



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DINÁMICA DE LA SIALILACIÓN α 2,8 DURANTE LA ACTIVACIÓN DEL
LINFOCITO T CD4+ NAIVE HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

TANIA MARIA VILLANUEVA CABELLO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER R.

Centro de Investigación en Dinámica Celular
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Gustavo Pedraza Alba

Instituto de Biotecnología. UNAM

Dra. Blanca Ortíz Quintero

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2019.



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.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo otorgado de las instituciones, unidades, laboratorios y colaboradores:

Universidad Nacional Autónoma de México.

Instituto de Biotecnología UNAM.

Centro de Investigación en Dinámica Celular UAEM.

Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular UAEM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número de beca 245192.

Red temática de Glicociencia en Salud-CONACyT.

Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos, Instituto de Biotecnología UNAM.

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) UNAM.

Este trabajo de investigación fue realizado con el financiamiento CONACyT Ciencia Básica 282454.

Agradecimientos:

A Romina y Mario, por ser mi motivo, por su amor y paciencia

A mi familia, por ser y estar.

A mis amigos, por escucharme.

A Iván, por ser mi tutor y compañero en esta aventura. Por su amistad y apoyo todos estos años.

A mis compañeros del laboratorio de Glicobiología humana y diagnóstico molecular, de cada uno me llevo algo.

A la M. en C. Angélica Ortega por su apoyo y compañía en el laboratorio.

A los Dres. Blanca Ortíz Quintero y Gustavo Pedraza Alba por sus comentarios e ideas durante las evaluaciones.

Dedicado a Iván y a Carlota,

*“Recordar es fácil para quien tiene memoria, olvidar
es difícil para quien tiene corazón”.*

Gabriel García Márquez

Resumen. Los linfocitos T CD4⁺ orquestan la respuesta inmune posterior a la activación por parte de las células presentadoras de antígeno. Durante la activación ocurren rearrreglos del citoesqueleto, expresión de genes y moléculas asociadas a la activación, así como un incremento en la proliferación debida a la producción de la citocina IL-2. Adicionalmente, se ha reportado que la activación de los linfocitos T CD4⁺ conduce a un asialofenotipo en los glicanos de superficie como consecuencia de la reducción de ácido siálico (Sia) en enlaces α 2,3 y α 2,6. Sin embargo, a pesar de que esta bien caracterizada la reducción de Sia α 2,3 y Sia α 2,6, la presencia del enlace Sia α 2,8 ha sido poco estudiado en estas células. El enlace Sia α 2,8 debido a su complejidad estructural participa en diversas funciones celulares. En el presente trabajo evaluamos la incorporación total de Sia en la superficie de linfocitos T CD4⁺ naive humanos, tanto en reposo como activados mediante anticuerpos anti-CD3/anti-CD28. Observamos que la activación induce un incremento en el Sia total de la superficie celular, independientemente de la reducción reportada en Sia α 2,3 y Sia α 2,6. Lo anterior nos llevó a postular que la activación de los linfocitos T CD4⁺ naive humanos resulta en un incremento de Sia total a expensas de estructuras Sia α 2,8. El análisis en la expresión de las α 2,8 sialiltransferasas nos permitió identificar que la activación incrementa la expresión de los genes codificantes para las ST8Sia I, ST8Sia II y ST8Sia IV, indicando la posible síntesis de gangliósidos y proteínas polisialiladas.

En este trabajo identificamos que durante la activación, la expresión de los genes *ST8SIAI* y *β 4GALNT1* promueve la sobreexpresión y neoexpresión de los gangliósidos GD3 y GD2, respectivamente. Adicionalmente, encontramos que el

silenciamiento de la *β 4GALNT1* promueve una eficiente polarización del TCR y activa la vía de señalización río abajo.

Por otro lado, con base en el incremento de las polisialtransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV se sugirió la posible presencia de ácido polisiálico (PSA) en el linfocito T CD4+ naive humano, un tipo de glicosilación que no había sido descrita en estas células. A través del uso del anticuerpo monoclonal anti-PSA clona 12E3 confirmamos en este trabajo que los linfocitos T CD4+ sintetizan PSA a través de la expresión de ambas polisialiltransferasas. Adicionalmente, mediante el silenciamiento de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV*, se identificó que el PSA está asociado a la modulación de la activación de la respuesta inmune mediada por IL-2, IL-2R e IFN- γ .

Summary. CD4 + T lymphocytes orchestrate the immune response after activation by the antigen-presenting cells. During activation, rearrangements of the cytoskeleton, gene expression and molecules associated with activation occur, as well as an increase in proliferation due to the production of the cytokine IL-2. Additionally, it has been reported that the activation of CD4+ T lymphocytes leads to an asialofenotype in the surface glycans as a consequence of the reduction of sialic acid (Sia) in α 2,3 and α 2,6 linkages. However, although the reduction of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 is well characterized, the presence of the Sia α 2,8 link has been little studied in these cells. In the present work we evaluate the total incorporation of Sia on the surface of human naïve CD4+ T lymphocytes, both at rest and activated by anti-CD3/anti-CD28 antibodies. We observed that the activation induces an increase in the total Sia of the cell surface, independently of the reduction reported in Sia α 2,3 and Sia α 2,6. This led us to postulate that the activation of human naïve CD4+ T lymphocytes presents an increase in total Sia at the expense of Sia α 2,8 structures. The analysis in the expression of the α 2,8 sialyltransferases allowed us to identify that the activation increases the expression of the coding genes for ST8Sia I, ST8Sia II and ST8Sia IV, indicating the possible synthesis of gangliosides and polysialylated proteins.

The expression of *ST8SIAI* is derived, in cooperation with the expression of the enzyme β 4GalNT1 in the overexpression and neoexpression of gangliosides GD3 and GD2, respectively. Additionally, we found that the silencing of *β 4GALNT1* in the activation promotes an efficient polarization of the TCR as well as the signaling pathway below it.

On the other hand, based on the increase in the polysialtransferases ST8Sia II and ST8Sia IV, the possible presence of polysialic acid (PSA) in the human naïve CD4+ T

lymphocyte, a type of glycosylation that had not been described in these cells, was suggested. Through the use of the monoclonal antibody anti-PSA clone 12E3 we confirmed in this work, that CD4+ T lymphocytes synthesize PSA through the expression of both polysialyltransferases. Additionally, by silencing the *ST8SIAII* and *ST8SIAIV* it was identified that the PSA is associated to the modulation of the activation of the immune response mediated by IL-2, IL-2R and IFN- γ .

Índice general

Capítulo I.....	15
Introducción	15
El sistema inmune	15
La glicosilación	18
Biosíntesis y función de los gangliósidos	20
La sialilación en el linfocito T CD4+	23
Antecedentes	27
Planteamiento del problema	29
Hipótesis general del proyecto	30
Objetivos	30
Objetivo General	30
Objetivos Particulares	30
Estrategia metodológica	31
Capítulo II.....	32
Materiales y métodos	32
Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs)	32
Purificación de linfocitos T CD4+ naive	32
Activación de linfocitos T CD4+ naive	34
Citometría de flujo	35
ELISA (ensayo de competencia)	37
Microscopía confocal	37
SDS-PAGE y Western blot	39
Digestión con endoneuraminidasa N	40
Extracción de ARN y PCR Tiempo Real	40
Transducciones lentivirales	43

Análisis estadístico	44
Capítulo III.....	45
Resultados	45
Resultados Parte I. Sialilación α2,8 asociada a gangliósidos durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano	47
El gangliósido GD3 se sobreexpresa durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.	47
El gangliósido GD2 se neoexpresa durante la activación del linfocito T CD4+ humano.	52
Silenciamiento de la β GALNT1 en linfocitos T CD4+ naïve humanos.	60
Discusión de los Resultados Parte I: Sialilación α2,8 asociada a glicolípidos durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.	64
Conclusiones de los Resultados Parte I: Sialilación α2,8 asociada a glicolípidos durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.	71
Perspectivas de los Resultados Parte I: Sialilación α2,8 asociada a glicolípidos durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.	72
Resultados Parte II: Sialilación α2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naïve humano.	74
Introducción. El ácido polisiálico	74
Descripción de resultados	78
Los linfocitos T CD4+ humanos sintetizan PSA asociado a la sobreexpresión de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV.	78
La activación del linfocito T CD4+ naïve induce la sobreexpresión y relocalización de PSA.	79
El silenciamiento génico de las ST8Sia II y ST8Sia IV polisialiltransferasas induce la sobreexpresión de genes asociados a la activación.	84

Discusión de los Resultados Parte II: Sialilación α2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naïve humano.	87
Conclusiones de los Resultados Parte II: Sialilación α2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naïve humano.	97
Perspectivas de los Resultados Parte II: Sialilación α2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naïve humano.	97
Bibliografía	99
Anexos	111

Abreviaturas

ADN, ácido desoxiribonucleico; ARN, CDs, células dendríticas; BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; CMH II, complejo mayor de histocompatibilidad tipo II; CMP, citidina monofosfato; CPA, célula presentadora de antígeno; EndoN, endoneuraminidasa N; FGF2, factor de crecimiento de fibroblastos 2; GlcCer, glucosil ceramida; GlcNAc, N-acetilglucosamina; GSLs, glicoesfingolípidos; GPIs, glicofosfatidilinositol; h.p.a., horas post activación; ITAM, Motivo de Activación del Inmunorreceptor Basado en Tirosina; LacCer, lactosil ceramida; MAL II, lectina *maackia amurensis* tipo II; ManNAc, manosamina; ManNAz, manosamida azida; NCAM, molécula de adhesión de células neurales; NeuAc, ácido neuramínico, NK, célula asesina natural, NRP-2, neuropilina-2; PE, ficoeritrina; PKC, proteína cinasa C; PMA, forbol 12-miristato 13-acetato; PNA, lectina *peanut aglutinina*; RE, retículo endoplásmico; Ser, serina; Sia, ácido siálico; SiaNAz, ácido siálico azida, SNA, lectina *sambucus nigra*; SynCAM 1, molécula de adhesión sináptica 1; T. A., temperatura ambiente; TCR, receptor de células T; Tre, treonina; UDP, nucleótido uridina difosfato.

Lista de Figuras

Figura 1. La activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Figura 2. Ejemplo de *N*-glicanos y *O*-glicanos en una proteína transmembranal.

Figura 3. Biosíntesis de los gangliósidos.

Figura 4. Esquema descriptivo de la localización y función de las tres familias de sialiltransferasas en trans-Golgi.

Figura 5. La activación del linfocito T CD4+ naive humano promueve una reducción en la presencia de ácido siálico en enlaces $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ debido a una reducción en la expresión de las *ST3GAL1* y *ST6GAL1*.

Figura 6. La activación del linfocito T CD4+ naive humano promueve el incremento en superficie de ácido siálico sintetizado *de novo*.

Figura 7. Expresión relativa de los genes que codifican para las sialiltransferasas ST8Sia durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.

Figura 8. Expresión relativa del gen que codifica para sialiltransferasa ST8Sia 1 durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.

Figura 9. Incremento en la presencia de gangliósidos GD3 presente durante la activación de linfocitos T CD4+ naive humanos.

Figura 10. El gangliósido GD3 presente en linfocitos T CD4+ naive en reposo y activados no colocaliza con el TCR.

Figura 11. Expresión relativa del gen *β GALNT1* que codifica para GM2/GD2 sintasa durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Figura 12. Análisis de la presencia del gangliósido GD2 durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano.

Figura 13. El gangliósido GD2 también se neoexpresa después de la estimulación con PMA/Iono.

Figura 14. El gangliósido GD2 colocaliza con el TCR durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Figura 15. Validación del silenciamiento de la *β GALNT1* (GM2/GD2 sintasa) en linfocitos T CD4+.

Figura 16. El silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa afecta la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Figura 17. La neoexpresión de la GM2/GD2 sintasa sustenta la eficiente activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Figura 18. El PSA en la NCAM.

Figura 19. Identificación semicuantitativa de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV y proteínas polisialiladas en linfocitos T CD4+.

Figura 20. La expresión y distribución de PSA es modificada por la activación.

Figura 21. Las enzimas polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8sia IV incrementan durante la activación del linfocito T CD4+.

Figura 22. El silenciamiento de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV reduce expresión de PSA de linfocitos T CD4+ causando una hiperactivación.

Figura 23. El silenciamiento de las *ST8Sia II* y *ST8Sia IV* reduce la expresión de PSA durante de la activación.

Figura 24. La sobreexpresión de las ST8Sia II y ST8Sia IV sustenta la polisialilación del linfocito T CD4+ naive y regula la expresión de genes asociados a la activación.

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la PCR tiempo real y PCR punto final.

Capítulo I

Introducción.

El sistema inmune.

El sistema inmune protege al organismo de la invasión por patógenos potencialmente infecciosos a través de distintos mecanismos que conforman la respuesta inmune. Dicha respuesta inmune está integrada por barreras físicas como son los epitelios pulmonares y gastrointestinales, mucosidades y por procesos celulares y humorales, que permiten prevenir y erradicar potenciales infecciones en el organismo. La respuesta inmune ha sido clasificada en dos tipos según los mecanismos utilizados; la innata y la adaptativa. La respuesta inmune innata se presenta principalmente al inicio de una infección y actúa en el reconocimiento de lo no propio (Abbas y Litchman, 2004). La respuesta inmune innata está descrita como inespecífica y es mediada principalmente por las células dendríticas (CD), las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos, las cuales se movilizan al sitio de infección en respuesta a señales específicas. Sin embargo, si los mecanismos de la respuesta inmune innata no son suficientes para erradicar la infección, la respuesta inmune adaptativa es activada. La respuesta inmune adaptativa, establecida por los linfocitos T y B, confiere memoria inmunológica para el reconocimiento del patógeno, es decir, durante una segunda infección ante el mismo patógeno se genera un incremento en la intensidad de la respuesta de manera que es más eficiente y rápida la eliminación de dicho patógeno, en este sentido se ha denominado a la respuesta inmune adaptativa como específica y de memoria (Zhang et al., 2009; Gasper et al., 2014).

Los linfocitos T CD4⁺ cooperadores son las células de la respuesta inmune adaptativa que tiene como función organizar y controlar la respuesta inmune modulando la función de otras células principalmente mediante la secreción de proteínas específicas denominadas citocinas, después del proceso de activación (Figura 1) (Ahmadzadeh et al., 1999). La activación del linfocito T CD4⁺ ocurre posterior a la presentación de un antígeno derivado de un patógeno por parte de una célula presentadora de antígeno (CPA), la cual expone dicho antígeno en su superficie a través del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH II) (Mazzon y Viola, 2007). Posteriormente, el linfocito T CD4⁺ reconoce al antígeno a través de su receptor (TCR), lo que conlleva a la formación del complejo de reconocimiento CMH II-antígeno-TCR que desencadena una interacción compleja entre la CPA y el linfocito T CD4⁺, en la cual además participan moléculas co-estimuladoras y de adhesión que promueven una eficiente sinapsis inmunológica, denominada así por la interacción entre receptores y moléculas en la superficie de la CPA y del linfocito T CD4⁺ (**Figura 1**).

Para que ocurra una eficiente presentación y activación de linfocitos T CD4⁺, las moléculas que participan en la sinapsis inmunológica deben estar presentes en la superficie celular y correctamente organizadas en balsas lipídicas, dominios lipídicos de membrana que reclutan moléculas involucradas en la cascada de señalización (Jury et al., 2007; Alonso y Millan, 2001; Giurisato et al., 2003). En el linfocito T CD4⁺, el receptor TCR debe estar asociado en microdominios con las cadenas del CD3, así como al co-receptor CD4 (Figura 1). Durante la activación, estos receptores interactúan con sus contrapartes en la CPA, desencadenando eventos de señalización del linfocito T CD4⁺ que conllevan a la activación de la tirosina cinasa Lck y la consecuente fosforilación de los motivos de activación del inmunorreceptor basado en

tirosina (del inglés ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) (Smith-Garvin et al., 2009). Los dominios ITAM están presentes en las cadenas de la molécula CD3, que de manera general inicia cascadas de señalización que conducen a la activación de factores transcripcionales tales como NFAT, NFκB y AP-1. Estos factores transcripcionales promueven la expresión de genes de proliferación, producción de citocinas, particularmente IL-2 e IFN γ , funciones efectoras del linfocito y rearrreglos del citoesqueleto basados en la polimerización y despolimerización de actina, lo cual promueve la acumulación de receptores de membrana en microdominios que favorecen simultáneamente la sinapsis (Jury et al., 2007). La activación eficiente del linfocito T CD4+, que implica la activación de cascadas de señalización que inducen la secreción de IL-2 y proliferación, conduce al inicio de funciones efectoras, y en otros casos, su diferenciación en otros subtipos efectoras (Alegre y Frauwirth, 2001). La activación del linfocito T CD4+ también se acompaña de cambios en los procesos enzimáticos que determinan la síntesis de los glicanos que se encuentran unidos a proteínas y lípidos y que modulan distintos procesos celulares, como son la diferenciación principalmente hacia los subtipos Th1, Th2 y Th17, migración, adhesión e interacción con otras células (Zhu et al., 2010). Los cambios en la glicosilación de estas células pueden conllevar entre otros, a cambios en su función efectora (Toscano et al., 2007). La glicosilación es un proceso que participa generalmente en la regulación de funciones citosolicas y nucleares, supervivencia inmune, reacción inflamatoria, autoinmunidad, acción hormonal y metástasis tumoral (Haltiwanger et al., 2004; Dennis et al., 2009).

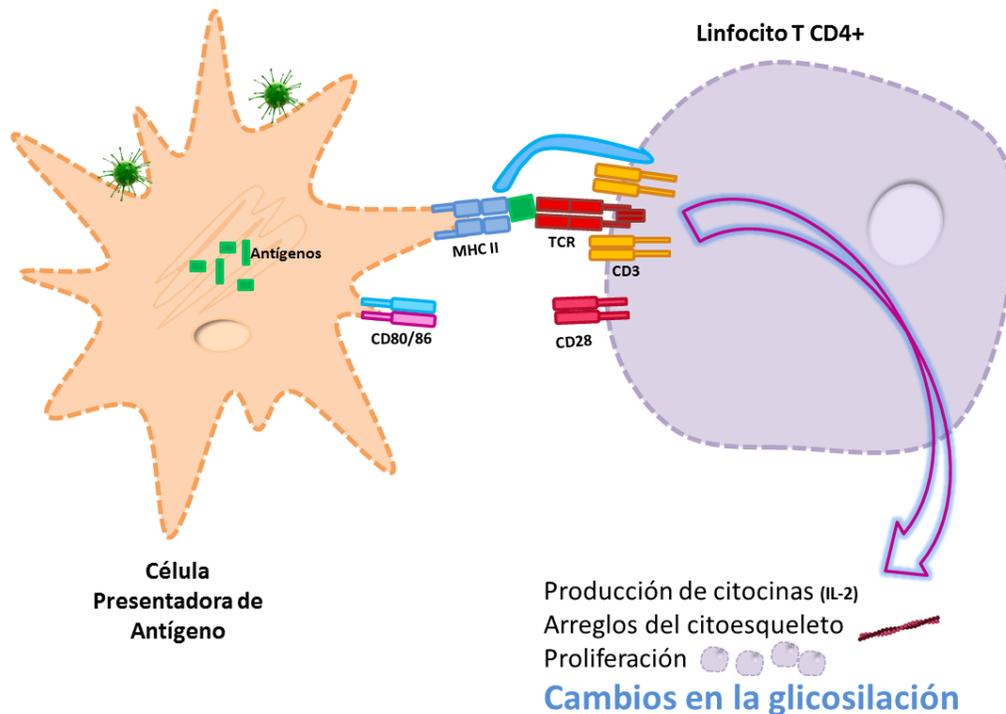


Figura 1. La activación del linfocito T CD4+ naive humano. La presentación de un antígeno derivado de un patógeno por parte de una CPA y el reconocimiento de este antígeno mediante el TCR del linfocito T CD4+ induce la activación. La participación de moléculas coestimuladoras en el linfocito, como son los *clusters* de diferenciación CD3, CD28 y el co-receptor CD4, así como en la CPA, como CD80/CD86, es esencial para una eficiente activación del linfocito T CD4+. La activación de los linfocitos T CD4+ esta caracterizada por la expresión de citocinas, como IL-2, proliferación inducida por esta citocina, rearrreglos del citoesqueleto y cambios asociados a procesos de glicosilación.

La glicosilación.

La superficie de las células T CD4+ cooperadoras, como la de todas las células de eucariontes, está cubierta por glicanos, que son cadenas de carbohidratos que cubren la superficie de las células de mamífero. La abundancia de los glicanos depende del tipo celular, así como del proceso celular en el que se encuentren (An et al., 2012; Park et al., 2015; Goh y Ng, 2018). Los glicanos pueden ser sintetizados y unidos a proteínas o lípidos en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (Varki et al.,

2009). Dentro de dichos compartimentos celulares, la glicosilación es mediada por la acción coordinada de enzimas y otras proteínas que conforman la maquinaria de glicosilación y que incluyen glicosiltransferasas, glicosidasas, transportadores de glicosil-nucleótidos, sintetetasas, etc. (Varki et al., 2009). Los genes que codifican para la maquinaria de glicosilación representan aproximadamente 1% del total del genoma (Ohtsubo y Marth, 2006) y la expresión de dichos genes varía por el metabolismo, activación y cambios en el microambiente de las células (Bi y Baum, 2009; Varki et al., 2009). Se han descrito principalmente dos tipos de glicosilación de proteínas; la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación (Figura 2). La *N*-glicosilación ocurre cuando se une el monosacárido *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) al residuo asparagina de una proteína ubicado en la secuencia consenso asparagina-X-serina/treonina, donde X representa cualquier residuo de aminoácido excepto prolina (Varki et al., 2009). La *O*-glicosilación, en cambio, está caracterizada por la síntesis de un glicano a partir de la unión de un primer monosacárido a un residuo de serina, treonina o hidroxilisina de una proteína y la formación de “núcleos” ó “cores” de glicanos (Varki et al., 2009). La glicosilación en lípidos da lugar a dos importantes familias de glicolípidos: los glicoesfingolípidos (GSLs) y los glicofosfatidilinositoles (GPIs). Los GSLs se forman cuando la glucoceramida sintasa transfiere glucosa del donador UDP-glucosa a la ceramida para formar glucosilceramida (Varki et al., 2009). Los gangliósidos son formas sialiladas de los GSLs y se han relacionado de manera esencial con el desarrollo del sistema nervioso central a través de su localización en la membrana celular. A su vez, los GPIs están conformados por la adición de glucosamina al grupo inositol del fosfatidilinositol en posición α 1-6. Los GPIs comúnmente se encuentran asociados a proteínas y anclados a la membrana plasmática, proporcionando

estabilidad (Varki et al., 2009). Por otro lado, dentro de los GSLs encontramos a los gangliosidos, glicolípidos sialilados que participan en procesos tumorales, así como en funciones asociadas al linfocito T (Yamashiro et al., 1995).

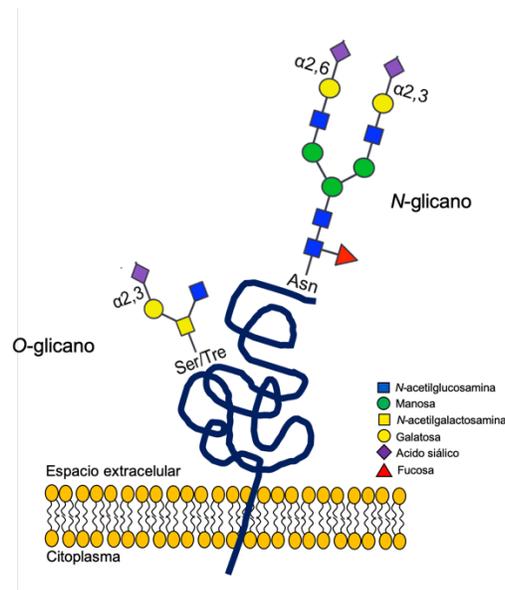


Figura 2. Ejemplo de N-glicanos y O-glicanos en una proteína transmembranal. La N-glicosilación ocurre por la adición y modificación de un oligosacárido precursor adicionado en el RE sobre un residuo de asparagina (Asn) en la proteína. La O-glicosilación ocurre en el aparato de Golgi por adición de N-acetilgalactosamina (GalNAc) sobre un residuo de serina o treonina (Ser/Tre).

Biosíntesis y función de los gangliósidos

Los gangliósidos son GSLs que contienen ácido siálico y forman parte importante de los glicanos de superficie de algunas células, como las neuronales (Yu et al., 2011; Schnaar et al., 2014). Los GSLs son lípidos que contienen una base de esfingosina y uno o más residuos de carbohidratos (Yu et al. 2011). En sus estructuras, los gangliosidos combinan una porción de glicano y otra lipídica y de acuerdo con la presencia de determinados carbohidratos, del tipo de enlace y de la configuración anomérica, los gangliósidos han sido clasificados en “series” (Figura 3). Los gangliósidos son sintetizados en aparato de Golgi, donde se genera una diversidad

de estos en relación con la porción glúcida a partir de la unión de una ceramida previamente sintetizada en el RE (Yu et. al. 2011). La biosíntesis de los gangliósidos comienza con la unión de glucosa a una ceramida para generar glucosilceramida (GlcCer), a la que posteriormente se une un residuo de galatosa para generar lactosilceramida (LacCer). La LacCer funciona como precursor en la biosíntesis de todas las glicofomas de gangliosidos y GSL (Yu et. al. 2011). La biosíntesis de los gangliósidos requiere de la actividad de pocas enzimas que actúan de forma combinatoria en la vía biosintética (Figura 3). De acuerdo con el número de ácidos siálicos unidos al residuo galactosil interno, los gangliósidos han sido clasificados en las series O-, a-, b- y c- (Figura 3). Los gangliósidos GM3, GD3 y GT3 actúan como precursores de las series “a”, “b” y “c”, a partir de estos las mismas enzimas generan la variedad existente de los gangliósidos (Yu et. al. 2011). Las glicosiltransferasas y sialiltransferasas de la vía de biosíntesis de gangliósidos se expresan de manera célula-específica y de modo dependiente del desarrollo (Yu et al. 2011).

Los gangliósidos son especialmente abundantes en el cerebro y la expresión de estos en diferentes regiones cerebrales correlaciona con neurogénesis, transmisión sináptica y proliferación celular (Yu et al., 2011). El perfil de gangliósidos puede cambiar durante el desarrollo del cerebro y después de la diferenciación celular, así como en algunas transformaciones celulares (Yu et al., 2011). En algunos modelos murinos se ha demostrado que principalmente los gangliósidos de las series “a” y “b” participan en en la axogénesis neuronal hipocampal (Schnaar et al., 2014). Adicionalmente, se sabe que los gangliósidos y otros glicoesfingolípidos pueden participar en procesos inmunes como son diferenciación, reconocimiento y transducción de señales durante la activación (Zhang et al., 2019).

