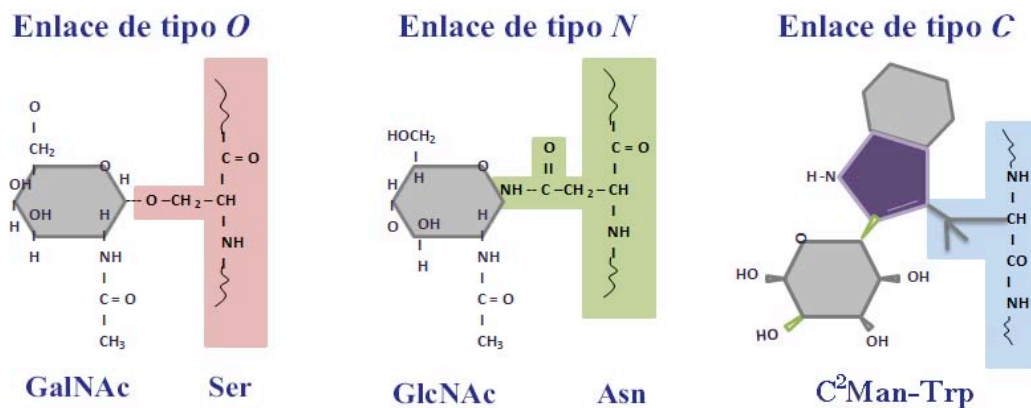


Figura 1. **Tipos de enlace de oligosacáridos a proteínas.** Enlace tipo O donde la N-acetilgalactosamina (GalNAc) se une a residuos de serina o treonina. Enlace tipo N, en el cual la N-acetilglucosamina (GlcNAc) se une a un residuo de asparagina. Enlace tipo C donde la manosa se une al carbono 2 de un residuo de triptófano (C²Man-Trp) [30, modificado].

A partir de esta estructura pueden formarse los diferentes cores, mediante la acción de glicosiltransferasas específicas, que actúan de manera secuencial [29]. Por ejemplo, el core 1 se sintetiza por la adición de galactosa en enlace β -1,3 a la GalNAc del antígeno Tn, mediante la enzima β -1,3 galactosiltransferasa. Esta estructura se conoce como antígeno TF o de Thomsen-Friedenreich ($\text{Gal}\beta$ -1,3 GalNAc-O-Ser/Thr). La adición de N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante la acción de otra glicosiltransferasa al core 1 forma el core 2. El core 3 se forma por la adición de GlcNAc en unión β -1,3 al antígeno Tn. El core 3 se convierte en core 4 cuando se le adiciona otra GalNAc [29-31]. Estas 4 estructuras de O-glicanos son las que se sintetizan principalmente en las células eucariotas (Fig. 2).

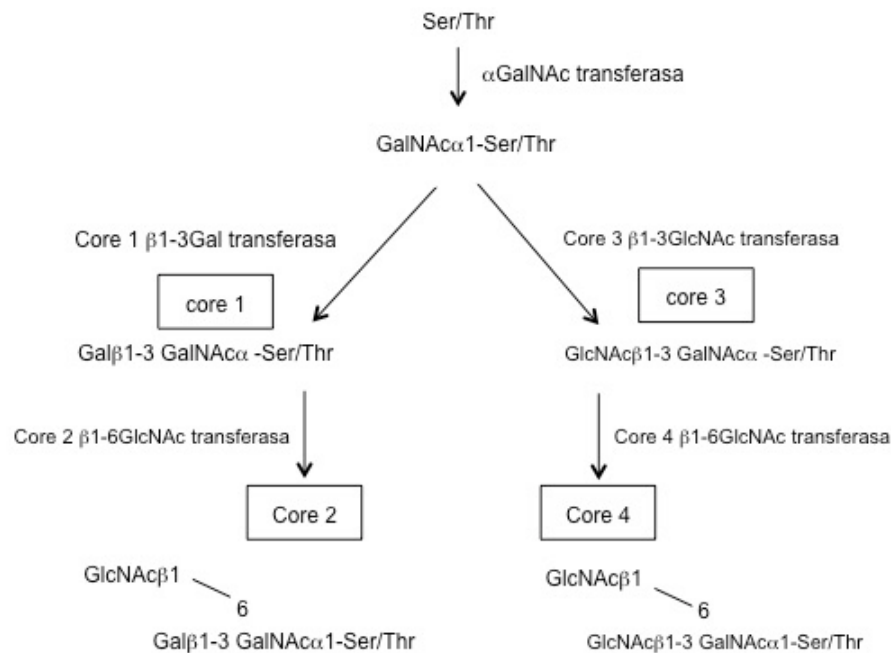


Figura 2. **Biosíntesis de core en O-glicanos.** La reacción inicial de la O-glicosilación es la adición de GalNAc a residuos de serina o treonina de una proteína. Estas estructuras se pueden modificar por galactosilación, sialilación, fucosilación o sulfatación [modificado de la referencia 31].

3.3. Lectinas

Una de las herramientas útiles para el estudio de las glicoproteínas son las lectinas [1, 6]. Las lectinas son proteínas que se unen de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas [32-33]. La especificidad de unión de las lectinas a su ligandos, es comparable con aquélla que presentan los anticuerpos con los antígenos. La mayoría de las lectinas contienen al menos 2 sitios de unión, de ahí que su utilidad se basa en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares [1, 32-34]. Las lectinas están presentes en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como animales vertebrados superiores [32-34]. Algunas de estas proteínas son reconocidas por su capacidad de activar linfocitos y promover su proliferación a través de la interacción con residuos sacarídicos presentes en numerosas glicoproteínas de membrana, se incluyen aquéllas involucradas en la sinápsis inmunológica como es el caso de las sialolectinas [35]. Las interacciones de lectinas con carbohidratos, no sólo se hallan involucradas en el fenómeno de activación de linfocitos, sino que también juegan un papel fundamental en innumerables eventos de la regulación de la fisiología del sistema inmune, como la maduración tímica, la migración linfocitaria y la apoptosis [1-3, 36-37]. Se han estudiado lectinas con efecto mitogénico sobre los linfocitos, entre las que se destacan las provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Pisum sativum* (PSA) y *Fitolaca americana* (PWM) [2, 38-39]. Las interacciones de estas lectinas con células se pueden inhibir en muchos casos por monosacáridos, por lo que se ha llegado a la conclusión de que ellas se unen a

sacáridos de la superficie celular, lo que ha provisto a los científicos de marcadores útiles para emplearlos en técnicas de histoquímica y en la microscopia electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática [40]. Generalmente se utilizan lectinas conjugadas con fluorocromos [2, 39] y dentro de los estudios de membrana, se ha descrito en la literatura el uso de lectinas para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y en ocasiones de esta forma se pueden detectar cambios morfológicos ocurridos, para analizar la distribución subcelular de epítomos y terminales glicoproteícas, además para detectar alteraciones en la expresión de moléculas presentes en la superficie celular [41]. Además, se emplean en la caracterización e identificación de grupos sanguíneos [2, 42]; son excelentes herramientas para el estudio de carbohidratos de superficie celular y para la identificación y aislamiento de subpoblaciones celulares [6, 42].

4. Antecedentes

La lectina del *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) es una glicoproteína dimérica de 35kDa específica para el denominado antígeno T (Gal β -1,3GalNAc) presente en O-glicanos [43]. En trabajos previos se demostró mediante técnicas histoquímicas que *ALL* posee la capacidad de interactuar específicamente con timocitos presentes en la zona corticomedular y medula tímica [36], mientras que las células reconocidas por la lectina *Arachis hypogaea* (*PNA*) también reconocen específicamente la estructura Gal β -1,3GalNAc, se encuentran distribuidas básicamente en la corteza tímica [36]. *ALL* reconoce en médula tímica de ratón una población de linfocitos que son predominantemente CD4⁺, mientras que los linfocitos CD8⁺ identificados se presentan en menor proporción (aproximadamente 11%), evidenciando así la etapa de maduración en las que se encuentran las poblaciones celulares [36-37]. Así mismo se detectaron células dendríticas *ALL*⁺, que interactúan principalmente con los timocitos CD4⁺ [36].

Otros estudios han demostrado que la *ALL* reconoce macrófagos no activados y la expresión de la molécula reconocida por *ALL* depende del estado de activación del macrófago [38]. Todos los macrófagos *ALL*⁺ son Mac⁻, se sabe que Mac 2 (Galectina-3) pertenece a la familia de las galectinas, las cuales son moléculas que aumentan proporcionalmente su expresión con la activación celular. La interacción de *ALL* con el macrófago disminuye con su estado de activación [38]. Estudios bioquímicos revelaron que el receptor de *ALL* es una glicoproteína de 70kDa el cual, podría jugar un papel importante en los mecanismos de activación de macrófagos [38].

El aislamiento de la molécula detectada por la *ALL* mediante cromatografía de afinidad reveló que la glicoproteína presenta un peso molecular de 70 kDa, que no coincide con el peso molecular de los diferentes ligandos que reconoce la lectina *PNA* [44]. La molécula reconocida por la *ALL* presenta una composición de 20% de carbohidratos, principalmente GalNAc y Galactosa. La composición de aminoácidos reveló que la mayoría de los residuos corresponden a serinas, lo cual es común de las proteínas O-glicosiladas [45]. La caracterización por MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) de la molécula reconocida por *ALL* proveniente de timocitos de ratón indican mediante comparación con la base de datos NCBI nr (Swiss-Prot) que no existe homología significativa con otras proteínas ya descritas, lo que sugiere que este receptor sea considerado como una molécula de membrana no descrita [45].

Por citometría de flujo se ha demostrado que *ALL* puede unirse a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de circulación sanguínea, de bazo y de ganglios axiales; observándose que casi todos los linfocitos T CD8⁺ (88-95%) expresan la molécula reconocida por *ALL*, mientras que la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ no expresan a la molécula reconocida por *ALL* y quienes lo presentan (12-40%) es en menor densidad que los CD8⁺ [44]. A las 72h de cultivo el estímulo mitogénico ConA, induce un decremento en el número de linfocitos T CD8⁺ *ALL*⁺, mientras que a las 24h de cultivo induce un incremento máximo en el número de los linfocitos T CD4⁺ *ALL*⁺, seguido por un rápido decremento después de las 48h de cultivo. Esta glicoproteína pareciera que se expresa de manera selectiva en los linfocitos T CD8⁺ en reposo, y en los primeros estadios de activación de los linfocitos T CD4⁺.

La activación en el co-cultivo de los linfocitos T CD4⁺ ALL⁻ con células CD3⁻ y ConA en un cultivo de 72h, mostró que la expresión de la molécula reconocida por ALL es equivalente al encontrado en linfocitos T CD4⁺ de cultivos totales. Sin embargo, el máximo grado de unión de la ALL sobre linfocitos T en el co-cultivo fue a las 48h, a diferencia de las 24h en el cultivo de linfocitos T CD4⁺ de cultivos de células linfoides de ganglio linfático [46]. Posteriormente, se evaluó la proliferación celular, observándose el mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ALL⁺ (65.59%) se presenta cuando las células linfoides de ganglio se cultivaron durante 72h. Sin embargo, en el cultivo de los linfocitos TCD4⁺ purificados, se observó que el máximo porcentaje de linfocitos ALL⁺ fue de 8.41% a las 24h de cultivo. Asimismo, en la activación por medio de anticuerpos anti-CD3s en células linfoides de ganglio linfático hubo un reconocimiento máximo 44.86% de linfocitos T CD4⁺ a las 24 horas de cultivo; mientras que la activación de linfocitos T CD4⁺ purificados presentó un reconocimiento máximo de 19.2% por ALL. Con el uso de anticuerpos anti-CD3 inmovilizado en placa se determinó que el porcentaje máximo de linfocitos T CD4⁺ ALL⁺ en células linfoides de ganglio linfático fue de 50.18% a las 48h de cultivo, mientras que en los linfocitos T CD4⁺ purificados el porcentaje de células que expresan el receptor de ALL fue máximo de 18.25% a las 24h de cultivo, lo que sugiere que la expresión de la glicoproteína reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en los linfocitos T CD4⁺ depende de la activación de otras poblaciones celulares [47]. Por otra parte, las células totales de órganos linfoides murinos estimulados con anticuerpo anti-CD3 en presencia de ALL, muestran un incremento en la proliferación de los linfocitos T [48]; sin embargo, para confirmar el papel coestimulador de ALL, se requieren análisis en

ausencia de otras poblaciones celulares como las células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, consideramos que identificar los componentes celulares y moleculares que están involucrados en la activación celular y determinar la secuencia de eventos bioquímicos que ocurren después del reconocimiento del antígeno son de gran importancia.

5. Hipótesis

La lectina *Amaranthus leucocarpus* reconoce una molécula que promueve la proliferación celular en linfocitos T CD4⁺ murinos.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Identificar a la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* y evaluar su función en linfocitos T CD4⁺ murinos.

6.2. Objetivos particulares

1. Demostrar que la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) en linfocitos T CD4⁺ tiene función coestimuladora.
2. Evaluar la producción de citocinas solubles e intracelulares de linfocitos T CD4⁺ coestimulados por *ALL*.
3. Desorganizar y aislar dominios lipídicos de membrana en linfocitos T CD4⁺.
4. Identificar a la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) en linfocitos T CD4⁺.
5. Demostrar mediante microscopia confocal la colocalización de *ALL* y el dominio FERM de la proteína moesina.

7. Material y Métodos

7.1. Ratones

Ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y/o de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

7.2. Reactivos y anticuerpos

La lectina proveniente de las semillas de *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos humanos tipo O [49] y se acopló con éster de N-hidroxisuccinimida de biotina para obtener el conjugado *ALL*-B. El medio de cultivo RPMI-1640 y el colorante azul tripano se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). La estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC), estreptavidina-CyChrome (Cy-Chr), los anticuerpos monoclonales anti-CD4-ficoeritrina (PE), anti-CD3-CyChrome (CyChr), anti-CD3 y anti-CD28 se adquirieron en PharMingen (San Diego, CA, USA). Las perlas magnéticas para aislamiento de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ se obtuvieron de Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA). El carboxifluorescein succimidil ester (CFSE) se adquirió en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

7.3. Obtención de linfocitos T CD4⁺ purificados

Se adquirieron las células totales provenientes de ganglios linfáticos axiales y se suspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 sin suplementar. Los linfocitos T CD4⁺ se purificaron a partir de la incubación con una mezcla de anticuerpos

contra CD11b, CD8a, CD45R (B220), DX5 y Ter-119, los cuales estaban acoplados a perlas magnéticas y en una segunda etapa se pasaron a una columna unida a una placa magnética, se eluyó la fracción positiva para la molécula CD4 (selección negativa). Se determinó el número y viabilidad de las células mediante el colorante de exclusión azul de tripano al 0.2% y se evaluó el porcentaje de pureza mediante citometría de flujo a través de anticuerpos anti-CD4-PE (1:100) y/o anti-CD3-Cychr (1:100). Se utilizaron suspensiones celulares con >95% de viabilidad y pureza. Se realizaron 3 experimentos independientes.

7.4. Cultivo celular, activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ se incubaron 15 min con CFSE a 5mM, a temperatura ambiente en agitación constante y en la oscuridad. Enseguida, se agregaron 8 mL de medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero fetal de ternera inactivado con calor, descartándose el sobrenadante. Los linfocitos T CD4⁺ (2×10^5) se colocaron en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 suplementado (suero fetal al 10%, 1% de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 50 mM de 2-mercaptoetanol) activando en las siguientes condiciones: anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/ALL y/o ALL a diversas concentraciones (0.1, 1 y 5 µg/mL para anti-CD3 así como 5, 10 15 y 20 mg/mL para ALL) durante 48 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. La activación con anticuerpo anti-CD3 inmovilizado se realizó de la siguiente manera: las concentraciones se ajustaron a 50 µl de volumen final, los cuales se colocaron en la placa de 96 pozos y se incubó durante 2 hrs a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%; posteriormente, se realizaron 2 lavados y

prosiguió con el cultivo celular. Después de obtener la concentración óptima de los diferentes estímulos, los linfocitos se incubaron a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 h de cultivo, con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28, anti-CD28, anti-CD3/*ALL* y/o anti-CD28/*ALL*. En los cultivos, se incluyeron células no tratadas con CFSE como control y células tratadas con CFSE sin estímulo. Posteriormente las células recuperadas del cultivo se lavaron con PBA (PBS conteniendo azida de sodio al 0.2% y albúmina bovina al 0.2%, pH 7.3) y se incubaron con anticuerpos anti-CD4-PE y/o anti-CD3-CyChr durante 15 min. Todas las incubaciones se realizaron a 4°C.

7.5. Cultivo celular, activación y desorganización de las balsas lipídicas en los linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ (2×10^5) se colocaron en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 suplementado [(suero fetal al 10%, 1% de L-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), 10 mM HEPES y 50 mM de 2-mercaptoetanol)] a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48h en presencia de anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28 y anti-CD3/*ALL*. Los linfocitos T CD4⁺ sin estímulo y/o activados provenientes de cultivo, se lavaron con PBA y posteriormente se incubaron 30 min a 37°C con 10mM de metil-β-ciclodextrina (MβCD) adquirido en Sigma (St. Louis, MO). Finalmente, se realizó un segundo lavado con PBA y se incubaron los linfocitos T CD4⁺ con *ALL* y anticuerpos anti-CD4-PE y/o anti-CD3-CyChr durante 15 min. Las incubaciones se realizaron a 4°C. El análisis se realizó en un citómetro FACS-Excalibur de Becton & Dickinson

(Mountain View, CA) con el programa Cellquest para verificar la población celular que se encuentra en proliferación. En todos los experimentos se adquirieron al menos 10^4 eventos y se analizaron las regiones correspondientes a los linfocitos de acuerdo a su tamaño y granularidad.

7.6. Evaluación de los transcritos (ARNm) de las citocinas.

Los linfocitos T CD4⁺ (5×10^6) activados con 1 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD3 inmovilizado y 1 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD28 o con 1 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD3 y 5 $\mu\text{g/mL}$ ALL (concentraciones óptimas) durante 48 h de cultivo, se utilizaron para evaluar los transcritos (ARNm) de las citocinas. Las células se lavaron en PBS estéril, y el ARN total se aisló usando un kit mini RNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro a 260 nm. Como control se utilizaron células no activadas.

Se utilizó el sistema Omniscript RT y 1 μg de muestra para realizar la transcripción inversa, el ADNc (1 μg) resultante se utilizó para amplificar mediante la Reacción de Cadena de la polimerasa (PCR) los genes de IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ y TGF- β . Cada muestra de ADNc se amplificó por duplicado como se describe [50]; los conjuntos de las sondas o “primers”, así como, la concentración de ADNc se calibraron con un número de ciclos para obtener los amplicones en la fase lineal. Se utilizaron las secuencias específicas de los primers para los genes: (IL-2) en el sentido 5' ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC 3', antisentido 5' GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A 3'; (IL-4) sentido 5' ACA GGA GAA GGG CGC CAT 3', antisentido 5' GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA 3'; (IL-10) sentido 5'

ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T 3', antisentido 5' ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT GTT T 3'; (TNF- α) sentido 5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC 3', antisentido 5' CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC 3'; (IFN-g) sentido 5' GAA AGC CTA GAA AGT CTG AAT AAC T 3', antisentido 5' ATC AGC AGC GAC TCC TTT TCG GCT T 3'; (TGF- β) sentido 5' GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA 3', antisentido 5' GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG 3' and (β -actina) sentido 5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA 3', antisentido 5' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC 3' [50]. Las reacciones de la PCR contenían, en un volumen final de 20 μ L, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 0.1 mg/mL gelatina, 2 mM MgCl₂, 100 nM de cada primer, 200 mM de dNTPs y 0.5 U de ampli-Taq polimerasa/75 ng de ADNc. Después de 29–36 ciclos, los productos de la PCR aislados en geles de acrilamida al 10% se tiñeron con bromuro de etidio y la cuantificación se realizó en un UV-fotodocumentador con ayuda del programa Carestream molecular Imaging V5.0.2.30. La cantidad de ARNm de cada citocina se ajustó a la cantidad de ARNm de la β -actina (control). El análisis se realizó por densitometría de barrido y se expresó como unidades arbitrarias.

7.7. Producción de citocinas solubles e intracelulares.

Para evaluar la producción de citocinas solubles, linfocitos T CD4⁺ se activaron con anticuerpos anti-CD3/CD28, anti-CD3/*ALL* o con 1:1 μ g/mL de anticuerpos anti-CD3 inmovilizado/anti-moesina durante 48h de cultivo. Posteriormente, se utilizaron 25 mL del sobrenadante para la medición de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-gama y TNF se utilizó un sistema comercial cytometric

bead array (CBA) siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). El análisis se realizó con un citómetro de flujo utilizando el programa FCAP Array versión 3.0.19.2091. Los límites de detección de los CBA fueron los siguientes: IL-2, 0.1 pg/mL; IL-4, 0.03 pg/mL; IL-6, 1.4 pg/mL; IFN-g, 0.5 pg/ mL; TNF, 0.9 pg/ mL; IL-17A, 0.8 pg/ mL e IL-10, 16.8 pg/mL.

Para la detección de citocinas intracelulares, las células se activaron como se ha descrito anteriormente y cuatro horas antes de finalizar el periodo de incubación, se adicionó brefeldina-A (1 mg/mL). Posteriormente, las células se cosecharon, se lavaron con PBS-BSA y se fijaron con *p*-formaldehído al 4% en PBS durante 10 min. Adicionalmente, las células se lavaron 2 veces con PBS y se permeabilizaron utilizando un amortiguador PBS, 0.1% saponina, 0.01% IgG de cerdo, 10 mM HEPES y 10% BSA, durante 10 min. Después de la permeabilización, las células se incubaron durante 30 min con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos: IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN-gama, y TGF-beta. Finalmente, las células se lavaron con PBS, 0.1% saponina, 100 mM HEPES y 10% BSA, seguido de un lavado con amortiguador PBS-BSA. Todas las incubaciones se realizaron a 4 ° C y el análisis se llevó a cabo por citometría de flujo.

7.8. Obtención de la muestra proteica.

Para la obtención de la muestra proteica, los LT CD4⁺ se ajustaron a 1x10⁸ y se realizó un lisado mecánico en presencia de solución amortiguadora de lisis (10% Triton X-100, 2M Tris-HCl pH 7.5, 0.25M EDTA pH 8, y 1M NaCl) e inhibidores de proteasas (Mini complete Roche Diagnostics GMBH, Mannheim,

Germany).