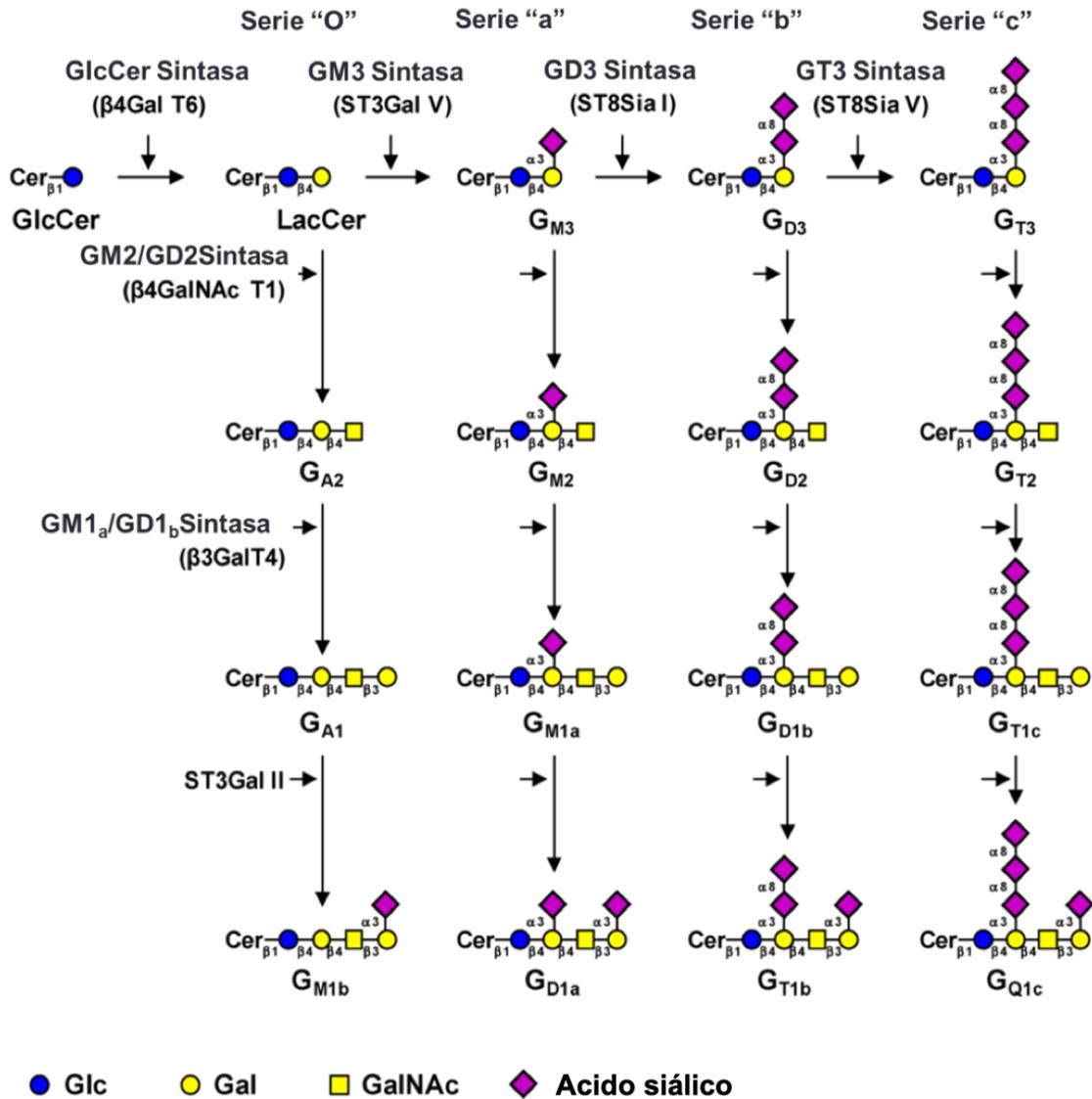


Figura 3. Biosíntesis de los gangliósidos. Los gangliósidos son sintetizados mediante la adición secuencial de monosácaridos al lípido cerámida. La acción secuencial de la ST3Gal V (GM3 sintasa), ST8Sia I (GD3 sintasa) y ST8Sia V (GT3 sintasa) genera la biosíntesis de los precursores de las series a-, b- y c- respectivamente. Las series O- de los gangliosidos son directamente sintetizadas a partir de LacCer. Figura modificada de Julien et al., 2013.

En este sentido y en el contexto del proceso general de la glicosilación y como se mencionó previamente, se ha observado que algunos mecanismos de desarrollo, maduración, activación y diferenciación del linfocito T CD4+ cooperador están

acompañados de cambios en la glicosilación (Bi y Baum, 2009). Algunos de estos cambios ocurren como consecuencia de la regulación de la expresión génica de las enzimas sialiltransferasas (Daniels 2002), es decir, están estrechamente asociados a los procesos de sialilación.

La sialilación en el linfocito T CD4+.

La familia de los ácidos siálicos está conformada por monosacáridos de nueve carbonos que están cargados negativamente en su forma libre (Schauer et al., 2004). Los ácidos siálicos más abundantes en mamíferos son el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (Reglero et al., 2007). El NeuAc se ha identificado en todos los organismos, no así el Neu5Gc y el Neu5,9Ac2 (Varki, 1992). Si bien, todas las especies animales con excepción del humano pueden sintetizar el Neu5Gc, es posible encontrar este carbohidrato en tejidos sanos ya que puede ser obtenido a través de la dieta y en mayor cantidad en algunos tejidos tumorales (Varki, 1992; Samraj et al., 2014). Además, los ácidos siálicos pueden adquirir mayor diversidad por la presencia de distintos sustituyentes, como son acetato, lactato, sulfato o ésteres fosfato. El Neu5Ac se encuentra en mayor proporción con respecto a los otros ácidos siálicos en mamíferos (Reglero et al., 2007). Las reacciones de sialilación celular que ocurren sobre glicanos de glicoproteínas y glicolípidos, son realizadas por las sialiltransferasas que conforman tres familias y que requieren como sustrato donador al glicosil-nucleótido CMP-NeuAc (Li y Chen 2012; Bi, 2009). Se llevan a cabo en la región trans del aparato de Golgi (Figura 4). En el ser humano, veinte enzimas sialiltransferasas catalizan la transferencia terminal de ácido siálico a partir del sustrato donador citidin monofosfato-NeuAc (CMP-Sia) a

glicoproteínas o glicolípidos aceptores mediante enlaces glicosídicos del tipo $\alpha 2,3$ (catalizados por enzimas ST3), $\alpha 2,6$ (catalizados por enzimas ST6) o $\alpha 2,8$ (catalizados por enzimas ST8) (Harduin- Lepers, 2005; Li y Chen 2012) (Figura 4). De las veinte enzimas, seis corresponden a la familia ST3, ocho a la ST6 y seis a la ST8, sin embargo, de estas solo se ha identificado ampliamente la expresión y función de las ST3Gal I, III, IV y la ST6Gal I en linfocitos T (Bi, 2009).

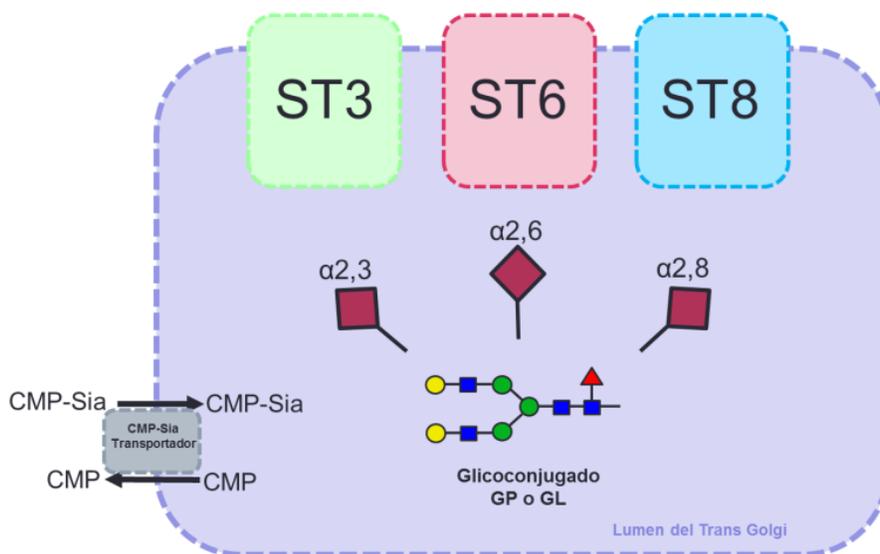


Figura 4. Esquema descriptivo de la localización y función de las tres familias de sialiltransferasas en trans-Golgi. La figura describe por una parte el proceso de transporte de CMP-ácido siálico (CMP-Sia) por medio de un transportador de CMP-Sia del citosol al lumen del aparato de Golgi, donde es utilizado como sustrato para las reacciones de sialilación catalizadas por las tres familias de sialiltransferasas, la familia ST3 cataliza la unión de ácido siálico, denotado como el rombo rojo, en enlaces $\alpha 2,3$, la familia ST6 cataliza enlaces de tipo $\alpha 2,6$ y la familia ST8 que cataliza enlaces $\alpha 2,8$. Una vez que el ácido siálico es transferido al glicano aceptor, se libera el CMP en el lumen del Golgi, de donde es transportado hacia el citosol por el mismo transportador.

Las sialiltransferasas, a semejanza de muchas otras glicosiltransferasas, pertenecen al tipo 2 de proteínas de membrana y poseen señales de localización al Golgi, donde

realizan su función. Las STs presentan una corta secuencia *N*-terminal citoplásmica, un único dominio transmembranal y una región tallo de longitud de 20 a 200 aminoácidos seguida de un gran dominio catalítico C-terminal (Harduin-Lepers, 2001). De manera, general todas estas enzimas eucarióticas poseen cuatro regiones péptidicas altamente conservadas en sus dominios catalíticos, llamados sialil motivos L (por long), S (short), 3 y VS (very short). En humanos veinte sialiltransferasas catalizan la transferencia de residuos de Neu5Ac a partir del sustrato donador CMP-Neu5Ac (CMP-Sia) a glicoproteínas o glicolípidos aceptores a través de enlaces glicosídicos de tipo α 2,3 (familia ST3), α 2,6 (familia ST6) o α 2,8 (familia ST8) (Harduin-Lepers, 2005). La expresión de algunas sialiltransferasas es regulada durante diferentes estadios del linfocito T CD4+, lo que conlleva al establecimiento de diferentes perfiles de glicosilación que favorecen funciones específicas. Sin embargo, el papel en las diferentes etapas de los linfocitos T no ha sido descrito para todas las sialiltransferasas (Bi, 2009).

Se ha observado que durante la activación del linfocito T CD4+ disminuye la expresión de los genes que codifican para las enzimas sialiltransferasas ST3Gal I y ST6Gal I, responsables de catalizar la unión terminal de ácido siálico (Sia) en enlaces del tipo α 2,3 y α 2,6, respectivamente (Toscano et al., 2007; Bi y Baum, 2009). La desregulación en la expresión de las ST3Gal I y ST6Gal I promueve el establecimiento del denominado “asialofenotipo” del linfocito T CD4+ activado caracterizado por la reducción en la presencia de Sia α 2,3 y Sia α 2,6. Los linfocitos T CD4+ naive, denominados así debido a que aún no han participado en un evento de presentación antigénica (Dubey et al. 1996), que se activan pueden exhibir patrones heterogéneos de expresión de citocinas que definen los distintos subtipos celulares a

los que da origen su diferenciación (Wilson, et al., 2009), y que incluyen: Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos Th2 presentan un aumento en la expresión de glicoconjugados sialilados del tipo Sia α 2,6 y Sia α 2,6 con respecto a los linfocitos Th1, esto es debido a un aumento de la expresión de la ST6Gal I (Toscano, et al., 2007; Bi y Baum, 2009) y ST3Gal I (Grabie et al., 2002), mientras que el glicofenotipo del linfocito Th1 se acompaña de una inhibición de la expresión de dichas enzimas, lo que se refleja como la reducción en la exposición NeuAc terminal del tipo α 2,3 y α 2,6 (Daniels et al., 2002). La diferencia en los patrones de glicosilación de los linfocitos Th1 y Th2 es determinante en la regulación homeostática de estas células (Toscano et al., 2007). La ausencia de glicanos sialilados del tipo NeuAc α 2,6Gal, debida a la baja expresión de la enzima ST6Gal I, predispone a los linfocitos Th1 a la inducción de muerte por apoptosis causada por la unión de galectina-1, una lectina endógena que se une a secuencias expuestas β -lactosaminas con actividad inmunoreguladora (Toscano et al., 2007). Las galectinas se une a glicoproteínas como CD7, CD45 y CD43 en linfocitos T. La unión a la CD7 se requiere de manera general para la inducción de muerte por apoptosis de linfocitos T causada por galectina-1 (Hernandez et al., 2006). En la polarización hacia el subtipo Th2 se incrementa la expresión de la ST6Gal I, por lo que los ligandos de galectina-1 quedan enmascarados por NeuAc α 2,6, de manera que no puede reconocerlos e inducir muerte por apoptosis, generando un balance dirigido hacia la respuesta Th2 (Toscano et al., 2007). Se sabe que la vía de señalización de galectina-1 puede ser a través de CD45, molécula que puede ser regulada por su abundancia relativa y el tipo de O-glicanos que genera la diferentes isoformas. El balance entre la sialilación NeuAc α 2,3 y NeuAc α 2,6 en N-glicanos

determina la susceptibilidad a la unión de galectina-1 a linfocitos T durante la activación (Earl et al., 2010).

Antecedentes.

En estudios previos validamos el asialofenotipo en linfocitos T CD4+ naives aislados de sangre periférica de humano y activados a través de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, mediante el uso de las lectinas *Maackia amurensis* II (MAL II), *Sambucus nigra* (SNA) y *Peanut agglutinin* (PNA) que reconocen ácido siálico en enlace $\alpha 2,3$, ácido siálico en enlace $\alpha 2,6$ y el Core-1 de los O- Glicanos Gal $\beta 1,3$ GalNAc respectivamente (Villanueva et al., 2015). Observamos mediante citometría de flujo que tras 24, 48 y 72 h post-activación (h.p.a.) la reducción de la unión de las lectinas MAL II y SNA, mientras que la unión de la lectina PNA se incrementa en linfocitos T CD4+ naives activados (Figura 5A). Dichos resultados demostraron que hay una reducción de ácido siálico unido en enlaces $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ durante la activación, como había sido reportado (Daniels, 2002). Esto resultó importante debido a que validó nuestro modelo de estudio en el laboratorio, además de que fue novedoso, pues se describe por primera vez la cinética de los cambios en el perfil de sialilación del linfocito T CD4+ naive humano.

Si bien, estos datos (Figura 5) corroboran en adición a lo previamente reportado (Toscano et al., 2007), la presencia de cambios en la glicosilación asociados principalmente a la sialilación en el linfocito T CD4+, adicionalmente se ha demostrado

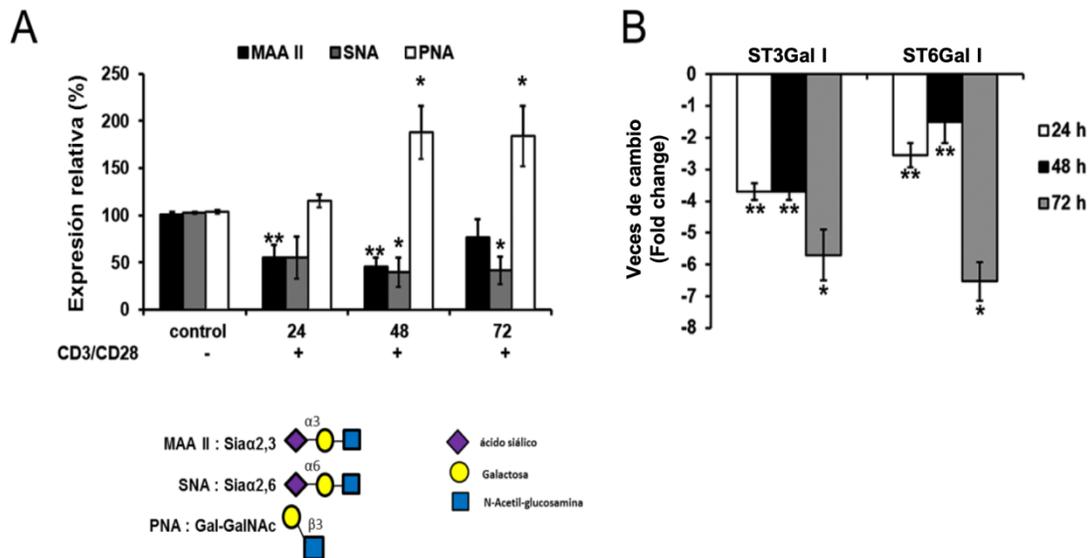


Figura 5. La activación del linfocito T CD4⁺ naive humano promueve una reducción de la presencia de ácido siálico en enlaces α 2,3 y α 2,6, debida a una reducción en la expresión de las *ST3GALI* y *ST6GALI* (A) Analisis por citometría de flujo de la unión de las lectinas biotiniladas MAA II, SNA y PNA a linfocitos T CD4⁺ naive en condiciones de reposo y activados con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 24, 48 y 72 h. (B) Determinación de la expresión de los genes de las *ST3GALI* y *ST6GALI* mediante PCR tiempo real. Los valores de la gráfica muestran la comparación relativa de la expresión de linfocitos T CD4⁺ activados en tres tiempos respecto a linfocitos T CD4⁺ en reposo, el valor fue calculado por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalizado con respecto a la expresión del gen interno eEF1 α . (A) y (B) muestran la media y su error estándar de cinco experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Figura tomada de Villanueva et al., 2015.

mediante ensayos metabólicos de incorporación utilizando manosamida azida (ManNAz), un análogo marcado de la manosamina (ManNAc), un precursor del ácido siálico (Sia), que la incorporación de SiaNAz (sintetizado *de novo* a partir de ManNAz) en glicanos de superficie durante la activación en linfocitos T CD4⁺ naive humanos incrementa a las 24, 48 y 72 h.p.a., en comparación con la incorporación de SiaNAz en linfocitos T CD4⁺ naive humanos sin activar (Figura 6) (Villanueva et al., 2015). Este resultado evidenció que tras la activación hay un incremento en la sialilación

global, a pesar del decremento en la unión de las lectinas MALII y SNA que unen Sia2,3 y Sia2,6, respectivamente.

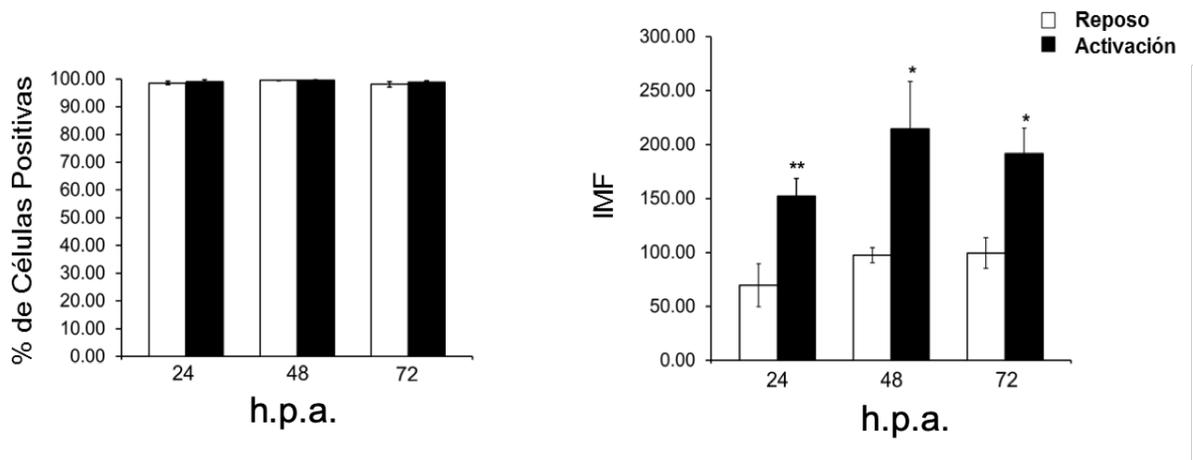


Figura 6. La activación del linfocito T CD4+ naive humano promueve el incremento en superficie de ácido siálico sintetizado *de novo*. Determinación mediante citometría de flujo de la incorporación de ácido siálico sintetizado *de novo* a partir del análogo ManNAz a glicoconjugados de superficie. La gráfica izquierda muestra el porcentaje de células que incorpora el análogo y forma ácido siálico (SiaNAz) y la gráfica de la derecha muestra la media de fluorescencia geométrica de la incorporación en superficie. Las gráficas muestran la media y su error estándar de cinco experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Figura tomada de Villanueva et al., 2015.

Planteamiento del problema

La sialilación de las glicoproteínas y glicolípidos de superficie es un mecanismo fundamental para las diferentes funciones de las células humanas y es particularmente dinámico durante la activación de los linfocitos T CD4+. Sin embargo, a la fecha solo se habían descrito los cambios en la sialilación asociados a la expresión de sialiltransferasas ST3 y ST6. Con base en estos antecedentes y conciliando nuestras observaciones, sugerimos que la hipersialilación global demostrada por el aumento en SiaNAz *de novo* es a expensas de la transferencia del otro tipo de enlace

del ácido siálico no reconocido por las lectinas SNA o MAL II, es decir, el enlace $\alpha 2,8$ el cual puede encontrarse en gangliósidos, así como en glicoproteínas. Dicho tipo de enlace ha sido poco estudiado en el linfocito T CD4+. Comprender la dinámica y función del Sia2,8 durante la activación de estas células ampliará el conocimiento sobre el papel de la glicosilación en la activación, así como contribuirá al conocimiento de la fisiología de la inmunidad mediada por los linfocitos T.

Hipótesis.

El aumento en la expresión de $\alpha 2,8$ sialiltransferasas durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano, causa un aumento en la presencia de glicolípidos y glicoproteínas que contienen Sia $\alpha 2,8$.

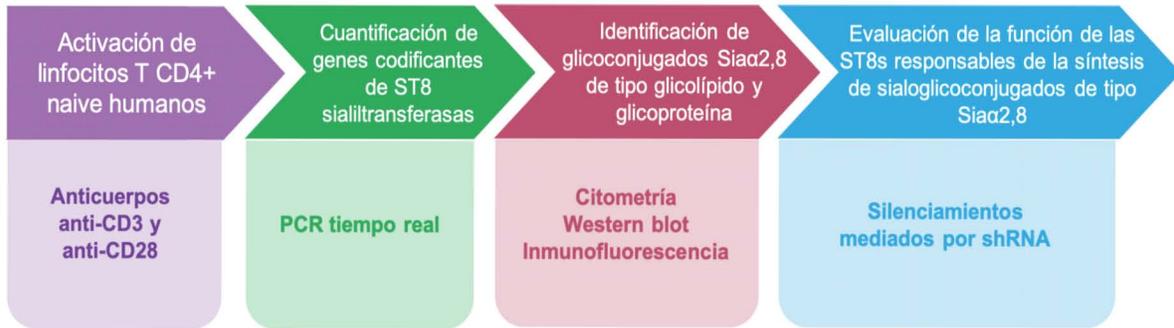
Objetivo General

Identificar si glicoconjugados con Sia $\alpha 2,8$ incrementan su expresión durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Objetivos Particulares

- Evaluar la expresión de $\alpha 2,8$ sialiltransferasas expresadas en el linfocito T CD4+ naive humano en condiciones de reposo y activación.
- Determinar la expresión de glicoconjugados Sia $\alpha 2,8$ de tipo glicolípidos y su papel en la activación.
- Determinar la expresión de glicoconjugados Sia $\alpha 2,8$ de tipo glicoproteínas y su papel en la activación.

Estrategia Metodológica



Capítulo II

Materiales y Métodos

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana

La sangre periférica humana fue obtenida de paquetes leucocitarios (*buffy coats*) de individuos adultos sanos. La sangre fue procesada mediante un gradiente de densidad Histopaque (Sigma) a través del siguiente procedimiento. Se diluyó la sangre 1:1 con solución salina PBS 1x-EDTA (PBS1x: 2 mM EDTA a pH 7.4 y esterilizada). Posteriormente, 3 ml de Histopaque fueron depositados en un tubo de poliestireno esteril de 15 ml y sobre Hystopaque se añadieron 4 ml de la dilución sanguínea sin romper la fase. Posteriormente, se centrifugó a 250 x g por 30 min a 22°C y sin freno. Se recuperaron las células mononucleares que forman una fase de tipo “anillo blanco” en el gradiente. Las células recuperadas se lavaron con solución salina PBS 1x-EDTA por 10 min. a 1500 rpm. Las células se lavaron dos veces más centrifugando a 1500 rpm por 10 min. Las pastillas celulares se resuspendieron en solución de bloqueo (5% albumina serica bovina de Equitech, 2mM EDTA, PBS 1x pH 7.2) y fueron teñidas con azul de tripano para contar por medio de un hemocitómetro. Posterior a la obtención del número total de células, se procedió a la purificación de linfocitos T CD4⁺ naive.

Purificación de linfocitos T CD4⁺ naive

Para la obtención de linfocitos T CD4⁺ naive a partir de las células mononucleares aisladas por el gradiente de densidad usando Hystopaque, se utilizó el *kit* de purificación de células T CD4⁺ naive humanas MACS (Miltenyi Biotec), que se basa en la separación de células por selección negativa en una columna magnética a través

del siguiente protocolo en condiciones de esterilidad. Se centrifugaron las células a 250 g por 10 min a 8 °C. Posteriormente, se resuspendió la pastilla celular en 40 µl de solución de bloqueo por cada 10^7 células y se añadieron 10 µl de coctel de anticuerpos biotinilados por cada 10^7 células, que incluye los siguientes:

Anticuerpos anti-:

- CD8: linfocitos que expresan el restringidos por el MHC I.
- CD14: antígeno de diferenciación de monocitos.
- CD16: expresión en neutrófilos, células NK y macrófagos.
- CD19: expresión específica de linfocitos B.
- CD36: principal expresión en plaquetas, monocitos, y macrófagos maduros, células endoteliales de la vasculatura.
- CD45RO: linfocitos T de memoria, subpoblación de linfocitos B, monocitos y macrófagos.
- CD56: células NK, subpoblación de T y B.
- CD123: monocitos, macrófagos, megacariocitos.
- TCR γ/δ : forma del TCR presente en el subgrupo de linfocitos T presentes en su mayoría en tejidos epiteliales, actuando de barrera.

Glicoforina A: sialoglicoproteína de eritrócitos.

Después de la adición de los anticuerpos, se procedió a incubar las células durante 10 min a 4°C y posteriormente se lavaron a 300 g por 10 min en solución de bloqueo y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 30 µl de solución de bloqueo por cada 10^7 células, adicionando 20 µl de microperlas magnéticas anti-biotina por cada 10^7 células (Kamala 2008). Posterior a la incubación durante 15 min, se lavaron las células con 1 ml de solución de bloqueo por cada 10^7 células y se centrifugaron a 250 g por

10 min a 8 °C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 500 µl de solución de bloqueo, se mantuvieron en hielo hasta su transferencia a la columna. En la columna, las células etiquetadas con los anticuerpos son retenidas debido a la unión de las perlas a la columna por magnetismo. Inmediatamente, se lavó la columna magnética mediante la transferencia de 500 µl solución de bloqueo fría y enseguida se hizo pasar la suspensión celular y se recuperó el eluyente que representa la fracción correspondiente a linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ (linfocitos T CD4⁺ naive) en un tubo esteril de 15 ml. Se determinó la eficiencia de la purificación de linfocitos T CD4⁺ naive (fracción negativa) a través de citometría de flujo, incubando con solución de bloqueo 2% suero por 20 min en hielo, seguido de dos lavados con PBS1X. Posteriormente, se incubaron las células con anticuerpos anti-CD4 humano 1:100 (OKT4 ebioscience) y anti-CD45RA humano 1:1000 (HI100 ebioscience). Las células se lavaron en dos ocasiones con PBS 1x y se fijaron en paraformaldehído 4% durante 20 minutos en hielo para luego lavarse nuevamente con PBS 1x y adquirirse en el citometro para acceder al porcentaje de pureza.