7.9. Purificación de dominios lipídicos.

Los dominios lipídicos se obtuvieron mediante el procedimiento descrito [51]. Esta técnica se modificó para ajustarla a los volúmenes necesarios para la ultracentrifugación. Por lo tanto, la muestra proteica se centrifugó a 17,949 xg durante 10 minutos a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le adicionó regulador base TEN (2M Tris-HCl pH 7.5, 0.25M EDTA pH 8, y 1M NaCl) y OptiPrep 60% (Sigma, St. Louis, MO), obteniendo así una solución al 40% de OptiPrep, el cual, se transfirió a un tubo de ultracentrifugación de 13x51mm Beckman (Palo Alto, CA) para posteriormente, formar un gradiente al 0, 5, 30 y 40% de OptiPrep. El gradiente se centrifugó a 201,000 xg en un rotor TLS55 de ángulo móvil (Beckman) durante 2h a 4°C. Finalmente, se recuperaron 7 fracciones de 340 mL cada una, empezando la recuperación por la concentración al 0% (parte superior del gradiente, fracciones 1-7).

7.10. Cuantificación proteica mediante el método de Lowry para volúmenes pequeños.

La cuantificación de la concentración proteica se realizó espectrofotométricamente, utilizando el método de Lowry (DC protein assay kit 500-0116) de Bio-Rad (CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como proteína estándar se utilizó 1mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA).

7.11. Identificación de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, mediante electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las muestras proteicas (10-30 μ g) se suspendieron en solución amortiguadora de muestra (Tris 62,5 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v y azul de bromofenol 0,01% p/v, pH 6,8. Laemmli simple amortiguador) de Bio-Rad (CA, USA) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% [52]. Se utilizaron marcadores de peso molecular (precision plus protein standars, Kaleidoscope) de amplio rango 10-250kD (BioRad). Las condiciones de corrimiento electroforético fueron 100V/1.5 h en una cámara mini-PROTEAN (BioRad). Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie, o bien se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección (técnica de Far-Western blot).

7.12. Identificación de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, mediante electroforesis de doble dimensión.

La primera dimensión se realizó en tiras de poliacrilamida de 7cm (Immobiline DryStrip, pH 3-10, GE Healthcare), que se hidrataron en una solución de rehidratación (8M urea, 0.5% CHAPS p/v, 2% anfollinas IPG-buffer pH 3-10 v/v, 40mM DTT, 2M Tiourea y 0.002% de azul bromofenol) de GE Healthcare (Connecticut, USA), 18 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el isoelectroenfoco de las muestras proteicas (100-500mg) en un sistema Ettan IPGphor (Biorad) de acuerdo a los métodos estándares [53]. Finalizado el

isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron 15min en una solución de equilibrio-DTT (2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% v/v glicerol, 0.002% de azul bromofenol y 100mg DTT), seguida por una incubación de 15min en una solución de equilibrio-IAA (2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% v/v glicerol, 0.002% de azul bromofenol y 250mg IAA). Finalmente, para la segunda dimensión, se colocaron las tiras sobre un gel de SDS al 7.5% en una cámara mini-PROTEAN (BioRad) a 100V/1.5 h. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie, finalmente, se llevo a cabo, la electrotransferencia e inmunodetección o la espectrometría de masas.

7.13. Electrotransferencia e Inmunodetección.

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a papel PVDF (Immobilon; Millipore, USA) de acuerdo a los métodos estándares [52, 54]. La membrana se lavó con metanol durante 30 seg para activarla y luego se colocó en solución amortiguadora de transferencia (Tris base 50 mM, glicina 384 mM y 40% de metanol) al igual que el papel filtro para equilibrar el sistema, así permanecieron hasta el momento de la transferencia. Una vez concluida la electroforesis, el gel también se equilibró en amortiguador de transferencia durante 15min. Las condiciones fueron 15V/1.15 h en una cámara de transferencia semiseca (Trans blot, BioRad Laboratoires). Concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó en amortiguador Tris salino-Tween 20 0.1% (TBS-Tw) (Tris base 20 mM, NaCl 370 mM. pH 7.6/Tween 20 al 0.1%) con BSA al 3% durante toda la noche a 4°C o bien 2 h a 37°C para evitar reacciones inespecíficas, luego se realizaron lavados con TBS-Tw. Una vez bloqueada la

membrana, ésta se incubó con la lectina *Amaranthus leucocarpus* biotinada (ALL-B) o con la subunidad β de la toxina de cólera biotinada (S β TC) (Sigma Aldrich, USA) en TBS-Tw durante toda la noche a 4°C y posteriormente 2 h a 37°C [55]. Al término de la incubación se realizaron varios lavados con TBS-Tw. Luego se realizó una segunda incubación con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Sigma Chem. Co. St. Louis MO)/TBS pH 7.6, dilución 1:5000, durante 1 h en oscuridad a 37°C en agitación suave. Finalmente se realizaron varios lavados con TBS-Tw. La detección se realizó con un kit para quimioluminiscencia (ECL Amersham) se siguieron las instrucciones del fabricante, sobre película para autorradiografía (Kodak Biomax MR, Kodak Company).

7.14. Espectrometría de masas y comparación de péptidos.

Las proteínas obtenidas por el aislamiento de la electroforesis de doble dimensión, fueron extraídas manualmente y congelados a -70 ° C hasta su uso. Para el análisis de MALDI-TOF, los puntos proteicos fueron desteñidos, reducidos, alquilados y digeridos con tripsina; además, se desalaron usando una punta C18 ZipTip (miliopore). El espectro de masas se realizó en un Autoflex (Bruker Daltonics) operado modo reflectrón. Los espectros se calibraron manualmente usando péptidos de calibración estándar, mientras que para el análisis de la mezcla de péptidos se utilizó una solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en acetonitrilo 50%/ ácido trifluoroacético 0.1%. Se generó la lista de masas de los péptidos tripticos y se compararon en la base de datos NCBI nr 20111022, utilizando los motores de búsqueda de Mascot

(<http://www.matrixscience.com/>). Este apartado se realizó en colaboración con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del Laboratorio de Proteínas y Péptidos de la Facultad de Medicina-UNAM.

7.15. Microscopía Confocal.

Linfocitos T CD4⁺ (2×10^6) se incubaron en placas de 8 pozos de cultivo tratados con poli-L-lisina (BD Falcon, San Diego, CA) y se activaron con anti-CD3/anti-CD28 durante 48 h. Después de remover el sobrenadante, las células con o sin tratamiento de *p*-formaldehído al 1% (por 5 min), se lavaron dos veces en PBS. Posteriormente, se incubaron con BSA al 1% durante 20 min, se lavaron y se incubaron en cámara húmeda con ALL-biotina (15 µg/mL) por 2 h, seguido por una incubación con streptavidina-FITC o bien las células se incubaron con el anticuerpo conejo contra el dominio FERM de la moesina seguido por una incubación con un anticuerpo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 546 preparado en burro y que reconoce a la IgG de conejo. Finalmente, las células se lavaron con PBS y los portaobjetos se trataron con medio de montaje Vectashield (conteniendo colorante DAPI) en una dilución 1:3 en PBS. Como control se utilizaron células incubadas con streptavidina-FITC o con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 546. Para los ensayos de colocalización, las células se fijaron con *p*-formaldehído al 1% y se visualizaron en un microscopio equipado con un sistema confocal ApoTome.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) se utilizó el objetivo de 63x/1. Las imágenes digitales se procesaron con el programa AxioVision, basado

en la versión 4.8.2 SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Las imágenes se tomaron bajo la misma exposición, magnificación e intensificación.

7.16. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con los programas Graphpad Prism 5 (La Jolla, CA) y Origin 8.5.1 sr2 (Northampton, UK). Para la distribución de la población se utilizó la prueba Shapiro-Wilk y la prueba t-Student se utilizó para comparar las variables se distribuyeron simétricamente. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar (SD). La comparación de los grupos, se realizó con un análisis de varianza seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni's. Los valores se consideraron estadísticamente significativos a $P < 0.05$.

8. Resultados

8.1. Pureza de linfocitos T CD4⁺ murinos.

A partir de células linfoides de ganglio de ratón, se obtuvieron linfocitos T CD4⁺ purificados mediante selección negativa. Esta población se analizó en una gráfica de tamaño vs granularidad celular (Fig. 3a) delimitándola como región 1 (R1). Las células de la R1 se analizaron en relación a la autofluorescencia y a la reacción inespecífica de anticuerpos del mismo isotipo para constituir los controles negativos (Fig. 3b). Con respecto a las células incubadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4, la Fig. 3c muestra tres gráficas de las células que corresponden a linfocitos CD4⁺, CD3⁺ y CD3⁺CD4⁺ que presentaron una pureza del 98%. En todos los casos se realizaron 3 experimentos independientes.

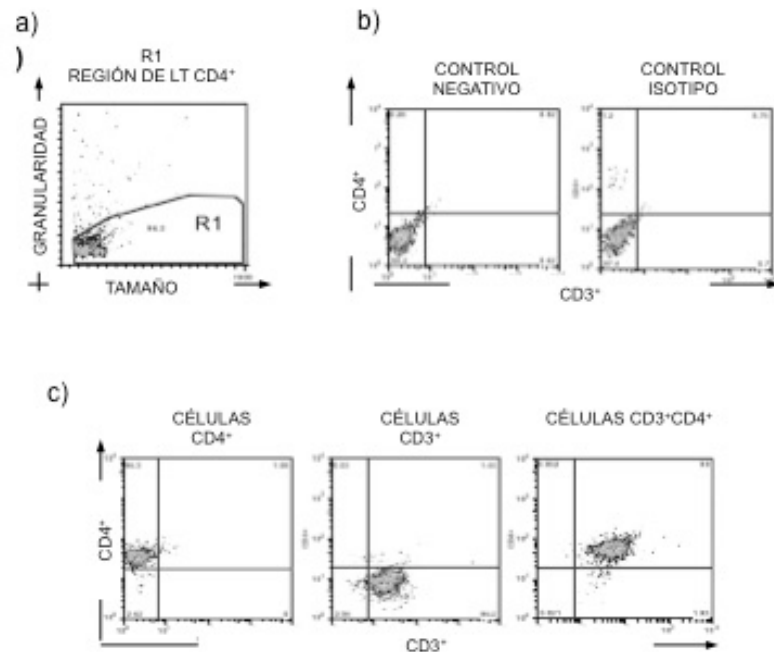


Figura 3. **El porcentaje de pureza de linfocitos T CD4⁺ fue mayor al 98%.** Linfocitos T CD4⁺ se analizaron mediante citometría de flujo. a) Gráfica correspondiente al tamaño vs granularidad celular para obtener la región 1 (R1), la cual fue analizada en: b) Gráfica de fluorescencias (FL-1 vs FL-2) que muestra el control negativo y el control de isotipo; c) Gráficas de FL1 vs FL2, mostrando células CD4⁺, CD3⁺ y CD3⁺CD4⁺, n=3.

8.2. Cinética de proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3, anti-CD3/*ALL* y *ALL*.

La siguiente meta fue determinar la concentración óptima del estímulo para inducir proliferación celular, para lograrlo se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/*ALL* y/o *ALL* en cultivo de 48 h. En todos los casos se analizaron las células correspondientes a la región de linfocitos en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. En la figura 4 se ejemplifica mediante histogramas el incremento en el porcentaje de linfocitos que proliferaron en respuesta a concentraciones crecientes de los estímulos mencionados. En el caso de las células estimuladas con 20 µg/mL de *ALL* no se observó proliferación. En las columnas 1 y 2 de izquierda a derecha se muestran las gráficas correspondientes a células sin estimular así como las estimuladas con 20 µg/mL de *ALL*, mientras que el porcentaje máximo de proliferación con 0.1, 1 y 5 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 fue de 10.7 ± 0.42 , 39.53 ± 0.57 y 42.03 ± 0.95 , respectivamente. Por lo tanto la dosis óptima de estimulación fue de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en placa. Con respecto, a los linfocitos T CD4⁺ coestimulados con anticuerpo anti-CD3/*ALL* en relación a 1/5 µg/mL, 5/10 µg/mL, 1/15 µg/mL y 1/20 µg/mL, el porcentaje máximo de proliferación fue de 69.1 ± 0.85 , 69.9 ± 0.6 , 70.3 ± 0.75 , 64.9 ± 0.7 , respectivamente (Fig. 4 columnas 5 a 7 de izquierda a derecha). Por lo tanto, el porcentaje óptimo de proliferación celular con anticuerpo anti-CD3 plus *ALL* fue con 1/5 µg/mL (Fig. 4 columna 4). En la figura 5 se muestra una gráfica de porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en proliferación contra anticuerpos anti-CD3 en coestimulación a diferentes concentraciones de *ALL*. Se

observa que las células estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (1 y 5 $\mu\text{g/mL}$) en combinación con *ALL* (5 $\mu\text{g/mL}$) mostraron de manera significativa mayor porcentaje de proliferación que las células estimuladas solamente con anticuerpo anti-CD3 ($p= 0.03$). Asimismo, se detectó un porcentaje similar de proliferación entre las células estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (1 y 5 $\mu\text{g/mL}$) y las diferentes concentraciones de *ALL* (5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$).

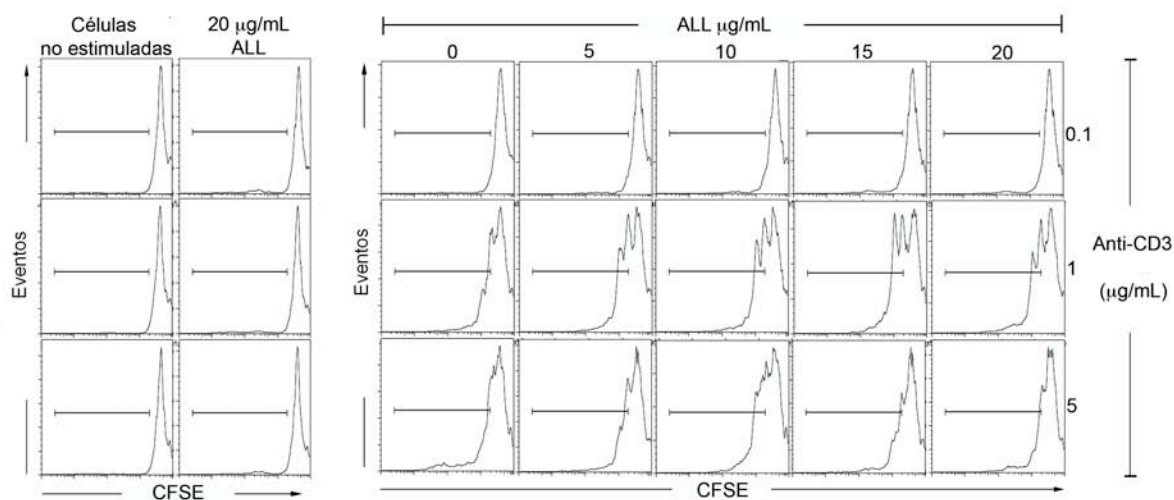


Figura 4. **Los linfocitos T CD4⁺ proliferan en respuesta a los anticuerpos anti-CD3 con la coestimulación de *ALL*.** Análisis mediante citometría de flujo de células después de cultivo de 48 h. Histogramas de proliferación celular donde las columnas de izquierda a derecha muestran: células sin estímulo, células estimuladas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de *ALL*, con 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD3 solamente (tercera columna), seguido por células coestimuladas con 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de *ALL*, $n=3$.

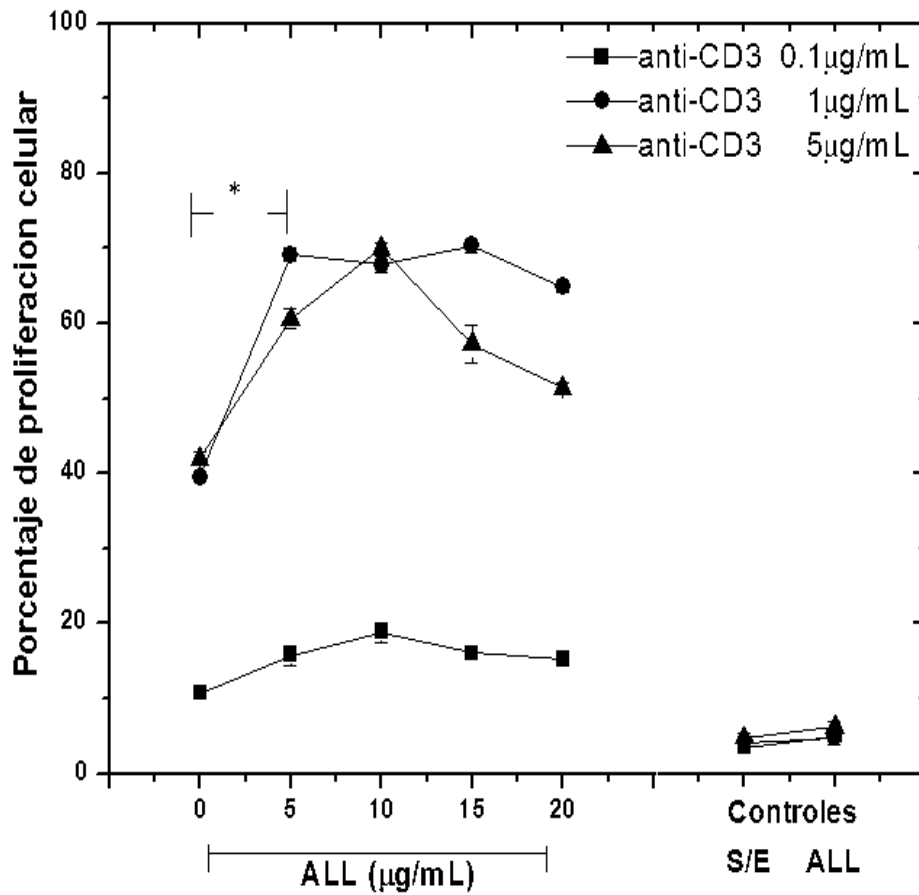


Figura 5. **La molécula reconocida por ALL coestimula la proliferación de linfocitos T CD4⁺**. Linfocitos T CD4⁺ proliferan en respuesta a la estimulación con anticuerpo anti-CD3/ALL. La gráfica representa la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $p=0.03$.

8.3. Cinética de proliferación de linfocitos T CD4⁺ a diferentes tiempos y estímulos.

El siguiente paso a realizar fue la cinética de tiempo para evaluar la proliferación de linfocitos T CD4⁺ activados con anti-CD3, anti-CD3/CD28, anti-

CD28, anti-CD3/*ALL* o anti-CD28/*ALL*. Los resultados se analizaron por microscopia electrónica y citometría de flujo. Por microscopia se observó que los cultivos celulares coestimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 y los coestimulados con anticuerpos anti-CD3/*ALL* presentaron aglutinaciones celulares típicas de activación a partir de las 48 h de cultivo (Fig. 6). El análisis de las mediciones en pixel del área ocupada por las aglutinaciones de las células activadas con anticuerpos anti-CD3/CD28 y anti-CD3/*ALL* se observa en la figura 6c. Por citometría de flujo, se evaluaron los porcentajes de proliferación de linfocitos T CD4⁺ activados a las 24, 48, 72 y 96 h con anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28, anti-CD28, anti-CD3/*ALL*, solamente *ALL* y anti-CD28/*ALL*. En la figura 7 se muestran los histogramas de células activadas en las condiciones mencionadas. Como se esperaba, las células estimuladas con anti-CD3/*ALL* (54.83 ± 1.98) presentaron un porcentaje de proliferación similar al observado por anti-CD3/CD28 (63.6 ± 8.11) (columnas 5 y 3, de izquierda a derecha). Los controles fueron: células sin estímulo, activadas con anti-CD28, *ALL* y anti-CD28/*ALL* (columnas 1, 4, 6 y 7, de izquierda a derecha). La columna 2 corresponde a células activadas con anti-CD3, el cual fue menor al porcentaje de proliferación (28.36 ± 0.67) observado con aquellas células coestimuladas. En la tabla 2 se observa el análisis comparativo del índice de división y proliferación de los linfocitos T CD4⁺ estimulados bajo las condiciones mencionadas, sugiriéndonos la función coestimuladora de la molécula reconocida por *ALL*. Se realizó la gráfica de los porcentajes de proliferación celular con respecto al tiempo. En la figura 8 se muestra la diferencia estadística entre linfocitos activados con anti-CD3 en comparación con aquellos coestimulados con CD3/*ALL* ($p=0.018$).

Cabe mencionar que observamos un comportamiento paralelo de las células coestimuladas con anti-CD3/*ALL* y anti-CD3/CD28 en todos los tiempos.

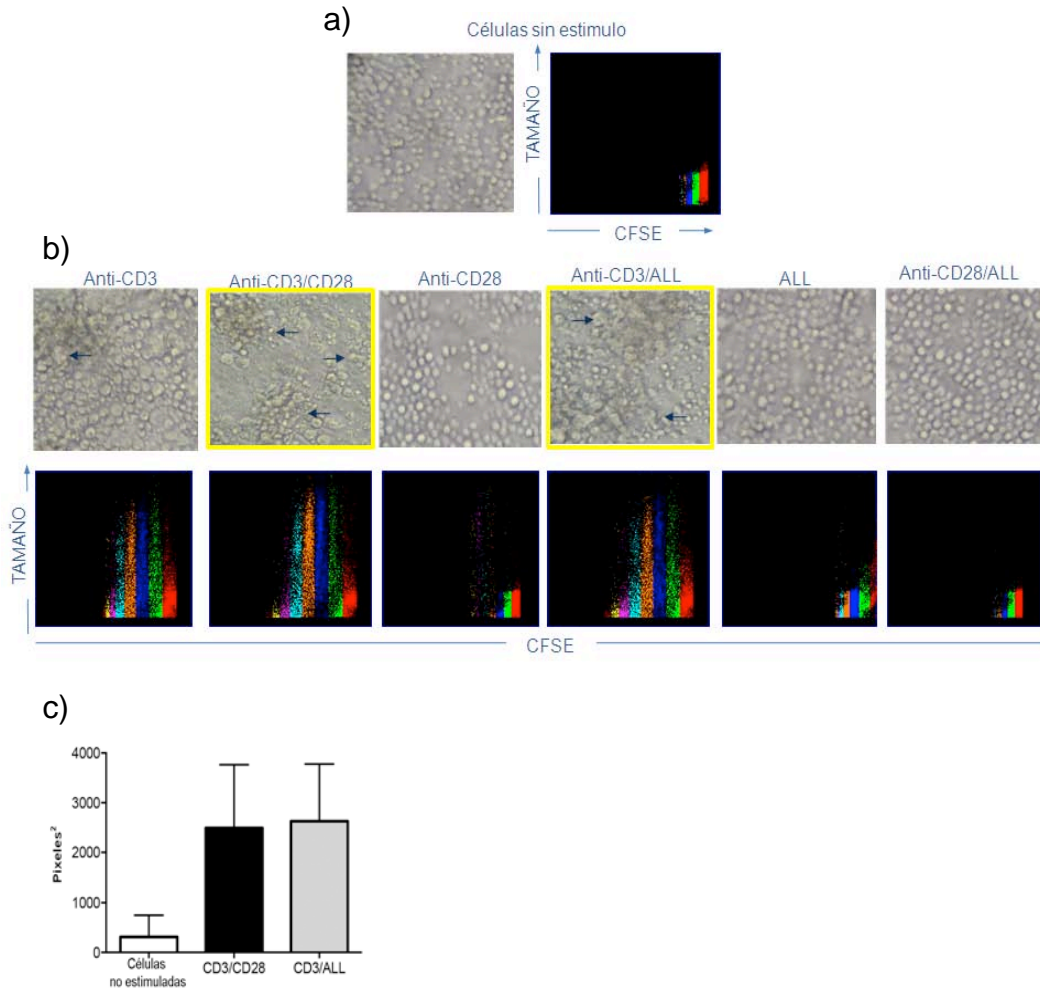


Figura 6. Imágenes representativas de la activación de linfocitos T CD4⁺ mediante diferentes estímulos. Linfocitos T CD4⁺ fueron estimulados durante el cultivo con anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28, anti-CD28, anti-CD3/*ALL* o anti-CD28/*ALL*. a) células sin estímulo. b) de izquierda a derecha: células estimuladas con: 1µg/mL de anticuerpo anti-CD3; 1/1µg/mL de anti-CD3/CD28, 1µg/mL de anti-CD28, 1/5µg/mL de anti-CD3/*ALL*, 5µg/mL de *ALL* y 1/5µg/mL de anti-CD28/*ALL* a las 48 h de cultivo. Las flechas indican la aglutinación celular típica de células activadas, n=3. c) Análisis de las mediciones en pixel del área ocupada por las aglutinaciones de las células activadas con anticuerpos anti-CD3/CD28 y anti-CD3/*ALL*.

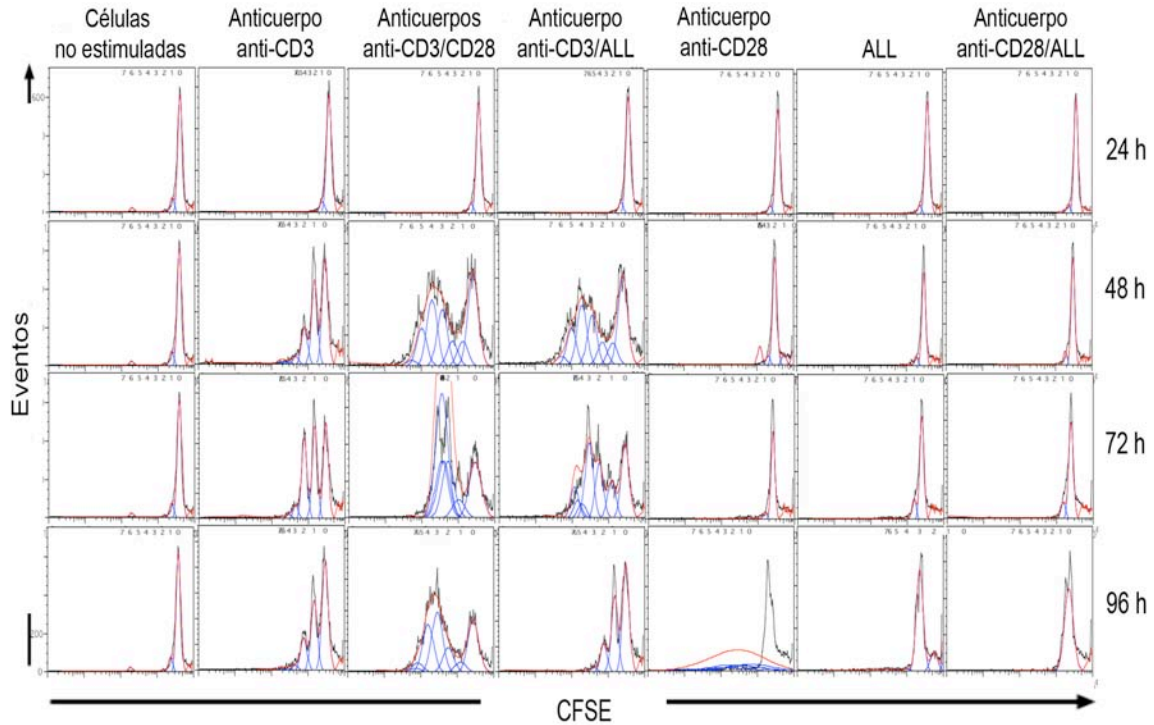


Figura 7. La molécula reconocida por **ALL** genera coestimulación comparable a la obtenida por el anticuerpo anti-CD28. Análisis mediante citometría de flujo, Histogramas de proliferación celular de linfocitos T CD4⁺; las columnas de izquierda a derecha muestran células sin estímulo y células estimuladas: con anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28, anti-CD28, anti-CD3/ALL, ALL y anti-CD28/ALL durante 24 h (panel superior), 48 h (panel intermedio superior), 72 h (panel intermedio inferior) y 96 h (panel inferior). n=3.

		Células no estimuladas	Anticuerpo Anti-CD3	Anticuerpos Anti-CD3/CD28	Anticuerpo Anti-CD3/ALL	Anticuerpo Anti-CD28	ALL	Anticuerpo Anti-CD28/ALL
24 h	Índice Div.	0.06±0.01	0.05±0.003	0.05±0.001	0.05±0.03	0.04±0.02	0.04±0.05	0.04±0.02
	Índice Prol.	1.18±0.02	1.06±0.03	1.09±0.007	1.2±0.14	1.09±0.01	1.19±0.15	1.33±0.27
48 h	Índice Div.	0.06±0.006	0.58±0.02	0.87±0.04	0.66±0.04	0.06±0.008	0.15±0.05	0.089±0.003
	Índice Prol.	1.18±0.02	1.3±0.17	2.12±0.17	1.83±0.09	1.36±0.06	1.23±0.14	1.1±0.04
72 h	Índice Div.	0.07±0.005	0.39±0.02	0.59±0.03	0.47±0.08	0.18±0.02	0.076±0.009	0.065±0.01
	Índice Prol.	1.19±0.04	1.17±0.09	2.33±0.16	2.32±0.11	1.9±0.10	1.24±0.10	1.16±0.10
96 h	Índice Div.	0.08±0.008	0.385±0.03	0.77±0.08	0.32±0.04	0.605±0.03	2.76±0.79	0.016±0.005
	Índice Prol.	1.18±0.02	1.19±0.04	2.31±0.15	1.21±0.02	1.15±0.04	1.92±0.26	2.56±0.42

Tabla 2. Análisis comparativo de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados bajo las condiciones indicadas. Índice de División: número medio de divisiones de las células totales en cultivo. Índice de Proliferación número de divisiones que han sufrido las células respondedoras.

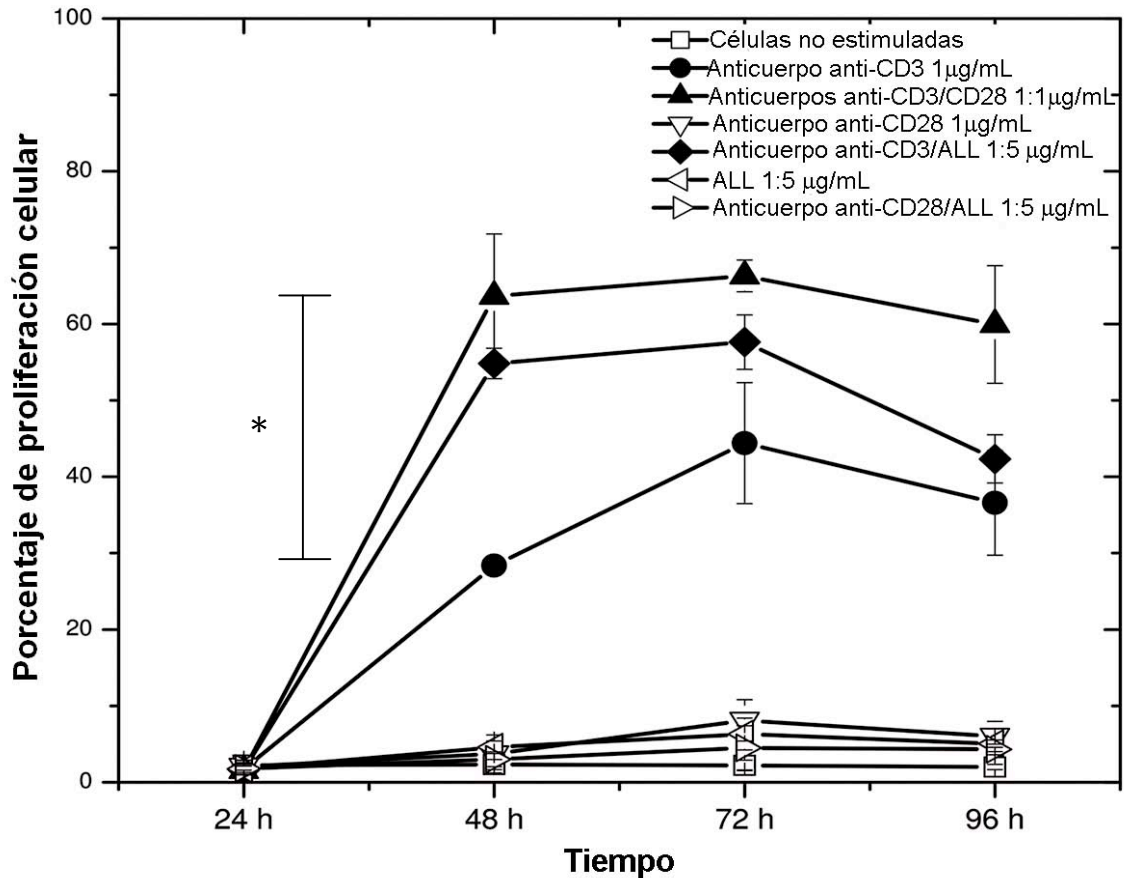


Figura 8. La molécula reconocida por ALL provee coestimulación similar a la obtenida por CD28. Los linfocitos T CD4⁺ se estimularon con anti-CD3, anti-CD3/CD28, anti-CD28, anti-CD3/ALL, ALL o anti-CD28/ALL en cultivos de 24, 48, 72 y 96 h. La gráfica muestra la proliferación en respuesta a los diferentes estímulos con respecto al tiempo, mostrando la media \pm SD de 3 experimentos independientes. *p= 0.018.

8.4. Linfocitos T CD4⁺ estimulados vía anticuerpo anti-CD3/ALL producen citocinas.

Para evaluar la función celular, se estimularon linfocitos T CD4⁺ con el anticuerpo anti-CD3 y ALL. Los resultados obtenidos mostraron niveles similares de transcritos para IL-2, TNF- α , TGF- β e IFN- γ comparados a aquellos mostrados

por los linfocitos T CD4⁺ estimulados vía CD3/CD28 (Fig. 9a). Sin embargo, las células activadas a través de CD3/*ALL* producen menor cantidad de ARNm para IL-4 e IL-10 que aquellas activadas vía CD3/CD28. La diferencia fue estadísticamente significativa tanto para IL-4 (0.06 ± 0.05 vs. 0.64 ± 0.19 ; $P= 0.005$, respectivamente) como IL-10 (0.19 ± 0.08 vs. 0.39 ± 0.07 ; $P= 0.03$, respectivamente) (Fig. 9a). Con respecto a los niveles de citocinas solubles medidos en el sobrenadante del cultivo celular, IL-2 fue 67 veces mayor en células activadas vía CD3/CD28 que en las activadas vía CD3/*ALL* ($P < 0.005$). Por otro lado, IL-10 fue 1.5 veces mayor en el sobrenadante del cultivo de células estimuladas por CD3/*ALL* que en las células activadas por CD3/CD28 ($P < 0.05$) como se muestra en la Fig. 9b. Otras citocinas no mostraron diferencias significativas en sus cantidades, los niveles tanto de IFN- γ como de IL-4 fueron prácticamente indetectables (Fig. 9b). Las mediciones de las citocinas intracelulares, se observó un mayor porcentaje de células positivas para IL-2 y TGF- β en el cultivo de células activadas por CD3/*ALL* que en las células activadas por CD3/CD28 (Fig. 9c).

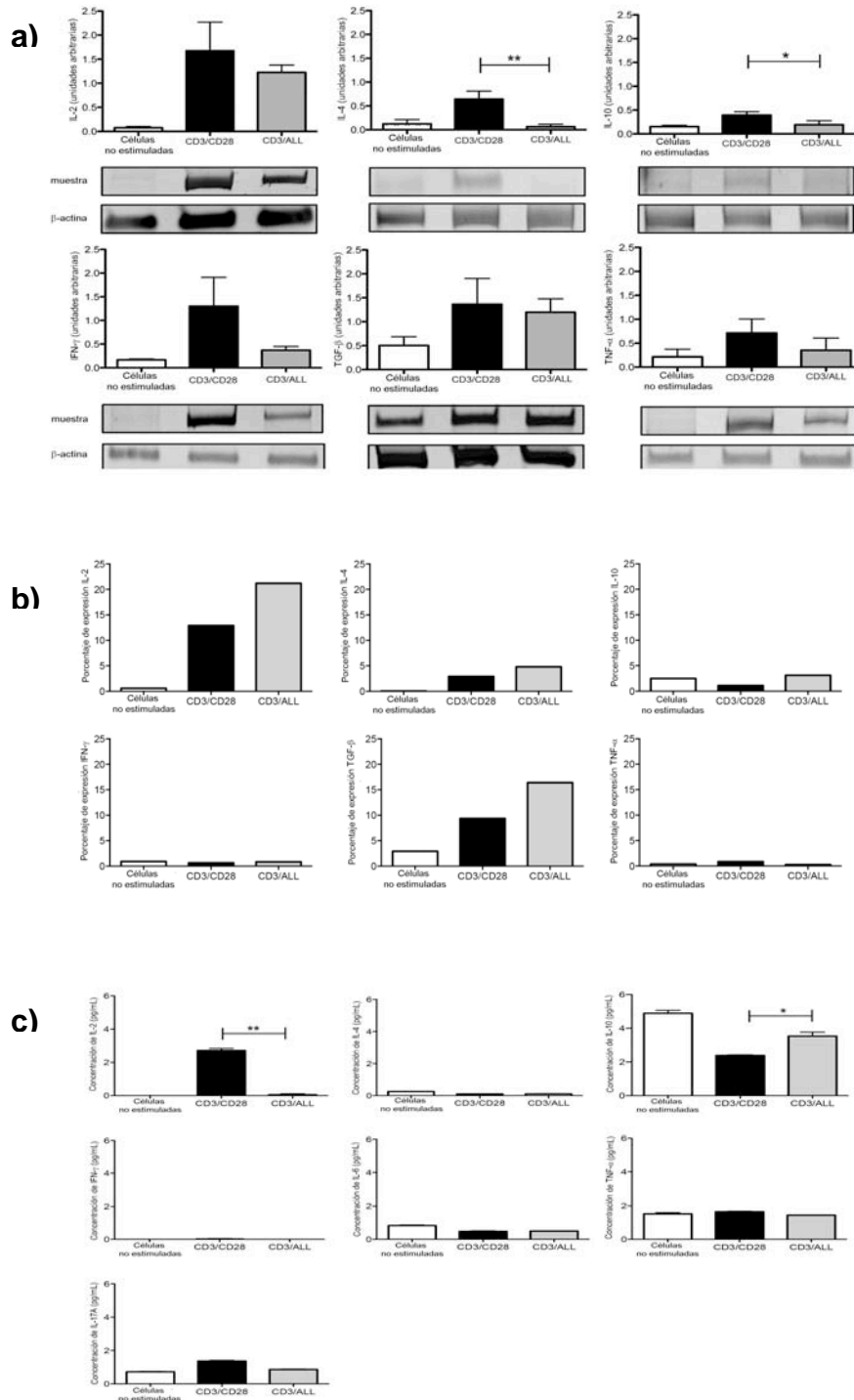


Figura 9. Comparación de la producción de citocinas en linfocitos T $CD4^+$ activados por CD3/ALL y por CD3/CD28. Linfocitos T $CD4^+$ se estimularon vía CD3/CD28 o CD3/ALL por 48 h. a) Productos de la PCR para los transcritos de las citocinas indicadas, se resolvieron en geles de poliacrilamida PAGE-SDS al 10%. La cantidad de ARNm de las citocinas por microgramo de ADN total se normalizó a la cantidad de ARNm de la β -actina mediante densitometría de

barrido. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes, los cuales se expresaron como unidades arbitrarias de densitometría. b) El sobrenadante del cultivo celular se colectó y analizó por un kit CBA para la medición de las citocinas solubles. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. c) Citocinas intracelulares en células estimuladas por 48 h. las barras muestran la media de dos experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

8.5. Expresión de la molécula reconocida por ALL en linfocitos T CD4⁺ tratados con metil- β -ciclodextrina.

Las balsas lipídicas, son microdominios especializados enriquecidos en glicofosfolípidos y colesterol, ubicados en la membrana plasmática de células de mamíferos [4-5]. La metil- β -ciclodextrina (M β CD) es un oligosacárido cíclico que se une al colesterol con alta afinidad, depletan y desorganizan dichos microdominios [55]. El efecto de la M β CD sobre las balsas lipídicas de los linfocitos T CD4⁺ y sobre la molécula reconocida por ALL se observa en la figura 10, donde linfocitos T CD4⁺ provenientes de cultivo, sin estímulo y/o activados con anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28 y anti-CD3/ALL, se trataron con M β CD y posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Demostrándose que la expresión de la molécula reconocida por ALL se afecta cuando los linfocitos T CD4⁺ son tratados con M β CD. Lo que sugiere que la molécula reconocida por ALL se localiza en las balsas lipídicas de dicha población celular.

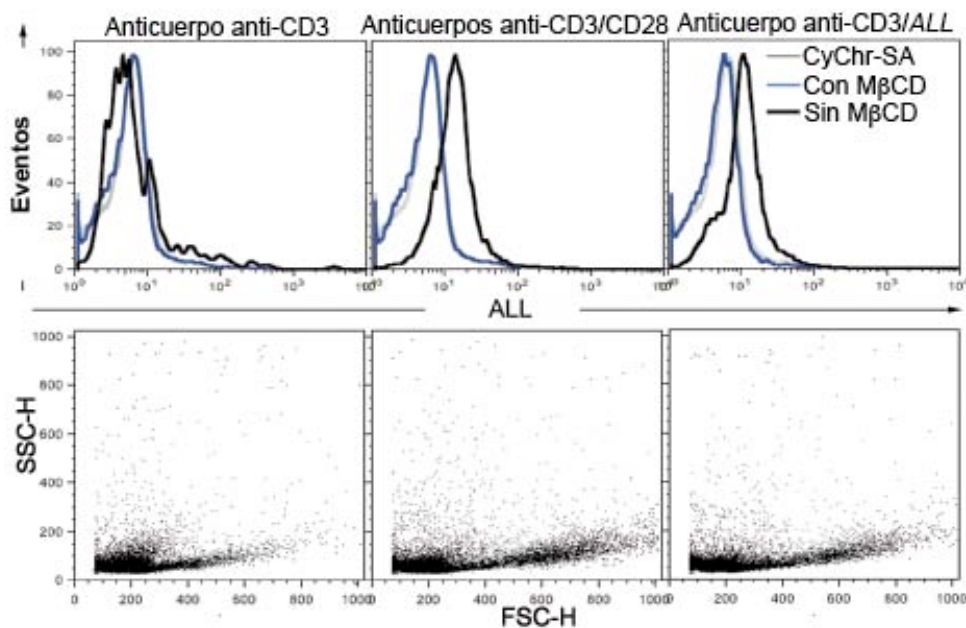


Figura 10. **La molécula reconocida por ALL se localiza en las balsas lipídicas de los linfocitos T CD4⁺.** Linfocitos T CD4⁺ con o sin estímulo, fueron tratados con 10 mM de MβCD y analizados por citometría de flujo. Panel inferior: análisis del tamaño vs granularidad de la región 1 de linfocitos T CD4⁺ con o sin estímulo. Panel superior: histograma de la expresión de la molécula reconocida por ALL, en células activadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD3/CD28 o anti-CD3/ALL, con o sin tratamiento de MβCD. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

8.6. Reconocimiento de ALL mediante Far-western blotting en lisado proteico total de linfocitos T CD4⁺.

Se sometieron 18 μg de muestra proteica de linfocitos T CD4⁺ con o sin estímulo, a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), posteriormente se realizó el Far-western blotting, utilizando ALL para la identificación de la molécula(s). Observándose en la figura 11, que ALL reconoce al menos 10 bandas proteicas, incluyendo una de aproximadamente 70kD, tanto en la muestra proteica de linfocitos T CD4⁺ sin

estímulo como en la muestra proteica de linfocitos T CD4⁺ estimulados con anticuerpo anti-CD3 plus anti-CD28 (1:1 µg/mL). Cabe mencionar, que la banda de 70kD sobreexpresó en los linfocitos T CD4⁺ activados, lo cual concuerda con el peso y la expresión de lo descrito anteriormente. Sin embargo, al ser un extracto del lisado total, no se puede descartar el reconocimiento de moléculas que pueden estar localizadas en el citoplasma o en organelos celulares.

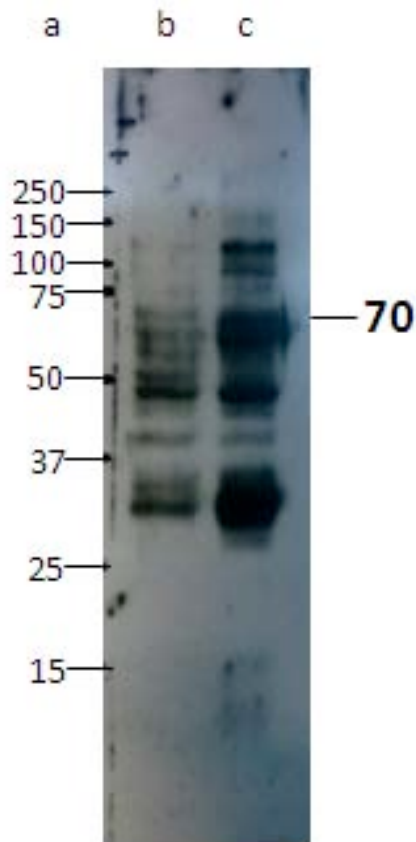


Figura 11. **ALL reconoce varias bandas proteicas en el lisado total de linfocitos T CD4⁺.** Far-western blotting de muestra proteica de linfocitos T CD4⁺. a) Pesos moleculares, b) muestra proteica de linfocitos T CD4⁺ sin estimular y c) muestra proteica de linfocitos T CD4⁺ que proliferaron en presencia de anticuerpos anti-CD3/CD28. En ambas condiciones se identificó una banda de aproximadamente 70kD. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

8.7. Reconocimiento de *ALL* mediante Far-western blotting en lisado proteico de dominios lipídicos provenientes de linfocitos T CD4⁺.