Activación de linfocitos T CD4+ naive

Los linfocitos T CD4⁺ naive humanos purificados fueron incubados en presencia del estímulo de activación. Para ello, se adhirieron anticuerpos anti-CD3 (OKT3 eBioscience) a una concentración de 5 µg/ml en una placa de cultivo por incubación de 2 hrs en PBS 1X a 37°C. Posteriormente se lavó la placa de cultivo dos veces con PBS 1X y posteriormente se cultivaron las células a una concentración de 1 millón/ml en medio Advanced RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 2% suero fetal bovino (Gibco) y 2 mM glutamina (Gibco). Se añadieron anticuerpos anti-CD28 (CD28.6

eBioscience) a una concentración de 1 µg/ml para complementar el estímulo de activación. Las células se mantuvieron en cultivo por 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs. Las células fueron cosechadas y procesadas para los diferentes tipos de análisis en los diferentes tiempos. Para confirmar y determinar la activación de los linfocitos T CD4⁺ naives, estos fueron teñidos con anticuerpos dirigidos contra el marcador de activación temprana CD69 acoplado a ficoeritrina (PE) (FN50 eBioscience). Las células se incubaron con solución de bloqueo (PBS 1X, 2% suero humano) por 20 min en hielo. A continuación, los linfocitos T CD4⁺ activados y no activados (control) se incubaron 20 min en hielo con anticuerpos anti-CD69-PE 1:10. Las células fueron lavadas con PBS 1X dos veces y posteriormente se fijaron con paraformaldehído 1%.

Citometría de flujo

Para la expresión de gangliósidos disialilados en linfocitos T CD4⁺ naive activados (24 h, 48 h y 72 h) y en condiciones de reposo, se distribuyeron linfocitos en una placa de 96 pozos de fondo redondo para su tinción con anticuerpos anti-gangliósidos. Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4 % para luego proceder al análisis de las poblaciones celulares a través de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS por sus siglas en inglés). El análisis en superficie de la expresión de los gangliósidos GD3 y GD2, así como la presencia de PSA, se realizó a través de la incubación de los anticuerpos; ratón IgG3 anti-GD3 humano clona R24 (5 µg/ml; Abcam), ratón IgG2a anti-GD2 humano clona 14G2a (2.5 µg/ml; Santa Cruz Biotech) y ratón IgM anti-PSA clona 12E3 (5 µg/ml; eBioscience). Posterior a la incubación en *buffer* de bloqueo (0.5 % BSA, 2 % SFB and 1x PBS) durante 1 h a 4 °C y de el lavado con PBS 1x, se incubaron los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG3 acoplado a

FITC, anti-ratón IgG2a acoplado a ficoeritrina o Alexa Fluor 647 (0.1 µg/ml; Abcam o Molecular Probes), anti-ratón IgM acoplado a PE (0.3 µg/ml; eBioscience)

Por otro lado, la presencia intracelular de la GM2/GD2 sintasa, Zap-70 y de las ST8SialI y ST8SialIV fue determinada previa permeabilización mediante el uso del kit Citofix/Citoperm (BD Biosciences), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor o a través de la permeabilización por incubación durante 30 minutos con metanol al 90 %. Los linfocitos T CD4+ permeabilizados fueron incubados durante 1 h con los anticuerpos conejo IgG anti-GM2/GD2 sintasa humana (1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology), conejo IgG anti-fosfo Zap-70 humana (Tyr319)/Syk(Tyr352) (1:400; Cell Signalling), conejo IgG anti-ST8SialI (Santa Cruz Biotechnology) y conejo IgG anti-ST8SialIV (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se lavaron los linfocitos y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 o 647 (0.25 µg/ml; Molecular Probes). El análisis por citometría de flujo se realizó usando los citómetros de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) o FACS Canto II (Becton Dickinson). Las muestras fueron adquiridas para su análisis con el software CellQuest (BD Biosciences) o FACSDiva (BD Biosciences). Para la obtención de todos los datos, se adquirieron al menos diez mil eventos. Posteriormente, los datos fueron analizados utilizando el software comercial de análisis de citometría de flujo FlowJo (Flowjo LLC). La intensidad media de fluorescencia de las células activadas fue normalizada a la intensidad media de fluorescencia de células control del mismo tiempo de cultivo. Esto generó como resultado la fluorescencia media relativa que esta expresada en porcentaje para algunos análisis.

ELISA (ensayo de competencia)

Para la realización del ELISA (en sándwich), se incubó el anticuerpo anti-GD2 clona 14G2a (Santa Cruz Biotechnology) diluido en PBS 1x a diferentes concentraciones en una placa de 96 pozos (ELISA) durante 12 h a 4 °C. Posteriormente se lavó la placa tres veces con *buffer* de lavado (PBS 1x Tween 20 0.05 %). Se bloqueó la placa con *buffer* de bloqueo (PBS 1x, caseína 1 %) durante 4 h a 37 °C. Posterior al bloqueo con caseína, se añadieron 5 µg/ml de gangliósido GD3 (Santa Cruz Biotechnology) o gangliósido GD2 (derivado de cerebro humano Calbiotech) y se incubó la placa durante 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó e incubó el anti-GD2 clona 14G2a por 2 h a T.A. seguido de tres lavados con *buffer* de lavado. Para revelar se incubó el anticuerpo conejo anti-ratón IgG acoplado a la peroxidasa de rabano durante 30 minutos, se lavó tres veces y tras la adición del sustrato se determinó la absorbancia a 492 nm.

Microscopía confocal

Linfocitos T CD4+ naive humanos de las diferentes condiciones experimentales fueron teñidos para evaluar la presencia y localización de los glicoconjugados GD3, GD2, PSA y del TCR. 1×10^6 células/ml o 2×10^4 células/ml (para los experimentos de silenciamiento de los resultados Parte I) fueron adheridos en placas con cubreobjetos de 12 mm preparados con poli-L-lisina (Sigma Aldrich) o placas de 8 pozos Labtek® (Thermo) mediante incubación a 37°C y 5% CO₂ toda la noche. Posterior al lavado con PBS 1x, fijado con PFA 4% y bloqueo (0.5 % BSA, 2% SFB en PBS 1x) se procedió a la tinción con los anticuerpos anti-GD3 clona R24 y anti-GD2 clona 14G2a.

El procedimiento se describe a detalle en Villanueva et al. (2016). Los anticuerpos raton anti-TCR α/β humano acoplado a Alexa Fluor 647 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Biolegend) y ratón IgM anti-PSA clona 12E3 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, eBioscience) utilizados en las Parte I y II respectivamente de este trabajo fueron incubados 1 h en hielo, seguido de la incubación por otra hora con el anti-IgM acoplado a PE para el caso del anti-PSA. Las células lavadas con PBS 1x fueron incubadas con el colorante Hoechst 33342 (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) para visualizar el ADN y montadas con solución de montaje (1:1, Glycerol:PBS) sobre portaobjetos. Los linfocitos T CD4+ en reposo y activados, así como silenciados, fueron analizados con el microscopio confocal Olympus FV1000 Laser Confocal Microscope (Olympus, Miami, FL) con un objetivo de inmersión en aceite 60X S/1.3 y un zoom digital 2X. Para el caso del análisis de gangliósidos, cortes ópticos fueron obtenidos en el plano Z con un grosor de 0.48-2.0 μm . Las imágenes adquiridas en el análisis de la parte II fueron tomadas con un solo corte, ajustando el pin hole cercano a cero. El análisis de imágenes y de colocalización fue realizado con el software libre ImageJ 1.49^a (NIH) y el comercial Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.). Cada colocalización fue realizada en triplicado, usando cinco células seleccionadas aleatoriamente en cada tiempo de activación en cada experimento. Se adquirieron dos campos de cada condición por experimento. La colocalización fue realizada usando la herramienta de análisis de colocalización y de correlación de ImageJ que calcula el coeficiente de Pearson. La cuantificación de la señal se calculó usando un umbral de 0.02-1.5 μm^2 .

SDS-PAGE y Western blot

Linfocitos T CD4⁺ en reposo y activados de los diferentes experimentos fueron colectados y se realizó la extracción de proteínas a través de la solubilización en *buffer* de lisis, que contiene 25 mM Tris-HCL, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100 (Bio-Rad), coctel inhibidor de proteínas libre de EDTA (Roche). Los linfocitos T CD4⁺ fueron incubados en hielo durante 30 minutos y el lisado fue centrifugado a 18,000 x g por 10 min. La cantidad total de proteína en el sobrenadante fue determinada mediante el método Bradford usando el kit de ensayo proteico BioRad. Para el SDS-PAGE, 30-100 µg de proteínas de cada lisado total fueron resultas en un gel 7.5 % SDS-poliacrilamida. El gel fue electrotransferido mediante el método húmedo a una membrana PVDF (Millipore). Las membranas fueron bloqueadas a T.A. con 5 % leche no grasa, 1x TBS, 0.2 % Tween 20 durante 1 h en agitación suave. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo ratón IgM anti-PSA clona 12E3 (1:10,000; eBioscience), ratón IgG anti-Erk1/2 clona C-9 (1:5000, Santa Cruz Biotechnology), ratón IgG anti-tubulina (1:5000; eBioscience), conejo IgG anti-ST8SialI (1:1000 H136 Santa Cruz Biotechnology) o conejo IgG anti-ST8SialIV (1:1000; H-70 Santa Cruz biotechnology) a 4 °C en agitación suave durante toda la noche. Los *Western blots* fueron lavados y posteriormente incubados con el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución 1:10,000, los cuales fueron el cabra IgG anti-ratón IgM conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) (Bethyl Laboratories), cabra anti-ratón IgG conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology) o ratón IgG anti-conejo acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas fueron reveladas usando el *kit* ECL (General electric).

Digestion con endoneuraminidasa N

Lisados totales de linfocitos T CD4⁺ activados fueron incubados con 2.5 µg/ml de endoneuraminidasa N (EndoN, *Escherichia coli* K1 bacteriophage neuraminidase; ABC scientific) durante 12 h a 37 °C (Galuska et al. 2006; Roth et al. 1987). Para inactivar las digestiones, las muestras fueron incubadas durante 10 min en termoblock. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot usando el anticuerpo anti-PSA 12E3 para evaluar la pérdida de PSA, como se describió previamente.

Extracción de ARN y PCR Tiempo Real.

Los linfocitos T CD4⁺ (1x10⁶ células) activados por 24 h, 48 h, 72 h y sus respectivos controles fueron procesados para su extracción de ARN total de la siguiente manera: Se recuperó el medio con linfocitos de las placas y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 1500 rpm por 5 min. a 4°C. Las pastillas celulares fueron resuspendidas en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y homogenizadas en vórtex por 20 segundos y se incubó el homogenizado a temperatura ambiente por 5 min. Se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitó a mano por 15 segundos y posteriormente se centrifugó 15 min a 13,500 rpm a una temperatura de 4°C. Una vez centrifugado, se recuperó la interfase acuosa y se mezcló con 500 µl de isopropanol. Los tubos fueron invertidos tres veces para luego incubarse 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min. Se decantó el isopropanol e inmediatamente se añadió 1ml de etanol 75% frío y se centrifugó nuevamente a 13,500 rpm por 10 min. Se vació el contenido, se secó la pastilla de

ARN retirando la mayor cantidad de etanol posible. Después de secar la pastilla, se resuspendió el ARN en 20 μ l de agua libre de RNasas/DNasas. Se determinó la absorbancia de las muestras de ARN a 260 nm por espectrofotometría (Biomate Thermo Scientific) y se realizó el cálculo de la concentración de ARN. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa 1 (Fermentas) como indica el proveedor. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 1 μ g de ARN tratado con DNasa 1 para cada condición, siguiendo el protocolo del proveedor del *kit* de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Se utilizó 1 μ l de ADNc a una dilución 1:10 para realizar la amplificación de los genes de interés mediante PCR tiempo real. Se utilizó el *kit* Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master mix (2X) siguiendo el protocolo de dos pasos del proveedor (Thermo Fisher Scientific). Pre-tratamiento UDG a 50°C por 2 min durante un ciclo, desnaturalización inicial a 95°C por 10 min. por un ciclo, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos y alineamiento-extensión a 55°C o 60°C (dependiendo la T_m de los oligos) por 60 segundos. Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de la UNAM y corresponden a las secuencias enlistadas en la tabla 1. Para determinar la expresión de los genes β 4GALNT1, NRP-2, IL-2 y $eEF1\alpha$ mediante PCR punto final, se utilizó 1 μ l de ADNc en una reacción de polimerización catalizada por la Taq Polimerasa de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Fermentas). Todos los oligonucleótidos tienen una T_m de 55 °C, excepto β 4GALNT1 que amplifica a 60 °C.

La reacción de PCR tiempo real se realizó en el termociclador ABI 5700 (Applied Biosystems) y se adquirieron los datos en el sistema de detección GeneAmp 5700

Sequence Detection System para los análisis de expresión de la Parte I y el StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems) para la expresión de los genes analizados en la Parte II. La expresión de los genes fue normalizada a la expresión del gen control interno (eEF1 α). Los oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real tenían como mínimo un 85 % de eficiencia. La eficiencia de los oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real fue determinada mediante la fórmula $E=e^{\ln 10/m}-1$, donde m representa la pendiente de la curva estándar graficada a partir de diferentes diluciones de los oligonucleótidos. Los cálculos se realizaron utilizando el método de cuantificación relativa por comparación (método comparativo del Ct) de como sigue: Se calculó el ΔCt que normaliza la expresión del gen de interés relativa a la expresión de su control interno para un tiempo dado,

$\Delta Ct_{\text{control (0h)}} = Ct_{\text{gen X(0h)}} - Ct_{\text{gen X(0h)}}$ determina la expresión del gen de interés a las 0hrs.

$\Delta Ct_{\text{activación(24h)}} = Ct_{\text{gen X(24h.p.a.)}} - Ct_{\text{gen X(24h ctrl)}}$ determina el cambio de expresión del gen de interés a las 24 h.p.a., en comparación con la expresión del mismo gen a las 24 h en condiciones control.

$\Delta Ct_{\text{activación(48h)}} = Ct_{\text{gen X(48h.p.a.)}} - Ct_{\text{gen X(48h ctrl)}}$ determina el cambio de expresión del gen de interés a las 48 h, en comparación con la expresión del mismo gen a las 48 h en condiciones control.

$\Delta Ct_{\text{activación(72h)}} = Ct_{\text{gen X (72h.p.a.)}} - Ct_{\text{gen X (72hrs ctrl)}}$ determina el cambio de expresión del gen de interés a las 72 h con en comparación a la expresión del mismo gen a las 72 h en condiciones control.

Donde gen X= al gen de interés. Posteriormente se calculó la expresión relativa del gen de interés a las 24, 48 y 72 h en comparación con la expresión del gen a las 0 h.

$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{activación}} - \Delta Ct_{\text{control}}$.

Veces de cambio (*Fold change*): $2^{-\Delta\Delta C}$

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la PCR tiempo real y PCR punto final.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
<i>ST3GAL1</i>	5'-CCTCTCGGTCATCTTCTCAATG-3'	5'-GTGGTGCCAGTTCCCTTTGC-3'
<i>ST6GAL1</i>	5'-CCAGAAGAGATTCAGCCAAACC-3'	5'-CTTCTGGTAGTAGTAGCACACG-3'
<i>ST8SIAI</i>	5'-GAGCGTTCAGGAAACAAATGG-3'	5'-CCTGTGGGAAGAGAGAGTAAG-3'
<i>ST8SIAII</i>	5'-CACAGCTTCGTCATCAGGTG-3'	5'-GTGGCATTGACCAAGTCCTC-3'
<i>ST8SIAIII</i>	5'-CCAGGAACTCCAAGAGAAACC-3'	5'-GCATCAGTTGTCCAATCCGAAC-3'
<i>ST8SIAIV</i>	5'-GACGCAACTCATCGGAGATG-3'	5'-CACTGACACATCTCGTTCTGC-3'
<i>ST8SIAV</i>	5'-CCATGGTGAAGCAGTCAGAGCTG-3'	5'-GGAGTGTCTTCTGGGTGGTGAA-3'
<i>ST8SIAVI</i>	5'-AGGATTCTGGTGGAGGAAAGC-3'	5'-GTCAGTTGGAGCGACTTCTC-3'
<i>IL-2</i>	5'-ATGCACAAGCTCTGCCACTC-3'	5'-CTGTATCCCTGGACGCACT-3'
<i>IL-2R</i>	5'-CTTTCACTTAAGACCCAGGGAC-3'	5'-CACATGAATGTTGTTTCAGATCCC-3'
<i>IFN-γ</i>	5'-GCAGAGCCAAATTGTCTCC-3'	5'-GGACATTCAAGTCAGTTACC-3'
<i>NRP-2</i>	5'-GCACGACTGCAAGTATGACT-3'	5'-TCTCTAGTGGCTCTTGGTGG-3'
<i>β4GALNT1</i>	5'-CAACACAGCAGACACAGTCC-3'	5'-GTGGCAATCGTGACTAGAGC-3'
<i>eEF1α SQ</i>	5'-GCCAGAACAGGTGTCGTGAA-3'	5'-AGTGGTGGACTTGCCCGAAT-3'
<i>eEF1α RT</i>	5'-GGCATCGACAAAAGAACCAT-3'	5'-CCATTCCAACCAGAAATTGG-3'

Transducciones lentivirales

Para los experimentos de la sección de resultados Parte I, 20,000 linfocitos T CD4+ humanos de cada condición fueron incubados 12 h en medio suplementado sin o con polybrene (4 μ g/ml, Sigma), un polication que mejora la transducción lentiviral de las

siguientes construcciones comerciales: Partículas lentivirales Control mock shRNA, CopGFP shRNA y GM2/GD2 sintasa shRNA (Santa Cruz Biotechnology). Para los experimentos de la sección Parte II 80, 000 linfocitos T CD4+ naive humanos fueron incubados con las partículas lentivirales Control mock shRNA, ST8SialII shRNA y ST8SialIV shRNA (Santa Cruz Biotechnology). La multiplicidad de infección utilizada en todas las condiciones fue de 2.5. Después de 12 h de incubación a 37 C y 5 % CO₂, los linfocitos fueron lavados y arrestados en medio de cultivo completo durante 24 h. Linfocitos control no transducidos y linfocitos en las diferentes condiciones de silenciamiento fueron activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 72 h o durante 6 y 12 h para el análisis de expresión de fosfo Zap-70. Se colectaron los linfocitos T CD4+ activados silenciados de cada condición y se procedió a evaluar la expresión de genes, proliferación, y presencia de proteínas según el caso descrito en cada sección de resultados.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov. Con base en la clasificación de las muestras, la significancia estadística se calculó con las pruebas que se ajustaban a cada caso. Las pruebas realizadas en el software comercial Prisma (GraphPad) fueron la prueba de *t* pareada, prueba de Wilcoxon, prueba de Friedman y ANOVA de dos vías con prueba post-hoc LSD. Valores de *P* menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Capítulo III

Resultados

Basados en la hipótesis planteada, donde proponemos que el incremento de ácido siálico en forma de SiaNAz observado durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano es en parte a expensas de un incremento en la sialilación de tipo $\alpha 2,8$ que no se ha descrito previamente en el linfocito, se procedió a evaluar la expresión de los genes que codifican para las seis $\alpha 2,8$ sialiltransferasas conocidas en el humano (Figura 7). Se observó, mediante PCR tiempo real, que los linfocitos T CD4+ humanos de las 72 horas post-activación (h.p.a.) en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 muestran un incremento en la expresión de los genes *ST8SIAI*, *ST8SII* y *ST8SIV*. Si bien las tres enzimas sialiltransferasas codificadas por estos genes se encargan de la unión de dos ácidos siálicos mediante un enlace de tipo $\alpha 2,8$, tanto el sustrato como el grado de polimerización en que pueden extender estos ácidos siálicos es diferente. Por un lado, la ST8Sia I (GD3 sintasa) es encargada de sialilación $\alpha 2,8$ en glicoesfingolípidos sialilados, también llamados gangliósidos, mientras que las sialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV adicionan más de un ácido siálico en enlace $\alpha 2,8$ a glicoproteínas, generando polímeros de ácido siálico conocidos como ácido polisiálico (PSA). Estas observaciones sugieren que la adición de ácido siálico de tipo $\alpha 2,8$ durante la activación del linfocito T CD4+ humano podría ocurrir tanto en gangliósidos como en glicoproteínas.

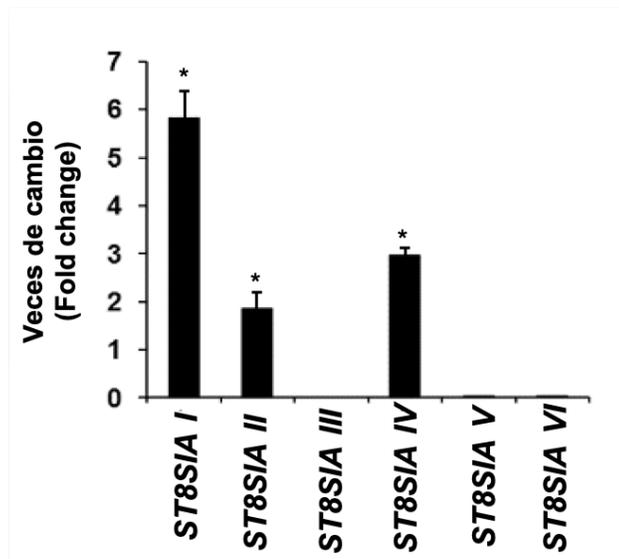


Figura 7. Expresión relativa de los genes que codifican para las sialiltransferasas ST8Sia durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano. Análisis por PCR tiempo real para determinar la expresión relativa de los genes que codifican para las sialiltransferasas ST8SIA I, II, III, IV, V y VI en linfocitos T CD4+ a las 72 horas post-activación (h.p.a.) en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28. La gráfica muestra las veces de cambio en la expresión de los genes de las seis ST8s en linfocitos T CD4+ activados con la expresión en células en reposo. El valor mostrado para cada gen de ST8 representa el nivel de cambio obtenido normalizando la expresión de los genes de interés en condiciones reposo y activadas, con el gen control interno eEF1 α por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Posteriormente se comparó la expresión del gen de cada ST8 en la activación con la de reposo. Nivel de significancia evaluado con la prueba *t* de student aplicando el análisis restringido > 1.5 veces de cambio de acuerdo con Dozmorov et al., 2010 y $*P < 0.05$. La figura representa la media de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Con el objetivo de describir y entender mejor la posible expresión de los gangliósidos y glicoproteínas susceptibles a sialilación $\alpha 2,8$ por estas enzimas, se dividirán los resultados en dos partes. La Parte I, que describe los hallazgos asociados a silailación $\alpha 2,8$ en gangliosidos y la Parte II de resultados que describe la posible polisialilación de proteínas en el linfocito T CD4+ humano.

Resultados Parte I. Sialilación α 2,8 asociada a gangliósidos durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

Durante la activación de linfocitos T totales, se ha observado un incremento en la expresión del gen *ST8SIAI* que codifica para la sialiltransferasa ST8Sia I y un incremento del gangliósido GD3 (disialilado α 2,8) sintetizado por esta enzima. Sin embargo, no se ha detallado la función de este gangliósido durante la activación (Yamashiro et al., 1995). La expresión de otros gangliósidos se ha analizado a detalle en modelos murinos, donde se ha observado que la ausencia de los gangliósidos GM3, GM1a y GD1a resulta en una reducción en la proliferación de linfocitos T CD4+ murinos generada por activación en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Nagafuku et al., 2012). Debido a estas observaciones se podría sugerir que la hipersialilación del linfocito T CD4+ naive activado, aunado al aumento en la expresión de la ST8Sia I, podría conducir a la sobreexpresión de gangliósidos sialilados del tipo α 2,8 los cuales podrían tener roles importantes durante la activación. En relación con esto y a la expresión del gen *ST8SIAI* en los linfocitos T CD4+ y su sobreexpresión durante la activación, consideramos importante identificar si dicha expresión esta asociada con la presencia de gangliósidos en estas células. Para ello procedimos al estudio de los gangliósidos durante la activación.

El gangliósido GD3 se sobreexpresa durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano

Como se mencionó, la sialiltransferasa ST8Sia I participa en la sialilación de tipo α 2,8 durante la biosíntesis de gangliósidos y es codificada por el gen *ST8SIAI* (Figura 3).

Debido a la sobreexpresión del gen *ST8SIAI* y en ausencia de expresión de la *ST8SIAV*, que también participa en la sialilación $\alpha 2,8$ de gangliósidos (Figura 7), consideramos que la activación celular podría inducir la síntesis de gangliósidos sialilados $\alpha 2,8$ de la serie “b”. Para ubicar una ventana temporal para la síntesis de gangliósidos de la serie b se realizó un análisis de la expresión mediante PCR tiempo real del gen *ST8SIAI* a 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h post-activación. Para identificar si esta sobreexpresión de *ST8SIAI* ocurre en tiempos tempranos y tardíos de la activación del linfocito T CD4+, se comparó la expresión de este gen en los seis tiempos de activación con la expresión en linfocitos T CD4+ del tiempo 0 h, que representa la población de linfocitos T CD4+ naives recién aislados. En el análisis se observó que en todos los tiempos de activación hay sobreexpresión significativa del gen *ST8SIAI* desde las con respecto a células T CD4+ en reposo. También se observó que en los tiempos 6, 12 y 48 h.p.a. ocurre la máxima expresión dentro de las 72 h.p.a. (Figura 8). Estos cambios en la expresión de *ST8SIAI* se observan de forma dinámica lo que sugiere que existe una fina regulación en la expresión de la *ST8SIAI* que sustentaría la sobreproducción de gangliósidos requeridos durante la activación.

Como se mencionó previamente, la ST8Sia I es responsable de la síntesis del gangliósido GD3, que es precursor de la serie “b” de los gangliósidos. Debido a que se observó el incremento en la expresión de la *ST8SIAI* a diferentes tiempos, se evaluó en linfocitos T CD4+ en reposo y activados mediante citometría de flujo, la posible presencia del producto directo de la actividad de esta enzima, el gangliósido GD3, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-gangliósido GD3 humano clona R24 (Figura 9).