La molécula(s) reconocida por *ALL* se encuentra en las fracciones reconocidas por la subunidad β de la toxina de Cólera. 30 μ g de muestra proteica de dominios lipídicos de linfocitos T CD4⁺ estimulados con anticuerpo anti-CD3 plus anti-CD28 (1:1 μ g/mL), fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), posteriormente se realizó el Far-western blotting, utilizando *ALL* para la identificación de la molécula(s) y la subunidad β de la toxina de cólera, la cual, reconoce gangliósidos GM1. Observándose en la figura 12, que *ALL* reconoce al menos 6 bandas proteicas en las fracciones 5 y 7, incluyendo una de aproximadamente 70kD. Ambas fracciones coinciden con el reconocimiento de los gangliósidos GM1 confirmando que la(s) molécula(s) reconocida por *ALL* se localiza en los dominios lipídicos.

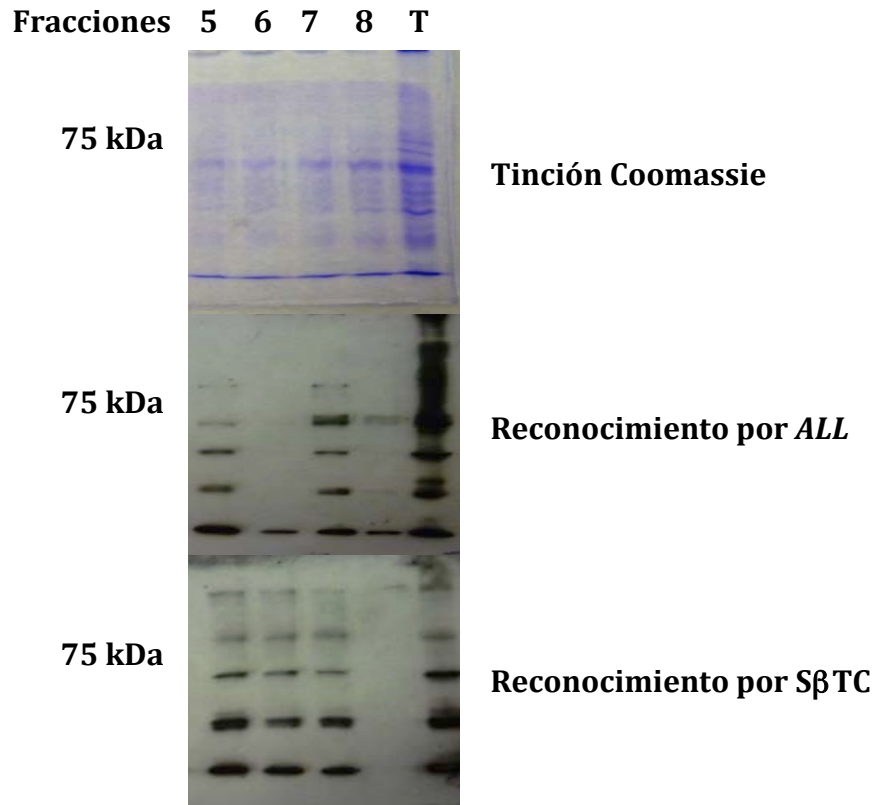


Figura 12. **La molécula(s) reconocida por *ALL* se localiza en los dominios lipídicos.** Coomassie y Far-western blotting de las fracciones libres de detergentes obtenidas por ultracentrifugación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28. Tinción Coomassie de las fracciones 5, 6, 7, 8 y de la muestra total proteica; Reconocimiento de *ALL* y Reconocimiento de la subunidad β de la Toxina de Cólera. En ambas condiciones se identificó una banda de aproximadamente 70kD. Imagen representativa de 6 experimentos independientes.

8.8. Identificación de la molécula(s) reconocida por *ALL* en dominios lipídicos mediante doble dimensión.

Para lograr un mayor aislamiento de la molécula reconocida por *ALL*, 100-500 μ g de muestra proteica de las fracciones 5 y 7, se sometieron a electroforesis de doble dimensión; Posteriormente se realizó el Far-western blot, utilizando *ALL* y la subunidad β de toxina de cólera, observándose en la figura 13, que *ALL*, reconoce puntos (spots) en un peso de aproximadamente 70kD, con un punto

isoeléctrico (PI) de 6 a 4 aproximadamente; Finalmente, dichos puntos se sometieron a espectrometría de masas para la identificación de la molécula(s) reconocida por *ALL*.

8.9. Aislamiento y Comparación de la molécula(s) reconocida por *ALL*.

Se realizó el estudio indirecto de la secuencia de aminoácidos de la molécula(s) reconocida por *ALL* por medio de la digestión de la proteína(s) con tripsina y el análisis de péptidos por espectrometría de masas. Obteniéndose la siguiente secuencia peptídica: QLFDQVVKKESPLLFKFY PEDVSEELIQDITQRLFF LQVKEGILNDDIYCP PETAVLLASYAVQSKIQVWHEEHREDAVLEYLKIAQDLEMY GVNYSIKIGFPWSEIRFVIKPIDKAPDFV FYAPRILALCMGNHELYMRALELEQER EALLQASRKTQEQLASEMAELTARISQLEMARESEAVEWQQKAQMVQEDLEKTA MSTPHVAEPAENEHDEQDENGAEASAE LRALTSELANAR. Los péptidos obtenidos se compararon en la base de datos NCBI nr SwissProt 2011-10. Las proteínas con mayor identidad se muestran en la tabla 3; sobresaliendo la proteína Moesina (punto 2 en la Fig. 13 b) con 41% de identidad o extensa homología (gi|74186081 NCBI nr) la cual, pertenece a la familia ERM, dicha familia regula la formación de dominios de membrana especializados que son esenciales para la transducción de señales de la GTPasa RhoA [56-57]. Además, la secuencia proteica se analizó mediante el sistema de predicción de estructuras proteicas Phyre² [58] y el programa NetOGlyc v 4.0 [59]. El sistema Phyre² mostró 90% de identidad hacia el dominio FERM de la moesina, mientras que el programa NetOGlyc mostró 9 sitios potenciales de O-glicosilación, de los cuales, las

posiciones 165, 205 y 206 exhibieron puntuaciones de 0.68, 0.78 y 0.86, respectivamente.

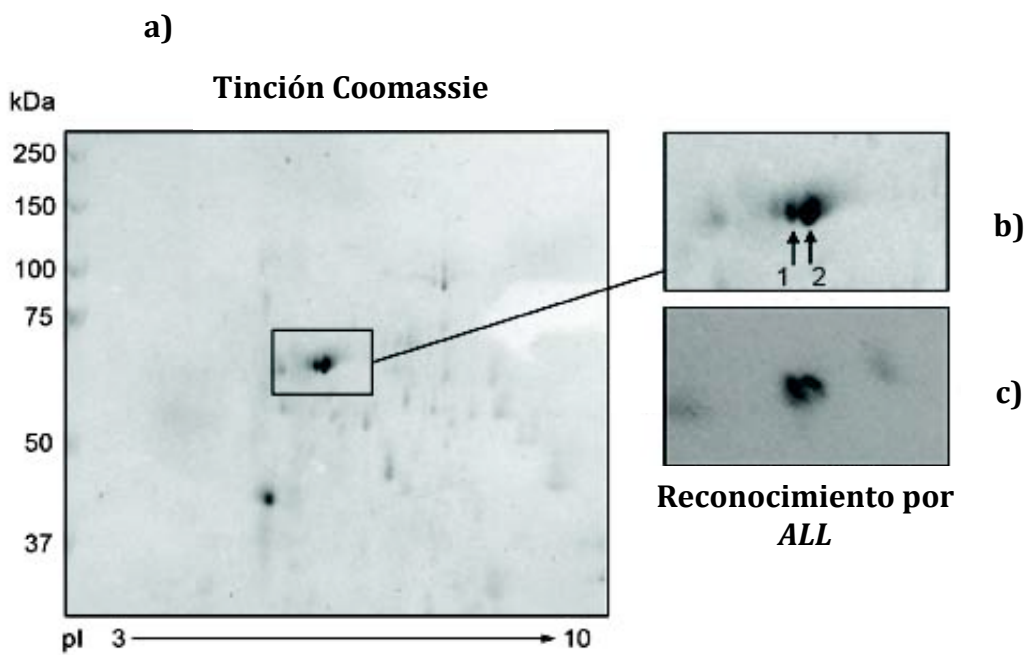


Figura 13. **Aislamiento de la molécula(s) reconocida por ALL mediante doble dimensión.** Coomassie y Western blotting de la doble dimensión de la fracción 7. a) Tinción Coomassie; b) Acercamiento de los puntos analizados por espectrometría de masas y c) Reconocimiento por ALL. En ambas condiciones se identificaron puntos con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa y con un punto isoeléctrico de 6-4. Imagen representativa de 4 experimentos independientes.

Proteína relacionada	secuenciación	%	PM	PI
Producto de proteína sin nombre (moesina)	1 MPKTSVSRVT TMDAELEFAI QPNTTGKQLF DQVVKTIGLR EVVFFGLQYQ 51 DTKAFSTWLK LNKVTAQDV RKESPLLFK RAKFPEDVS EELIQDITQR 101 FFLQVKEGI LNDDIYCPE TAVLLASVAV QSKYGDFNKE VHKSGYLAGD 151 KLLPQRVLEQ HKLNKDQWEE RIQVWHEEHR GMLREDAVLE YLKIAQDLEM 201 YGVNYFSIKN KKGSELWLVG DALGLNIYEQ NDRLTPKIGF PWSEIRNISF 251 NDKFFVIKPI DKKAPDFVYF APRLRINKRI LALCMGNHEL YMRRRKPDTI 301 EVQQMKAQAR EEKHQKQMER ALLENEKKR ELAEKEKEKI EREKEELMEK 351 LKQIEEQTKK AQQELEEQTR RALELEQERK RAQSEAEKLA KERQEAEEAK 401 EALLQASRDQ KKTQEQLASE MAELTARISQ LEMARKKKES EAVEWQQKAQ 451 MVQEDLEKTR AELKTAMSTP HVAEPAENEH DEQDENGAEA SAELRADAMA 501 KDRSEERTT EAEKNERVQK HLKALTELA NARDESKTA NDMIHAENMR 551 LGRDKYKTLR QIRQGNKQR IDEFESM	41	67.8kDa	6.22
Matricina	1 MGHPRVLVLS QNTKRESGRK VQSGNINAAK TIADIIRCL GPKSMMKMML 51 DPMGGIVMTN DGNAILREIQ VQHPAAKSMI EISRQDEEV GDGTTSVIIL 101 AGEMLSVAEH FLEQQMHPTV VIGAYR MALD DMISTLKKIS TPVDVNNRDM 151 MLNIINSSIT TKVISRWSSL ACNIALDAVK TVQFEENGRK EIDIKKYARV 201 EKIPGGIHED SCVLR GVMIN KDVTHPRMRR YKINPRIVLL DSSLEYKKEG 251 SQTDEITRE EDFTRILQME EEYIQLCED IQLKPDVVI TEKGISDLAQ 301 HYLMRANVTA IRRVRKTDNN RIARACGARI VSRPEELRED DVGTGAGLLE 351 IKKIGDEYFT FITECKDKPA CTILLRGASK ELSEVERN QDAMQVCRNV 401 LLDPQLVPGG GASEMVAHA LTEKSKAMTG VEQWPPYRAVA QALEVIPRTL 451 IQNCGASTIR LLTSLRAKHT QENCETWGVN GETGTLVDMK ELGIWEPLAV 501 KLQTYKTAVE TAVLLLRIDD IVSGHKKGD DQSRQSSAPD GGQE	33	61kDa	6.23
Dominio SAM	1 MQSAPLEQPA KRPRCDGSPR TPPSTPPATA NLSADDDFON TDLR TWEPED 51 VCSFLENRGF REKKVLDIFR DNKIAGSFLP FLEDDRLEDL GVSSLEERK 101 MIECIQQLSQ SRIDLKMFVN DPHIGHIEFH PLLIRIIDTP QFQRLRYIKQ 151 LGGGYVFPG ASHNRFEHS L GVGYLACLV RALAEPQEL QISERDILCV 201 QIAGLCHDLG HGPFSHMF DG RFIAPRPEK KWKHEQGSIE MFEHLVNSNE 251 LKLVMKNYGL VPEEDITFIK EQIMGPPITP VKDSLWPPYK RPATKSFYLE 301 IVSNKRNGID VDKWDYFARD CHHLGIQNNF DYKRFIKAR ICEVEYKVKKE 351 DKTYIRKVKH ICSREKEGVN LYDMFHRNCR LHRRAYQHKI SNLIDIMITD 401 AFLKADPYVE ITGTAGKKFR ISTAIDDMEA FTKLTDNIFL EVLHSTDPQL 451 SEAQSILRNI ECRNLYKYLQ ETQPKREKIR KEEYERLPQE VAKAKPEKAP 501 DVELKAEDFI VDVINVDYGM EDKNPIDRVH FYCKSNSKQA VRINKEQVSQ 551 LLPEFAEQL IRVYCKKDG KSLDAAGKHV VQWCALRDT KPQDGDIIAP 601 LITPLKWNK TSSCLQEVSK VTKCLKF	20	73.5kDa	8.17
GRP75	1 MISASRAAAA RLVTGTAASRS PAAARPODQGW NGLSHEAFRF VSRRDYASEA 51 IKGAVVGIDL GTTNSCAVAVM EGKQAKVLEN AEGARTTSPV VAFADGERL 101 VGMAPAKRQAV TNPNTFYAT KRLIGRRYDD PEVQKDTKNV PFKIVRASNG 151 DAWVEAHGKL YSPSQIGAFV LMKMKETAEN YLGHTAKNAV ITVPAYFNDS 201 QRQATKDAGQ ISGLNVLVRI NEPTAAALAY GLDKSEDKVI AVYDLGGGTF 251 DISILEIQKG VFEVKSTNGD TFLGGEDFDQ ALLRHIVKEF KRETVGDLTK 301 DNMLALQVRVE AAEKAKCELS SSVQTDINLP YLTMDSAGPK HLNMLK TRAQ 351 FEIVTDLIK RTIAPCQKAM QDAEVSXSDI GEVILVGGMT RMPKVQQTVQ 401 DLFGRAPSKA VNPDEAVAIG AAIQGGVLAG DVTDVLLLDV TPLSLGIET 451 GGVFTKLINR NTTIPTKKSQ VFSTAADGQT QVEIKVCQGE REMAGDNKLL 501 GQFTLIGIPP APRGVPQIEV TFDIDANGIV HVSADKDKGTG REQQVIQSS 551 GGLSKDDIEN MVKNAEKYAE EDRRKKERVE AVNMAEGIIH DTETKMEEFK 601 DQLPADECNK LKEEISKVRA LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASLKFEM 651 AYKMASERE GSGSSGTGEQ KEDQKEEQ	14	73.4kDa	5.91
KARS, KIAA0070	1 MQAAVRLVRG ALRQTSWAEW GQRELRLGHL APFTLHKDQ PLSDRRSELK 51 RRLKAEKLA EKEAKQKELS EKQLNQTASA PNHTADNGVG AEEETLDPNQ 101 YKIRSQAVQ QLKVTGEDPY PHKFVHDISL TQFIQEYSHL QPGDHLTDTV 151 LKVAGRIHAK RASGGKLIFY DLRGEGVKLQ VMANSRNYKS EEEFVHINNK 201 LRRGDIIGVE GNPQKTKKGE LSIIPQEITL LSPCLHMLPH LHFGLDKKET 251 RYRQRYLDLI LNDFVRQKFI VRSKIITYIR SFLDELGFLE IETPMNNIP 301 GGAVAKPFIT YHNELDMNLY MRIAPELYHK MLVVGIDRV YEIGRQFRNE 351 GIDLTHNPEF TTCEFYMAYA DYHDLMEITE KMLSGMVKSI TGSYKITY HP 401 DGPEGQAYEV DFTPPFRRIS MVEELEKALG VKLPETSLFE TEETRKILDD 451 ICVAKAVECP PPRTTARLLD KLVGEFLEV T CISPTFICDH PQIMSP LAKW 501 HRSKEGLTER FELFV MMKEI CNAYTELNDP VRQRQLFEEQ AKAKAAGDDE 551 AMFIDENFCT ALEYGLPPTA GWGMGIDRLT MFLTDSNNIK EVLLFPAMKP 601 EDKKETAATT ETPESTEASP SV	6	68.2kDa	5.65

Tabla 3. **Análisis de péptidos trípticos de la(s) molécula(s) reconocida por ALL, determinada por espectrometría de masas.** Los péptidos fueron comparados con los obtenidos de la base de datos NCBI nr SwissProt 2011-10. La tabla muestra las principales homologías/identidades encontradas.

8.10. La tinción de *ALL* colocaliza con el anticuerpo anti-dominio FERM de la moesina en la superficie celular de linfocitos T CD4⁺ activados.

Para demostrar si *ALL* reconoce una proteína de la familia FERM, linfocitos T CD4⁺ se activaron vía CD3/CD28 durante 48 h, después, se tiñeron con *ALL* y con el anticuerpo anti-dominio FERM de la moesina. La tinción se realizó en células no dañadas, ya que no se trataron con reactivos permeabilizantes.

La tinción fluorescente por *ALL* se observó a lo largo de la superficie celular solo en células *ALL* positivas, la cual parece estar concentrada en los sitios de contacto intercelular (Fig. 14 A, D). Interesantemente, la gran mayoría de las células fueron reconocidas por el anticuerpo anti-moesina y en algunas células, la tinción fluorescente también fue intensa en los sitios de interacción celular (Fig. 14 B, E). Las células incubadas con reactivos secundarios no mostraron tinción fluorescente (Fig. 14 G–I). Los eventos de colocalización se observaron en los sitios de contacto intercelular en las células aglutinadas *ALL* positivas (Fig. 14 C, F).

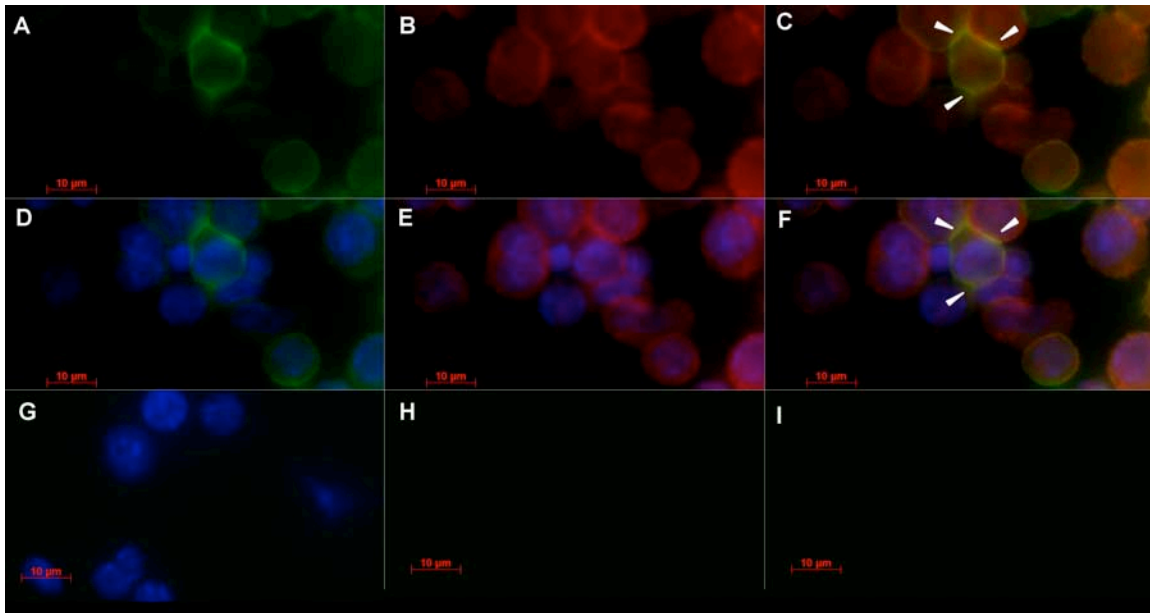


Figura 14. **Glicoproteína reconocida por la lectina de *A. leuocarpus* colocaliza con el anticuerpo anti-dominio FERM de la proteína moesina en la superficie celular de linfocitos T CD4⁺ activados.** Linfocitos T CD4⁺ de órganos linfoides murinos se activaron vía CD3/CD28 durante 48 h de cultivo. Luego, las células no permeabilizadas se fijaron y tiñeron por inmunofluorescencia triple. Las imágenes son parte de una serie Z reconstruida y las secciones individuales fueron registradas a lo largo de los ejes X y Y. **A.** Imagen de células marcadas con *ALL*-biotina seguida de estreptavidina-FITC. **B.** Imagen de células marcadas con anticuerpo de conejo contra el dominio FERM de la moesina seguido por una incubación de un anticuerpo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 546 preparado en burro y que reconoce a la IgG de conejo. **C.** Imagen de colocalización de células marcadas por *ALL* (verde) y anticuerpo anti-moesina (rojo). **D–F.** Tinción nuclear DAPI (azul) se utilizó como contratinción celular. **G.** Células marcadas únicamente con DAPI como control. **H–I.** Células incubadas con estreptavidina-FITC o anticuerpo secundario Alexa-546 fueron usados como tinción control, respectivamente. Las imágenes se visualizaron mediante un microscopio equipado con el sistema confocal ApoTome.2 (Carl Zeiss). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos individuales. Las puntas de flecha indican el sitio de reconocimiento entre *ALL* y el anticuerpo anti-moesina. Barras de las imágenes a 10 µm.

8.11. Linfocitos T CD4⁺ activados con anticuerpos anti-CD3/anti-moesina secretan citocinas.

Para examinar si el anticuerpo anti-dominio FERM de la moesina coestimulaba linfocitos T CD4⁺ estimulados con anticuerpo anti-CD3, linfocitos T CD4⁺ purificados, fueron simultáneamente activados con anticuerpo anti-CD3 más anticuerpo anti-moesina por 48 h. Los resultados mostraron que las aglutinaciones formadas por las células activadas son similares a los de las células estimuladas vía CD3/CD28 o CD3/*ALL*. La medición en píxeles² fue de 312.9 ± 435.8 para células no estimuladas; 2492 ± 1275 para células con estimulación por CD3/CD28; 2629 ± 1150 para CD3/*ALL* y 2393 ± 1246 para CD3/moesina. Asimismo, los niveles de citocinas en el sobrenadante del cultivo de células activadas con CD3/moesina fueron similares al de las células activadas vía anticuerpos anti-CD3 más *ALL* (Tabla 4). Sin embargo, la concentración de IL-17A en células activadas por CD3/*ALL* fue mayor que las células activadas con anticuerpos anti-CD3/moesina (Tabla 4). Además, el análisis de citocinas intracelulares realizado por citometría de flujo, mostró que el porcentaje de células positivas para IL-2 y TGF-β en células activadas con CD3/moesina fue 3.1 y 1.5 veces menor que aquellas células activadas vía CD3/*ALL*, respectivamente (Tabla 5).