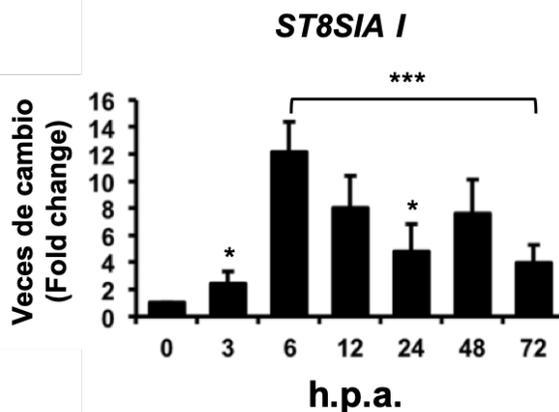


Figura 8. Expresión relativa del gen que codifica para sialiltransferasa ST8Sia I durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano. Análisis por PCR Tiempo real para determinar la expresión relativa del gen *ST8SIAI* en linfocitos T CD4+ activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 durante 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h. La grafica muestra el cambio en la expresión de la *ST8SIAI* en linfocitos T CD4+ activados comparado con respecto a la expresión en células en reposo expresado como veces de cambio (Fold change). El valor mostrado representa el nivel de cambio obtenido normalizando de la expresión del gen *ST8SIAI* que codifica para la sialiltransferasa ST8Sia I en condiciones reposo y activación con respecto a la expresión del gen control interno eEF1 α por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se comparó la expresión del gen *ST8SIAI* en la activación con la de reposo. Nivel de significancia evaluado con la prueba de Wilcoxon aplicando el análisis restringido > 1.5 veces de cambio donde los tiempos 6 a 72 h.p.a. resultaron significantes y * $P < 0.05$ y *** $P < 0.01$. La figura representa la media de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se observó que el gangliósido se encuentra presente en la superficie del 27 al 44 % de células T CD4+ naïve en reposo (Figura 9A), mientras que después de la estimulación en presencia de mAbs anti-CD3/anti-CD28, se incrementó significativamente a 70 % de células T CD4+ positivas para el gangliósido GD3 desde las 24 h y hasta el 90 % a las 72 h, pasando por el 99 % a las 48 h (Figura 9B). De igual forma la unión del anticuerpo anti-gangliósido GD3 a los linfocitos T CD4+ activados es significativamente mayor en comparación con los linfocitos en reposo (histogramas Figura 9A y 9C).

Los glicosfingolípidos participan en la formación de los microdominios que ocurren en la sinapsis durante la activación de los linfocitos T CD4+ (Balamuth et al., 2004).

Los gangliosidos son glicosfingolípidos caracterizados por su participación en la formación de balsas lipídicas, tal es el caso del marcador de balsas lipídicas, el gangliósido GM1 (Tani-Ichi, 2005, Gomes-Ferreira, 2018). Previamente, se identificó que la formación de microdominios lipídicos en linfocitos T CD4+ humanos activados mediados por el gangliósido GM1 promueve el evento de polarización del TCR del linfocito, causando una activación eficiente (Janes et al., 2000).

Basados en este antecedente, se procedió a la identificación de la localización del gangliósido GD3 en las células T CD4+ en reposo y activadas y la posible co-localización con el TCR con base en los antecedentes del GM1. Usando el anticuerpo anti-gangliósido GD3 humano clona R24 y un anticuerpo anti-TCR humano, se evaluó la localización de ambas moléculas en linfocitos T CD4+ en reposo y activados tras la adquisición de imágenes con cincio células por campo, por experimento mediante el uso de microscopia confocal (Olympus).

En la Figura 10 se observa que en células T CD4+ en reposo se encuentra el gangliósido GD3 localizado homogéneamente en la superficie y se puede observar una baja localización intracelular. Por otro lado, el TCR en linfocitos T CD4+ en reposo se encuentra expresado y localizado en la membrana, pero no colocaliza con el gangliósido GD3. Posterior a la activación a 3, 24 y 72 h, los patrones de localización del gangliósido GD3 y del TCR se modifican, de tal forma que se observa la formación de agregados, sin embargo, se determinó que el gangliósido GD3 y el TCR no colocalizan en estas estructuras.

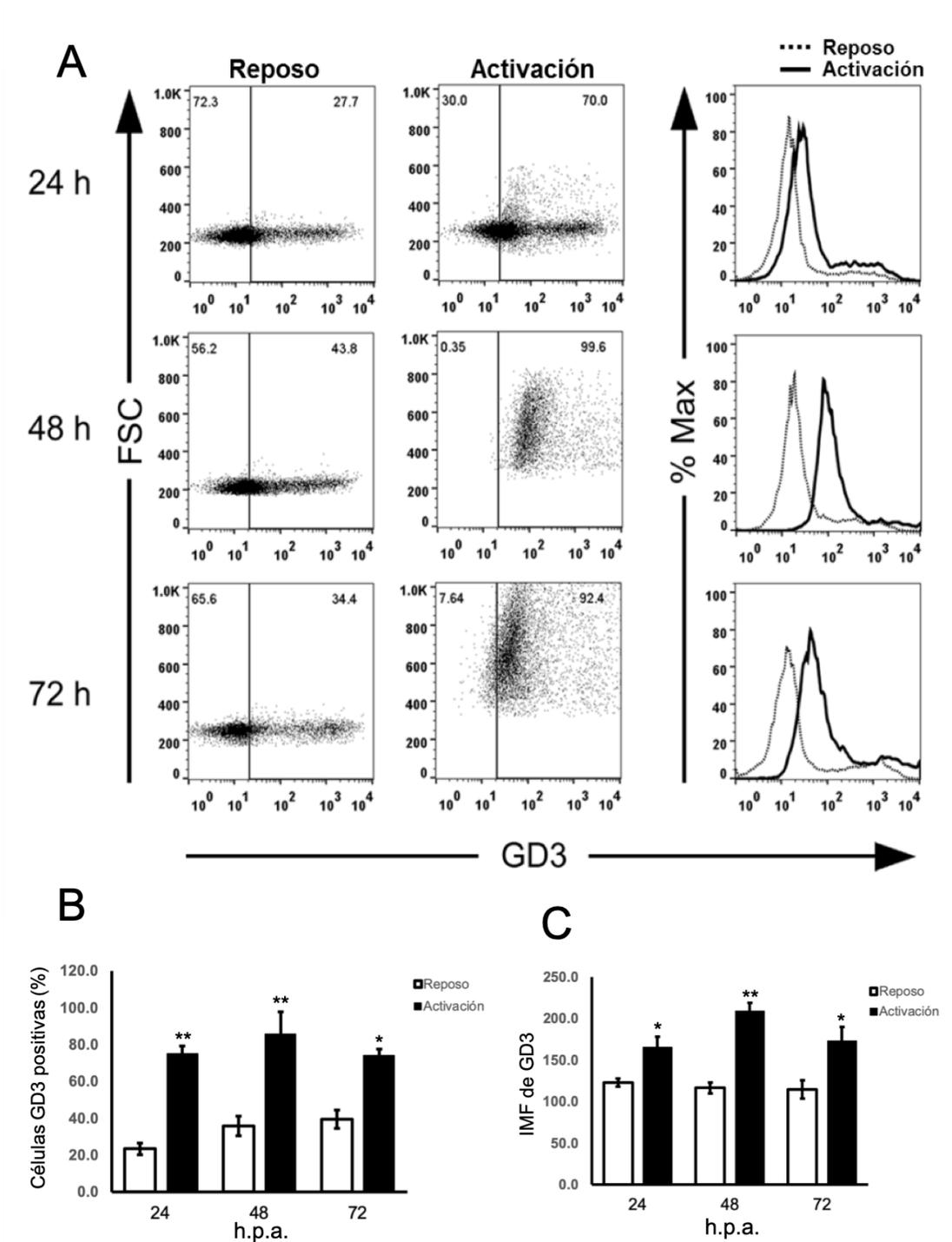


Figura 9. Incremento en la presencia de gangliósidos GD3 presente durante la activación de linfocitos T CD4+ naive humanos. Análisis por citometría de flujo para determinar la unión del anticuerpo anti-gangliósido GD3 clona R24 en condiciones de reposo y activación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 durante 24, 48 y 72 h. (A) Las gráficas de puntos muestran el porcentaje de células positivas para el gangliósido GD3 y los histogramas muestran la intensidad media de fluorescencia de la unión del

anticuerpo a linfocitos en reposo y activados. (B) La gráfica muestra el porcentaje de células GD3 positivas a 24, 48 y 72 horas post-activación (h.p.a.). Los datos mostrados corresponden a la media de cinco experimentos independientes y su desviación estándar. $**P < 0.01$. (C) La gráfica muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) derivada de los histogramas obtenidos para la determinación del gangliósido GD3 en linfocitos T CD4+ en reposo y activados por 24, 48 y 72 h. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de cinco experimentos independientes. $*P < 0.05$ y $**P < 0.01$. El análisis estadístico se realizó comparando la activación con la condición reposo utilizando la prueba de *t*.

El gangliósido GD2 se neoexpresa durante la activación del linfocito T CD4+ humano

Continuando con la hipótesis de la posible expresión de los gangliósidos de la serie “b” debido a una sobreexpresión de la *ST8SIAI*, se procedió a evaluar la expresión de otros gangliósidos, como el gangliósido GD2 que es sintetizado a partir del gangliósido GD3 (Figura 3). La GM2/GD2 sintasa (*gen β4GALNT1*) es la enzima responsable de la síntesis de los gangliósidos GM2, GD2 y GT2. Para sintetizar los gangliósidos GM2 y GD2, la sintasa utiliza como sustrato el gangliósido GD3, y une a través de una reacción de glicosilación, una *N*-acetilgalactosamina a la galactosa que porta el enlace $\alpha 2,8\text{Sia}$ (Figura 3).

A pesar de que solo un carbohidrato diferencia al gangliósido GD2 del gangliósido GD3, estos poseen diferentes funciones, así como una expresión diferencial en las células humanas (Ruan et al., 1999). El gangliósido GD3 usualmente se encuentra altamente expresado en patologías como el melanoma, mientras que el gangliósido GD2 se restringe principalmente a neuroblastomas (Yu et al., 2011).

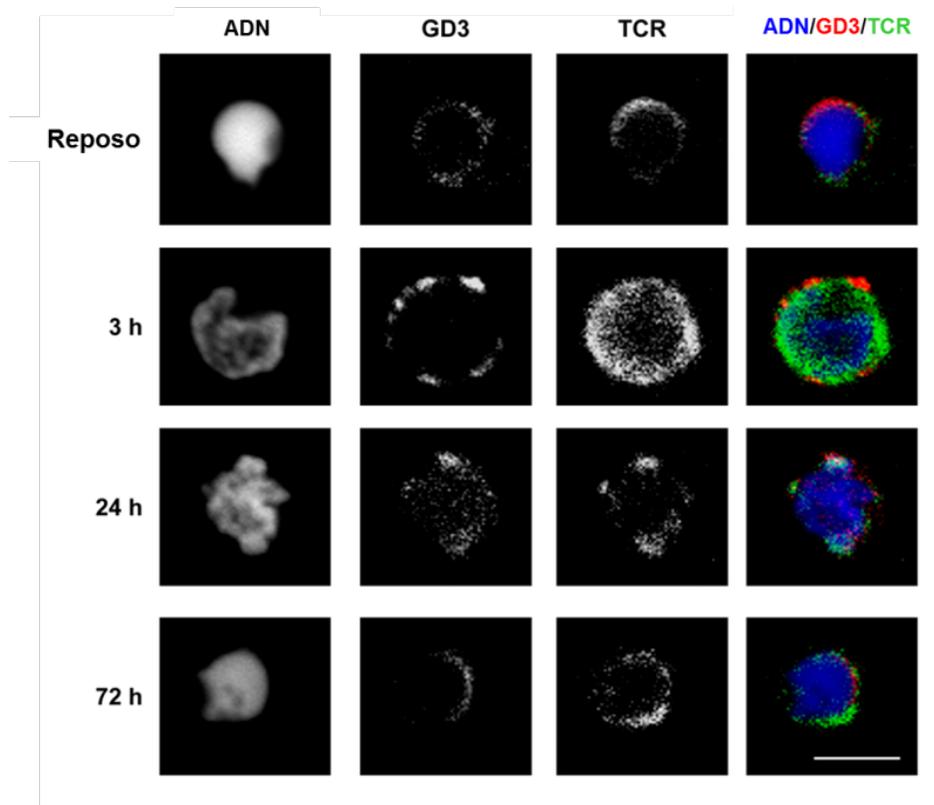


Figura 10. El gangliósido GD3 presente en linfocitos T CD4+ naïve en reposo y activados no colocaliza con el TCR. Análisis por microscopía confocal de la localización del gangliósido GD3 y el receptor TCR en linfocitos T CD4+ en reposo y activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 3, 24 y 72 h. Los linfocitos fueron incubados con el anticuerpo ratón IgG3 anti-gangliósido GD3 humano (clona R24) seguido del anticuerpo secundario anti-ratón IgG3 acoplado a Isotiocianato de Fluoresceina (FITC). Para identificar la presencia del TCR se utilizó un anticuerpo anti-TCR humano acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 647. Para visualizar el gangliósido GD3 y el TCR se utilizó un microscopio confocal laser Olympus FV1000 y las muestras fueron adquiridas usando el objetivo 60x S/1.3 de aceite y el zoom digital 2x. La barra representa una escala de 5 μ m Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Primero se realizó un análisis de la expresión del gen que codifica para la GM2/GD2 sintasa, el gen $\beta 4$ GALNT1. Mediante PCR tiempo real se determinó la expresión del $\beta 4$ GALNT1 a las a 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h.p.a. en presencia de mAbs anti-CD3/anti-CD28. Se observó que la $\beta 4$ GALNT1 está sobreexpresada de manera significativa durante la activación, con respecto a las condiciones control, excepto a las 6 h.p.a.

cuya expresión se reduce (Figura 11). Esta observación refuerza la hipótesis de la posible sobreproducción del gangliósido GD2 en linfocitos T CD4+ activados.

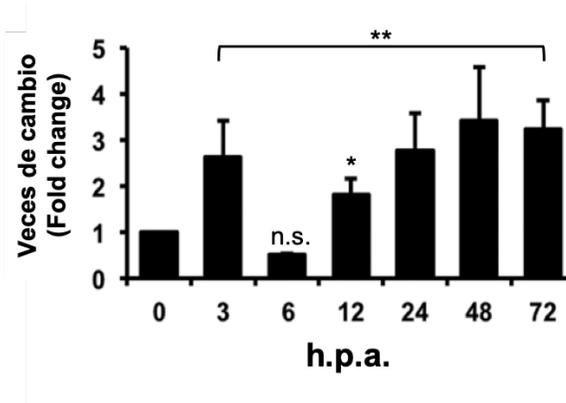


Figura 11. Expresión relativa del gen $\beta 4GALNT1$ que codifica para GM2/GD2 sintasa durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano. Análisis por PCR Tiempo real para determinar la expresión relativa del gen $\beta 4GALNT1$ en linfocitos T CD4+ activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 durante 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-activación (h.p.a.). La gráfica muestra el cambio en la expresión de la $\beta 4GALNT1$ en linfocitos T CD4+ activados comparado con respecto a la expresión en células en reposo expresado como veces de cambio (Fold change). El valor mostrado representa el nivel de cambio obtenido normalizando la expresión del gen $\beta 4GALNT1$ en condiciones de reposo y de activación con respecto a la expresión del gen control interno eEF1 α por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se comparó la expresión del gen $\beta 4GALNT1$ en la activación con respecto a la de reposo. Nivel de significancia evaluado con la prueba de Wilcoxon aplicando el análisis restringido > 1.5 veces de cambio donde los tiempos 3 a 72 h.p.a. excepto 6 h.p.a. resultaron significativos * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ en todos los tiempos de activación respecto a la condición reposo. La figura representa la media de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Para evaluar la presencia del gangliósido GD2, linfocitos T CD4+ fueron teñidos con el anticuerpo anti-gangliósido GD2 clona 14G2a y analizados por citometría de flujo en condiciones de reposo y activación a las 24, 48 y 72 h en presencia de los mAbs anti-CD3/anti-CD28. Inesperadamente, los linfocitos T CD4+ en reposo no expresan el gangliósido GD2 (Figura 12). Sin embargo, después de la activación se observó que

el gangliósido se expresa en el 100 % de los linfocitos activados a 24, 48 y 72 h.p.a. (Figuras 12A y 12B). A su vez, la intensidad media de fluorescencia (IMF), que representa la cantidad de gangliósido reconocido por el anti-GD2, aumentó en los linfocitos T CD4+ activados desde tiempos tempranos de activación (Figura 12C). A partir de este resultado propusimos que el gangliósido GD2 se neoexpresa durante la activación del linfocito T CD4+ en presencia de anti-CD3/anti-CD28, que representa una activación mediada a través de receptores de superficie.

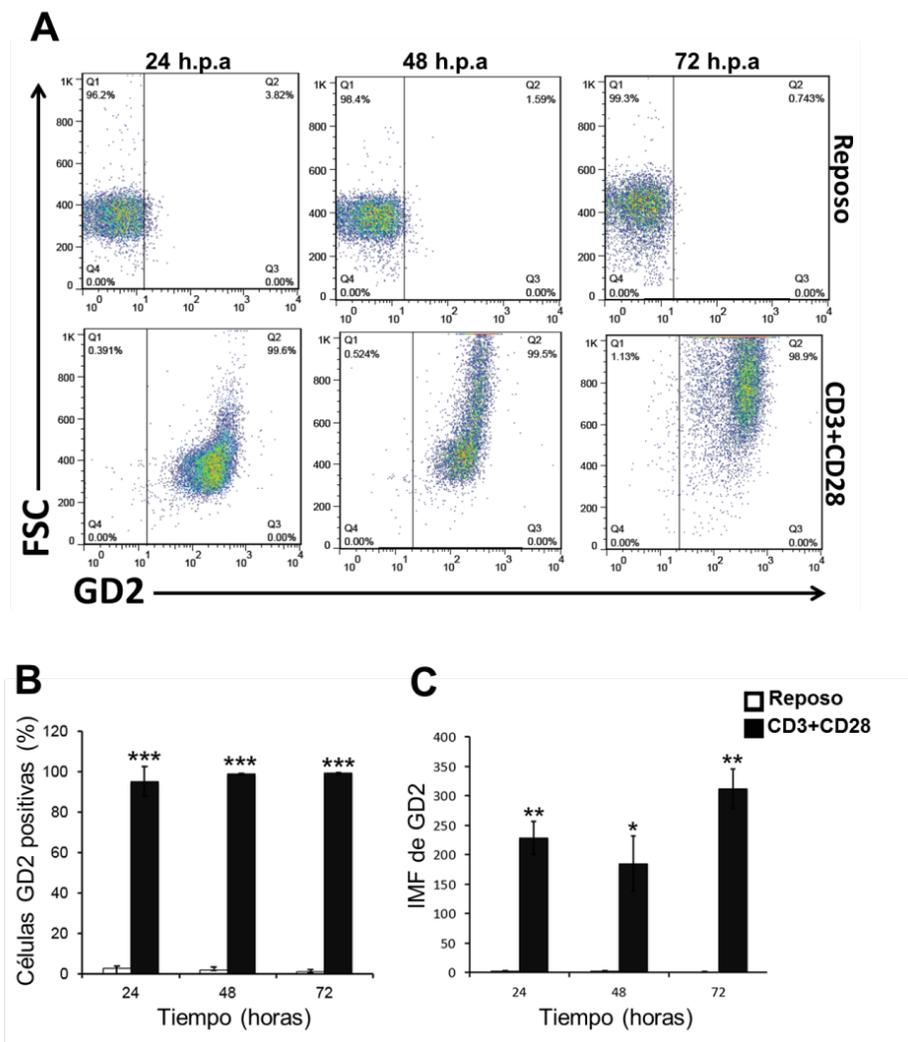


Figura 12. Análisis de la presencia del gangliósido GD2 durante la activación del linfocito T CD4+ naïve humano. (A) La figura muestra las gráficas de puntos derivadas del análisis por citometría de flujo del gangliósido GD2 en linfocitos T CD4+

naive humanos en reposo o incubados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 24, 48 y 72 h. Las células fueron teñidas con anticuerpos ratón IgG2a anti-gangliosido GD2 (clona 14G2a) seguida de la tinción con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG2a acoplado a Alexa Fluor 647. (B) La gráfica muestra el porcentaje de células GD2 positivas a las 24, 48 y 72 horas post-activación (h.p.a.). Los datos mostrados corresponden a la media de cuatro experimentos independientes y su desviación estándar. $***P < 0.001$. (C) La gráfica muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) derivada de los histogramas obtenidos para la determinación del gangliósido GD2 en linfocitos T CD4⁺ en reposo y activados por 24, 48 y 72 h. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de cuatro experimentos independientes. $*P < 0.05$ y $**P < 0.01$. El análisis estadístico se realizó comparando la activación con la condición reposo utilizando la prueba de *t*.

Para determinar si la neoexpresión del gangliósido GD2 en linfocitos T CD4⁺ en presencia de los mAbs anti-CD3/anti-CD28, que representa una activación de la señalización via receptores en superficie, se podía reproducir utilizando estímulos directos sobre proteínas intracelulares, se utilizó forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y ionomicina (Iono), activadores en conjunto de la proteína cinasa C (PKC) (Chatila 1989). Se incubaron linfocitos T CD4⁺ en ausencia o presencia de PMA/Iono durante 24 h y se evaluó la presencia del gangliósido GD2 mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo anti-gangliósido GD2 clona 14G2a (Figura 13). Se observó que a las 24 h.p.a. los linfocitos activados son 100% positivos para el gangliosido GD2 mientras que los linfocitos en reposo no presentan gangliósido GD2 en la superficie, como en el caso de la estimulación vía anti-CD3/anti-CD28. Con este resultado pudimos observar que, independiente del estímulo de activación, el linfocito T CD4⁺ naive humano es capaz de exponer en su superficie el gangliósido GD2.

Como se mencionó, la expresión de los gangliósidos en la membrana, particularmente el GM1, puede estar asociada a procesos de formación de microdominios lipídicos y conducir a la polarización del TCR durante la activación (Janes et al., 2000; Jury et al.,

2007). Para evaluar si la neoexpresión del gangliósido GD2 durante la activación está asociada con algún evento de polarización, se tiñeron células T CD4+ en reposo y activadas con los anticuerpos anti-GD2 clona 14G2a y anti-TCR y se evaluó la localización de ambos marcadores mediante microscopía confocal (Figura 14).

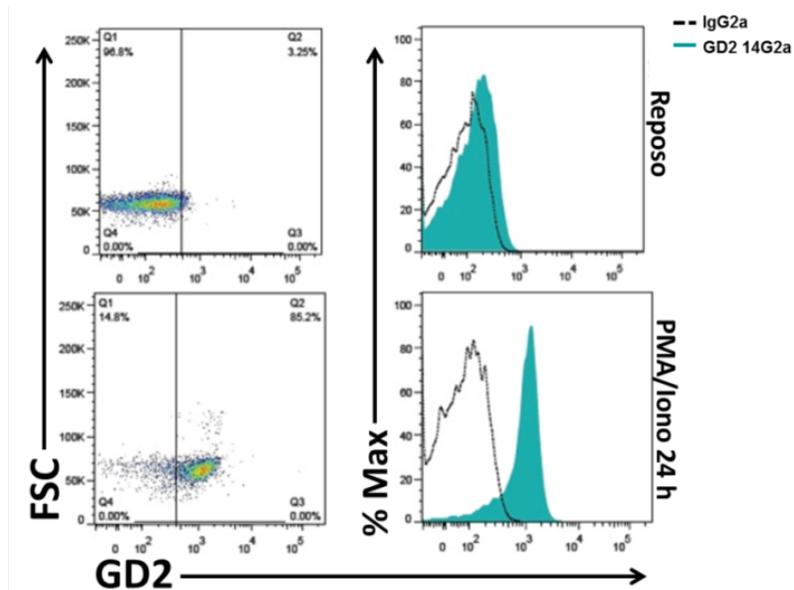


Figura 13. El gangliósido GD2 también se neoexpresa después de la estimulación con PMA/Iono. Citometría de flujo a 12 h p.a. en linfocitos T CD4+ naive en reposo o incubados en presencia de PMA/Iono teñidos con el anticuerpo anti-gangliósido GD2 humano clona 14G2a seguido de la tinción con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG2a acoplado a Alexa Fluor 647. La figura muestra del lado izquierdo las gráficas de puntos con el porcentaje de células positivas para el gangliósido GD2 en reposo y activación. Los histogramas de la derecha muestran la intensidad media de fluorescencia de la unión del anticuerpo a linfocitos en reposo y activados. La figura es una imagen representativa de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 12, a excepción de las 6 h.p.a., la presencia del gangliósido GD2 en linfocitos T CD4+ activados está asociada espacialmente a la localización del TCR, es decir, el gangliósido GD2 y el TCR colocalizan durante la polarización del TCR (Figura 14B). A las 3 h.p.a se observa que GD2 colocaliza en

ciertas regiones con el TCR y presenta una localización homogénea en la membrana, similar a la localización a este sin polarizarse. Adicionalmente, a las 6 h.p.a. se observa que el TCR se polariza, pero no colocaliza con el gangliósido GD2. En tiempos avanzados de la activación (24, 48 y 72 h.p.a.) se observa que GD2 y TCR colocalizan y se polarizan en la membrana lo que indica que el gangliósido GD2 podría participar en la polarización de otras moléculas hacia el TCR de manera tardía.

Debido a que este trabajo describe por primera vez la expresión de GD2 durante la activación del linfocito T CD4+ y su colocalización con el TCR, resulta crucial corroborar que el anticuerpo anti GD2 clona 14G2a se une de manera específica a GD2 expresado en el linfocito T CD4+ y no a otros gangliósidos como el GD3 o GD1b que también forman parte de la serie "b" de los gangliósidos (Figura 3). Para ello, se realizaron ensayos de competencia para el anticuerpo anti-GD2 clona 14G2a utilizando un gangliósido GD2 purificado de cerebro humano (Calbiochem), gangliósidos GD3 purificados de suero de leche bovina (Santa Cruz Biotech) y gangliósido GD1b purificado de cerebro bovino (Enzo). Usando diferentes concentraciones (2, 3, 4 y 5 μ g) de gangliósidos GD3, GD2 y GD1b, se incubaron los gangliósidos por separado con anticuerpos anti-GD2 14G2a y mediante citometría de flujo se determinó la unión del anticuerpo pre-incubado con cada gangliósido a los linfocitos T CD4+ activados (Figura Anexa 1). Como se observa, la unión del anticuerpo anti-GD2 clona 14G2a a las células T CD4+ activadas solo se reduce de manera dosis dependiente tras la incubación previa con gangliósido GD2 purificado y no con GD3 o GD1b (Figura Anexa 1).

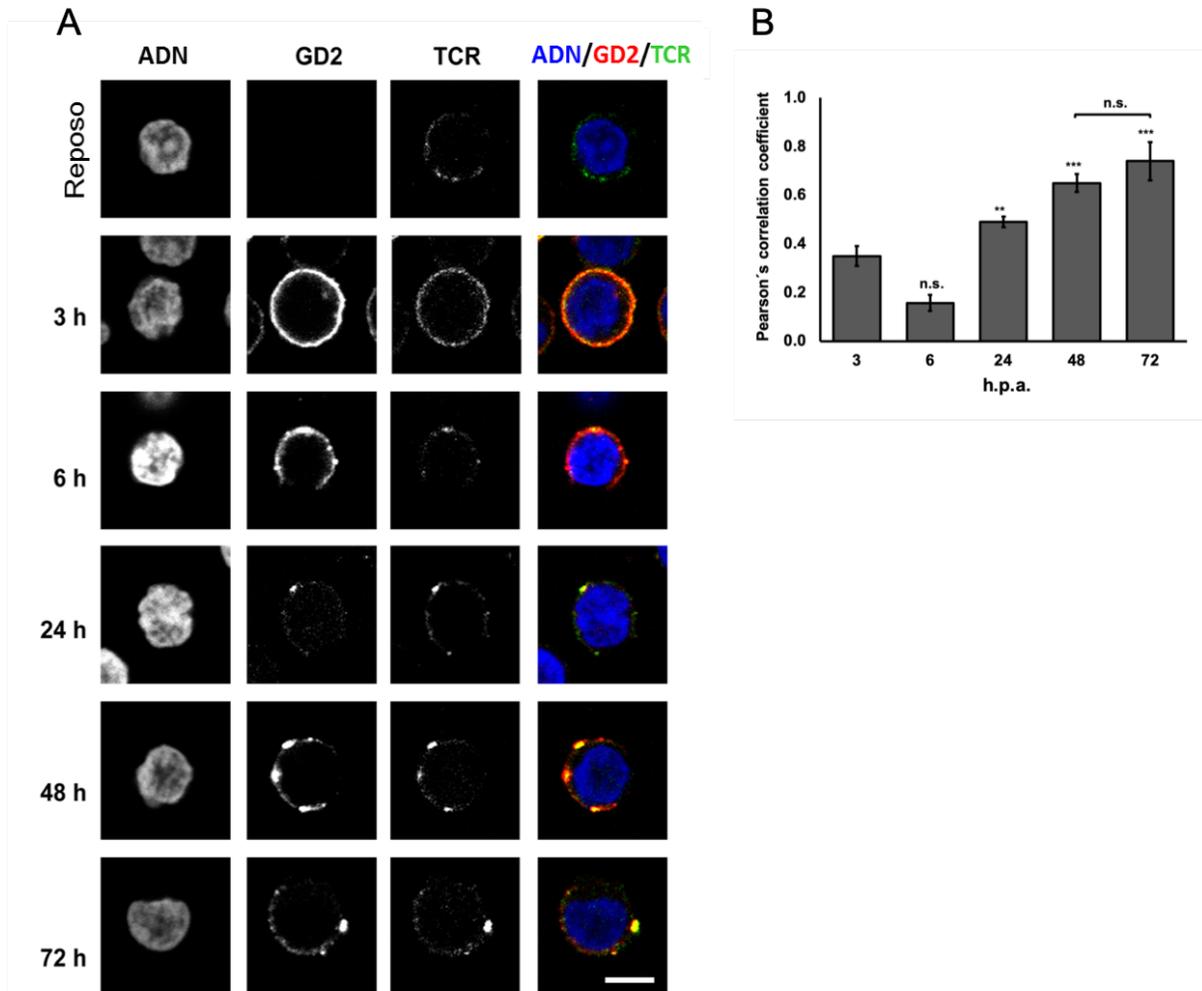


Figura 14. El gangliósido GD2 colocaliza con el TCR durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de linfocitos T CD4+ naive en condiciones de reposo y activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 a 3, 6, 24, 48, y 72 h. Las células fueron teñidas con el anticuerpo ratón anti-gangliósido GD2 IgG2a clona 14G2a seguido del anticuerpo secundario anti-ratón IgG2a acoplado a Alexa Flúor 488 (fluorescencia simple en escala de grises o en rojo con color falso asignado), con el anti-TCR humano acoplado a Alexa Flúor 647 (verde) y la tinción de núcleos con el colorante 33342 para visualizar el ADN (azul). La localización fue obtenida mediante la captura de diferentes campos y cortes transversales de diferentes grosores utilizando el microscopio confocal de laser Olympus FV1000 con un objetivo 60x S/1.3 de aceite y amplificando la imagen con un zoom digital 2x. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La barra representa una escala de 5 μ m. (B) Coeficiente de correlación de Pearson para la colocalización de el GD2 y el TCR. Las barras de error indican la desviación estándar de una n=3. ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

Así mismo, el análisis de la unión del anti-GD2 a los gangliósidos GD3 y GD2 mediante la técnica ELISA reveló la especificidad de este únicamente por el GD2 (Figura Anexa 2). Posteriormente, se analizó la presencia en linfocitos T CD4+ en reposo y activados de los gangliósidos GD1b y GT1b. No se observaron cambios importantes en la presencia de estos gangliósidos durante la activación (datos no mostrados).

Silenciamiento de la $\beta 4GALNT1$ en linfocitos T CD4+ naive humanos.

Con base en la expresión diferencial de gangliósidos observada previamente, hipotetizamos que la activación induce la sobreexpresión de la GM2/GD2 sintasa para sintetizar el gangliósido GD2 a partir de GD3 y posiblemente otros gangliósidos como GA2, GM2 y GT2 (Figura 3). La neoexpresión de GD2 y su colocalización sugiere que podría tener un papel funcional importante durante la activación. Realizar un ensayo de la pérdida de un solo gangliósido no es posible sin afectar la presencia de otros. Para entender la función de estos gangliósidos, se evaluó el efecto de la reducción de la expresión génica del gen $\beta 4GALNT1$, que codifica para la GM2/GD2 sintasa, durante la activación de las células T CD4+ humanas. Mediante el uso de un sistema lentiviral comercial se realizó el silenciamiento de la $\beta 4GALNT1$ mediado por tres diferentes shRNAs específicos (Santa Cruz Biotechnology). Los linfocitos T CD4+ naive fueron incubados 12 h con los vectores lentivirales ($\beta 4GALNT1$ shRNA shRNA, mock shRNA y CopGFP shRNA) con una multiplicidad de infección (MOI) de 2,5 y posteriormente lavados con medio. Después de un proceso de recuperación en medio completo, los linfocitos T CD4+ silenciados se separaron en condiciones de reposo y de estimulación en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28. A las 72 h.p.a., se

realizó un análisis de la expresión del mRNA de *β4GALNT1* mediante PCR punto final y PCR tiempo real (Figuras 15A y 15B). Se observó que la expresión del gen *β4GALNT1* disminuye 80 % en los linfocitos T CD4+ activados silenciados con el vector *β4GALNT1* shRNA, en comparación con los a linfocitos T CD4+ activados con el control shRNA mock, que contiene shRNAs inespecíficos (Figura 15B). Se evaluó también que la eficiencia de traducción con las partículas lentivirales fuera igual de eficientes, en linfocitos en reposo o activados, y se observó que después de 72 h de incubación en presencia o ausencia de estímulos de activación, cerca del 80 % de linfocitos transducidos con el vector control CopGFP en reposo y activados expresaban de manera estable el gen que codifica para la proteína control CopGFP (Figura 15C). Por otro lado, se determinó mediante citometría de flujo el cambio en la cantidad de proteína GM2/GD2 sintasa en linfocitos mock shRNA y *β4GALNT1* shRNA T CD4+ activados (Figura 15D). Se observó que el silenciamiento en linfocitos *β4GALNT1* shRNA T CD4+ activados produjo una reducción del 40 % en la cantidad de GM2/GD2 sintasa respecto a los linfocitos mock shRNA T CD4+ activados.

A partir de estas observaciones, se procedió a analizar el efecto de la reducción de la expresión del gen *β4GALNT1* shRNA (80 %) y de la proteína GM2/GD2 sintasa (40 %) durante la activación de los linfocitos T CD4+ para determinar el papel funcional que tiene el incremento de la expresión de la GM2/GD2 sintasa en la activación (Figura 16). Se analizó la expresión del marcador de activación temprana CD69 mediante citometría de flujo a partir de 40 000 linfocitos T CD4+ activados (Figura 16A). Se observó que el 100 % de los linfocitos T CD4+ activados tanto mock como silenciados expresan CD69 (datos no mostrados).

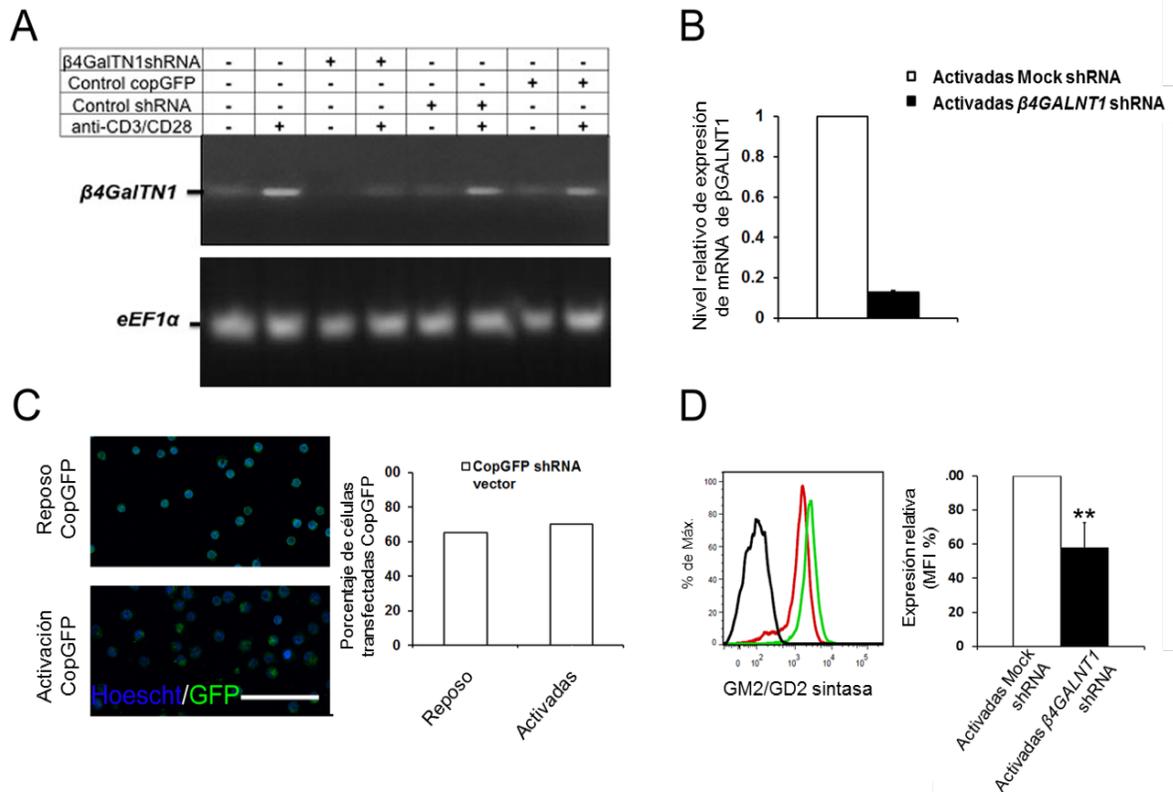


Figura 15. Validación del silenciamiento de la $\beta 4GALNT1$ (GM2/GD2 sintasa) en linfocitos T CD4+. (A) Análisis por PCR semi-cuantitativo para determinar la expresión del gen $\beta 4GALNT1$ con referencia a la expresión del gen interno $eEF1\alpha$ en linfocitos T CD4+ naive en reposo y activados transducidos con mock shRNA, control CopGFP shRNA, $\beta 4GALNT1$ shRNA o solo en presencia del vehículo *polybrene*. (B) PCR tiempo real para $\beta 4GALNT1$ en linfocitos T CD4+ activados transducidos con Mock shRNA o $\beta 4GALNT1$ shRNA a las 72 horas post-activación (h.p.a.). La expresión relativa del gen es expresada como veces de cambio normalizada a la expresión del gen control interno $eEF1\alpha$. Los datos son la media y su desviación estandar de tres experimentos independientes. (C) Determinación de la eficiencia de transducción mediante microscopia confocal de linfocitos T CD4+ en reposo y activados previamente trasducidos con el vector CopGFP shRNA teñidos con Hoechst 33342 para identificar los nucleos. Microscopia confocal laser (Olympus) bajo el objetivo 60 X, la barra de escala respresneta 50 μ m. (D) Ensayo de citometría de flujo para determinar la presencia de la GM2/GD2 sintasa en linfocitos Mock shRNA y $\beta 4GALNT1$ shRNA activados durante 24 h. Los histogramas muestran la IMF de los linfocitos T CD4+ teñidos con solo el anticuerpo secundario anti-conejo IgG acoplado a Alexa Fluor 647 (línea negra), linfocitos T CD4+ Mock shRNA activados teñidos con el anticuerpo anti-GM2/GD2 sintasa (línea verde) y linfocitos T CD4+ $\beta 4GALNT1$ shRNA activados teñidos con el anticuerpo anti-GM2/GD2 sintasa (línea roja). La gráfica de la derecha muestra la cuantificación de la IMF expresada como el

porcentaje de expresión relativa en linfocitos TCD4+ Mock shRNA y β 4GALNT1 shRNA activados para la GM2/GD2 sintasa. $**P < 0,01$, Los datos representan la media mas su desviación estandar de cinco experimentos independientes. Para el análisis estadístico en esta figura se realizó la comparación de la expresión de los genes en la condición silenciamiento con respecto al mock en la activación utilizando la prueba de *t*.

Sin embargo, la IMF de la unión del anticuerpo anti CD69 a células CD4+ silenciadas se redujo significativamente ($*P < 0.01$) un 20 % respecto a las células T CD4+ activadas tratadas con el shRNA mock. También se analizó la polarización del receptor TCR en linfocitos activados incubados previamente con el vehículo polybrene, con el vector mock shRNA y con el vector β GALNT1 shRNA (Figura 16B). Se observó mediante microscopía confocal que los linfocitos T CD4+ activados silenciados para la GM2/GD2 sintasa perdían la capacidad de formación de los microdominios del TCR, en comparación con los incubados solo con polybrene o mock shRNA (Figura 16B). La proliferación de los linfocitos T CD4+ es un mecanismo que se induce tras un evento de activación. Para evaluar si el silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa tiene un efecto sobre la proliferación de linfocitos activados, se realizó un ensayo MTT midiendo la formación de sales de formazán. Los linfocitos β GALNT1 shRNA T CD4+ activados proliferaron significativamente cerca de 40 % menos que los linfocitos mock shRNA T CD4+ activados en presencia de anti-CD3/anti-CD28 por 72 h (Figura 16C). La proliferación de los linfocitos T CD4+ tras la activación es inducida por el incremento en la expresión de la citocina proliferativa IL-2 y de su receptor IL-2r (CD25). Para determinar si la disminución en la proliferación de los linfocitos T CD4+ debida al silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa se debe a un efecto en el cambio de la expresión de los genes que codifican para la IL-2 y el IL-2r, se determinó el nivel de

expresión de *IL-2* y de *IL-2R* por PCR tiempo real en linfocitos *βGALNT1* shRNA T CD4+ y mock shRNA T CD4+ activados (Figura 16D). Se identificó que el nivel de expresión relativa expresado como Fold change de los genes *IL-2* e *IL-2R* disminuyó en los linfocitos *βGALNT1* shRNA T CD4+, en comparación a sus contrapartes activadas, pero no silenciadas mock shRNA T CD4+.

Finalmente, se evaluó la fosforilación de la proteína Zap-70, que participa en la cascada de activación mediada por las cadenas del CD3 y el receptor TCR durante la estimulación de los linfocitos T CD4+ con el fin de identificar parte de las proteínas de señalización blanco afectada durante el silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa. Mediante citometría de flujo se observó que la presencia de la proteína fosforilada ZAP-70 en linfocitos *βGALNT1* shRNA TCD4+ activados respecto a linfocitos mock shRNA T CD4+ activados fue 20 % y 40 % menor a las 6 y 12 h.p.a., respectivamente (Figura 16E). Esto demuestra la vía de señalización activada vía TCR está afectada cuando el linfocito T CD4+ activado no sobreexpresa el gen *βGALNT1*, que codifica para la GM2/GD2 sintasa responsable de la síntesis de gangliósidos.

Discusión de los resultados Parte I: Sialilación α 2,8 asociada a glicolípidos durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano

Como se describió en la sección introducción, previamente identificamos un incremento en la sialilación global del linfocito T CD4+ naive humano durante su activación. Esto nos llevó a hipotetizar que la presencia de Sia α 2,8 debía ser determinante para establecer este glicofenotipo.

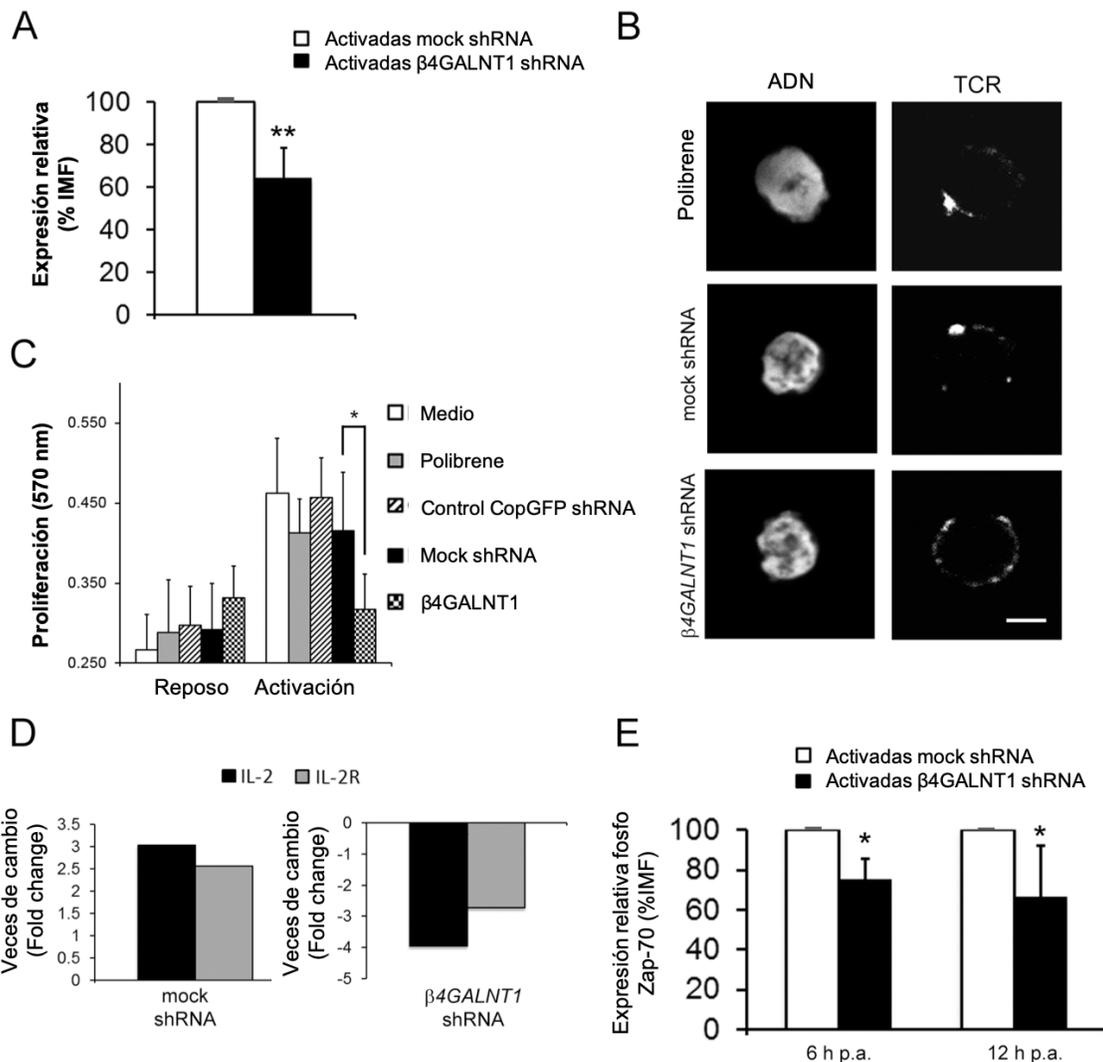


Figura 16. El silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa afecta la activación del linfocito T CD4+ naive humano. (A) Citometría de flujo para el análisis de la presencia del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD4+ mock shRNA activados y linfocitos T CD4+ β 4GALNT1 shRNA activados 24 h. La gráfica muestra la IMF expresada como expresión relativa (%). **P < 0.01. Se graficó el valor medio con desviación estándar de cinco experimentos independientes. (B) Linfocitos T CD4+ mock shRNA, incubados solo con el agente Polybrene o β 4GALNT1 shRNA activados por 24 h teñidos para determinar la presencia del TCR con anti-TCR humano acoplado a Alexa Fluor 647 y el colorante Hoechst 33342 fueron analizados mediante microscopia confocal con un microscopio Laser Olympus FV1000 bajo un objetivo de aceite 60x S/1.3 y una amplificación digital 2X. Datos representativos de tres experimentos independientes. La barra representa una escala de 2 μ m. (C) Análisis de la proliferación celular obtenido mediante un ensayo MTT en linfocitos T CD4+ naive en reposo y activados transducidos o no con los diferentes vectores lentivirales (solo medio, solo vehículo polybrene, mock shRNA, control copGFP shRNA y

βGALNT1 shRNA). El ensayo de proliferación fue determinado a las 72 h.p.a. después de un pulso con el reactivo MTT. *P <0.05. Los datos representan la media con su desviación estándar de tres experimentos independientes. (D) Expresión de los genes que codifican para IL-2 e IL-2r determinada por PCR tiempo real y expresada como veces de cambio en linfocitos T CD4+ mock shRNA (gráfica izquierda) y *βGALNT1* shRNA (gráfica derecha) activados por 72 h. Para la normalización de los datos, el Fold change de IL-2 y de IL-2r, los valores del mock shRNA activadas se calcularon respecto a los linfocitos mock shRNA en reposo, mientras que los valores de Fold change de estos genes medido en los linfocitos GM2/GD2 shRNA activados se compararon con respecto a los valores de los linfocitos T CD4+ mock shRNA activados. (E) Análisis por citometría de flujo de la presencia de la proteína Zap-70 fosforilada en linfocitos T CD4 mock shRNA y *βGALNT1* shRNA activados a 6 y 12 h.p.a. La gráfica muestra la IMF expresada como expresión relativa (%). *P <0.05. Los datos graficados corresponden a la media y su desviación estándar de cuatro experimentos independientes a 6 h.p.a. y cinco experimentos independientes a 12 h.p.a. Para el análisis estadístico en esta figura se realizó la comparación de la cantidad de proteína medida (CD69 y Zap-70) comparando la condición silenciamiento con respecto al mock en la activación utilizando la prueba de *t* y para la proliferación la prueba de ANOVA.

Para demostrar esto, la unión de anticuerpos anti-gangliósidos disialilados ($\alpha 2,8$) se evaluó mediante citometría de flujo y microscopía confocal (Figuras 9-13), así como la expresión génica de enzimas asociadas a esta sialilación (Figuras 8 y 11). Derivado de esto, se demostró que la activación mediada por el anticuerpo anti-CD3/anti-CD28 en el linfocito T CD4+ naive humano causa una sobreexpresión de la *ST8SIA1* que codifica para la enzima GD3 sintasa y de la *βGALNT1* que codifica para la GM2/GD2 sintasa, sustentando el potencial para expresar gangliósidos de la serie “b”, particularmente los gangliósidos GD3 y GD2. Se ha observado que la estimulación del TCR en timocitos de ratón induce la expresión de la GM2/GD2 sintasa (Takamiya et al., 1995), sin embargo, posterior a este trabajo no se ha reportado la presencia de GD2 en estas células. En este trabajo demostramos que la activación del linfocito T CD4+ induce el incremento en la cantidad del gangliósido GD3 en la superficie (Figura

9) y una neoexpresión del gangliósido GD2 (Figura 12). Estudios previos han caracterizado la presencia del gangliósido GD2 en linfocitos T CD4+ de periferia en pacientes con melanoma, linfocitos T CD4+ infectados con el virus HTLV-1 y en algunas líneas celulares tipo T (Hersey y Jamal, 1989; Furukawa, 1993.). Así mismo, otros estudios señalan que la estimulación de linfocitos T de periferia con concavalina A o anti-CD3/IL-1 induce un incremento en la presencia del gangliósido GD3, pero no de GD2 (Yamashiro et al., 1995). Una hipótesis para esta diferencia observada es que estos análisis que realizaron fueron con estímulos de activación diferentes a los realizados en este estudio, ya que dejaron 6 días de estimulación, lo que probablemente induce la desregulación del gangliósido GD2. Está comprobado que el uso de diferentes estímulos y tiempos de activación puede inducir respuestas diferenciales (Duarte, 2002; Butte, 2012; Pang, 2012). En este trabajo, se observó que el GD2 pero no el GD3 está presente desde las 3 h.p.a. y colocaliza con el TCR (Figuras 10 y 14). Se ha descrito previamente que la activación de linfocitos T CD4+ promueve la asociación de glicoesfingolípidos con colesterol promoviendo la formación de balsas lipídicas que son importantes para la polarización del TCR/CD3 y con ello una eficiente activación (Alonso y Millan, 2001; Giurisato et al., 2003, Janes et al., 2000). La formación de microdominios del TCR promueve también la eficiente proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD4+. Las balsas lipídicas reclutan moléculas asociadas a la señalización, como el correceptor CD4, la cinasa de leucocitos Lck, la proteína cinasa PKC θ y la proteína adaptadora LAT (Zhang et al., 1998; Ebert et al., 2000; Marmor y Julius, 2001; Pizzo y Viola, 2004; Pizzo et al., 2004). La disgregación de las balsas lipídicas por eliminación del colesterol con el inhibidor

M β CD afecta la polarización del TCR/CD3 y la secreción de citocinas (Blanket et al., 2005; Zhu et al., 2011; Zhong et al., 2013). En este trabajo evidenciamos un posible papel funcional del gangliósido GD2 en la polarización del TCR o en moléculas involucradas en la señalización, ya que el gangliósido GD3 podría tener un papel en la formación de microdominios con moléculas no relacionadas con la activación. De cualquier manera, el estudio del papel de los gangliosidos GD3 y de GD2 durante la activación resolvería muchas cuestiones asociadas al establecimiento de la sinapsis inmunológica. También sería interesante el estudio de las formas O-acetiladas de los gangliosidos GD3 y GD2 en el linfocito T CD4⁺ (Reivinen et al., 1994; Wipfler et al., 2011).

Para entender la función de los gangliosidos, asociada principalmente a la sobreexpresión de las enzimas que los sintetizan, se evaluó el efecto de la disminución en la expresión de la *β GALNT1*, que codifica para la GM2/GD2 sintasa responsable de la síntesis de GD2 y otros gangliósidos (Figura 3). En trabajos previos se ha observado que el ratón nulo para la GM2/GD2 sintasa muestra la pérdida completa de los gangliósidos complejos y solo expresa GM3, GD3 y GT3 (Takamiya et al., 1996). Este ratón GM2/GD2 sintasa^{-/-} muestra defectos en la señalización mediada por la citocina IL-2, debido probablemente a la deficiencia de los gangliósidos GM1/GD1b y GA1 (Takamiya et al., 1996). Sin embargo, no se reportaron defectos en la proliferación ni polarización del TCR. En otro reporte se señala que este ratón GM2/GD2 sintasa^{-/-} no tiene reducción en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ activados con anti-CD3/anti-CD28, en comparación al ratón GM3 sintasa^{-/-} que si reduce su proliferación y la secreción de IL-2 (Nagafuku et al., 2012). El

restablecimiento del fenotipo proliferativo de los linfocitos T CD4⁺ del ratón GM3 sintasa^{-/-} se logró tras la suplementación con los gangliósidos GM3, GM1a y GD1a, demostrando que estos gangliósidos son relevantes para la activación de los linfocitos T CD4⁺ de ratón (Nagafuku et al., 2012). En contraste a las observaciones en ratón, nuestros resultados muestran que tras la activación mediada por anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 de linfocitos T CD4⁺ naive humanos ocurre un incremento en la expresión de la GM2/GD2 sintasa y la neoexpresión del gangliósido GD2, el cual colocaliza con el TCR durante la activación (Figura 14). La reducción de la sobreexpresión de la GM2/GD2 sintasa por silenciamiento del gen *βGALNT1* mediado por shRNA en linfocitos T CD4⁺ humanos activados demostró que en humano la presencia de esta enzima y la probable producción de sus gangliósidos es esencial para el establecimiento eficiente de la polarización del TCR, la señalización mediada por Zap-70, la proliferación y la expresión de genes asociados a la producción de citocinas proliferativas como es IL-2 y su receptor IL-2r (Figura 17). Con base en esto, creemos que sería muy importante el estudio del papel funcional de los gangliósidos que son sintetizados por la GM2/GD2 sintasa, como son GA2, GA1, GM1b, GM2, GM1a, GD1a, GD2 y GD1b en la activación del linfocito T CD4⁺.