	Células no estimuladas	CD3/CD28	CD3/ALL	CD3/Moesina
IL-10	4.8±0.17	2.3±0.03	3.5±0.2*	2.4±0.02*
IL-17A	0.7±0.02	1.3±0.04	0.86±0.02	0.01±0.01
TNF-α	3.0±0.07	1.6±0.02	1.4±0.01	1.3±0.007
IL-6	0.8±0.03	0.4±0.03	0.4±0.01	0.5±0.02
IL-2	0±0	2.71±0.12**	0.04±0.06**	0.03±0.04**
IL-4	0.2±0.007	0.1±0.01	0.1±0.01	0.07±0.01
IFN-γ	0±0	0.02±0.02	0±0	0±0

Tabla 4. **Citocinas detectadas en el sobrenadante de linfocitos T CD4⁺ activadas bajo las condiciones mencionadas a 48h de cultivo.** Media ± desviación estándar * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Resultados se representan en pg/ml. Los límites de detección del kit se describieron en la sección experimental.

	Células no estimuladas	CD3/CD28	CD3/ALL	CD3/Moesina
IL-10	2.49	1.09	3.14	0.54
TNF-α	0.36	0.87	0.29	0.38
IL-4	0.042	2.9	4.81	7.57
IFN-γ	0.92	0.66	0.85	0.55
IL-2	0.60	12.9	21.2	6.78
TGF-β	2.93	9.36	16.4	10.5

Tabla 5. **Expresión de citocinas intracelulares en linfocitos T CD4⁺ estimulados bajo las condiciones mencionadas a 48h de cultivo.**

9. Discusión

La activación de linfocitos T es un evento esencial en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa [2]. Unas moléculas ampliamente reconocidas por su capacidad de activar linfocitos y promover su proliferación a través de la interacción con residuos sacarídicos presentes en numerosas glicoproteínas de membrana, incluyendo aquéllas involucradas en la sinapsis inmunológica, son las lectinas, que son proteínas o glicoproteínas con unión reversible a sus ligandos sacarídicos [60-61]. Las lectinas tienen al menos un dominio no catalítico que reconoce oligosacáridos en una conformación espacial específica [61]. Una de estas lectinas, la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) que es específica para el residuo sacarídico GalNAc en el antígeno Thomsen-Friedenreich (Gal β -1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr) o en el antígeno Tn (GalNAc α 1,O-Ser/Thr) [43] se utilizó en este trabajo. El papel de *ALL* en la coestimulación de las células T se ha reportado anteriormente [48]; sin embargo, en este trabajo mostramos que en ausencia de células presentadoras de antígeno (CPAs), *ALL* incrementa la proliferación de linfocitos T CD4⁺ cuando se han estimulado con anticuerpos anti-CD3, fenómeno comparable a la estimulación vía CD3/CD28. La molécula CD28 es conocida como el principal receptor coestimulador de linfocitos T para la producción de IL-2 [62]. Por lo tanto, la producción de citocinas se determinó en linfocitos T CD4⁺ estimulados vía CD3/*ALL*; en ese sentido, se ha evidenciado que moléculas coestimuladoras de células T diferentes a CD28 inducen la producción de citocinas. Entre estas moléculas, el factor derivado del estroma 1 alfa coestimula la proliferación celular y la producción de IL-2, IL-4, IL-10 e INF- γ en

linfocitos T CD4⁺ activados [63]. Los anticuerpos monoclonales para CD5 o CD9 también inducen potente captación de [³H]TdR y producen IL-2 en linfocitos T activados [64]. Asimismo, la coestimulación simultánea de CD2 y CD48 mejora la activación vía CD3 de linfocitos T tanto en la proliferación como en la síntesis de transcriptos para IL-2 e IFN- γ [65]. Sin embargo, la coestimulación de células T por la interacción de CD5, CD9 o CD2-CD48 es menos eficiente que la proporcionada por CD28 [64-65]. En nuestro caso, la producción de transcriptos para IL-2, TNF- α , TGF- β e IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ activados vía CD3/*ALL* no muestran diferencia estadística comparadas con aquellas activadas vía CD3/CD28. Respecto a la secreción de citocinas, nosotros observamos que IL-2 fue más abundante en el cultivo de células activadas a través de CD3/CD28 en comparación a las otras condiciones de cultivo, posiblemente por la retroalimentación positiva durante la activación [2]. Aunque la coestimulación vía *ALL* parece ser insuficiente para la producción de IL-2, el número de células positivas para IL-2 y TGF- β fue mayor que en la coestimulación por CD3/CD28. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la principal glicoproteína reconocida por *ALL* es capaz de coestimular la producción de citocinas, reflejándose en la actividad funcional de la célula T. En este sentido, se ha descrito que algunos de los componentes mayoritarios de las balsas lipídicas poseen capacidad coestimuladora en las células T [4-5] y debido a que los linfocitos T CD4⁺ incubados con *ALL* mostraron organización de balsas o parches en la superficie celular, nosotros utilizamos M β CD para eliminar el colesterol de las balsas lipídicas luego de la activación de los linfocitos T CD4⁺. Previos estudios de nuestro laboratorio mostraron que *ALL*

se une 22% a linfocitos T CD4⁺ no estimulados y el número de células *ALL* positivas incrementa 3 veces luego de 24-48h de activación [44]. La desorganización de las balsas lipídicas por el tratamiento con MβCD causó pérdida del reconocimiento de *ALL* en células activadas por 48h, sugiriendo que *ALL* se une a glicoproteínas recluidas o localizadas en las balsas lipídicas de linfocitos T CD4⁺. Los microdominios de la balsa en la membrana se conocen como complejos de señalización que procesan cascadas de reacción intracelular, donde diversas moléculas participan en la transducción de señal [4].

Con base a lo anterior, para poder identificar a la(s) molécula(s) reconocida(s) por *ALL*, se seleccionaron los puntos proteicos con peso molecular cercano a 70 kDa en las balsas lipídicas de la membrana mediante electroforesis de doble dimensión. Se reconocieron dos puntos proteicos prominentes por *ALL* y la secuencia obtenida mediante espectrometría de masas, mostró 41% de identidad con una proteína sin nombre (gi|74186081) relacionada estrechamente a moesina. Esta secuencia proteica se analizó con el programa NetOGlyc 4.0 [59] y evidenció 9 sitios de O-glicosilación, de los cuales 4 de ellos exhiben una elevada probabilidad de ser reconocidos por *ALL*. Previos estudios han mostrado que el sitio de unión de *ALL* interactúa con el núcleo interno del antígeno Thomsen-Friedenreich y que *ALL* se une a residuos de GalNAc, los cuales son separados por 4 aminoácidos [66]. Otro análisis de la secuencia proteica se llevó a cabo usando el programa Phyre² [58] que mostró 90% de identidad con el dominio FERM de moesina. El dominio FERM define miembros de la familia de la banda 4.1, la cual incluye proteínas de citoesqueleto, como son la familia de proteínas

eizrina-radixina-moesina (ERM), así como varias tirosinas cinasas y fosfatasas [67]. Las proteínas ERM juegan un papel importante en la interfase entre las proteínas de la membrana plasmática y las principales estructuras del citoesqueleto que regulan vías de señalización asociadas a la membrana [68]. Para corroborar el reconocimiento de *ALL* a moesina, datos de tinción de inmunofluorescencia confocal muestran que *ALL* y el dominio FERM de la moesina colocalizan en sitios de contacto celular, indicando la presencia de O-glicanos reconocidos por *ALL* en esas zonas. Se han mostrado cambios en la glicosilación en O-glicoproteínas de la superficie celular durante la activación de las células T [69-70]. La disminución de ácido siálico en las células T activadas [71], permite la exposición de residuos de GalNAc o Gal β -1,3GalNAc sobre glicoproteínas de la superficie celular, las cuales puede reconocerlas *ALL*. Sin embargo, como se observó en la imagen de inmunofluorescencia, algunas células aglutinadas fueron fuertemente marcadas por *ALL* pero débilmente unidas con el anticuerpo anti-moesina y viceversa. Por otro lado, otras células aglutinadas no fueron reconocidas por *ALL* ni por el anticuerpo anti-moesina, lo que sugiere que no todas las proteínas tipo moesina muestran el mismo perfil de glicosilación y que *ALL* puede reconocer a diferentes O-glicoproteínas. Diversos estudios han evidenciado la importancia de los O-glicanos en la superficie celular, los cuales, parecieran estar involucrados en el proceso de activación de las células T. Comelli EM *et al.* reportó que la activación de células T murinas conduce a una marcada disminución de N-glicanos que contienen NeuAc α 2,6Gal y al incremento de O-glicanos que contienen el disacárido Gal β -1,3GalNAc sobre la superficie celular

[72]. Similarmente, van Vliet *et al.* mostraron que la activación de células T humanas vía CD3/CD28 esta acompañada por un incremento en la expresión de Gal β -1,3GalNAc sobre la superficie celular [73]. Nosotros reportamos en este estudio la visualización directa de una proteína tipo moesina sobre la superficie celular de linfocitos T CD4⁺ activados. Aunque moesina se localiza en el citoesqueleto sub-membranoso, algunos autores han descrito proteínas tipo moesina sobre la superficie de leucocitos [74-75]. Ariel A *et al.* demostraron que una proteína tipo moesina es expresada sobre la membrana de células T humanas en reposo, la cual incrementa significativamente sobre la superficie celular después de 48 h de activación [76]. Además, el anticuerpo anti-moesina fue capaz de incrementar la estimulación basada en la molécula CD3 de linfocitos T CD4⁺ luego de 48h de cultivo, lo que favoreció la producción de citocinas. Es la primera vez que un anticuerpo anti-dominio FERM de moesina exhibe una función coestimuladora. Sin embargo, se requieren más estudios para identificar completamente a la molécula reconocida por ALL, así como la vía de señalización que sigue después de la coestimulación de las células T.

10. Conclusiones

La principal glicoproteína reconocida por *ALL* es capaz de coestimular linfocitos T CD4⁺ y favorecer la producción de citocinas.

La lectina de *A. leucocarpus* reconoce a dos glicoproteínas mayoritarias situadas en los microdominios de las balsas lipídicas de linfocitos T CD4⁺ activados.

La secuencia peptídica mostró 41% de identidad con una proteína sin nombre, relacionada con el dominio FERM de la moesina.

ALL y el anticuerpo anti-dominio FERM de la moesina colocalizan en la membrana de los linfocitos T CD4⁺ activados vía anticuerpos anti-CD3/CD28 a las 48 h de cultivo.

El anticuerpo anti-dominio FERM de la moesina coestimula linfocitos T CD4⁺ activados vía CD3.

11. Literatura citada

- [1] Peacock JS, Colsky AS, Pinto VB. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions, *J. Immunol. Methods*. 1990. (126): 147-157.
- [2] Abbas K., Lichtman A. *Cellular and Molecular immunology*. Elsevier science. 2004.
- [3] Roitt I., Brostoff J., Male D. *Inmunologia*. Quinta edición. Harcourt. 2000.
- [4] Kabouridis PS. Lipid rafts in T cell receptor signaling. 2006. *Mol Membr Biol*; 23(1): 49-57.
- [5] Fielding C. *Lipid Rafts and Caveolae: From Membrane Biophysics to Cell Biology*. Wiley-VCH. 2006.
- [6] Bluestone JA, Et al. Accesory Molecules. In: Paul WE, Ed. *Fundamental Immunology*. Fourth Edition ed. Philidelphia: Lippincott-Raven Publishers. 449-78. 1999.
- [7] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996. 14: 233-58.
- [8] Davis MM, Krogsgaard M, Huppa JB, Sumen C, Purbhoo MA, Irvine DJ, Wu LC, Ehrlich L. Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition. *Annu Rev Biochem*. 2003. 72: 717-42.
- [9] Wulfig C, Chien YH, Davis MM. Visualizing lymphocyte recognition. *Immunol Cell Biol*. 1999. 77:186-187.
- [10] Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009. 229(1): 12-26.

- [11] Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2002. 2(2): 116-26.
- [12] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005. 23: 515-48.
- [13] McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. Cells Regulates Differentiation of CD4⁺ T Enhanced by CD28 Costimulation and Molecule (ICOS) Expression Is Mouse Inducible Costimulatory. *J. Immunol.* 2000. 165: 5035-40.
- [14] Watanabe M, Hara Y, Tanabe K, Toma H, Abe R. A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. *Int Immunol.* 2005. 17(3): 269-78.
- [15] Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs KA, Valge-Archer VE, Collins M, Carreno BM. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 2003. 15;170 (2):711-8.
- [16] De Jong R, Loenen WA, Brouwer M, Van Emmerik L, De Vries EF, Borst J, Van Lier RA. Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J Immunol.* 1991. 146(8): 2488-94.
- [17] Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2005. 23: 23-68.
- [18] Yang H, Reinherz EL. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts.

- Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem.* 2001. 276: 18775-18785
- [19] Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, De Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature.* 1995. 376(6537): 260-3.
- [20] Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1992. 148(7): 1985-92.
- [21] Toyooka K, Tai XG, Yashiro Y, Ahn HJ, Abe R, Hamaoka T, Kobayashi M, Neben S, Fujiwara H. Synergy between CD28 and CD9 costimulation for naive T-cell activation. *Immunol Lett.* 1997. 58(1): 19-23.
- [22] Pfistershammer K, Majdic O, Stöckl J, Zlabinger G, Kirchberger S, Steinberger P, Knapp W. CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J Immunol.* 2004. 173(10): 6000-8.
- [23] Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. The costimulatory role of Tim molecules. *Immunol Rev.* 2009. 229(1): 259-70. Review.
- [24] Ibáñez A, Sarrias MR, Farnós M, Gimferrer I, Serra-Pagès C, Vives J, Lozano F. Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *J Immunol.* 2006. 177(2): 1152-9.
- [25] Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P. Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes. *Immunol Lett.* 2010. 128(2): 89-97. Review.
- [26] Kroczeck RA, Mages HW, Hutloff A. Emerging paradigms of T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol.* 2004. 16(3): 321-7. Review.

- [27] Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009. 229(1): 152-72. Review.
- [28] Sommer F, Huber M, Röllinghoff M, Lohoff M. CD44 plays a co-stimulatory role in murine T cell activation: ligation of CD44 selectively co-stimulates IL-2 production, but not proliferation in TCR-stimulated murine Th1 cells. *Int Immunol.* 1995. 7(11): 1779-86.
- [29] Freire T, Robello C, Casaravilla C, Álvarez D, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. Antígenos mucinicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de fisiología.* 2002. (8): 89-107.
- [30] Furmanek A, Hofsteenge. Protein C-mannosylation: Facts and questions. *Acta Biochimica Polonica.* 2000. (47): 781-89.
- [31] Tsuboi S, Fukuda M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays.* 2001. 23(1): 46-53.
- [32] Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 1986. (55): 35-67.
- [33] Hellstrom U, Hammarstrom ML, Hammarstro S, Permann P. Fractionation of human lymphocytes on Helix pomatia a hemagglutinin-sepharose and wheat germ agglutinin-sepharose. *Methods Enzymol.* 1984. (108): 153-68.
- [34] Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Science Chem. Rev.* 1988 (98): 637-674.
- [35] Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune

system. Nature reviews immunology. 2007. (7): 255-66.

[36] Lascurain R., Chavez R., Gorocica P., Perez A., Montaña L.F., Zenteno E., Recognition of CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin, Immunology. 1994. (83): 410-413.

[37] Álvarez G, Lascurain R, Hernández P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, Espinosa B, Zenteno E, Chávez R. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. Bioch et Biophys Acta. 2006. (1760): 1235-1240.

[38] Gorocica P, Lascurain R, Hernández P, Porras F, Bouquelet S, Vázquez L, Zenteno E. Isolation of the receptor for *Amaranthus Leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages Glycoconjugate J. 1998. (15): 809-814.

[39] Nilson C. Lectins Analytical Technologies. EIServier. USA. 2007. 1-457.

[40] De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. Nature. 2004. (427): 370-374.

[41] Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M, Baum LG. Regulation of a2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA⁺) to PNA⁻ phenotype in developing thymocytes. J. Biol. Chem. 1993. (268): 3801-3811.

[42] Hernández P, Pérez E, Martínez L, Ortiz B, Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB. 2005. (24): 21-27.

[43] Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Debray H, Montreuil J, Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. Glycoconj. J. 1992. (9): 204-208.

- [44] Ortíz B, Porras F, Jiménez-Martínez MC, Montaña LF, Martínez-Cairo S, Lascurain R, and Zenteno E. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cel. Immunol.* 2002. (218): 34-45.
- [45] Porras F, Lascurain R, Chávez R, Ortíz B, Hernández P, Debray H, Zenteno E, Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes. *Glycobiology.* 2000. (10): 459-465.
- [46] Ortíz B. Estudio de un nuevo marcador O-glicosilado de linfocitos T murinos. Tesis Ciencias Biomédicas. UNAM. 2002. 1-57.
- [47] Arenas-Del Ángel MC. Expresión de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus Leucocarpus* en Linfocitos T CD4+ murinos. Tesis Maestría Ciencias Biológicas. UNAM. 2008. 1-58.
- 48 Urrea F, Zenteno E, Avila-Moreno F, Sanchez-García F, Zúñiga J, Lascurain L, Ortiz-Quintero B, 2011. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) enhances anti-CD3-dependent activation of murine T cells and promotes cell survival. *Immunol. Invest.* 40:113–129.
- [49] Zenteno E, Debray H, Montreuil J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. *FEBS Lett.* 1988. 238(1): 95-100.
- [50] Ramos-Ávila A, Ventura-Gallegos J, Zentella- Dehesa A, Machuca-Rodríguez C, Moreno-Altamirano M, Narváez V, Legorreta-Herrera M, 2007. Immunomodulatory role of chloroquine and pyrimethamine in *Plasmodium yoelii* 17XL infected mice. *Scand. J. Immunol.* 65:54–62.

- [51] Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.* 2005. 46(5):1061-7.
- [52] Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann NY Acad Sci.* Dec 1964. 28; 121:321-49.
- [53] Westermeier R. *Electrophoresis in Practice.* Wiley-VCH. Fourth edition. 2005. Pp406.
- [54] Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979. 76:4350-4354.
- [55] Larbi A, Douziech N, Khalil A, Dupuis G, Gheraïri S, Guérard KP, Fülöp T Jr. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging. *Exp. Gerontol.* 2004. 39 (4): 551-8.
- [56] Fehon R. Organizing the Cell Cortex: The role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. 11(4): 276–287.
- [57] Cannon J. CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2011. 22(7):954-63.
- [58] Kelley LA, Sternberg MJE, 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4: 363–371.
- [59] Steentoft C, Vakhrushev S Y, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO J.* 2013. 32:478–488.

- [60] Rudd P, Wormald M, Dwek R. Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. Review. Trends in Biotechnology. 2004. (22): 524-30.
- [61] Lam SK. 2011. Lectins: production and practical applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89:45–55.
- [62] Shen K, Thomas VK, Dustin ML, Kam LC, Micropatterning of costimulatory ligands enhances CD4⁺ T cell function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008.105: 7791–7796.
- [63] Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell- derived factor-1 is a costimulator for CD4⁺ T cell activation. 2000. J. Immunol. 10:5010–5014.
- [64] Zhou X Y, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Park WR, Abe R, Hamaoka T, Naramura M, Gu H, Fujiwara H. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. J. Immunol. 2002.168:3847–3854.
- [65] Musgrave B, Watson C, Haeryfar S, Barnes C, Hoskin D. CD2-CD48 interactions promote interleukin-2 and interferon-gamma synthesis by stabilizing cytokine mRNA. Cell Immunol. 2004. 229(1): 1-12.
- [66] Hernandez P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, Jiménez MC, Fernández G, Agundis C, Degand P, Zenteno E. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn hypocondriacus lectin for O-glycopeptides. Biochim. Biophys. Acta. 2004.1674:282–290.
- [67] Pearson M A, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. Cell. 2000. 101: 259–270.

- [68] Neisch A L, Fehon RG. Ezrin, radixin and moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2011. 23: 377–382
- [69] Rudd PM, Wormald MR, Stanfield RL, Huang M, Mattsson N, Speir JA, DiGenaro JA, Fetrow JS, Dwek RA, Wilson IA. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* 1999. 293: 351–366.
- [70] Daniels MA, Hogquist SC. Sweet ‘n’ sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol.* 2002.10: 903–910.
- [71] Kaufmann M, Blaser C, Takashima S, Schwartz-Albiez R, Tsuji S, Pircher H. Identification of a alpha2,6- sialyltransferase induced early after lymphocyte activation. *Int. Immunol.* 1999. 5: 731–738.
- [72] Comelli EM, Sutton-Smith M, Yan Q, Amado M, Panico M, Gilmartin T, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Goldberg D, Morris HR, Dell A, Paulson JC. Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.* 2006. 177: 2431–2440.
- [73] van Vliet SJ, Vuist IM, Lenos K, Tefsen B, Kalay H, García-Vallejo JJ, van Kooyk Y. Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)-calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galactose-type lectin (MGL). *J. Biol. Chem.* 2013. 288:27519–27532.
- [74] Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin, and moesin: its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J. Cell. Sci.* 1992. 103:131–143.

[75] Thome ZN, Amar S, van Dyke TE. Moesin functions as a LPS receptor on human monocytes. *Infect. Immun.* 1999. 67:3215–3220.

[76] Ariel A, Hershkoviz R, Altbaum-Weiss I, Ganor S, Lider O. Cell surface-expressed moesin-like receptor regulates T cell interactions with tissue components and binds an adhesion-modulating IL-2 peptide generated by elastase. *J. Immunol.* 2001. 166: 3052–3060.

Apéndice

ORIGINAL RESEARCH

***Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes a moesin-like O-glycoprotein and costimulates murine CD3-activated CD4⁺ T cells**

Maria Arenas-Del Ángel¹, Martha Legorreta-Herrera², Guillermo Mendoza-Hernández^{1†}, Yonathan Garfias^{1,3}, Raul Chávez¹, Edgar Zenteno¹, & Ricardo Lascurain^{1,4}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

²Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México

³Unidad de Investigación Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana"

⁴Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", México

Keywords

Lectin, lipid raft, moesin-like protein, O-glycosylation, oligosaccharide recognition

Correspondence

Ricardo Lascurain, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico. Tel: +52(55)5623-2510; Fax: +52(55)5616-2419; E-mail: rlascurain@yahoo.com.mx

Received: 30 January 2015; Revised: 16 March 2015; Accepted: 18 March 2015
Final version published online 2015.

Immunity, Inflammation and Disease (2015)

doi: 10.1002/iid3.58

[†]In memoriam.