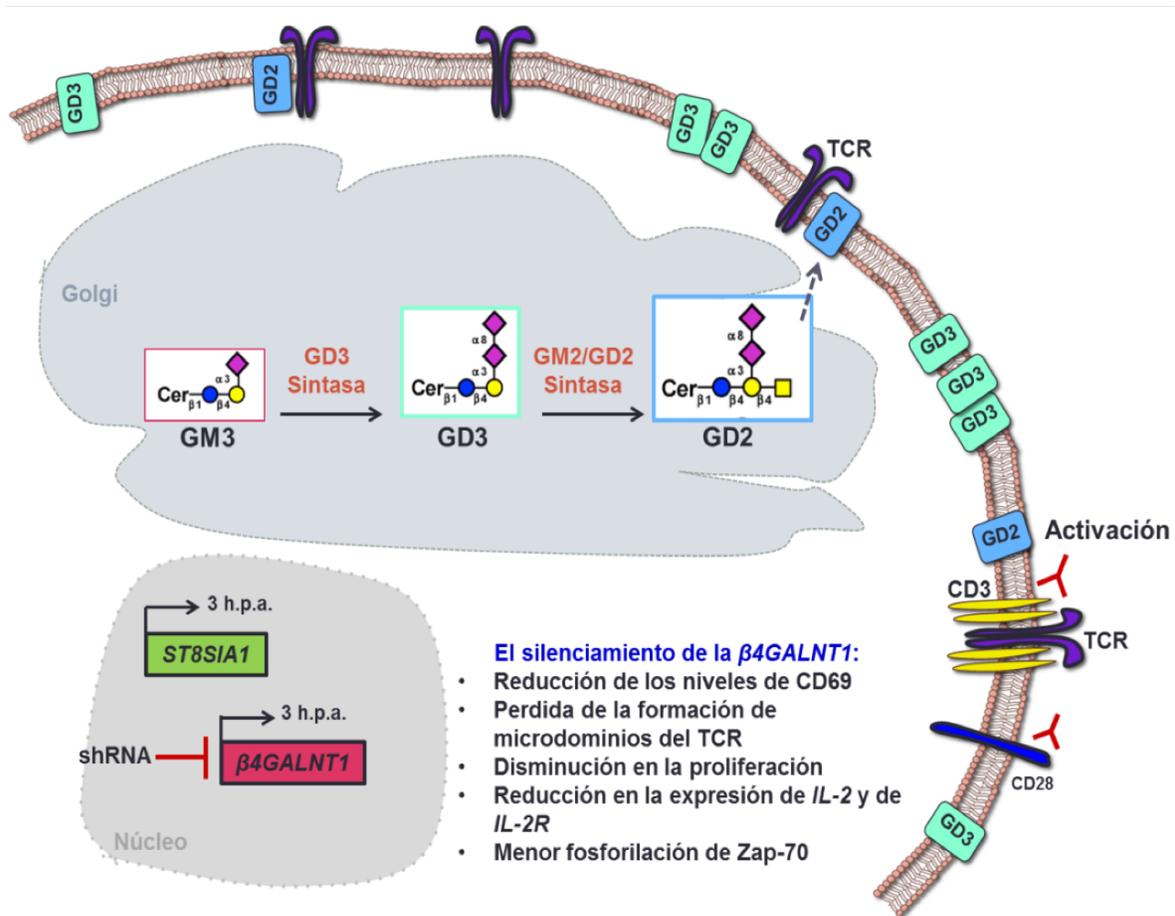


Figura 17. La expresión de la GM2/GD2 sintasa sustenta la eficiente activación del linfocito T CD4+ naive humano. La activación del linfocito T CD4+ naive humano está acompañada de la sobreexpresión en superficie del gangliósido GD3 y la expresión del gangliósido GD2. El gangliósido GD2 a diferencia del gangliósido GD3 colocaliza con el TCR durante la activación, lo que sugiere que podría participar en la polarización. El silenciamiento del gen $\beta 4GALNT1$ que codifica para la enzima GM2/GD2 sintasa en el linfocito T CD4+, responsable de la síntesis de GD2, conlleva a una disminución en la polarización del TCR y a una menor fosforilación de Zap-70, lo cual conduce a la reducción en la expresión de IL-2 y proliferación.

Conclusiones de los resultados parte I: Sialilación α 2,8 asociada a glicolípidos durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

1. Durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano, la *ST8SIAI* es sobreexpresada de las 3 a las 72 h.
2. El gangliósido GD3, producto de la actividad de la *ST8Sia I*, incrementa su presencia en la superficie de los linfocitos T CD4+ activados, en comparación con los niveles expresados en linfocitos T CD4+ en reposo.
3. El gangliósido GD3 forma microdominios durante la activación del linfocito T CD4+, pero no colocaliza con el TCR.
4. El gangliósido GD2 se neoexpresa en la superficie durante la activación del linfocito T CD4+ en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 y de PMA/Iono, en comparación con linfocitos T CD4+ en reposo.
5. La activación del linfocito T CD4+ naive induce la sobreexpresión del gen *β 4GALNT1* que codifica para la GM2/GD2 sintasa responsable de la síntesis del gangliósido GD2 a partir del gangliósido GD3.
6. El gangliósido GD2 colocaliza con el receptor TCR durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.
7. El uso del sistema lentiviral basado en shRNA para el silenciamiento del *β 4GALNT1* reprime la sobreexpresión del 80 % de la sobreexpresión del gen *β 4GALNT1* durante la activación del linfocito T CD4+ humano que promueve una disminución del 20 % en la cantidad del marcador CD69, del 20-40 % de Zap-70 fosforilada y una reducción de 4 y 3 veces la expresión de los genes *IL-2*, *IL-2r*

respectivamente, así como la pérdida de la proliferación y la polarización del TCR durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano.

8. La sobreexpresión del gen de la GM2/GD2 sintasa es esencial para la activación eficiente del linfocito T CD4+ naive humano.

Perspectivas Parte I.

La evidencia presentada en la primera parte de esta tesis sustenta que la expresión de gangliósidos con enlaces $\alpha 2,8$ es importante para la activación de los linfocitos T CD4+. Sin embargo, a pesar de evidenciar que estos tienen un papel funcional en estas células y debido a que el silenciamiento de la enzima $\beta 4GALNT1$ afecta la biosíntesis de diferentes gangliósidos, es necesario investigar la a detalle la contribución específica de cada gangliósido expresado en el linfocito T CD4+. Esto resultará complejo debido a que no es posible eliminar la expresión de un gangliósido de forma única, ya que la mayoría dependen de la expresión de la misma enzima. A pesar de ello, proponemos las siguientes perspectivas con el fin de enriquecer el conocimiento acerca del papel funcional de los gangliósidos:

1. Evaluar mediante la suplementación con gangliósidos derivados de la actividad de la GM2/GD2 sintasa en linfocitos T CD4+ activados silenciados para la $\beta 4GALNT1$.
2. Evaluar el efecto del silenciamiento de la ST8Sia I en la activación del linfocito T CD4+ humano.

3. Identificar la función particular de los gangliósidos en asociación a la maquinaria de recepción-señalización de la activación del linfocito T CD4+ a través de la suplementación en linfocitos T CD4+ silenciados.

Resultados Parte II: Sialilación α 2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naive humano.

Introducción. El ácido polisiálico.

El ácido polisiálico (PSA) es un homopolímero de ácido siálico unido en enlaces de tipo α 2,8 (α 2,8 Sia-Sia)_n que se ha encontrado como una modificación post-traducciona. En los seres humanos se sintetiza y se agrega a las glicoproteínas en el aparato de Golgi a través de la actividad de las enzimas polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV, miembros de la familia de sialiltransferasas ST8 (Mühlenhoff et al., 2001). El PSA se expresa en diferentes organismos, incluyendo el ser humano en donde participa en diferentes funciones biológicas. La principal función descrita del PSA es generar condiciones antiadhesivas a las glicoproteínas que lo contienen, debido principalmente a través de su alta carga negativa y estructura lineal. Por otro lado, también se ha identificado que el PSA puede actuar como un modulador de la señalización celular debido a que funciona como un reservorio de moléculas biológicas con base en su capacidad de almacenamiento hidrodinámico estructural (Kanato et al., 2008; Schnaar et al., 2014). Estas propiedades se han descrito asociadas a procesos como el desarrollo embrionario, el mantenimiento del sistema nervioso, metástasis en cáncer, así como en la regeneración de tejidos e incluso en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar y el autismo (Isomura et al., 2011).

A la fecha, se ha identificado un pequeño número de proteínas humanas modificadas mediante polisialilación, dentro de las que se encuentran las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV, la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje, la

integrina $\alpha 5$, el importador de ácidos grasos CD36, la molécula de neuropilina tipo 2 (NRP-2), la molécula de adhesión sináptica (SynCAM 1) y la molécula de adhesión de células neurales (NCAM) (Ahrens et al., 2011, Yabe et al., 2003, Mühlenhoff et al., 2013). De estas glicoproteínas identificadas como portadoras de PSA, la mejor caracterizada es la NCAM, una glicoproteína polisialilada por las dos polisialiltransferasas en sitios de *N*-glicosilación y que se expresa predominantemente durante la morfogénesis cerebral y el desarrollo de vertebrados (Figura 18) (Galuska et al., 2008; Oltmann-Norden et al., 2008). El PSA en la NCAM modula la adhesión en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, promoviendo la migración y la plasticidad en las células neurales (Nacher et al., 2013). La NCAM polisialilada también actúa como un depósito de factores neurotróficos, como BDNF y neurotransmisores, que tienen una influencia decisiva en su señalización (Seki et al. 1991; Burgess et al., 2008).

Por otro lado, la SynCAM 1 es una glicoproteína modificada con PSA cuya polisialilación depende la actividad de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV (Galuska et al., 2010; Rollenhagen et al., 2012). La presencia de PSA en SynCAM ayuda a su función como un inductor sináptico (Galuska et al., 2010). La polisialilación de SynCAM 1 elimina su adhesión homofílica, lo que indica que el PSA participa en la regulación de la interacción celular como ocurre con la NCAM (Werneburg et al., 2015).

En células no neurales, en particular las del sistema inmune, la expresión de una isoforma NCAM (CD56) se ha detectado en células asesinas naturales (NK). Sin embargo, la función del PSA presente en la NCAM de estas células no es clara todavía (Drake et al., 2008). En este sentido, en las células dendríticas maduras (CDm), se ha

descrito la expresión de la glicoproteína NRP-2 polisialilada, la cual no se expresa en monocitos inmaduros, precursores celulares de las CDm. A diferencia de la NCAM, la adición de PSA a la NRP-2 se produce en los sitios de O-glicosilación por la actividad únicamente de la ST8Sia IV (Rollenhagen et al., 2013). En CDm, la presencia de PSA en el NRP-2 facilita su migración al ganglio linfático (Curreli et al., 2007). En este sentido, los experimentos realizados en CDm donde la expresión de PSA se inhibe mediante el bloqueo con anticuerpos anti-PSA o se reduce con el silenciamiento del gen *ST8SIA/IV*, sugieren que el PSA de NRP-2 responde a un papel inmunorregulador negativo en la activación del linfocito T por CDm, ya que la reducción en su expresión provoca una mayor activación del linfocito T mediada por estas células (Rollenhagen et al., 2013).

Como se mencionó, los linfocitos T CD4⁺ cooperadores son el subconjunto de linfocitos T responsables de orquestar la respuesta inmune adaptativa a través de la secreción de citocinas tras su activación. En estudios previos demostramos la sobreexpresión de genes que codifican las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV en células T CD4⁺ humanas activadas (Villanueva et al., 2015). Sin embargo, la expresión de las glicoproteínas polisialiladas y la relevancia de la expresión de dichas polisialiltransferasas ST8 durante la activación de estas células todavía no se ha investigado. De acuerdo con la hipótesis planteada en este trabajo, donde sugerimos la posible presencia de sialilación α 2,8 en proteínas y con base en los resultados obtenidos previamente, se procedió a evaluar la potencial presencia de PSA en el linfocito T CD4⁺ naive humano.

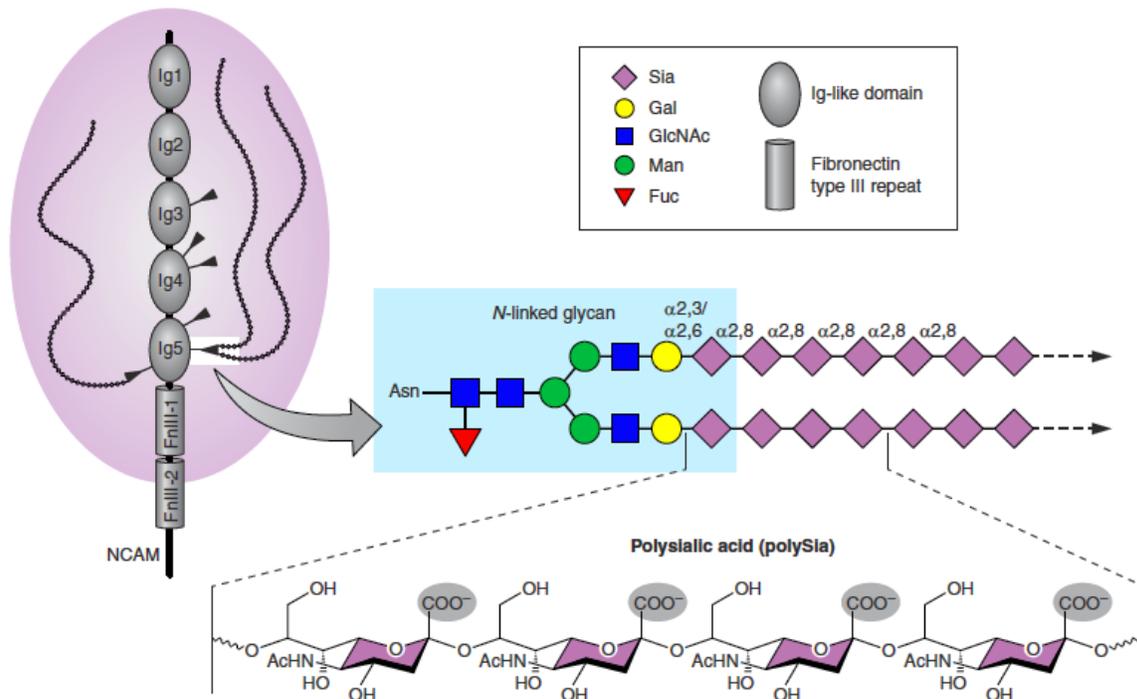


Figura 18. El PSA en la NCAM. Visualización de la síntesis del homopolímero PSA en la molécula NCAM que ocurre sobre N-glicanos. Los siltios de N-glicosilación asociados a polisialilación se encuentran en los dominios tipo inmunoglobulina (Ig) Ig3, Ig4, e Ig5. Las cadenas de PSA en la NCAM pueden contener más de 150 residuos de ácido siálico. La NCAM posee cinco dominios tipo Ig y dos dominios de integración a la membrana FnIII.

Resultados.

Los linfocitos T CD4+ humanos sintetizan PSA asociado a la sobreexpresión de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV

Linfocitos T CD4+ naive aislados de sangre periférica humana fueron activados en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 para determinar si la sobreexpresión génica observada previamente de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* está asociada a un incremento de la cantidad de proteínas de estas enzimas durante la activación. Para demostrar esto, la cantidad proteica de las ST8Sia II y ST8Sia IV fue determinada mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos policlonales anti-ST8Sia II humano y anti-ST8Sia IV humano en lisados totales de linfocitos T CD4+ en condiciones de reposo, así como a las 24, 48 y 72 h posterior a la activación. La presencia de las ST8 polisialiltransferasas, así como un incremento significativo en la cantidad de proteína durante la activación fue confirmada desde las 24 h.p.a. para la ST8Sia II (Figura 19A) y desde las 48 h.p.a. para la ST8Sia IV (Figura 19B). Las proteínas Erk 1 y Erk 2 (Erk 1/2) fueron utilizadas como control de carga mediante su detección con un anticuerpo monoclonal anti-Erk 1/2.

Debido a que se confirmó la expresión de las ST8 polisialiltransferasas, lo cual sustenta la síntesis potencial de PSA en el linfocito T CD4+, procedimos a detectar la presencia de PSA mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-PSA NCAM humano clona 12E3 (Sato et al., 1995), el cual reconoce PSA con un grado de polimerización ≥ 5 , es decir, reconoce moléculas de oligosialico (de cinco residuos de ácido siálico o mayores) y polisialico (con longitud mayor a 8 residuos de ácido siálico)

(Sato et al., 1995). La unión del anticuerpo anti-PSA 12E3 a lisados totales de linfocitos T CD4+ humanos en condiciones de reposo y activación a 24, 48 y 72 h fue determinada mediante Western blot (Figura 19C). Como se observa, proteínas de diferentes pesos moleculares son reconocidas por el anti-PSA 12E3, mostrando adicionalmente un perfil de similar de peso molecular de las proteínas reconocidas entre las condiciones de reposo y activación. Para determinar si el anti-PSA clona 12E3 reconoce específicamente PSA en los linfocitos T CD4+, lisados totales de linfocitos T CD4+ activados durante 72 h fueron tratados con la enzima endoreunaminidasa N (EndoN) derivada del bacteriófago K1. El análisis mediante Western blot (Figura 19D) muestra que la digestión con EndoN disminuye la unión del anti-PSA clona 12E3, por lo que confirma que el reconocimiento por las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ es específico.

Estos resultados demuestran que el linfocito T CD4+ humano expresa las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV, las cuales tras la activación incrementan su cantidad. Asociado a la presencia de las ST8 sialiltransferasas, PSA es sintetizado y unido a glicoproteínas de diferente peso molecular, cuya unión al anti-PSA 12E3 es específica.

La activación del linfocito T CD4+ naive induce la sobreexpresión y relocalización de PSA

Para caracterizar la expresión de PSA en el linfocito T CD4+ humano, la unión del anticuerpo anti-PSA clona 12E3 fue evaluada en linfocitos T CD4+ en reposo y activados a las 24, 48 y 72 h.p.a. mediante citometría de flujo (Figuras 20A y 20C).

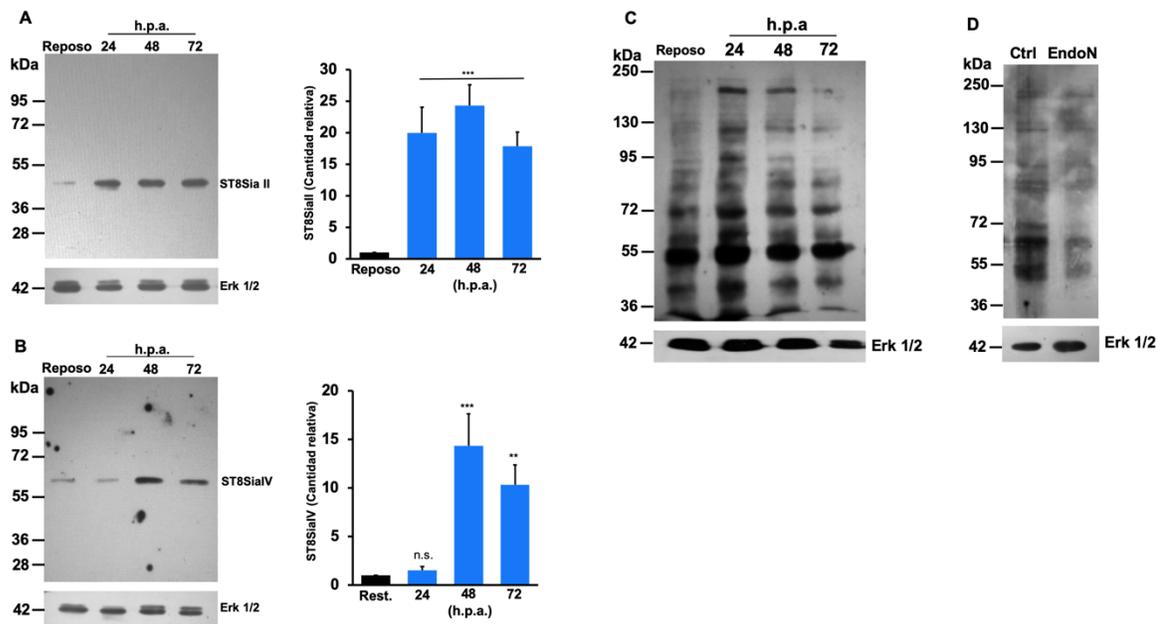


Figura 19. Identificación semicuantitativa de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV y proteínas polisialiladas en linfocitos T CD4+. (A y B) Se muestra un Western blot representativo de lisados totales obtenidos de linfocitos T CD4+ en reposo y activados de las 24, 48 y 72 h. Se incubaron anticuerpos policlonales conejo IgG anti-ST8Sia II y anti-ST8Sia IV. La expresión en cada condición fue comparada usando Erk 1/2 como control de carga seguido. El análisis estadístico de (A y B) fue calculado usando la prueba de t comparando los diferentes tiempos de activación con respecto a la condición reposo. $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$. (C) Análisis de Western blot de extractos proteicos de linfocitos T CD4+ en reposo y activados a las 24, 48 y 72 h, incubados con el anticuerpo monoclonal anti-PSA 12E3. El complejo inmune fue visualizado utilizando un anti-ratón IgM acoplado a peroxidasa. La expresión en cada condición fue comparada usando Erk 1/2 como control de carga. (D) WB de anti-PSA 12E3 sobre lisado total de linfocitos T CD4+ activados 72 h no incubado (Ctrl) e incubado (EndoN) con la endoneuraminidasa N durante 1h o 12 h a 37 C. La expresión de cada condición fue comparada usando Erk 1/2 como control de carga.

El análisis mostró que no todos los linfocitos en reposo unen el anticuerpo anti-PSA (denominada población de células PSA-) y que el porcentaje de linfocitos T CD4+ positivos para la unión del anti-PSA (denominada población de células PSA+) varía a través de los diferentes donadores (Figura 20A). Tras la activación en los tres tiempos muestreados, ocurre un incremento significativo del porcentaje de linfocitos T

CD4+PSA+ así como de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de dicha subpoblación PSA+ (Figura 20A y 20B). Siendo el incremento a las 24 h.p.a. del 18% (111 IMF), a las 48 h.p.a. del 22% (153 IMF) y a las 72 h.p.a. del 20% (148 IMF). Este resultado comprueba que no solo existe la presencia de PSA en linfocitos T CD4+ naives, sino que también existe un incremento de PSA asociado a la activación.

Adicionalmente, se evaluó la unión y localización mediante microscopia confocal del anti-PSA clona 12E3 a la superficie de los linfocitos T CD4+ en condiciones de reposo y de 72 h de activación (Figura 20C). La tinción y análisis demostró que la presencia de PSA en linfocitos T CD4+ durante el reposo está asociada a un perfil de tipo agregado o en forma de “*clusters*”, el cual, posterior a la estimulación se modifica generando un fenotipo disperso (Figura 20C). Este resultado demostró que el reconocimiento del anti-PSA en la superficie de los linfocitos T CD4+ está asociado a proteínas cuya localización es dinámica entre las condiciones reposo y activación.

Para caracterizar el papel de la expresión de las polisialiltransferasas en la síntesis de PSA en el linfocito T CD4+, se realizó un análisis de citometría de flujo en células en reposo y activadas de las 72 h utilizando los anticuerpos anti-PSA clona 12E3 y los anticuerpos policlonales anti-ST8Sia II y anti-ST8Sia IV (Figura 21). Se observó que la mayoría de los linfocitos T CD4+ en reposo expresan las ST8Sia II o ST8Sia IV (T CD4+ST8Sia II+ o T CD4+ST8Sia IV+) y posterior a la activación ocurre un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4+ST8Sia II+ pero no de ST8Sia IV+ (Figura 21A y 21B). La IMF de la unión a la ST8Sia II y ST8Sia IV incrementó significativamente posterior a la activación (Figuras 21C y 21D).

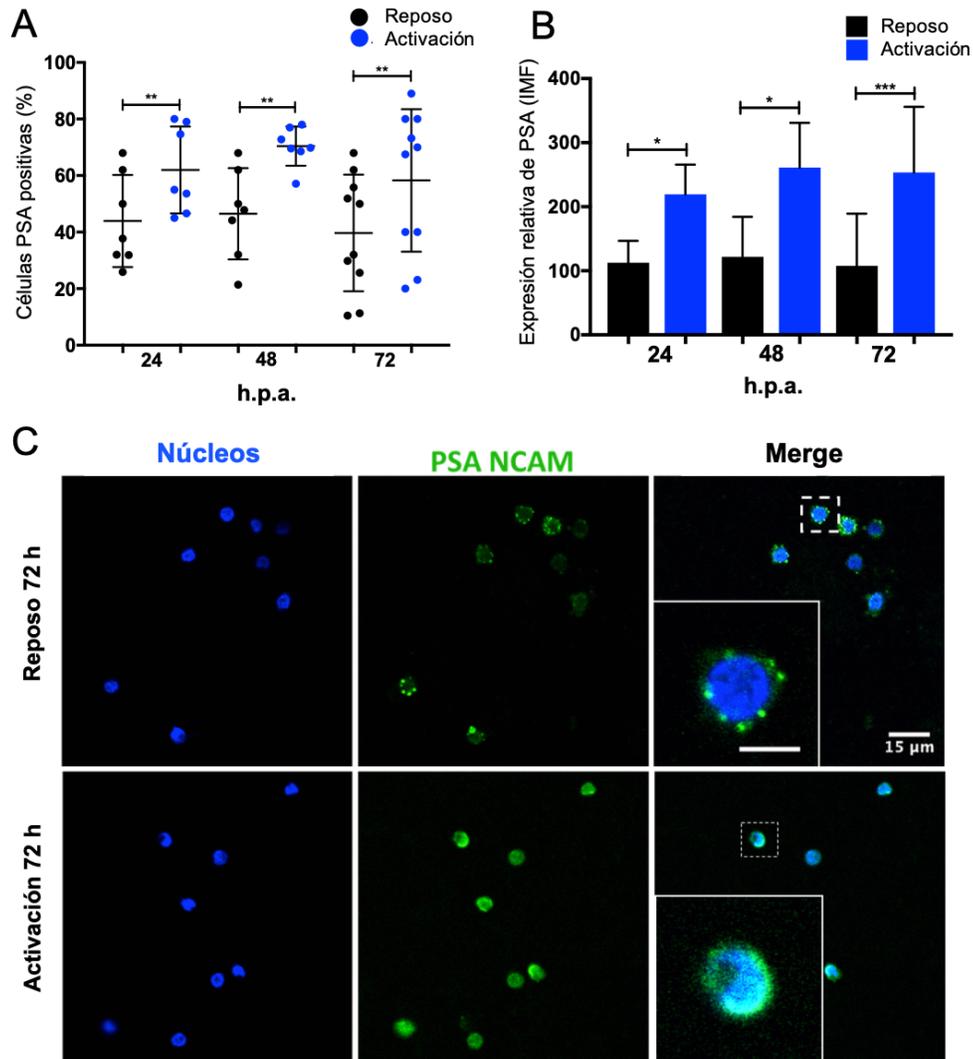


Figura 20. La expresión y distribución de PSA es modificada por la activación.

(A) Análisis de citometría de flujo. Porcentaje de linfocitos T CD4+ que unen el anti-PSA 12E3 en condiciones de reposo (puntos negros) y activación durante 24, 48 y 72 h (puntos azules). (B) Intensidad media relativa de fluorescencia (IMF) de la unión del anti-PSA 12E3 a linfocitos T CD4+ naïves en condiciones de reposo (barra negra) y activados (barra azul) durante 24, 48 y 72 h. Para (B) se muestra la media de fluorescencia fue normalizada y expresada como expresión relativa (%). El análisis estadístico de (A y B) fué calculado usando la prueba de *t* comparando los diferentes tiempos de activación con respecto a la condición reposo. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$ y * $P < 0.5$. Los datos graficados representan media con desviación estándar de siete experimentos independientes. (C) Microscopia confocal de PSA y núcleos en linfocitos TCD4+ naïve en reposo y activados 72 h. Los linfocitos fueron teñidos con anti-PSA clona 12E3 seguido de la incubación con anti-ratón IgM acoplado a ficoeritrina (verde)

así como Hoechst 33342 para visualizar el ADN (azul). La localización de PSA fue determinada mediante microscopia confocal con un microscopio confocal láser Olympus FV1000 (Olympus, Miami, FL) con un objetivo de aceite 60X S/1.3 y aumento digital de 2X. Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala correspondiente a 15 μm .

De manera interesante, un alto porcentaje de linfocitos T CD4+ activados son positivos para ambas ST8 silaliltransferasas, pero no son positivos para PSA (Figura 21E y 21F), lo que sugiere que no todas las células expresan PSA reconocido por el anti-PSA clona 12E3 a pesar de expresar las enzimas.

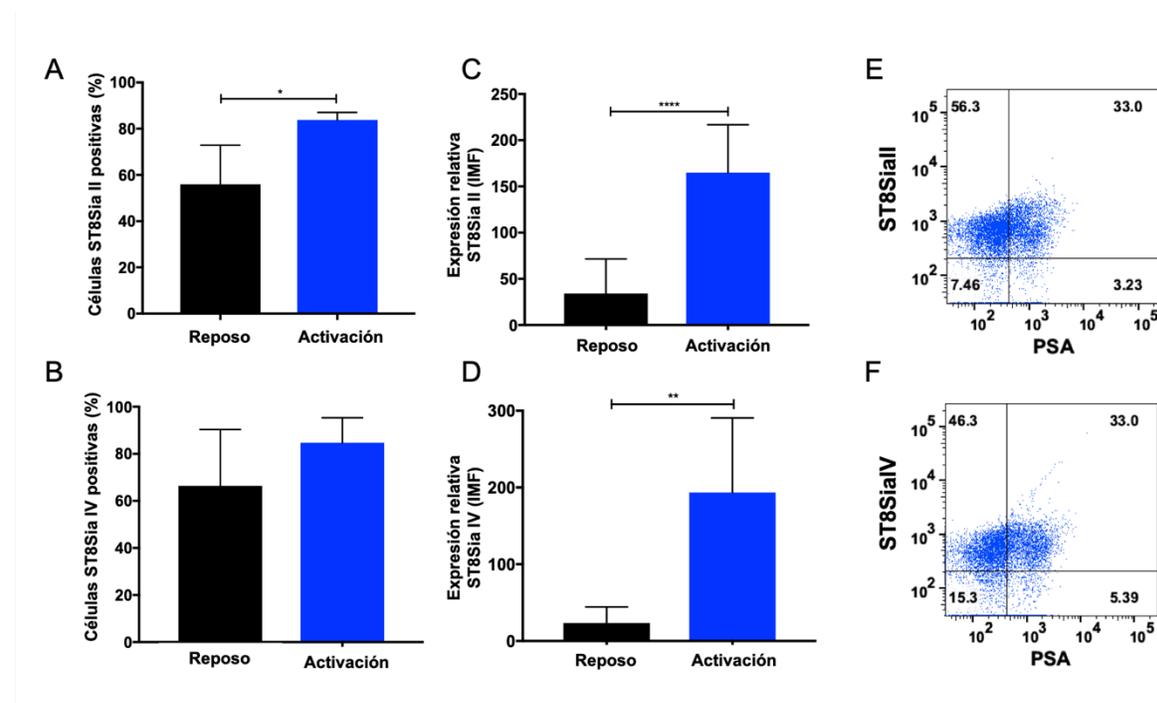


Figura 21. Las enzimas polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8sia IV incrementan durante la activación del linfocito T CD4+. Análisis de citometría de flujo para determinar la unión de los anticuerpos anti-ST8Sia II y anti-ST8Sia IV a linfocitos T CD4+ de las 72 h.p.a. (A y B) Porcentaje de linfocitos T CD4+ positivos para la unión de los anticuerpos anti-ST8 en condiciones de reposo (barra negra) y de activación (barra azul) a las 72 h. (C y D) La gráfica muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) para la unión de los anticuerpos anti-ST8Sia II y anti-ST8Sia IV en condiciones de reposo (barra negra) y activación (barra azul). La IMF fue normalizada y expresada como expresión relativa (%). El análisis estadístico de A-D fué calculado usando la prueba de *t* comparando la condición activación con respecto a la condición reposo. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. Los datos representan la media \pm la desviación

estándar de siete experimentos independientes. (E y F) Gráficas de puntos de linfocitos T CD4+ activados positivos para PSA y la ST8Sia II o la ST8Sia IV de un resultado representativo de cuatro experimentos independientes.

El silenciamiento génico de las ST8Sia II y ST8Sia IV polisialiltransferasas induce la sobreexpresión de genes asociados a la activación.

Para determinar el papel funcional de las ST8Sia II y ST8Sia IV en la activación del linfocito T CD4+, se realizó el silenciamiento génico mediado por shRNA de ambas enzimas. Mediante el silenciamiento génico mediado por shRNA a través de un vector lentiviral y seguido de la activación durante 72 h en presencia de los mAbs anti-CD3/anti-CD28, se observó una reducción de la expresión de los genes codificantes para la *ST8SIAII* en más del 90% (Figura 22A) y la *ST8SIAIV* cerca del 60% medido por PCR tiempo real (Figura 22B). Los niveles proteicos medidos mediante Western blot de las ST8Sia II y ST8Sia IV confirmaron la reducción de estas enzimas posterior al silenciamiento de dichos genes en linfocitos T CD4+ activados silenciados con shRNA *ST8SIAII* o shRNA *ST8SIAIV* en comparación a linfocitos T CD4+ activados tratados con el control del silenciamiento, mock shRNA (Figuras 22C y 22D). Adicionalmente, se evaluó la unión del anti-PSA clona 12E3 a lisados derivados de linfocitos T CD4+ activados de las 72 h silenciados para las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV*. Puede observarse que el silenciamiento de ambas enzimas polisialiltransferasas reduce claramente la unión del anticuerpo anti-PSA clona 12E3 a las proteínas expresadas en el linfocito T CD4+ (Figura 23), lo que confirma la especificidad del anticuerpo, así como el efecto funcional del silenciamiento sobre la síntesis de PSA al tiempo que muestra una contribución similar de cada ST8 polisialiltransferasa en la síntesis de dicho polímero.

Para evaluar la contribución funcional de las ST8 polisialiltransferasas en la polisililación del linfocito T CD4+ y el papel funcional del PSA en la activación de estas células, se realizaron mediciones a las 72 h a través de PCR tiempo real de los genes asociados a la activación, como interferón-gama ($IFN-\gamma$), una citocina efectora producida después de la constante estimulación antigénica en el linfocito T CD4+ naïve (Yu et al., 2014), la interleucina-2 (IL-2), y el receptor de la IL-2 (IL-2R) (Wei et al., 2013). Se determinó una sobreexpresión 4 veces mayor de $IFN-\gamma$ en linfocitos T CD4+ 72 h activados silenciados para la *ST8SIAII* y de 4.8 veces en linfocitos activados silenciados para la *ST8SIAIV* en comparación con linfocitos T CD4+ activados tratados con mock shRNA (Figura 22E). De forma inesperada, el gen *IL-2* se sobreexpresó 25 veces más en el silenciamiento de la *ST8SIAII* y 4.5 veces en el silenciamiento de la *ST8SIAIV* en comparación a la condición mock-shRNA (Figura 22F). Mientras que la expresión del *IL-2R* incrementó 2 veces y 3 veces en los silenciamientos de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* respectivamente, en comparación al mock shRNA (Figura 22G). Estos resultados demuestran que la reducción de la sobreexpresión de los genes codificantes para las ST8Sia II y ST8Sia IV polisialiltransferasas induce una sobreexpresión anormal de los genes asociados a la activación, por lo que demuestra que están involucrados en la regulación de esta.

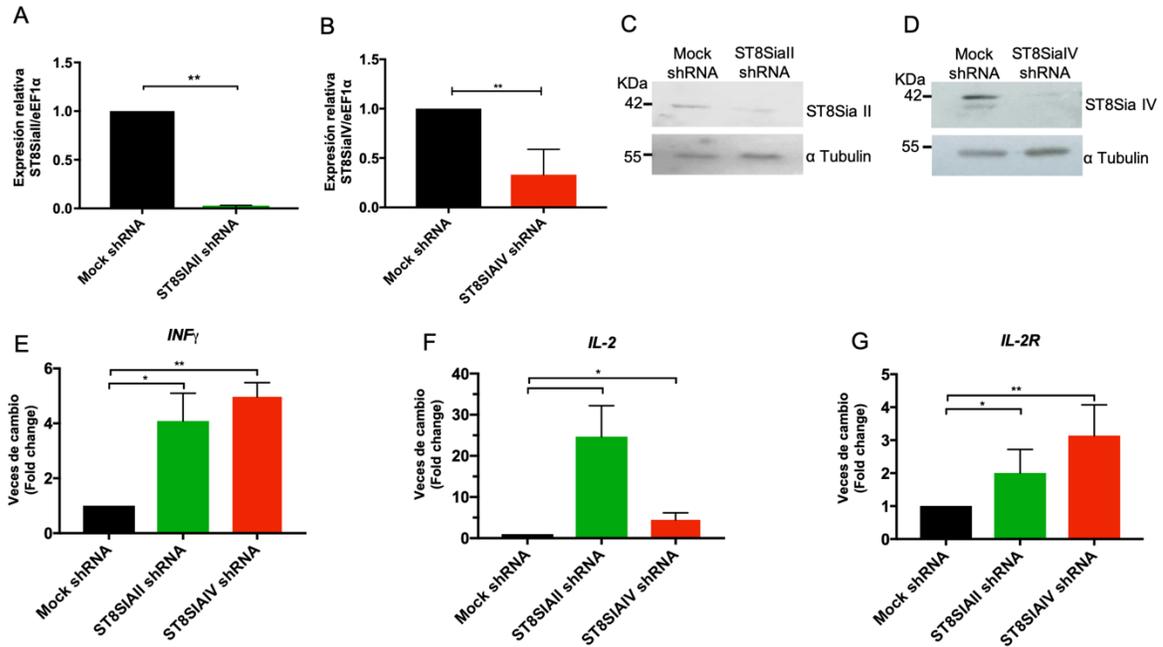


Figura 22. El silenciamiento de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV reduce expresión de PSA de linfocitos T CD4+ causando una hiperactivación. (A) y (B) Expresión relativa en linfocitos T CD4+ activados 72 h de los genes *ST8SiaII* y *ST8SiaIV* posterior al silenciamiento génico específico de cada polisialiltransferasa (barra verde o roja) comparada con linfocitos T CD4+ activados tratados con mock shARN (barras negras) determinada mediante PCR tiempo real. Para la normalización de los datos, la expresión relativa de las *ST8SiaII* y *ST8SiaIV* comparada con el mock shARN fué calculada por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ normalizada con respecto a la expresión del gen interno eEF1α. **P<0.001. Las gráficas muestran la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. (C) y (D) Análisis de Western blot de extractos proteicos de linfocitos T CD4+ de 72 h.p.a en condiciones mock-shARN y silenciadas para las *ST8SiaII* o *ST8SiaIV*, revelado con los anticuerpos policlonales anti-ST8Sia II y anti-ST8Sia IV. La expresión en cada condición fue comparada usando α -tubulina como control de carga, que es reconocida por el anticuerpo ratón anti-tubulina IgG. Western blot representativo de tres experimentos independientes. (E, F, G) Expresión de ARNm de IFN- γ , IL-2 y IL-2R expresada como veces de cambio fue determinada mediante PCR tiempo real en linfocitos T CD4+ activados incubados con la condición mock-shARN (barras negras) o con el silenciamiento específico para la *ST8SiaII* (barra verde) o *ST8SiaIV* (barra roja). La expresión fue normalizada como se describió previamente. El análisis estadístico del cambio en la expresión de los genes *ST8SiaII*, *ST8SiaIV*, IFN- γ , IL-2 e IL-2R fué calculado usando la prueba de *t* comparando la condición silenciamiento con respecto a la condición mock en linfocitos activados 72 h. *P<0.05, **P<0.001. Datos representativos de tres experimentos independientes.

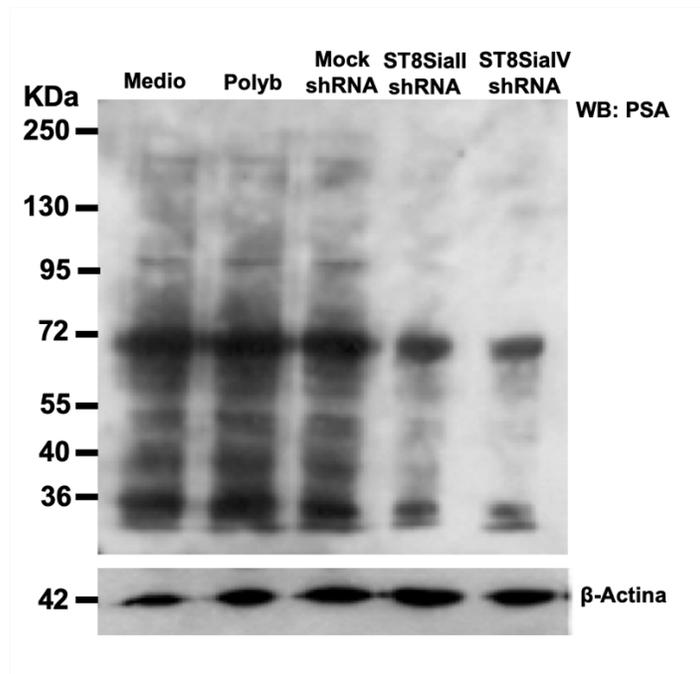


Figura 23. El silenciamiento de las ST8Sia II y ST8Sia IV reduce la expresión de PSA durante de la activación.

Análisis mediante Western blot de lisados totales obtenidos de 100 000 linfocitos T CD4+ a las 72 h.p.a. Las condiciones medio, polibrene, mock shRNA, ST8SIAII shRNA y ST8SIAIV shRNA fueron analizadas para la unión con el anticuerpo ratón IgM anti-PSA clona 12E3. Para revelar se utilizó el anticuerpo secundario anti-ratón IgM acoplado a la peroxidasa de rabano. La expresión en cada condición fue comparada usando β actina como control de carga.

Discusión de los resultados Parte II: Sialilación α 2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naive humano.

Estudios previos sugirieron la expresión de las ST8Sia II y IV en linfocitos T CD4+ de ratón sin describir la presencia de PSA en estas células (Comelli et al., 2006). En este trabajo se demostró que ocurre polisilación en los linfocitos T CD4 + y que está asociada a diferentes glicoproteínas, mediada por la expresión de las ST8Sia II y ST8Sia IV. La desregulación de las ST8Sia II y ST8Sia IV mediante el silenciamiento génico mejora la activación de estas células, lo que sugiere un posible papel negativo

del PSA en la activación de los linfocitos T CD4+. Como se mencionó previamente, durante la activación del linfocito T CD4+ naive humano en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 se observó que las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* se sobreexpresan. Debido a que no se ha descrito la presencia de glicoproteínas polisialiladas en el linfocito T CD4+ resulta interesante determinar si la expresión de estas dos ST8 sialiltransferasas está asociada a la presencia de glicoproteínas polisialiladas.

El PSA es el homopolímero del carbohidrato ácido siálico que es sintetizado por las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV, las cuales pueden realizar esta actividad de forma diferencial en diferentes especies, desde las bacterias hasta el humano (Angata et al., 2002; Burgess et al., 2008; Oltmann-Norden et al., 2008; Schnaar et al., 2014). En la primera parte de este trabajo describimos que la expresión de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* se encuentra incrementada después de la activación de los linfocitos T CD4+ naives humanos (Villanueva et al., 2015). Asociado a esta sobreexpresión génica, identificamos el correspondiente incremento en la cantidad de proteínas mediante la técnica de Western blot, donde encontramos que las células en reposo tienen ST8Sia II y ST8Sia IV (Figura 21 A y 21B), y su expresión se incrementa con la activación los tiempos 24, 48 y 72 h.

También demostramos que existe un cambio significativo en el porcentaje de células que expresan las ST8Sia II, pero no de las que expresan la ST8Sia IV durante la activación de los linfocitos T CD4+, en comparación con sus contrapartes no activadas. Es importante resaltar que los porcentajes de pureza de linfocitos T CD4+ naives se encuentran entre 90-98% y que más del 80 % de células expresan el marcador de activación temprana CD69 (dato no mostrado). Se ha reportado que la

activación de los linfocitos T CD4+ naive es menos eficiente bajo las mismas condiciones que la de linfocitos T CD4+ de memoria. En este sentido, creemos que debido a la característica “naïve” de nuestras células podrían requerir mayores tiempos de estimulación o ser nuevamente activadas para poder obtener un mayor número de células positivas para la ST8Sia IV.

Debido a que en los estudios previos observamos que un incremento en la expresión de las ST8 polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV estaba asociado a la síntesis de PSA, evaluamos la presencia de este polímero en linfocitos T CD4+ naive humanos, la cual hasta la fecha permanecía sin descripción reportada. Para evaluar la expresión de PSA se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-PSA NCAM clona 12E3, que reconoce PSA en un grado de polimerización $DP \geq 5$ PSA (oligosiálico/polisiálico) (Sato et al., 1995). En este trabajo, demostramos mediante las técnicas de Western blot, citometría de flujo y microscopía confocal la presencia de PSA en linfocitos T CD4+ humanos usando el anti-PSA 12E3. Como se describió en las Figuras 19C y 20, los linfocitos T CD4+ en reposo expresan PSA. Si bien el porcentaje de células positivas y la cantidad de PSA incrementa tras la activación, es importante resaltar la presencia de dos poblaciones bien definidas de linfocitos T CD4+ que expresan PSA en condiciones de reposo (Figuras 21E y 21F), una población negativa (PSA_{neg}) y una población positiva (PSA_{pos}) que se detectaron durante el marcaje con el anti-PSA 12E3. Durante la activación, la población de células PSA_{neg} que contienen PSA incrementa, mientras que ambas poblaciones incrementan la cantidad de PSA. En vista de que el porcentaje de pureza de los linfocitos T CD4+ es suficiente para tener la certeza de la población con la cual se trabajó, proponemos que en realidad existen

dos poblaciones de linfocitos T CD4+, una ST8Sia II_{pos}PSA_{pos} con un porcentaje de 33 % y otra ST8Sia II_{pos}PSA_{neg} con un porcentaje de (56 %), así como dos poblaciones de linfocitos T CD4+, una ST8Sia IV_{pos}PSA_{pos} con un porcentaje de 33 % y otra ST8Sia IV_{pos}PSA_{neg} con un porcentaje de (46 %), esto sustentado en descripciones previas que demuestran la presencia de dos tipos de poblaciones de linfocitos T CD4+ naives, los cuales expresan o no el marcador CD31 (PECAM-1). La expresión de CD31 está asociada al envejecimiento del linfocito en circulación periférica, los linfocitos T CD4+ inmigrantes recientes de timo expresan CD31, mientras que los linfocitos con mayor tiempo en circulación detienen la expresión de CD31 incluso manteniendo la de CD45RA, marcador de células naïves (Kilpatrick et al., 2008). En este sentido, proponemos que en adición al marcador CD3, la presencia de PSA podría funcionar como un marcador adicional para identificar a estas dos poblaciones, además de tener un papel funcional, tanto en linfocitos T CD4+ naives como activados. Estos resultados aportan información relevante de estas células. Otros estudios deben abordar la razón por la cual otras células T CD4 +, que expresan ambas polisialiltransferasas, no sintetizan PSA, esto ocurre debido a enzimas inactivas, proteínas ausentes o cadenas de PSA no detectadas por el mAb 12E3. Curiosamente, se ha demostrado que los timocitos de ratones ST8Sia IV -/- nulos no pueden acceder al timo para su maduración, lo que sugiere que el PSA también podría participar en los procesos de migración en las células T CD4 + (Drake et al., 2009).

Adicional a estos hallazgos, demostramos que el PSA y las glicoproteínas que lo portan en la superficie de los linfocitos T CD4+ poseen una localización dinámica durante los estadios de reposo y activación de estas células (Figura 20C). En condiciones de reposo, el PSA está localizado en *clusters* bien definidos, después de

la activación aparecen dinámicamente rearrreglados, sugiriendo que las proteínas polisialiladas podrían jugar un papel en la activación a través del rearrreglo de estructuras y la interacción de moléculas polisialiladas con otras que pudieran estarlo o no. Estudios previos realizados con interneuronas corticales GABAérgicas en cultivo, muestran que la NCAM y el receptor tirosin cinasa eprina-A5 interaccionan de forma heterofílica, formando *clusters* en la superficie celular a través de la inducción con Efrina-A5, ligando de este receptor (Sullivan et al., 2016). A través de esta unión, la NCAM promueve la autofosforilación de este receptor y la activación de la GTPasa RhoA, demostrando un papel de la NCAM en la activación de la señalización de EphA3 a través del aglomeramiento (Sullivan et al., 2016). En este contexto, resultaría muy importante estudiar cómo participa la polisialilación de glicoproteínas en el linfocito T CD4+ a través de la interacción con otras moléculas o receptores de forma homofílica o heterofílica.

Derivado de este trabajo y debido a que es la primera vez que se reporta la presencia de PSA en linfocitos T CD4+ naive humanos de sangre periférica, es importante acceder a la especificidad del reconocimiento del anticuerpo utilizado para el reconocimiento de este polímero en estas células. Estudios detallados de la especificidad del reconocimiento de diferentes anticuerpos anti-PSA fue realizada previamente (Sato et al., 1995). Los autores demostraron que el perfil de reconocimiento de diferentes anticuerpos difiere poco, pero esta diferencia es crítica debido a su especificidad. El anticuerpo anti-PSA clona 12E3 evaluado en dichos trabajos corresponde al grupo II de la clasificación de anticuerpos “anti-oligosialico + PSA”, estos reconocen tanto di-sialico, oligosialico de $GP \geq 5$, así como también

cadena larga de PSA. En este trabajo, utilizamos la enzima endoneuraminidasa N (EndoN) para demostrar la especificidad de reconocimiento del anti-PSA 12E3 en los linfocitos T CD4+ (Figura 19D). La digestión enzimática de EndoN requiere para el reconocimiento y corte un mínimo de 5 residuos y hasta 8 residuos de ácido siálico, liberando como productos de la digestión polímeros de diferentes longitudes de ácido siálico (Colley et al., 2014). Pelkonen et al., (1989), demostró que las enzimas de un panel de bacteriófagos remueven predominantemente PSA con GP de 8 dispuestos en 3 residuos localizados en el extremo no-reductor y 5 residuos localizados en el extremo reductor de la molécula de PSA. De acuerdo con esto y a que se sabe que la EndoN digiere PSA con un $GP \geq 8$, se consideró que las moléculas de PSA reconocidas por el anticuerpo 12E3 serían digeridas por la enzima. Con base en esto, podemos afirmar que la especificidad de nuestro anticuerpo que las condiciones de digestión son correctas y suficientes para demostrar la unión del anticuerpo a PSA. Así mismo, demostramos que en el linfocito T CD4+ existe la presencia potencial de glicanos polisialilados con cadenas largas de PSA (Figura 19D). Adicionalmente en el laboratorio se han realizado otros experimentos para demostrar la especificidad del reconocimiento del anticuerpos anti-PSA 12E3 como son, la inhibición competitiva a través del uso de ácido colomínico, la digestión con EndoN en células en cultivo, así como la digestión con la enzima PNGasa F para determinar si la polisialilación está asociada a *N*-glicanos (datos no mostrados). En conjunto al silenciamiento de las ST8Sias, estos hallazgos resultan importantes, ya que revelan la posible presencia de PSA con $GP \geq 8$ en estas células, el cual podría estar asociado a un remodelamiento

del sialofenotipo en su superficie que podría participar en procesos celulares asociados al reposo o activación de estas células.

En este sentido, se sabe que la función del PSA está dada principalmente por la naturaleza de sus cadenas y por la enzima polisialiltransferasa que las sintetiza. Recientemente se ha demostrado que la NCAM polisialilada sintetizada por las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV tiene dos propiedades funcionales diferentes. El PSA sintetizado por la ST8Sia II tiene características de repulsión sobre otras moléculas de PSA, pero de atracción en moléculas como BDNF y el factor de crecimiento de los fibroblastos 2 (FGF2). En contraste, el PSA sintetizado por ST8Sia IV muestra solo las propiedades atrayentes en otras moléculas de PSA-NCAM, BDNF2 y FGF2. Se cree que la dualidad funcional del PSA en la NCAM se debe a la longitud de las cadenas, donde el ST8Sia IV sintetiza cadenas de PSA ligeramente más grandes que el ST8Sia II con un grado de polimerización de 35 residuos frente a 32 residuos, respectivamente.

En este trabajo se demostró, mediante el uso del anticuerpo anti-PSA clona 12E3, el reconocimiento de proteínas con diferentes pesos moleculares en linfocitos T CD4+ en reposo y activados (Figura 19C). Como se describió, la cantidad de estas proteínas incrementa posterior a la activación y los pesos moleculares que son revelados no varían con el tiempo, lo cual indica que las proteínas expresadas bajo condiciones de reposo y activación podrían ser las mismas. Cuando los extractos de proteínas fueron tratados con EndoN antes del análisis por Western blot, desapareció la unión del anticuerpo 12E3, determinando que efectivamente el anticuerpo reconoce cadenas de PSA en estas células. En células NK y de linaje neural la NCAM posee un peso

molecular de 150 kDa a 270 kDa (Angata et al., 2002). Dicho peso molecular es variable de acuerdo con el grado de polimerización del PSA, el cual a su vez puede cambiar en distintas condiciones celulares (Stamatos et al., 2014). La NRP-2 se ha detectado entre 130 y 180 kDa (Curreli et al., 2007). Por otro lado, la isoforma polisialilada de la SynCAM es detectada alrededor de los 110 kDa (Werneburg 2015). Mientras que la subunidad α del canal de sodio se detecta en los 250 kDa en extractos (Zuber et al., 1992). Con base en estos reportes, se puede observar que los pesos moleculares detectados por Western blot en este trabajo (Figura 20C) son similares a los reportados para algunas proteínas, en este sentido es necesario identificar si las proteínas detectadas en linfocitos T CD4+ con el anti-PSA 12E3 corresponden a las previamente ya identificadas.