Introduction

Activation of CD4⁺ T cells is a crucial event in the adaptive immune response, since these cells control humoral and cellular immunity through the recognition of specific antigens [1]. The activation process initially involves interaction between T cell receptor (TCR) and MHC-peptide complexes on antigen-presenting cells (APCs) resulting in the formation of an immunological synapse [1]. Receptor–ligand complexes implicated in the immunological synapse are glycoproteins, which help both cell junction and lipid raft mobility on the membrane surface [2]. Lipid rafts are membrane microdomains that concentrate signaling molecules required for cellular costimulation and activation [3] in which the band 4.1, ezrin, radixin, and

Abstract

The Galβ1,3GalNAcα1,O-Ser/Thr specific lectin from *Amaranthus leucocarpus* (*ALL*) binds a ~70 kDa glycoprotein on murine T cell surface. We show that in the absence of antigen presenting cells, murine CD4⁺ T cells activated by an anti-CD3 antibody plus *ALL* enhanced cell proliferation similar to those cells activated via CD3/CD28 at 48 h of culture. Moreover, *ALL* induced the production of IL-4, IL-10, TNF-alpha, and TGF-beta in CD3-activated cells. Proteomic assay using two-dimensional electrophoresis and far-Western blotting, *ALL* recognized two prominent proteins associated to the lipid raft microdomains in CD3/CD28-activated CD4⁺ T cells. By mass spectrometry, the peptide fragments from *ALL*-recognized proteins showed sequences with 33% homology to matricin (gi|347839 NCBIInr) and 41% identity to an unnamed protein related to moesin (gi|74186081 NCBIInr). Confocal microscopy analysis of CD3/CD28-activated CD4⁺ T cells confirmed that staining by *ALL* colocalized with anti-moesin FERM domain antibody along the plasma membrane and in the intercellular contact sites. Our findings suggest that a moesin-like O-glycoprotein is the *ALL*-recognized molecule in lipid rafts, which induces costimulatory signals on CD4⁺ T cells.

moesin (FERM) family proteins have an essential role in organizing the interactions among transmembrane proteins and the underlying cytoskeleton [4].

T cell activation requires stimulation via TCR and costimulation signals; a powerful costimulatory pathway is provided through the CD28 molecule; however, other lipid raft-proteins have been shown to generate enough costimulation to activate T cells [5]. Some studies have shown that the saccharide portion of glycosylated proteins, such as CD2 and CD8, have an important role in the co-receptor interactions as reviewed [6]. For this reason, it is important to know how the saccharide structure influences many of these processes.

Cell surface oligosaccharides have been shown to play an important role in recognition events [6]. Oligosaccharides

may be cross-linked by lectins, which are proteins that recognize saccharides attached to glycosylated molecules in a highly specific manner [7]. *Amaranthus leucocarpus* lectin (*ALL*) has been shown to have an affinity for N-Acetyl-D-Galactosamine (GalNAc) in either the Thomsen–Friedenreich antigen (Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr) or Tn antigen (GalNAc α 1,O-Ser/Thr) [8]. This lectin has been isolated from *A. leucocarpus* seeds [9], and its hemagglutination activity is specifically inhibited by GalNAc [8–10]. *ALL* binds murine thymocytes and thymic dendritic cells, peritoneal macrophages, and peripheral blood T cells, but not B cells [11–13]. *ALL* recognizes a ~70 kDa O-glycoprotein, which increases its expression on CD4⁺ T cells stimulated by concanavalin-A for 48 h [13]. The isolation of the *ALL*-recognized O-glycoprotein from murine thymocytes showed that it has blocked N-terminal amino acid residue [14]. Moreover, total cells from murine lymph node stimulated by an anti-CD3 antibody in the presence of *ALL*, showed an increase in the T cell proliferation [15]. Here, we confirm the ability of *ALL* to induce proliferation of murine CD4⁺ T cells, which were stimulated by a suboptimal dose of anti-CD3 antibody in the absence of APCs along 48 h cell culture. Under these conditions, we show production of cytokine transcripts as well as intracellular and soluble cytokines, and the partial characterization of the main lipid raft glycoprotein recognized by *ALL*.

Materials and Methods

Lectin, reagents, and antibodies

A. leucocarpus seeds were obtained in Tulyehualco (Mexico) and the lectin was purified by affinity chromatography as described previously [9]. *ALL* was labeled with the N-hydroxysuccinimide ester of biotin from Pierce Chemical (Rockford, IL) with a label/protein ratio of 2:1 [16]. Phycoerythrin (PE)-labeled rat anti-mouse CD4, biotin-labeled hamster anti-mouse CD3 ϵ chain (145-2C11) monoclonal antibodies (mAbs), and PE-labeled rat IgG2a, kappa mAb (used as isotype control); purified no azide/low endotoxin (NA/LE) hamster anti-CD3 (clone 145-2C11) or anti-CD28 (clone 37.51) mAbs (used to activate T cells); PE-cyanine (Cy) 5-, fluorescein isothiocyanate (FITC)-, and CyChrome (CyChr)-labeled streptavidin; FITC-labeled rat anti-mouse mAb to IL-10, and IFN- γ , PE-labeled rat anti-mouse mAb to TNF, biotin-labeled rat anti-mouse mAb to IL-4, and IL-2; FITC-labeled rat IgG2b, FITC-, PE-labeled rat IgG1 (used as isotype controls), mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit, were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Rabbit anti-mouse TGF- β polyclonal Ab, FITC-labeled goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-mouse moesin FERM domain (EP1863Y) mAb were acquired from Abcam (Cambridge, MA). Alexa Fluor 546-labeled

donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody and HyClone foetal bovine serum were from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA). The magnetic antibody cell sorting (MACS) kit for isolation of murine CD4⁺ cells was purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Sodium pyruvate, L-glutamine, and β -mercaptoethanol were from Gibco BRL (Rockville, MD). Horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG polyclonal antibody was from R&D System, Inc. (Minneapolis, MN). Penicillin and streptomycin were from In Vitro Company (Mexico City, Mexico). Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) was from Invitrogen (Camarillo, CA). Vectashield (mounting medium with diamidino-2-phenylindole [DAPI] fluorescent dye) was purchased from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA). Mini RNeasy and Omniscript RT kits were from Qiagen (Carlsbad, CA). Ampli-Taq polymerase was from Applied Biosystems (Branchburg, NJ). The mini complete protease inhibitors kit was from Roche Diagnostics GMBH (Mannheim, Germany). Bovine serum albumin fraction V (BSA) \geq 95% purity, RPMI-1640 culture medium, Coomassie brilliant blue R-250, trypan blue, Triton X-100 Ultra-pure, polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-20), dimethyl sulfoxide, methyl- β -cyclodextrin (M β CD), peroxidase-labeled extravidin, saponin, biotin-labeled cholera toxin B subunit, brefeldin-A from *Penicillium brefeldianum*, OptiPrep, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium azide, Trizma base, HEPES, and other salts were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). DC protein assay kit (500-0116), ReadyPrep 2D cleanup kit and reagents for SDS–PAGE were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Reagents for 2-D electrophoresis, strips, and Reswelling Tray were acquired from GE Healthcare (Fairfield, CT). All solutions were prepared with Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA).

Mice

Six- to eight-week-old male Balb/c mice were killed by cervical disruption in accordance to the guidelines accredited by the Institutional Research and Ethics Committee. Cells from the axial lymph nodes were obtained, washed, and suspended in RPMI-1640 medium culture. Cell viability was assessed by the trypan blue dye exclusion test.

Purified CD4⁺ T cell culture and proliferation assays

CD4⁺ T cells were isolated from lymph nodes using a MACS negative selection kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Purity of CD4⁺ T cells was assessed by flow cytometry using PE-labeled anti-CD4 mAb and CyChr-streptavidin after biotin-labeled anti-CD3 mAb.

The purity and viability percentages of cell suspensions were 95–98%.

Purified CD4⁺ T cells at a density 1×10^7 /mL of RPMI-1640 medium were stained with CFSE according to described method [17]. In brief, 1 mL of suspended cells in RPMI medium, were incubated with 15 μ L of 0.5 mM CFSE (prepared from a 5 mM stock solution dissolved in dimethyl sulfoxide) for 10 min at 37°C in darkness. After incubation, cells were washed twice in 8 mL of RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1% L-glutamine, 100 mM sodium pyruvate, 100 IU penicillin, 50 μ g/mL gentamicin, 100 μ g/mL streptomycin, and 50 mM β -mercaptoethanol (supplemented-RPMI medium), and cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion test. CFSE-treated cells were cultured in a 96-well plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA) with a supplemented-RPMI medium and stimulated with either 0.1, 1, or 5 μ g/mL of plate-immobilized anti-CD3 mAb alone or in the presence of 1 μ g/mL soluble anti-CD28 mAb or *ALL* at different concentrations (5, 10, 15, or 20 μ g/mL) during 24, 48, 72, and 96 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells cultured with anti-CD28 mAb plus *ALL* or with these reagents separately were used as controls. Both CFSE-untreated and non-stimulated cells were also used as controls. At the end of the culture periods, the cells were acquired on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed by the FlowJo software (Tree Star, Inc. Ashland, OR). To evaluate the cell divisions that have occurred under stimulation, the FlowJo proliferation platform was used. A histogram based on the fluorescence intensity of unstimulated CFSE-stained cells, which lay within a scatter gate, was performed to differentiate the divided cells of lower intensity. The subsequent gates enclosed cell populations with progressive twofold decreases in fluorescent intensity. Cell proliferation was assessed by percentage of divided cells, cell proliferation index, and division index. Additionally, images from activated cells were acquired on a Zeiss Axiovert 25 inverted microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Membrane cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin

Purified CD4⁺ T cells were stimulated by a 1 μ g/mL immobilized anti-CD3 mAb alone or in the presence of 1 μ g/mL soluble anti-CD28 mAb or 5 μ g/mL *ALL*, for 48 h of culture. Once cultured, cells (5×10^5) were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 10 mM M β CD for 30 min at 37°C [18, 19]. Then, cells were washed in PBS containing 0.1% BSA and 0.1% sodium azide (PBS-BSA buffer), incubated with biotin-*ALL* (15 μ g/mL) for 30 min at 4°C, followed by a second incubation with CyChr-streptavidin at dilution 1:400 and analyzed by flow

cytometry. Non-activated cells incubated with CyChr-streptavidin after biotin-*ALL*, and activated-cells incubated only with CyChr-streptavidin were used as controls.

Flow cytometry analysis

The percentage of cell surface molecules on purified CD4⁺ T cells was analyzed by direct or indirect immunofluorescence. In brief, cells were washed in a PBS-BSA buffer and stained with fluorescent reagents during 15 min at 4°C for incubation. Afterwards, cells were washed in PBS-BSA buffer, suspended in FACS-Flow buffer and acquired in the FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). In each case, 25×10^3 cells were counted in linear mode for side and forward scatter and by log amplification for fluorescent cells. Fluorochrome-labeled isotype-matched control mAbs or fluorescent-second reagents were used to evaluate background staining. Data from cytometer were analyzed by the FlowJo software (Tree Star, Inc.).

Cytokine mRNA production

Purified CD4⁺ T cells (5×10^6) were simultaneously activated by 1 μ g/mL immobilized anti-CD3 mAb plus 1 μ g/mL anti-CD28 mAb or 1 μ g/mL immobilized anti-CD3 mAb plus 5 μ g/mL *ALL* (optimal concentrations) for 48 h of culture. Non-stimulated cells were used as control. To evaluate cytokine transcripts, cells were washed in sterile PBS, and total RNA was isolated by using the mini RNeasy kit according to manufacturer's instructions (Qiagen) and quantified by a spectrophotometer at 285 nm. One microgram of an RNA sample was reverse-transcribed through the Omniscript RT kit and 1 μ g from the resulting cDNA was used to amplify the IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β genes by polymerase chain reaction (PCR). Each cDNA sample was amplified in duplicate as described [20]; the sets of primers and the cDNA concentration were calibrated for a number of cycles to obtain amplicons in the linear phase of amplification. The following gene specific primer sequences were used: (IL-2) forward 5' ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC 3', reverse 5' GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A 3'; (IL-4) forward 5' ACA GGA GAA GGG CGC CAT 3', reverse 5' GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA 3'; (IL-10) forward 5' ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T 3', reverse 5' ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTT GTT T 3'; (TNF- α) forward 5' ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC 3', reverse 5' CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC 3'; (IFN- γ) forward 5' GAA AGC CTA GAA AGT CTG AAT AAC T 3', reverse 5' ATC AGC AGC GAC TCC TTT TCG GCT T 3'; (TGF- β) forward 5' GAC CGC AAC AAC GCC ATC TA 3', reverse 5' GGC GTA TCA GTG GGG GTC AG 3', and (β -actin) forward 5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA

3', reverse 5' CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'. PCR reactions were performed in a total volume of 30 μ L buffer containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 0.1 mg/mL gelatin, 2 mM MgCl₂, 100 nM of each primer, 200 mM dNTPs, and 0.5 U of ampli-Taq polymerase/75 ng of cDNA. After 29–36 cycles, the PCR products were analyzed in 10% acrylamide gels and stained with ethidium bromide. The amount of the corresponding cytokine mRNA per microgram of total RNA, normalized to the amount of β -actin mRNA, was determined by scanning densitometry and expressed as arbitrary units.

Intracellular and soluble cytokine production

To assess soluble cytokines, purified CD4⁺ T cells were stimulated by anti-CD3/CD28 mAbs or anti-CD3/*ALL* for 48 h. In addition, other cells were stimulated by 1 μ g/mL immobilized anti-CD3 mAb plus 1 μ g/mL anti-moesin mAb during 48 h of culture. After culture, 25 μ L supernatant was collected and analyzed to measurement of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , and TNF by means of a cytometric bead array (CBA) kit following manufacturer's instructions (BD Biosciences). Analyses were obtained by flow cytometry with FCAP Array version 3.0.19.2091 software. The Kit detection limits were as follows: IL-2, 0.1 pg/mL; IL-4, 0.03 pg/mL; IL-6, 1.4 pg/mL; IFN- γ , 0.5 pg/mL; TNF, 0.9 pg/mL; IL-17A, 0.8 pg/mL, and IL-10, 16.8 pg/mL.

For intracellular cytokine detection, cells were activated for 48 h as described and 4 h before brefeldin-A was added (1 μ g/ μ L). At the end of the incubation period, cells were harvested, washed in PBS-BSA buffer, and fixed with 4% *p*-formaldehyde in PBS for 10 min at 4°C. Then, cells were washed twice in PBS and permeabilized with saponine buffer (0.1% saponine, 0.01% pig IgG, 10 mM HEPES, 10% BSA in PBS), shaking gently for 10 min at 4°C. Subsequently, cells were incubated with fluorochrome-labeled Abs against IL-2, IL-4, IL-10, TNF, IFN- γ , and TGF- β for 30 min at 4°C. Cells were washed in 0.1% saponine, 100 mM HEPES, 10% BSA in PBS, then washed in PBS-BSA buffer, and analyzed by flow cytometry.

Isolation of lipid rafts from CD4⁺ T cell activated via CD3/CD28

Purified CD4⁺ T cells were stimulated by optimal concentrations of anti-CD3 mAb plus anti-CD28 mAb for 48 h of culture. Non-stimulated cells were used as control. Once cultured, cells were treated using a slightly modified method [21]. In brief, cells (1×10^8) were incubated in 200 μ L lysis buffer (1% Triton X-100 in base buffer TEN containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, and 150 mM NaCl supplemented with a protease inhibitor

mixture from Roche) and shaken for 30 min at 4°C. The cell lysate was sonicated four times \times 15 s at 14 Hz frequency with intervals of 30 s on ice and clarified (1500 g for 5 min at 4°C). The resulting supernatant was mixed in OptiPrep in base buffer TEN to obtain a solution of 40% OptiPrep; 0.75 mL of the solution were transferred to a 2.5 mL ultracentrifuge tube (Beckman, Palo Alto, CA). Next, 1.2 mL of 30%, 0.25 mL of 5%-OptiPrep, and 0.25 mL base buffer TEN were sequentially overlaid on top of the clarified cell lysate. The sample was then centrifuged at 60,000 g in a TL555 rotor (Beckman) movable angle for 2 h at 4°C. Seven 0.34 mL fractions were collected gradually from the top of the gradient and stored at -70°C . The protein concentration in each OptiPrep gradient fraction was determined by a DC protein assay kit according to manufacturer's instructions (Bio-Rad). BSA was used as the standard.

Electrophoresis

Equal volumes (30 μ g) of the cholesterol-rich membrane protein samples were resolved by 7.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and stained (0.1% Coomassie blue, 50% methanol, 10% acetic acid). For two-dimensional SDS-PAGE (2-DE), selected fractions (250 μ g) were clarified by a ReadyPrep 2D cleanup kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). After treatment, the dried pellet was mixed with a rehydration solution (8 M Urea, 2 M thiourea, 0.5% CHAPS, 2% immobilized pH gradient [IPG]-buffer ampholines pH 3–10, 40 mM dithiothreitol [DTT], and 0.002% bromophenol blue) yielding a final volume of 125 μ L that was applied to 7 cm IPG strips (Immobiline DryStrip), pH 3–10, and linear gradient in a reswelling tray (all GE Healthcare) and allowed to rehydrate for 18 h. For the first-dimension, IPG strips were resolved by isoelectric focusing using an Ettan IPGphor system (Bio-Rad) according to the described method [22]. Afterwards, IPG strips were stored at -70°C until needed. For the second dimension, focused strips were equilibrated for 15 min in 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, and 1% DTT, then followed by an identical incubation to replace DTT with 2.5% iodoacetamide. After placing the strips on 7.5% gels, vertical electrophoresis was performed and gels were stained with Coomassie blue solution or transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon-P membranes (Millipore Corp, Billerica, MA) or analyzed by Nano liquid-chromatography electrospray-ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) systems.

Far-Western blotting

For far-Western blotting, resolved proteins in electrophoresis were transferred to PVDF membranes (Millipore Corp.

Billerica, MA) as described in previous studies [23–24]. In brief, membranes were incubated in a blocking buffer (3% BSA in Tris-buffer-saline-Tween [TBS-Tween] containing 20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, and 0.1% Tween-20), washed three times (10 min each) in TBS-Tween, incubated at 4°C overnight, and then 2 h at 37°C [23], shaken gently with biotin-*ALL* (400 µg/mL), and followed by 1 h incubation with peroxidase-extravidin (1:5000) or peroxidase-cholera toxin B subunit (1:500). Finally, proteins were visualized by SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL) on autoradiography film from Kodak Biomax MR (Sigma-Aldrich).

Nano LC-ESI-MS/MS

Protein spots of interest in 2-DE were identified by comparing proteins stained in Coomassie blue and those recognized through *ALL* in far-Western blotting. Gel spots were excised from the 2-DE with a sterile scalpel. Gel pieces were washed in 50% (v/v) acetonitrile and 25 mM sodium bicarbonate (pH 8.5) for 15 min twice to remove Coomassie dye. Next, samples were dried in a vacuum after dehydration with 100% acetonitrile for 10 min at room temperature, followed by rehydration with sequencing-grade modified trypsin (Promega, Madison, WI) in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) at 37°C overnight. In-gel tryptic digested samples were trapped and desalted isocratically on an LC-Packing PepMap C₁₈ µ-pre-column cartridge (Dionex, Sunnyvale, CA) and loaded into an integrated nano-LC-ESI-MS/MS system by an analytical C₁₈ capillary column connected online to a quadrupole acceleration time-of-flight, Ultima API, and mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). Instrumental operation, data acquisition, and analysis were carried out under the full control of Mass-Lynx 4.0 (Micromass). The 1-s survey scans were run over in the *m/z* mass range of 400–2000. A maximum of three concurrent MS/MS acquisitions were triggered for 2+, 3+, and 4+ charged precursor detection at an intensity above the predefined threshold. Product ions were analyzed by the Mascot software (www.matrixscience.com) using both NCBItr and EST databases. Parameters for the Mascot search were peptide mass tolerance of 1 Da, MS/MS ion mass tolerance of 1 Da, maximally one missed cleavage and tryptic digestion. Variable modifications included cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation [25]. Only proteins with ion scores >30 were reported.

Confocal microscopy

Purified CD4⁺ T cells (2 × 10⁶) were cultured in chamber slides (BD Falcon, San Diego, CA) and activated by anti-CD3

plus anti-CD28 mAbs for 48 h. After removing the supernatant, cells with or without treatment in 1% *p*-formaldehyde (for 5 min), were washed twice in PBS. Cells were incubated with 1% BSA in PBS for 20 min, washed in PBS, and incubated again either with biotin-*ALL* (15 µg/mL) for 2 h, followed by a second incubation with FITC-streptavidin at dilution 1:200, or with rabbit anti-moesin FERM domain mAb, followed by an Alexa Fluor 546-labeled donkey anti-rabbit IgG secondary antibody for 30 min at 4°C in humidity chamber. Cells were then washed in PBS and slides were mounted in Vectashield (containing DAPI dye) at dilution 1:3 in PBS. Cells incubated with FITC-streptavidin or Alexa Fluor 546-secondary antibody were used as controls. For colocalization assays, cells were fixed in 1% *p*-formaldehyde and visualized by microscopy equipped with the ApoTome.2 confocal system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 63x/1.4 objective lens. The digital images were processed by AxioVision based on Release 4.8.2 SP1 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). The images were taken under the same exposure, magnification, and intensification; the processing was the same for all the images shown.

Statistical analysis

Data were analyzed by Graphpad Prism 5 software (La Jolla, CA) and Origin 8.5.1 sr2 software (Northampton, UK), using a Shapiro–Wilk test to reveal population distributions. Student's *t*-test was performed for comparison of variables that were symmetrically distributed, and values are shown as mean ± standard deviation (SD). To compare groups, an analysis of variance test followed by Bonferroni's multiple comparison test was carried out. Values were considered statistically significant at *P* < 0.05.

Results

ALL enhanced proliferation of CD4⁺ T cells activated by anti-CD3 antibody

To confirm whether *ALL* can act as a costimulatory molecule, purified CD4⁺ T cells were simultaneously stimulated via immobilized anti-CD3 mAb plus soluble *ALL*. The results showed 39.5 ± 0.6% CD4⁺ T cell proliferation at 1 µg/mL anti-CD3 mAb, which increased 1.7-fold (69.1 ± 0.9%) in the presence of 5 µg/mL *ALL* (*P* = 0.03) only at 48 h of cell culture. However, under these conditions, at 10, 15, or 20 µg/mL *ALL* did not show the highest increase in cell proliferation. Likewise, *ALL* alone was unable to induce CD4⁺ T cell proliferation, showing (even at high doses) behavior similar to that of non-stimulated cells (data not shown). To compare the effect of *ALL* on CD3-substimulated CD4⁺ T cell proliferation versus that mediated by the CD28

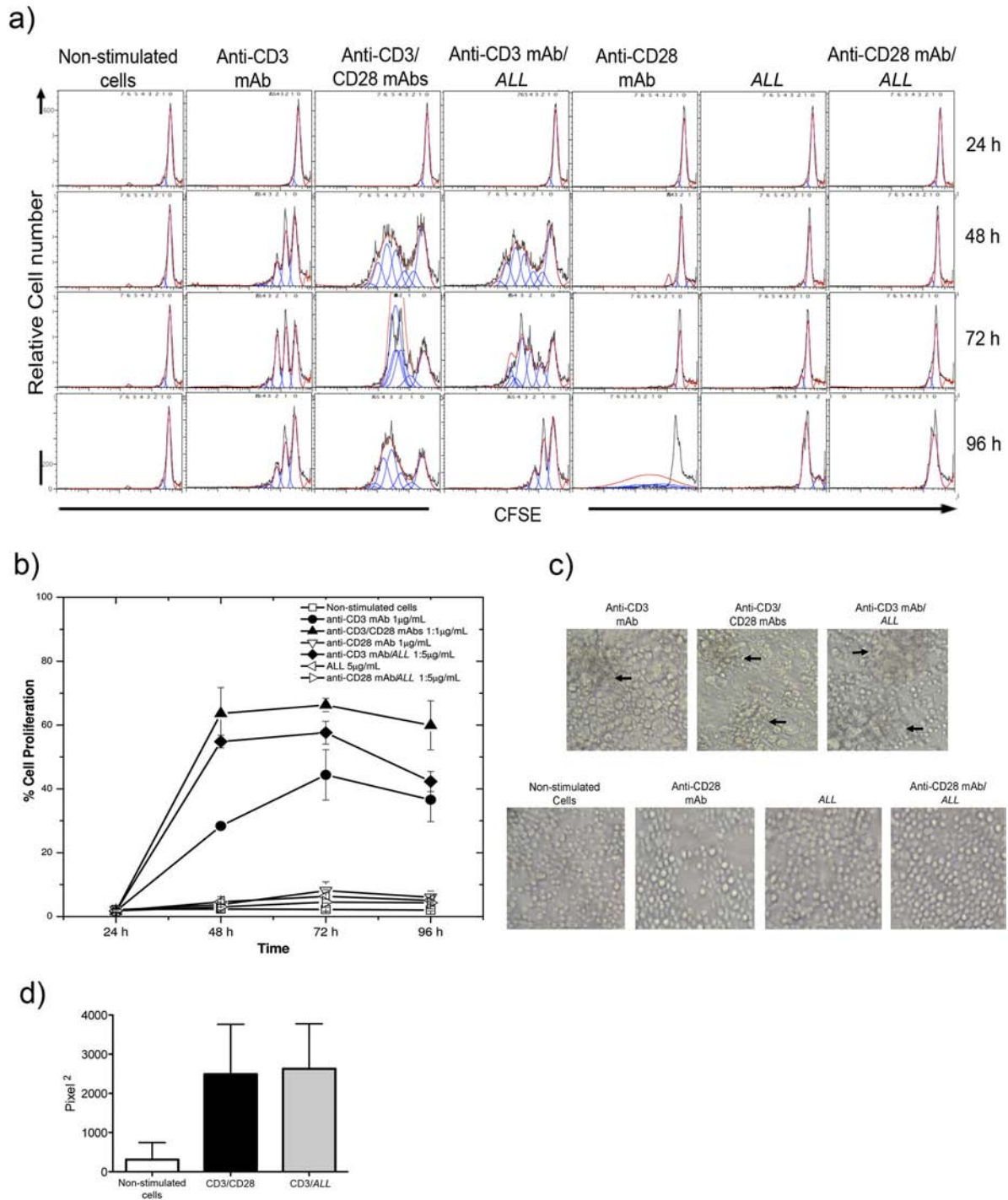


Figure 1. The CD4⁺ T cell proliferation percentage induced by CD3/A. leucocarpus lectin is comparable to that induced by CD3/CD28. Murine lymphoid node CD4⁺ T cells were purified, cultured, and analyzed by flow cytometry and microscopy. (a) Histograms representing cells stained by carboxyfluorescein succinidyl ester (CFSE) and cultured at indicated times. Cell proliferation (sequential halving of fluorescence intensity) was induced under indicated conditions using 1 µg/mL anti-CD3 mAb and either 1 µg/mL anti-CD28 mAb, or 5 µg/mL ALL. (b) Graphic showing the cell proliferation percentage on different days of culture under the conditions indicated. (c) Representative photographs showing massive cell clusters shaped via anti-CD3 mAb alone (upper left panel) or in combination with either anti-CD28 mAb or ALL (upper middle and right panels) during 48 h of culture. Non-stimulated cells, and cells cultured with anti-CD28 mAb or ALL and anti-CD28 mAb were used as controls (lower panels). Typical clusters of activated cells are pointed out by arrows. Magnification ×20. (d) Measurement in pixel² from area occupied by activated cell clusters. Results are presented as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 1. Comparative analysis on the cell proliferation of non-stimulated or stimulated CD4⁺ T cells upon indicated conditions

		Non-stimulated cells	Anti-CD3 mAb	Anti-CD3/CD28 mAbs	Anti-CD3 mAb/ALL	Anti-CD28 mAb	ALL	Anti-CD28 mAb/ALL
24 h	Div. index	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.001	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.02
	Prol. index	1.18 ± 0.02	1.06 ± 0.03	1.09 ± 0.007	1.2 ± 0.14	1.09 ± 0.01	1.19 ± 0.15	1.33 ± 0.27
48 h	Div. index	0.06 ± 0.006	0.58 ± 0.02	0.87 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.06 ± 0.008	0.15 ± 0.05	0.089 ± 0.003
	Prol. index	1.18 ± 0.02	1.3 ± 0.17	2.12 ± 0.17	1.83 ± 0.09	1.36 ± 0.06	1.23 ± 0.14	1.1 ± 0.04
72 h	Div. index	0.07 ± 0.005	0.39 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.47 ± 0.08	0.18 ± 0.02	0.076 ± 0.009	0.065 ± 0.01
	Prol. index	1.19 ± 0.04	1.17 ± 0.09	2.33 ± 0.16	2.32 ± 0.11	1.9 ± 0.10	1.24 ± 0.10	1.16 ± 0.10
96 h	Div. index	0.08 ± 0.008	0.385 ± 0.03	0.77 ± 0.08	0.32 ± 0.04	0.605 ± 0.03	2.76 ± 0.79	0.016 ± 0.005
	Prol. index	1.18 ± 0.02	1.19 ± 0.04	2.31 ± 0.15	1.21 ± 0.02	1.15 ± 0.04	1.92 ± 0.26	2.56 ± 0.42

Division Index (Div. Index) is the average number of divisions for all cells in the culture. Proliferation Index (Prol. Index) is the measurement for responding cells, denotes the average number of divisions that cells have undergone.

molecule, cells were treated as above, at different times of culture. In Figure 1a, the analysis by histograms showed that CD4⁺ T cell proliferation percentage induced via CD3 plus ALL (54.8 ± 2.0%) was comparable to that induced by CD3 plus CD28 at 48 h of culture (63.6 ± 8.1%). The effect of ALL on CD3-substimulated CD4⁺ T cells was maintained until 72 h, whereas costimulation by CD28 persisted until 96 h of culture (Fig. 1b). On the contrary, no difference was detected at 24 h of cell culture under any conditions tested (Fig. 1a). The quantitative analysis showed that proliferation index was 1.1-fold higher in cells activated by anti-CD3/CD28 than those cells activated by anti-CD3/ALL at 48 h of culture (Table 1). In both cell stimulations, similar results were observed through the division index at 48 h; and the values were the same for cell proliferation index and division index at 72 h of cell activation (Table 1). Analysis by microscopy showed typical cell clusters formed through sub-stimulation with immobilized anti-CD3 mAb (1 µg/mL) alone on purified CD4⁺ T cells at 48 h of culture (Fig. 1c). The massive cell clusters increased in size and number in culture of CD4⁺ T cells stimulated via CD3/CD28, which were similar shape in those cells stimulated via CD3/ALL (Fig. 1c, upper panels). The quantitative measurement on area occupied by cell clusters showed a same average value between cells stimulated by CD3/CD28 and CD3/ALL (Fig. 1d). In contrast, cells incubated with ALL or anti-CD28 mAb or ALL plus anti-CD28 mAb exhibited a similar shape than non-stimulated cells (Fig. 1c, lower panels).

CD4⁺ T cells stimulated by anti-CD3 mAb plus ALL produce cytokines

To evaluate cell function, CD4⁺ T cells were simultaneously stimulated by anti-CD3 mAb plus ALL. The results showed similar levels of transcripts for IL-2, TNF-α, TGF-β, and IFN-γ compared to those shown by CD3/CD28-stimulated CD4⁺ T cells (Fig. 2a). However, cells activated via CD3/ALL showed a lower production of mRNA for IL-4 and IL-10

than those cells activated by CD3/CD28. The difference was statistically significant for both IL-4 (0.06 ± 0.05 vs. 0.64 ± 0.19; *P* = 0.005, respectively) and IL-10 (0.19 ± 0.08 vs. 0.39 ± 0.07; *P* = 0.03, respectively) (Fig. 2a). With regard to the levels of soluble cytokines measured in cell culture supernatant, the IL-2 was 67-fold higher in cells activated by CD3/CD28 than in those cells activated by CD3/ALL (*P* < 0.005). On the other hand, IL-10 was 1.5-fold higher in the culture supernatant of cells activated by CD3/ALL than in cells activated by CD3/CD28 (*P* < 0.05) as shown in Figure 2b. Other cytokines did not show significant differences in their amounts, the levels of both IFN-γ and IL-4 were almost undetectable (Fig. 2b). Concerning to the measurement of intracellular cytokines, there were a higher percentage of cells positive to IL-2 and TGF-β in the culture of cells activated by CD3/ALL than in cells activated by CD3/CD28 (Fig. 2c).

A. *leucocarpus* lectin recognizes a receptor associated to lipid rafts

Because freshly obtained mouse CD4⁺ T cells incubated with FITC-labeled ALL showed formation of fluorescent patching and capping on cell surface (data not shown), we examine whether cholesterol depletion in lipid rafts affects cell membrane recognition by ALL. For this, CD4⁺ T cells were treated with MβCD after activation via CD3/CD28 or CD3/ALL for 48 h. Results showed that cells sub-stimulated by immobilized anti-CD3 antibody alone at a dose of 1 µg/mL, a low cell proliferation was observed (Fig. 3, lower left panel). Under this condition, ALL recognized 27% of the cells, which was lost after treatment with MβCD (Fig. 3, upper left panel). In contrast, cells stimulated by anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs, the percentage of ALL-positive cells increased 2.8-fold (Fig. 3, upper middle panel). Similarly, cells stimulated by anti-CD3 mAb plus ALL, the percentage of cells positive to ALL increased 2.3-fold (Fig. 3, upper right panel). Furthermore, the recognition of proliferating cells by

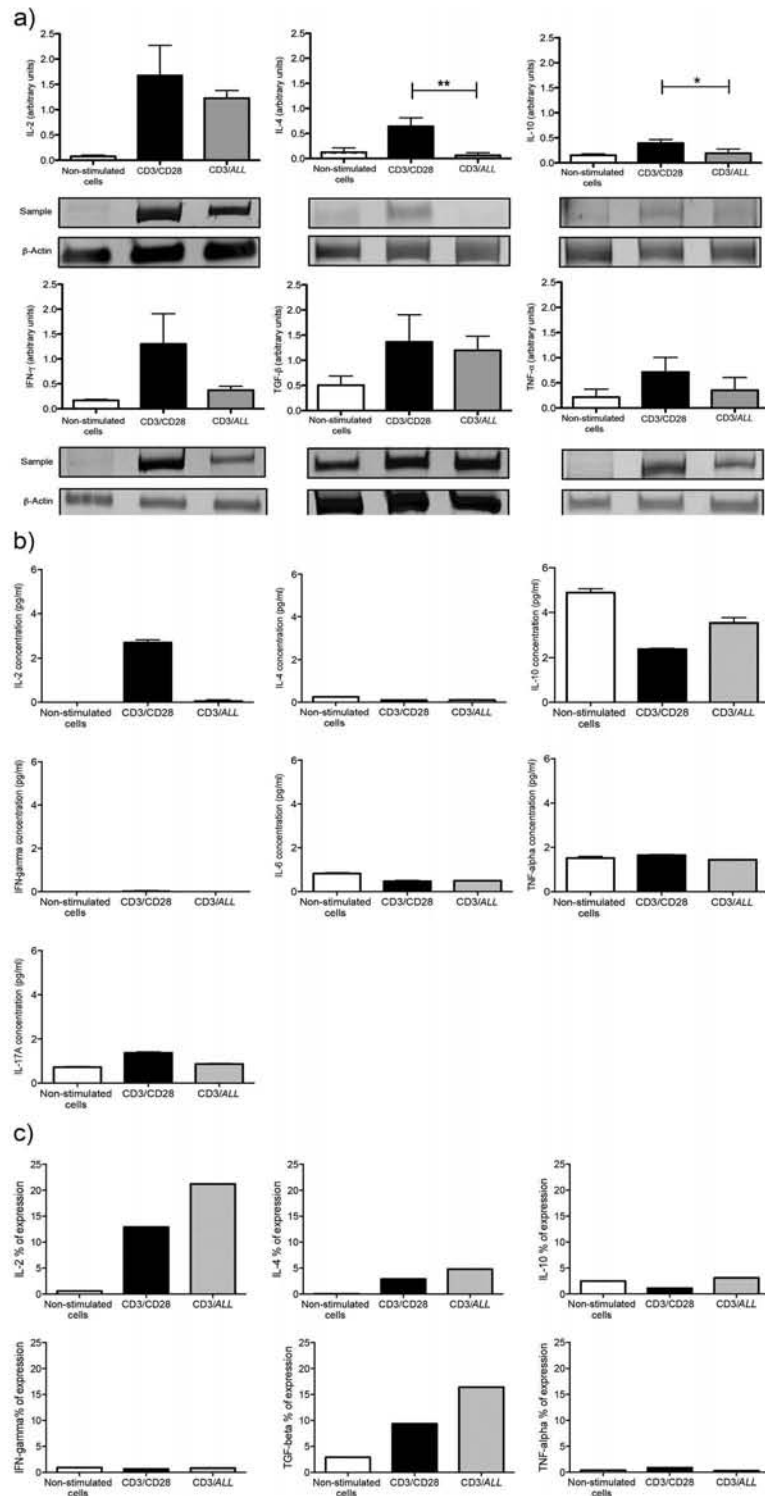


Figure 2. The production of cytokines in CD4⁺ T cells induced by CD3/A. *leucocarpus* lectin as compared to that induced by CD3/CD28. Murine lymph node CD4⁺ T cells were stimulated via CD3/CD28 or CD3/ALL for 48 h. (a) Products from PCR assay for indicated cytokine transcripts were resolved by 10% PAGE–SDS. The amount of cytokine mRNA per microgram of total RNA was normalized to the amount of β -actin mRNA by scanning densitometry. Bars represent mean \pm standard deviation of three independent experiments, which are expressed as arbitrary densitometry units. (b) Supernatant from cell cultures was collected and analyzed by CBA kit for measurement of indicated soluble cytokines. Bars represent mean \pm standard deviation of three independent experiments. (c) Intracellular cytokines in cells stimulated for 48 h. Bars denote mean of two independent experiments.

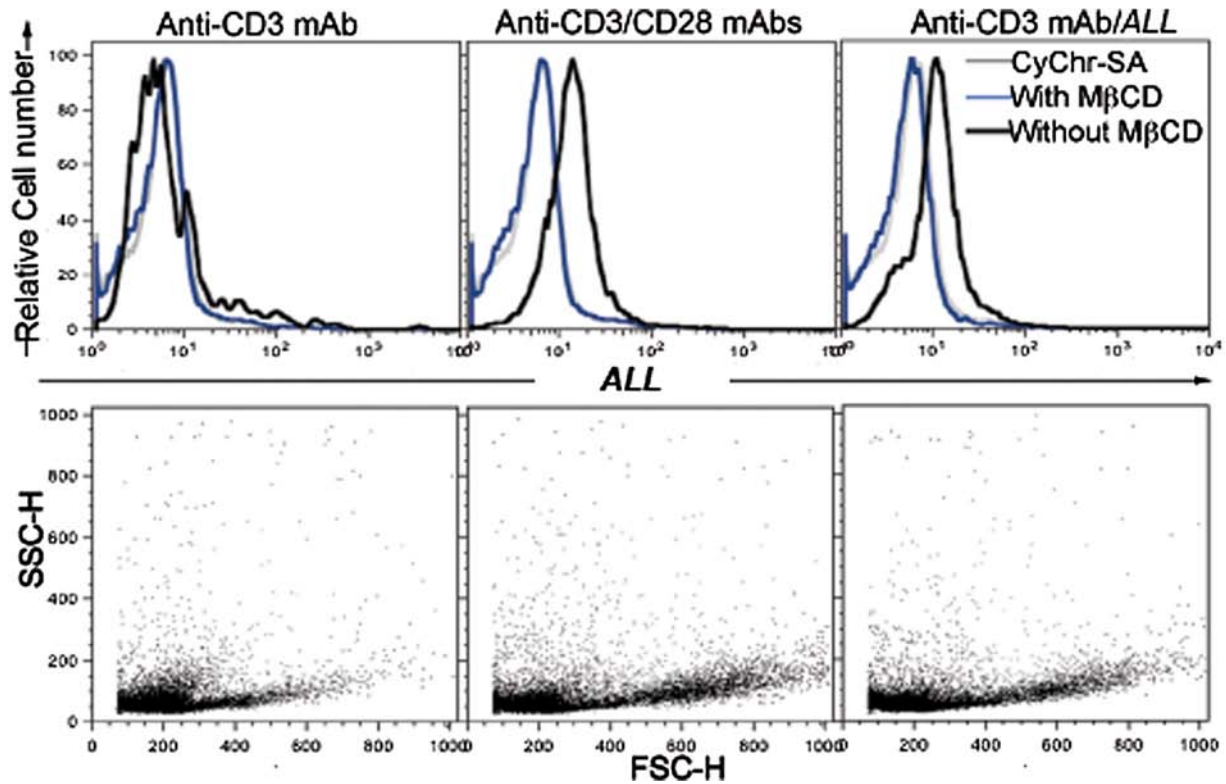


Figure 3. Glycoprotein recognized by *A. leucocarpus* lectin is associated to lipid rafts. Murine lymph node CD4⁺ T cells were cultured during 48 h. Representative histograms of fluorescent cells and dot plots of proliferating cells analyzed by flow cytometry. Cells were activated via anti-CD3 mAb alone (left panels) or in the presence of anti-CD28 mAb or ALL (middle and right panels). After culture, cells were treated (blue line in histograms) or not (black line in histograms) with methyl- β -cyclodextrin (M β CD). Next, cells were incubated with biotin-ALL followed by the CyChr-streptavidin (CyChr-SA) fluorescent staining. CyChr-SA as staining control (gray line in histograms) was used. Results are representative of three independent experiments.

ALL was returned to a background level after treatment with M β CD (Fig. 3, upper middle and right panels).

A. *leucocarpus* lectin recognizes two prominent proteins from lipid rafts

The far-Western blotting analysis of the resulting lipid raft fractions (isolated from CD3/CD28-activated CD4⁺ T cells during 48 h) showed a marked reactivity of ALL on two bands from fraction 7 (Fig. 4a, middle panel), which were also recognized by the cholera toxin B subunit (Fig. 4a, lower panel). Additionally, ALL recognized bands in fractions 5 and 8 but at a lesser extent (Fig. 4a, middle panel). Here, the cholera toxin B subunit was used as a reagent to confirm the isolation of lipid rafts. Subsequently, to identify the cholesterol-rich membrane proteins recognized by ALL, a far-Western blotting of fractions 5 and 7 was again performed after 2-DE. In fraction 7, around 40 protein spots were observed in Coomassie staining (Fig. 4b), where two prominent protein spots with mobility relatively close to 70 kDa were selected (amplified region in Fig. 4c). The selected protein spots in turn were recognized by ALL (Fig. 4d). Same results were obtained from fraction 5, but at a

lower intensity than from fraction 7 (data not shown). The ALL-recognized protein spots resulting from fraction 7 were subjected to mass spectrometry and compared with the protein database. The analyzed protein spots are shown in Table 2. The number one exhibited a 33% homology to matricin (gi|347839 NCBIInr) with a theoretical mass of 61 kDa, whereas the number two showed 41% identity to an unnamed protein closely related to moesin, with a theoretical mass of 67.8 kDa (gi|74186081 NCBIInr) and 6.3 pI. This last protein sequence was also analyzed by both the protein structure prediction system, Phyre² [26] and NetOGlyc v 4.0 software [27]. The Phyre² system showed 90% identity to the FERM domain of moesin, whereas the second showed nine potential O-glycosylation sites; which the positions 165, 205, and 206 exhibited 0.68, 0.78, and 0.86 scores, respectively.

Staining by ALL colocalizes with anti-moesin FERM domain antibody in activated CD4⁺ T cell surface

To test whether ALL recognizes a FERM family-bearing protein, CD4⁺ T cells were activated via CD3/CD28 for 48 h,

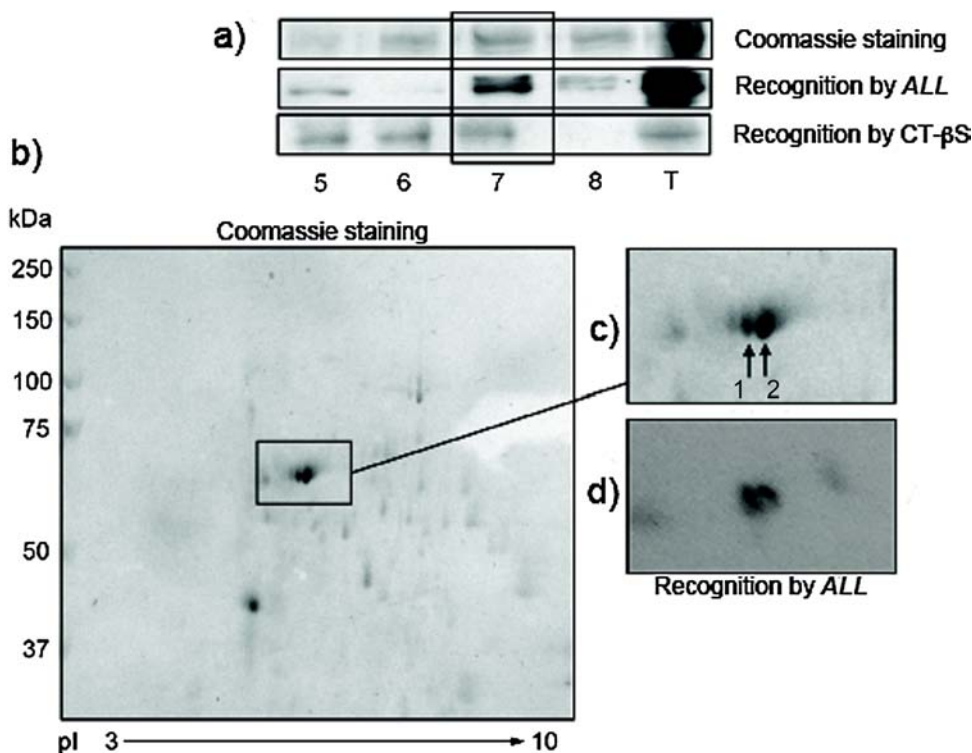


Figure 4. *A. leucocarpus* lectin recognizes two prominent proteins from lipid rafts. Murine lymph node CD4⁺ T cells were stimulated by CD3/CD28 during 48 h. (a) Protein bands close to 70 kDa were detected in 7.5% SDS-PAGE and far-Western blotting in isolated cholesterol-rich membrane fractions (lanes 5–8) and total lysed sample (lane T). Gel was visualized by staining with Coomassie blue (upper panel). By far-Western blotting, *ALL* recognized two protein bands (lanes 5, 7–8 and T; middle panel), whereas cholera toxin β subunit (CT-βS) reacted to 5–7 fractions and total lysed sample (lanes 5–7 and T; lower panel). (b) The 2-DE stained by Coomassie blue shows two close prominent protein spots, (c) which are indicated by numbered arrows on amplified mode. (d) The same protein spots were also recognized by *ALL*. Molecular weight markers are indicated alongside the gel. Their identities are listed in Table 1. The reactivity was visualized by chemiluminescence. Results are representative of six independent experiments.

after, stained with both *ALL* and anti-moesin FERM domain mAb. Staining was performed on undamaged cells, since they had not been treated with permeabilizing reagents. The fluorescent staining by *ALL* was observed along of cell surface only in *ALL*-positive cells, which seem be concentrated at intercellular contact sites (Fig. 5A, D). Interestingly, the vast majority of cells were recognized by anti-moesin mAb, and in some cells, the fluorescent staining was also intense at cellular interaction sites (Fig. 5B, E). Cells incubated with secondary reagents did not showed fluorescent staining (Fig. 5G–I). The colocalization events were

observed at intercellular contact sites in the agglutinated *ALL*-positive cells (Fig. 5C, F).

CD4⁺ T cells activated by anti-CD3/anti-moesin mAbs secrete cytokines

To examine whether the anti-moesin FERM domain mAb costimulates CD3-stimulated CD4⁺ T cells, purified CD4⁺ T cells were simultaneously activated by anti-CD3 mAb plus anti-moesin mAb for 48 h. Results showed activated cell clusters similar to those from cells stimulated

Table 2. *A. leucocarpus* lectin far-WB-bound proteins from activated CD4⁺ T cells identified by LC Ms/Ms

NCBI nr accession	Spot No*	Protein	Theoretical mass (kDa)	Peptides matched	Sequence coverage**
gil347839	1	Matricin	61	13	33%
gil74186081	2	Unnamed protein product	67.8	15	41%

Only proteins that showed significant ion scores (>33) are indicated.

**ALL*-positive spots identified in Figure 3e.

**Represents the identity or extensive homology ($P < 0.05$) with the indicated protein.

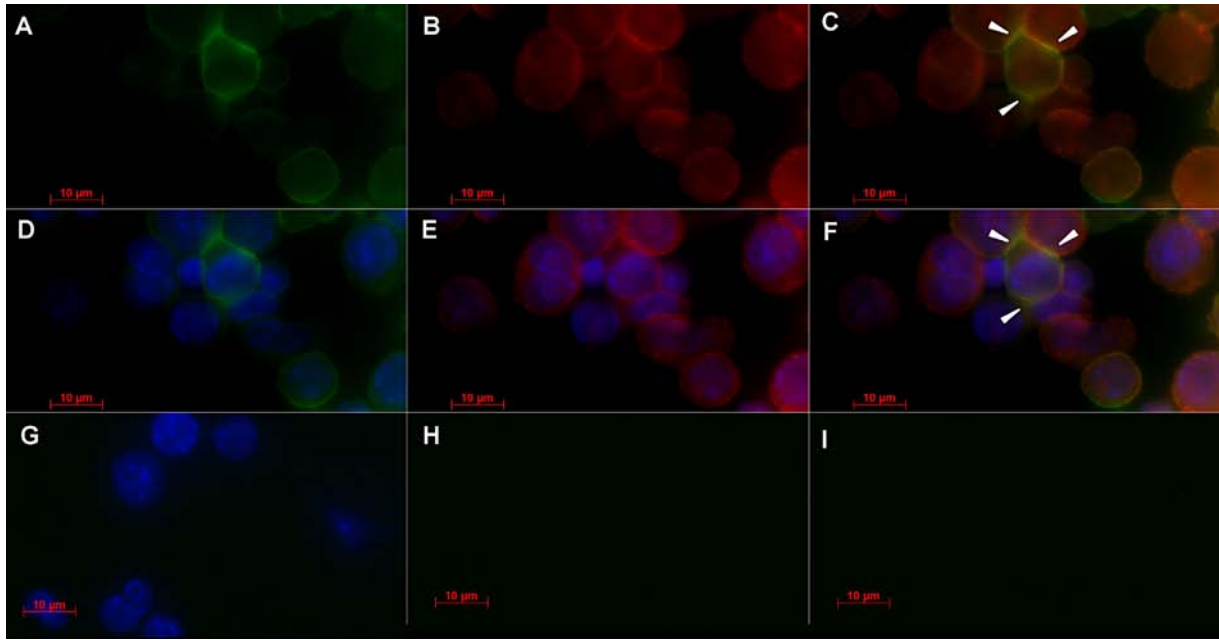


Figure 5. Glycoprotein recognized by *A. leucocarpus* lectin colocalizes with protein recognized by anti-moesin FERM domain antibody in activated CD4⁺ T cell surface. Murine lymph node CD4⁺ T cells were activated via CD3/CD28 for 48 h of culture. Then, non-permeabilized cells were fixed and stained by triple immunofluorescence. The images are part of a reconstructed Z series, and the individual sections were taken along the x–y axes. (a) Image from cells stained with biotin-*ALL* followed by FITC-streptavidin. (b) Image from cells stained by rabbit anti-moesin FERM domain mAb and followed by an Alexa Fluor 546-donkey anti-rabbit IgG secondary antibody. (c) Merged image from cells stained by *ALL* (green) and anti-moesin mAb (red). (d–f) DAPI nuclear staining (blue) was used as a cellular counterstain. (g) Cells stained with DAPI only as control. (h–i) Cells incubated with FITC-streptavidin or Alexa 546-secondary antibody were used as staining control. Images were visualized by microscopy equipped with the ApoTome.2 confocal system (Carl Zeiss). Data shown are representative of three individual experiments. Arrowheads indicate recognition by *ALL* and anti-moesin mAb. Bars 10 μm.

by CD3/CD28 or CD3/*ALL*. The measurement in pixels² was 312.9 ± 435.8 to non-stimulated cells; 2492 ± 1275 to cells upon stimulation by CD3/CD28; 2629 ± 1150 to CD3/*ALL*; and 2393 ± 1246 to CD3/moesin. Likewise, level of cytokines in culture supernatant from cells activated by CD3/moesin was very similar to those cells activated via anti-CD3 mAb plus *ALL* (Table 3). Nevertheless, the concentration of

IL-17A in CD3/*ALL*-activated cells was higher than CD3/moesin-activated cells (Table 3).

Discussion

The role of glycans to induce T cell activation can be shown by the use of lectins, which are proteins or glycoproteins with

Table 3. Soluble cytokines detected in culture supernatant of non-stimulated or stimulated CD4⁺ T cells upon indicated conditions at 48 h of culture

	Non-stimulated cells	CD3/CD28	CD3/ <i>ALL</i>	CD3/Moesin
IL-10	4.8 ± 0.17	2.3 ± 0.03	3.5 ± 0.2*	2.4 ± 0.02*
IL-17A	0.7 ± 0.02	1.3 ± 0.04	0.86 ± 0.02	0.01 ± 0.01
TNF-α	3.0 ± 0.07	1.6 ± 0.02	1.4 ± 0.01	1.3 ± 0.007
IL-6	0.8 ± 0.03	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.02
IL-2	0 ± 0	2.71 ± 0.12**	0.04 ± 0.06**	0.03 ± 0.04**
IL-4	0.2 ± 0.007	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.07 ± 0.01
IFN-γ	0 ± 0	0.02 ± 0.02	0 ± 0	0 ± 0

Mean ± Standard deviation. Results are in pg/mL. For kit detection limits, see experimental section.

**P* < 0.05.

***P* < 0.005.

reversible binding to their saccharide ligands [28]. The lectins have at least one non-catalytic domain that recognizes oligosaccharides in a specific spatial conformation [28]. One of these lectins, *ALL* with specificity for GalNAc in either the Thomsen–Friedenreich antigen (Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr) or Tn antigen (GalNAc α 1,O-Ser/Thr) [8] was used in this work. The role of *ALL* in T cell costimulation has been reported [15]; however, we showed that in the absence of APCs, *ALL* enhanced CD4⁺ T cell proliferation when given a CD3-based stimulation, which was comparable to stimulation via CD3/CD28. The CD28 molecule is known as the major T cell costimulatory receptor for the production of IL-2 [29]. Thus, the production of cytokines was determined in *ALL*/CD3-stimulated cells; in this sense, non-CD28 T cell costimulatory molecules have been found to induce cytokines production. Among these molecules, the stromal cell-derived factor-1 α costimulates cell proliferation and production of IL-2, IL-4, IL-10, and IFN- γ on activated CD4⁺ T cells [30]. Monoclonal antibodies to CD5 or CD9 induce also potent [³H]TdR uptake and IL-2 production on activated T cells [31]. Likewise, concurrent CD2 and CD48 costimulation enhances CD3-driven T cell activation concerning both proliferation and synthesis of transcript for IL-2 and IFN- γ [32]. Nevertheless, T cell costimulation by CD5, CD9, or CD2-CD48 interaction is less efficient than CD28 [31–32]. In our case, the production of transcripts for IL-2, TNF- α , TGF- β , and IFN- γ in CD4⁺ T cells activated via CD3/*ALL* did not show statistical differences comparing with those activated via CD3/CD28. Concerning to secreted cytokines, we observed that IL-2 is more abundant in the culture of cells activated through CD3/CD28 in comparison to the other conditions of culture, possibly by positive feedback during the activation [1]. Although the costimulation via *ALL* appears to be insufficient for production of IL-2, the number of cells positive for IL-2 and TGF- β were higher than the costimulation by CD3/CD28. Altogether our results suggest that the major *ALL*-recognized glycoprotein is able to costimulate the cytokine production, reflecting the T cell functional activity.

On the basis of that costimulatory molecules are found in lipid raft during T cell activation and because T cells incubated with *ALL* display formation of patching and capping on cell surface, we used M β CD to deplete cholesterol from lipid raft after activation of CD4⁺ T cells. Previous studies of our laboratory have been shown that *ALL* binds 22% non-stimulated CD4⁺ T cells, and the number of *ALL*-positive cells increases three-fold after 24–48 h activation [13]. The disruption of lipid rafts by treatment with M β CD caused loss in *ALL* recognition in cells activated by 48 h, suggesting that *ALL* binds to glycoproteins recruited or located in lipid rafts from activated CD4⁺ T cells. The membrane raft microdomains are known as the signaling complexes that process intracellular reaction cascades, where

diverse molecules participate in signal transduction [1]. We selected two prominent protein spots with molecular mass close to 70 kDa from lipid raft membranes resolved by two-dimensional electrophoresis. The two protein spots were recognized by *ALL*, one of them showed the highest score of identity (41%) with an unnamed protein (gi|74186081) closely related to moesin. This protein sequence was also analyzed by NetOGlyc 4.0 software [27] showing nine potential sites for O-glycosylation, of which four of them exhibited a very high probability of being recognized by *ALL*. Previous studies have shown that the binding site of *ALL* interacts with inner core of the Thomsen–Friedenreich antigen, and that *ALL* binds GalNAc residues, which are separated by four amino acids, whereas GalNAc residue clusters prevent recognition by *ALL* [33]. Another analysis on protein sequence was performed using Phyre² [26] that showed 90% identity with the FERM domain of moesin. The FERM domain defines members of the band 4.1 family, which includes cytoskeletal proteins, such as the ezrin–radixin–moesin (ERM) protein family, as well as several tyrosine kinases and phosphatases [34]. The ERM proteins play an important role in the interface between plasma membrane proteins and major cytoskeletal structures that regulate membrane-associated signalling pathways, as reviewed [4]. Data from confocal immunofluorescence staining showed that *ALL* and anti-moesin FERM domain mAb colocalized in cellular contact sites, indicating the presence the O-glycans recognized by *ALL* in these zones. Changes in glycosylation of cell surface O-glycoproteins during T cell activation have been reviewed [2, 35]. The decrease of acid sialic on activated T cells [36], allows exposition of GalNAc or Gal β 1,3GalNAc moieties on cell surface glycoproteins, which could be recognized by *ALL*. However, as observed in immunofluorescence image, some agglutinated cells were strongly stained by *ALL* and weakly bound with anti-moesin mAb and viceversa. Moreover, other agglutinated cells were not recognized either by *ALL* or anti-moesin mAb, suggesting that not all moesin-like proteins display the same glycosylation profile and that different O-glycoproteins could be recognized by *ALL*. Diverse studies have evidenced the importance of O-glycans on cell surface because they seem be involved in activation process of the T cell. Comelli E.M. et al. reported that the activation of murine T cells lead to a marked decrease of N-glycans carrying NeuAc α 2,6Gal and the increase of O-glycans carrying the disaccharide Gal β 1,3GalNAc on the cell surface [37]. Similarly, van Vliet et al. showed that the activation of human T cells via CD3/CD28 was accompanied by an increase in the expression of Gal β 1,3-GalNAc on the cell surface [38]. We reported in this study direct visualization of a moesin-like protein on the activated CD4⁺ T cell surface. Although moesin is localized in the sub-membranous cytoskeleton, some authors have reported

moesin-like proteins on the leukocyte surface [39–40]. Ariel A. et al. demonstrated that a moesin-like protein is expressed on a membrane of human resting T cells, which significantly increased on cell surface after 48 h activation [41]. Interestingly, the anti-moesin FERM domain antibody was able to enhance CD3-based stimulation in CD4⁺ T cells after 48 h of culture, being the first time that an anti-moesin FERM domain antibody displays a costimulatory function.

Conclusions

Our findings pointed out that the major glycoprotein recognized by ALL was able to costimulate the production of cytokines; A. *leucocarpus* lectin binds two glycoproteins situated in lipid raft microdomains from activated CD4⁺ T cells; one of which showed identity to a moesin-like protein that was visualised on activated-CD4⁺ T cell surface; and that anti-moesin antibody was able to costimulate CD4⁺ T cells activated by CD3.

Acknowledgments

We thank Dr. José Sullivan López-González for support with equipment and reagents for 2-DE, and Dra. Blanca Espinosa-Mancilla for technical assistance in the preparation and processing of samples for electrophoresis. We also thank Dr. Demetrio Bernal-Alcántara for assistance with statistical analyses. This work was supported by *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) CB-2009-01 0129932 and student scholarship 165388 from CONACyT, Mexico. This article is part of the requirements for the doctoral degree of Maria del Carmen Arenas-Del Ángel in the program of Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Conflicts of Interest

None declared.

References

1. Abbas, K., A. Lichtman, and S. Pillai. 2011. Cellular and molecular immunology. 7th ed. New York: Elsevier Saunders, p. 560.
2. Rudd, P. M., M. R. Wormald, R. L. Stanfield, M. Huang, N. Mattsson, J. A. Speir, J. A. DiGenaro, J. S. Fetrow, R. A. Dwek, and I. A. Wilson. 1999. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* 293:351–366.
3. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell.* 1:31–39.
4. Neisch, A. L., and R. G. Fehon. 2011. Ezrin, radixin and moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 23:377–382.
5. Yashiro-Ohtani, Y., X. Y. Zhou, K. Toyo-Oka, X. G. Tai, C. S. Park, T. Hamaoka, R. Abe, K. Miyake, and H. Fujiwara. 2000. Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J. Immunol.* 164:1251–1259.
6. Rudd, P. M., M. R. Wormald, and R. A. Dwek. 2004. Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol.* 22:524–530.
7. Ambrosi, M., N. R. Cameron, and B. G. Davis. 2005. Lectins: tolls for the molecular understanding of the glycode. *Org. Biomol. Chem.* 3:1593–1608.
8. Zenteno, E., R. Lascurain, L. Montaña, L. Vazquez, H. Debray, and J. Montreuil. 1992. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J.* 9:204–208.
9. Zenteno, E., and J. Ochoa. 1988. Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry.* 27:313–317.
10. Hernandez, P., H. Debray, H. Jaekel, Y. Garfias, M.C. Jiménez, S. Martínez- Cairo, and E. Zenteno. 2001. Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. *Glycoconj. J.* 18:321–329.
11. Lascurain, R., R. Chávez, P. Gorocica, A. Pérez, L. F. Montaña, and E. Zenteno. 1994. Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology.* 83:410–413.
12. Maldonado, G., P. Gorocica, C. Agundis, A. Pérez, J. Molina, and E. Zenteno. 1998. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj. J.* 15:615–622.
13. Ortiz, B., F. Porras, M. Jiménez- Martínez, L. Montaña, S. Martínez-Cairo, R. Lascurain, and E. Zenteno. 2002. Differential expression of a 70kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cell. Immunol.* 218:34–45.
14. Porras, F., R. Lascurain, R. Chávez, B. Ortiz, P. Hernández, H. Debra, and E. Zenteno. 2000. Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naïve thymocytes. *Glycobiology.* 10:459–465.
15. Urrea, F., E. Zenteno, F. Avila-Moreno, F. Sanchez- García, J. Zuñiga, L. Lascurain, and B. Ortiz-Quintero. 2011. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) enhances anti-CD3-dependent activation of murine T cells and promotes cell survival. *Immunol. Invest.* 40:113–129.
16. Savage, D., G. Mattson, S. Desai, G.W. Nielander, S. Morgensen, et al. 1992. Avidin-biotin chemistry: a Handbook. 1st ed. Rockford Illinois, USA: Pierce Chemical Company, p. 201.
17. Lyons, A., and C. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171:131–137.
18. Zidovetzki, R., and I. Levitan. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence,

- misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768:1311–1324.
19. Larbi, A., N. Douziech, G. Khalil, S. Gherari, K.P. Guérard, and T. Fülöp, Jr., 2004. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging. *Exp. Gerontol.* 39:551–558.
 20. Ramos-Avila, A., J. Ventura-Gallegos, A. Zentella-Dehesa, C. Machuca-Rodríguez, M. M. Moreno-Altamirano, V. Narváez, and M. Legorreta-Herrera. 2007. Immunomodulatory role of chloroquine and pyrimethamine in *Plasmodium yoelii* 17XL infected mice. *Scand. J. Immunol.* 65:54–62.
 21. Macdonald, J., and L. A. Pike. 2005. Simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* 46:1061–1067.
 22. Westermeier, R. 2005. *Electrophoresis in practice*. 4th ed. Munzinger Freiburg, Germany: Weinheim Wiley-VCH, p. 426.
 23. Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis, I background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121:321–349.
 24. Towbin, H. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76:4350–4354.
 25. Findlay, J. B. C., and M. J. Geisow. 1989. *Protein sequencing, a practical approach*. IRL Press-Oxford University Press: Cambridge CAM, UK, p. 199.
 26. Kelley, L. A., and M. J. E. Sternberg. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4:363–371.
 27. Steentoft, C., S. Y. Vakhrushev, H. J. Joshi, Y. Kong, M. B. Vester-Christensen, K. T. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N. B. Pedersen, L. Marcos-Silva, et al. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32:1478–1488.
 28. Lam, S. K. 2011. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:45–55.
 29. Shen, K., V. K. Thomas, M. L. Dustin, and L. C. Kam. 2008. Micropatterning of costimulatory ligands enhances CD4+ T cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105:7791–7796.
 30. Nanki, T., and P.E. Lipsky. 2000. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation. *J. Immunol.* 164:5010–5014.
 31. Zhou, X. Y., Y. Yashiro-Ohtani, M. Nakahira, W. R. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Naramura, H. Gu, and H. Fujiwara. 2002. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J. Immunol.* 168:3847–3854.
 32. Musgrave, B., C. Watson, S. Haeryfar, C. Barnes, and D. Hoskin. 2004. CD2-CD48 interactions promote interleukin-2 and interferon-gamma synthesis by stabilizing cytokine mRNA. *Cell Immunol.* 229:1–12.
 33. Hernández, P., D. Tetaert, G. Vergoten, H. Debray, M. C. Jimenez, G. Fernández, C. Agundis, P. Degand, and E. Zenteno. 2004. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn hypocondriacus lectin for O-glycopeptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1674:282–290.
 34. Pearson, M. A., D. Reczek, A. Bretscher, and P. A. Karplus. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell.* 101:259–270.
 35. Daniels, M. A., and K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2002. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol.* 3:903–910.
 36. Kaufmann, M., C. Blaser, S. Takashima, R. Schwartz-Albiez, S. Tsuji, and H. Pircher. 1999. Identification of an alpha2,6-sialyltransferase induced early after lymphocyte activation. *Int. Immunol.* 11:731–738.
 37. Comelli, E. M., M. Sutton-Smith, Q. Yan, M. Amado, M. Panico, T. Gilmartin, T. Whisenant, C. M. Lanigan, S. R. Head, D. Goldberg, H. R. Morris, A. Dell, and J. C. Paulson. 2006. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.* 177:2431–2440.
 38. van Vliet, S. J., I. M. Vuist, K. Lenos, B. Tefsen, H. Kalay, J. J. García-Vallejo, and Y. van Kooyk. 2013. Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)-calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galactose-type lectin (MGL). *J. Biol. Chem.* 288:27519–27532.
 39. Sato, N., N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1992. A gene family consisting of ezrin, radixin, and moesin: its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J. Cell. Sci.* 103:131–143.
 40. Thome, Z. N., S. Amar, and T. E. van Dyke. 1999. Moesin functions as a LPS receptor on human monocytes. *Infect. Immun.* 67:3215–3220.
 41. Ariel, A., R. Hershkoviz, I. Altbaum-Weiss, S. Ganor, and O. Lider. 2001. Cell surface-expressed moesin-like receptor regulates T cell interactions with tissue components and binds an adhesion-modulating IL-2 peptide generated by elastase. *J. Immunol.* 166:3052–3060.