Se realizó en linfocitos T CD4+ en reposo y activados un estudio preliminar mediante ensayos de qPCR de la expresión de los genes *NCAM* y *NRP-2* codificantes para la NCAM y la NRP-2 respectivamente. Se observó que *NCAM* no se expresa en estas células, mientras que *NRP-2* se expresa durante la activación (Figura anexa 3). Esto sugiere que la proteína con un peso cercano a 150 kDa reconocida por el anti-PSA clona 12E3 podría ser la NRP-2 con un peso molecular reportado de 142 kDa. En el futuro resultará interesante el estudio de la potencial presencia y función de NRP-2 en el linfocito T CD4+.

En este trabajo se determinó la presencia de PSA en el linfocito T CD4+ y adicionalmente se estudió la función de este PSA y la relevancia de la sobreexpresión de las ST8Sia II y ST8Sia IV a través de su silenciamiento génico (Figura 24). Observamos que la unión del mAAb anti-PSA se suprimió de manera similar al silenciar

cualquiera de las dos enzimas (Figura 23). Esto demuestra que la polisialilación de las glicoproteínas ocurre por la actividad de ambas enzimas. Como se mencionó previamente, la NCAM, la NRP-2 y la SynCAM 1 son polisialiladas de forma específica por las ST8Sia II y ST8Sia IV bajo diferentes condiciones. En esta idea, tendrían que identificarse las proteínas correspondientes a los diferentes pesos moleculares, con el fin de verificar la dependencia enzimática de cada una de ellas, puesto que resulta interesante el hecho de que ambas enzimas participen en la polisialilación global.

Adicional a estos hallazgos, se demostró que el silenciamiento de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* aumenta la expresión de los genes *IFN γ* , *IL-2* e *IL-2R*, codificantes de citocinas estrechamente asociadas a la activación. Si bien, el silenciamiento de cada gen produce un perfil similar en la pérdida de PSA, determinado por la unión del anti-PSA 12E3 (Figura 23), la expresión de *IFN γ* e *IL-2R* fue mayor en las células silenciadas para *ST8SIAIV* en comparación con las células silenciadas para *ST8SIAII* (Figuras 23E y 23G), y la expresión de *IL-2* en las células silenciadas para *ST8SIAII* fue mayor con respecto a las células silenciadas con *ST8SIAIV* (Figura 23F). Esto indica que el PSA sintetizado por cada polisialiltransferasa podría tener un papel diferencial en la activación. Como anteriormente se advirtió, las polisialiltransferasas pueden sintetizar PSA de diferentes longitudes y con papeles funcionales diferenciales. Así, el PSA sintetizado por la ST8Sia II participaría en la respuesta mediada por IL-2. Estos datos indican que el PSA expresado en células T CD4 + está involucrado en la modulación de la activación, aparentemente tiene un papel en evitar una respuesta exacerbada (Figura 24). Otros estudios deben abordar el papel de las proteínas PSA + y las vías involucradas en esta modulación. Estudios previos han

sugerido la participación del PSA expresado en células dendríticas maduras en la regulación de la activación de los linfocitos T CD4+ a través de la inhibición mediada por EndoN o el bloqueo por anticuerpos anti-PSA (Curreli et al., 2007).

Consideramos que este estudio contribuye al avance del conocimiento con respecto a una expresión no identificada previamente y el papel funcional del PSA en células T CD4 + naïve humanas, un tipo de glicosilación que se ha demostrado, sin excepción, que modula la función celular.

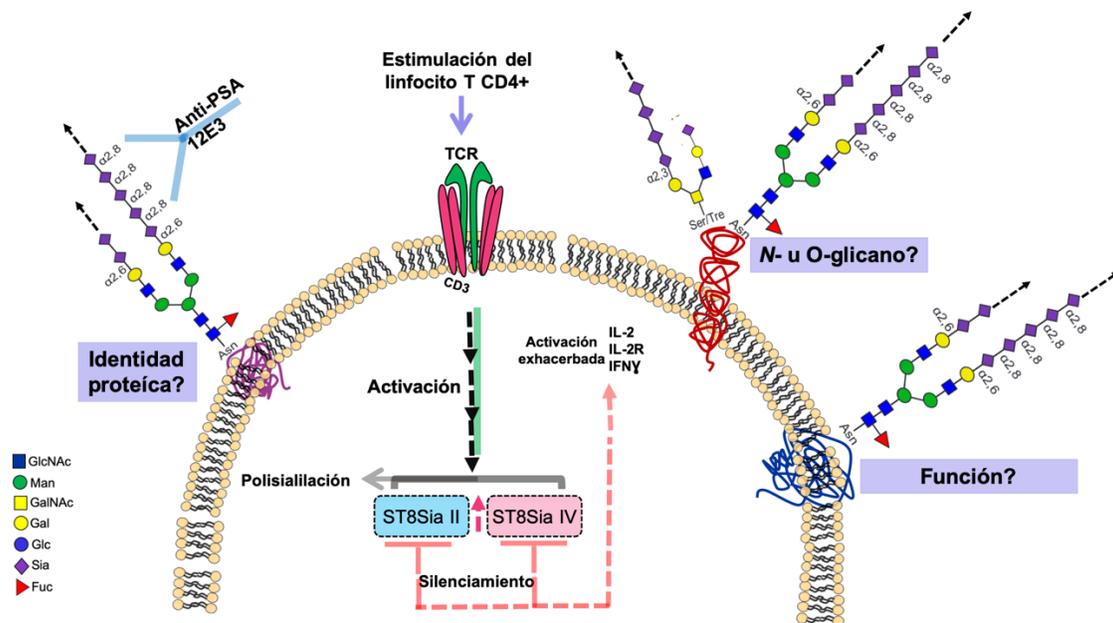


Figura 24. La sobreexpresión de las ST8Sia II y ST8Sia IV sustenta la polisialilación del linfocito T CD4+ naivo y regula la expresión de genes asociados a la activación. La activación del linfocito T CD4+ naivo humano induce la sobreexpresión de las polisialitrasferasas ST8Sia II y ST8Sia IV causando el incremento en la presencia de PSA en glicoproteínas aún no identificadas. El silenciamiento de los genes que codifican para estas enzimas induce una hiperactivación determinada por el aumento en los genes que codifican para las citocinas IL-2 e IFN γ y el receptor de IL-2. La expresión de ambas polisialitrasferasas, así como su actividad podría estar asociada a la regulación de la activación. La identidad de las proteínas polisialiladas, la función de estas y la asociación del PSA a N- u O-glicosilación son cuestionamientos que aun quedan por investigar.

Conclusiones de los resultados. Parte II: Sialilación α 2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naïve humano.

1. La activación del linfocito T CD4+ naïve humano induce la sobre expresión de los genes y proteínas polisialiltransferasas ST8SialII y ST8SialIV.
2. Los linfocitos T CD4+ en reposo y activados expresan proteínas polisialiladas reconocidas por el anticuerpo anti-PSA NCAM clona 12E3.
3. La expresión de PSA en superficie está localizada en forma de *clusters*, mientras que la activación conduce a la reorganización de estas estructuras.
4. El silenciamiento de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* induce una sobre-expresión de *IL-2*, *IL-2r* y de *IFN γ* en linfocitos T CD4+ activados.
5. La polisialilación de las proteínas detectadas por WB esta afectada durante el silenciamiento de las *ST8SIAII* y *ST8SIAIV*.

Perspectivas Parte II.

En el presente trabajo se encontró evidencia de que existe sialilación de tipo α 2,8 en glicoproteínas del linfocito T CD4+ naïve humano, y que dicha polisialilación está asociada a la activación. Sin embargo, aún se desconoce la identidad de estas glicoproteínas, el tipo de glicosilación al que está asociado el PSA y el grado de polimerización del PSA en cada proteína. Por ello, planteamos que en el futuro resultaría muy importante abordar los siguientes aspectos para contribuir con la información derivada de este trabajo.

1. Identificar la identidad de las glicoproteínas reconocidas por el anticuerpo anti-PSA clona 12E3 utilizado en este trabajo para caracterizar la polisialilación.

2. Evaluar si el PSA en linfocitos T CD4+ PSA+ e asociado a *N*-glicanos y/o a *O*-glicanos.
3. Determinar la causa de la presencia de dos poblaciones en el análisis de PSA por citometría de flujo.
4. Evaluar el grado de polimerización de PSA en las glicoproteínas previamente identificadas, así como la contribución de cada polisialiltransferasa en la polimerización.
5. Identificar si los linfocitos T CD4+ que no son reconocidos por el anti-PSA 12E3 y que expresan las ST8Sia II y IV expresan otros grados de polimerización de PSA.

Bibliografía

Abbas A., Lichtman A. H. Elsevier, Health Sciences Division 2004. Inmunología celular y molecular.

Ahmadzadeh M, Hussain SF, Farber DL. 1999. Effector CD4 T Cells Are Biochemically Distinct from the Memory Subset: Evidence for Long-Term Persistence of Effectors In Vivo. *J Immunol*, 163:3053–3063.

Ahrens J, Foadi N, Eberhardt A, Haeseler G, Dengler R, Leffler A, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Leuwer M. 2011. Defective polysialylation and sialylation induce opposite effects on gating of the skeletal Na⁺ channel NaV1.4 in Chinese hamster ovary cells. *Pharmacology*, 87:311-317.

Alegre, M. L., Frauwirth, et al. 2001. “T-cell regulation by CD28 and CTLA-4”. *Nat Immun Rev* 1: 220-228.

Alonso M.A, and Millan J. 2001. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci*. 114: 3957-3965.

An HJ, Gip P, Kim J et al. 2012. Extensive determination of glycan heterogeneity reveals an unusual abundance of high mannose glycans in enriched plasma membranes of human embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 11:M111.010660-M111.010660.

Angata K, Suzuki M, Fukuda M. 2002. ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J Biol Chem*, 277:36808-36817.

Balamuth F, Brogdon JL, Bottomly K. 2004. CD4 Raft Association and Signaling Regulate Molecular Clustering at the Immunological Synapse Site. *J Immunol*, 172:5887–5892.

Baum LG, Derbin K, Perillo NL, Wu T, Pang M, and Uittenbogaart C. 1996. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J Biol Chem.* 271: 10793-10799.

Bi S, and Baum LG. 2009. Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta.* 1790: 1599-1610.

Bieberich E, Freischutz B, Liour SS, and Yu RK. 1998. Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphorylation. *J Neurochem.* 71: 972-979.

Blank N, Schiller M, Gabler C, Kalden JR, and Lorenz HM. 2005. Inhibition of sphingolipid synthesis impairs cellular activation, cytokine production and proliferation in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 71: 126-135.

Burgess A, Wainwright SR, Shihabuddin LS et al. 2008. Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Dev Neurobiol,* 68:1580–90.

Campbell CT, Sampathkumar SG, and Yarema KJ. 2007. Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. *Mol BioSys.* 3: 187-194.

Chatila T, Silverman L, Miller T, and Geha R, 1989. Mechanisms of T Cell Activation by the Calcium Ionophore Ionomycin. *The Journal of Immunology,* 143: 1283 – 1289

Comelli E.M., Sutton-Smith M, Yan Q, Amado M, Panico M, Gilmartin T, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Goldberg D, et al. 2006. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J Immunol.* 177: 2431-2440.

Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. 2007. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem*, 282:30346-30356.

Colley, Karen J, Ken Kitajima, and Chihiro Sato. 2014. Polysialic Acid: Biosynthesis, Novel Functions and Applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49/6. 498–532.

Daniels MA, Hogquist KA, and Jameson SC. 2002. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol*. 3: 903-910.

Dennis JW, Lau KS, Demetriou M et al. 2009. Adaptive Regulation at the Cell Surface by N-Glycosylation. *Traffic*, 10:1569–78.

Dozmorov MG, Guthridge JM, Hurst RE *et al.* 2010. A comprehensive and universal method for assessing the performance of differential gene expression analyses. *PLoS One*, 5:e12657.

Drake PM, Nathan JK, Stock CK, Chang PV, Muench MO, Nakata D. 2008. Polysialic Acid, a Glycan with Highly Restricted Expression, Is Found on Human and Murine Leukocytes and Modulates Immune Responses. *Journal of Immunology*, 181: 6850–58.

Drake PM, Stock CM, Nathan JK, Gip P, Golden KP, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, and Bertozzi CR. 2009. Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 11995-12000.

Dubey C, Croft M. 1996. Accessory molecule regulation of naive CD4 T cell activation. *Immunol Res*, 15:114.

Earl L a, Bi S, Baum LG. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 2010;285:2232–44.

Ebert PJ, Baker JF, and Punt JA. 2000. Immature CD4+CD8+ thymocytes do not polarize lipid rafts in response to TCR-mediated signals. *J Immunol.* 165: 5435-5442.

Furukawa K, Akagi T, Nagata Y, Yamada Y, Shimotohno K, Cheung NK, Shiku H, and Furukawa K. 1993. GD2 ganglioside on human T-lymphotropic virus type I-infected T cells: possible activation of beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase gene by p40tax. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 1972-1976.

Galuska SP, Oltmann-Norden I, Geyer H, Weinhold B, Kuchelmeister K, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Mühlenhoff M. 2006. Polysialic Acid Profiles of Mice Expressing Variant Allelic Combinations of the Polysialyltransferases ST8Sia III.

Galuska SP, Geyer R, Gerardy-Schahn R *et al.* 2008. Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *J Biol Chem.* 283:17–28.

Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff I, and others. 2010. Synaptic Cell Adhesion Molecule SynCAM 1 Is a Target for Polysialylation in Postnatal Mouse Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 22:10250–55.

Gasper DJ, Tejera MM, Suresh M. 2014. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol*, 34:121–46.

Giurisato E, McIntosh DP, Tassi , Gamberucci A, and Benedetti A. 2003. T cell receptor can be recruited to a subset of plasma membrane rafts, independently of cell signaling and attendant to raft clustering. *J Biol Chem.* 278: 6771-6778.

Goh JB, Ng SK. 2018. Impact of host cell line choice on glycan profile. *Crit Rev Biotechnol*, 38:851–67.

Haltiwanger RS, Lowe JB. 2004. Role of Glycosylation in Development. *Annu Rev Biochem.* 73:491–537.

Harduin-Lepers A., Vallejo-Ruiz V, et al. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83(8): 727-37.

Herdewijn P. 2005. *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*. Humana Pres.

Hersey P, and Jamal O. 1989. Expression of the gangliosides GD3 and GD2 on lymphocytes in tissue sections of melanoma. *Pathol.* 21: 51-58.

Isomura R, Kitajima K, Sato C. 2011. Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia. *J Biol Chem*, 286:21535-21545.

Janes PW, Ley SC, Magee AI, and Kabouridis PS. 2000. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Sem Immunol.* 12: 23-34.

Julien S, Bobowski M, Steenackers A, Le Bourhis X, Delannoy P. 2013. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells*, 2: 751-767.

Jury EC, Kabouridis PS, Flores-Borja F et al. 2004. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 113:1176–87.

Jury EC, Flores-Borja F, & Kabouridis PS. 2007. Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Seminars in cell & developmental biology*, 18(5), 608–615.

Kamala T. 2008. An Optimized Immunomagnetic Bead-based Negative Selection Protocol for CD4 T-cell Isolation from Mouse Lymph Nodes and Spleen. *Scand J Immunol*, 67:285–94.

Kanato Y, Kitajima K, Sato C. 2008. Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology*, 18:1044-1053.

Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Hultin LE, Hultin P, Hausne MA, Detels R. 2008. Homeostasis of the Naive CD4+ T Cell Compartment during Aging. *The Journal of Immunology*, 180:1499–1507.

Li Y, Chen X. 2012. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94:887–905.

Marmor MD, and Julius M. 2001. Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood*. 98: 1489-1497.

Mazzon C, and Viola A. 2007. From tango to quadrilla: current views of the immunological synapse. *Cell Adh Migr*. 1: 7-12.

Mühlenhoff M, Manegold A, Windfuhr M, Gotza B, and Gerardy-Schahn R. 2001. The Impact of N-Glycosylation on the Functions of Polysialyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 276-36: 34066–73

Mühlenhoff M, Rollenhagen M, Werneburg S, Gerardy-Schahn R, and Hildebrandt H. 2013. Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochem Res*. 38: 1134-1143.

Nacher J, Guirado R, and Castillo-Gómez E. 2013. Structural plasticity of interneurons in the adult brain: Role of PSA-NCAM and implications for psychiatric disorders. *Neurochem. Res*. 38:1122–1133.

Nagafuku M, Okuyama K, Onimaru Y, Suzuki A, Odagiri Y, Yamashita T, Iwasaki K, Fujiwara M, Takayanagi M, Ohno I, Inokuchi J. 2012. CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 336-342.

Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." *Cell* 126(5): 855-67.

Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H et al. 2008. Impact of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem*, 283:1463–71.

Park D, Brune KA, Mitra A et al. 2015. Characteristic Changes in Cell Surface Glycosylation Accompany Intestinal Epithelial Cell (IEC) Differentiation: High Mannose Structures Dominate the Cell Surface Glycome of Undifferentiated Enterocytes. *Mol Cell Proteomics*, 14:2910–21.

Pelkonen S, Pelkonen J, Finne J. 1989. Common cleavage pattern of polysialic acid by bacteriophage endosialidases of different properties and origins. *J Virol*, 63:4409 LP – 4416.

Pizzo P, Giurisato E, Bigsten A, Tassi M, Tavano R, Shaw A, and Viola A. 2004. Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol Lett*. 91: 3-9.

Pizzo P, and Viola A. 2004. Lipid rafts in lymphocyte activation. *Microbes and infection Institut Pasteur*. 6: 686-692.

Reglero, A., Bravo G., et al. (2007). “Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica.” *Anal. Real Acad. Nac Farm*.73(4): 833-871.

Reivinen J, Holthöfer H, Miettinen A. 1994. O-acetyl GD3 ganglioside in human peripheral blood T lymphocytes. *Int Immunol*. 6: 1409-1416.

Rollenhagen M, Buettner FFR, Reismann M, Jirno AC, Grove M, Behrens GM. 2013. Polysialic Acid on Neuropilin-2 Is Exclusively Synthesized by the Polysialyltransferase ST8SialIV and Attached to Mucintype O-Glycans Located between the B2 and c Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 22880–92

Ruan, Shutian, Mohan Raj, and Kenneth Lloyd, 1999. Relationship of Glycosyltransferases and mRNA Levels to Ganglioside Expression in Neuroblastoma and Melanoma Cells, *Journal of Neurochemistry*, 72/2 (1999), 514–21

Sato C, Kitajima K, Inoue S, Seki T, Troy II FA, Inoue Y. 1995. Characterization of the Antigenic Specificity of Four Different Anti-(α 2 \rightarrow 8-linked polysialic acid) Antibodies Using Lipid-conjugated Oligo/Polysialic Acids. *J Biol Chem*, 270:18923-18928.

Schauer, R. (2004). "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man." *Zoology (Jena)* 107(1): 49-64.

Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, and Hildebrandt H. 2014. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* 94: 461–518.

Seki T, Arai Y. 1991. Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat Embryol (Berl)*, 184:395–401.

Smith-Garvin JE, Koretzky GA, & Jordan MS. 2009. T cell activation. *Annual review of immunology*, 27, 591–619.

Stamatos NM, Zhang L, Jokilammi A et al. 2014. Changes in polysialic acid expression on myeloid cells during differentiation and recruitment to sites of inflammation: Role in phagocytosis. *Glycobiology*, 24:864–79.

Sullivan CS, Kumper M, Temple BS, Maness PF. 2016. The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Promotes Clustering and Activation of EphA3 Receptors in GABAergic Interneurons to Induce Ras Homolog Gene Family, Member A (RhoA)/Rho-associated protein kinase (ROCK)-mediated Growth Cone Collapse. *J Biol Chem*, 291:26262-26272.

Takamiya K, Yamamoto A, Yamashiro S, Furukawa K, Haraguchi M, Okada M, Ikeda T, Shiku H, and Furukawa K. 1995. T cell receptor-mediated stimulation of mouse

thymocytes induces up-regulation of the GM2/GD2 synthase gene. *FEBS Lett.* 358: 79-83.

Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, Fukumoto S, Haraguchi M, Takeda N, Fujimura K, et al. 1996. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 10662-10667.

Tani-ichi S, Maruyama K, Kondo N, Nagafuku M, Kabayama K, Inokuchi J, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Yagita H, Kawano S, and Kosugi A. 2005. Structure and function of lipid rafts in human activated T cells. *Int Immunol.* 17: 749-758.

Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, and Rabinovich GA. 2007. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol.* 8: 825-834.

Varki, A. 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2,1: 25-40.

Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3:97–130.

Varki, A., National Center for Biotechnology Information (U.S.), et al. 2009. *Essentials of glycobiology.* Cold Spring Harbor.

Villanueva-Cabello TM, Mollicone R, Cruz-Munoz ME, Lopez-Guerrero DV, Martinez-Duncker I. 2015. Activation of human naive Th cells increases surface expression of GD3 and induces neoexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. *Glycobiology*, 25:1454-1464.

Villanueva-Cabello TM, Martinez-Duncker I. 2016. Preparation of CD4+ T Cells for Analysis of GD3 and GD2 Ganglioside Membrane Expression by Microscopy. *JoVE*, e54569.

Wei L, Lin JX, Warren JL. 2013. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*, 38:13-25.

Werneburg S, Muhlenhoff M, Stangel M, Hildebrandt H. 2015. Polysialic acid on SynCAM 1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation. *Glia*, 63:1240-1255.

Wipfler D, Srinivasan GV, Sadick H, Kniep B, Arming S, Willhauck-Fleckenstein M, Vlasak R, Schauer R, Schwartz-Albiez R. 2011. Differentially regulated expression of 9-O-acetyl GD3 (CD60b) and 7-O-acetyl-GD3 (CD60c) during differentiation and maturation of human T and B lymphocytes. *Glycobiology*. 21: 1161-1172.

Yabe U, Sato C, Matsuda T, and Kitajima K. 2003. Polysialic acid in human milk: CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 278:13875–13880

Yamashiro S, Okada M, Haraguchi M, Furukawa K, Lloyd KO, Shiku H, and Furukawa K. 1995. Expression of alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene in human cancer cell lines: high level expression in melanomas and up-regulation in activated T lymphocytes. *Glycoconj J*. 12: 894-900.

Yu RK, Tsai YT, Ariga T, & Yanagisawa M. 2011. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides an overview. *Journal of oleo science*, 60(10), 537–544.

Yu SF, Zhang YN, Yang BY, Wu CY. 2014. Human memory, but not naive, CD4+ T cells expressing transcription factor T-bet might drive rapid cytokine production. *J Biol Chem*, 289:35561-35569.

Yu SF, Zhang YN, Yang BY et al. 2014. Human memory, but not naive, CD4+ T cells expressing transcription factor T-bet might drive rapid cytokine. *J Biol Chem*, 289:35561–9.

Zhang W, Tribble RP, and Samelson LE. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*. 9: 239-246.

Zhang, J., X. Xiao, et al. 2009. "Inhibitory receptors of the immune system: functions and therapeutic implications." *Cell Mol Immunol* 6(6): 407-14.

Zhang T, de Waard AA, Wuhrer M et al. 2019. The Role of Glycosphingolipids in Immune Cell Functions. *Front Immunol*, 10:90.

Zhong L, Zhang Z, Lu X, Liu S, Chen CY, and Chen ZW. 2013. NSOM/QD-based visualization of GM1 serving as platforms for TCR/CD3 mediated T-cell activation. *BioMed Res Int*. 2013: 276498.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol*, 28:445–89.

Zhu Y, Gumlaw N, Karman J, Zhao H, Zhang J, Jiang JL, Maniatis P, Edling A, Chuang WL, Siegel C, et al. 2011. Lowering glycosphingolipid levels in CD4+ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. *J Biol Chem*. 286: 14787-14794.

Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J. 1992. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem*, 267:9965-9971.

Anexos.

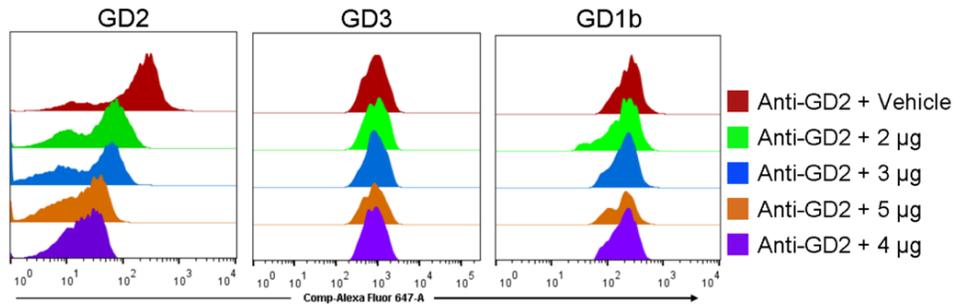


Figura anexa 1. Ensayo de competencia para el anticuerpo anti-gangliósido GD2.

Linfocitos T CD4+ naïve activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 24 h fueron teñidos para determinar la unión del anticuerpo anti-gangliósido GD2 (clona 14G2a), que fue incubado previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente con 2 µg (curva verde), 3 µg (curva azul), 4 µg (curva anaranjada) o 5 µg (curva morada) de di-sialogangliósido GD2 derivado de cerebro humano (Calbiochem), de di-sialogangliósido GD3 derivado de suero de leche de bovino (Santa Cruz Biotechnology), de di-sialogangliósido GD1b derivado de cerebro bovino (Enzo) o sin ningún gangliósido (curva marrón).

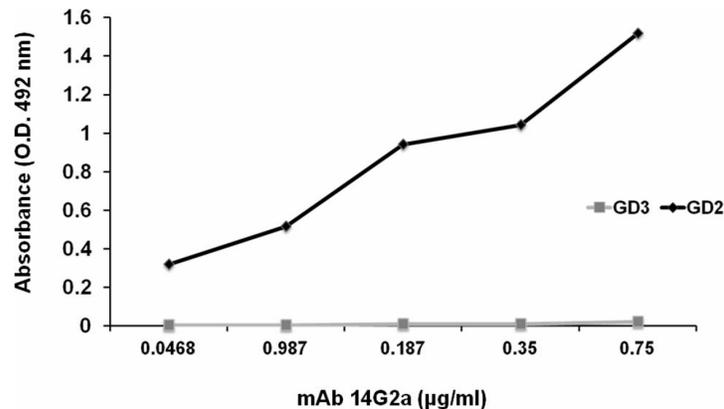


Figura anexa 2. Ensayo de ELISA para titular la unión del anticuerpo anti-gangliósido GD2 clona 14G2a a los gangliósidos GD3 y GD2.

La gráfica muestra la eficiencia de unión del anticuerpo anti-gangliósido GD2 al gangliósido GD3 (curva gris) y al gangliósido (GD2), que fueron previamente adheridos a la placa de ELISA. El anticuerpo anti-GD2 fue revelado con el secundario anti-ratón IgG conjugado a la peroxidasa de rabano (por sus siglas en ingles HRP).

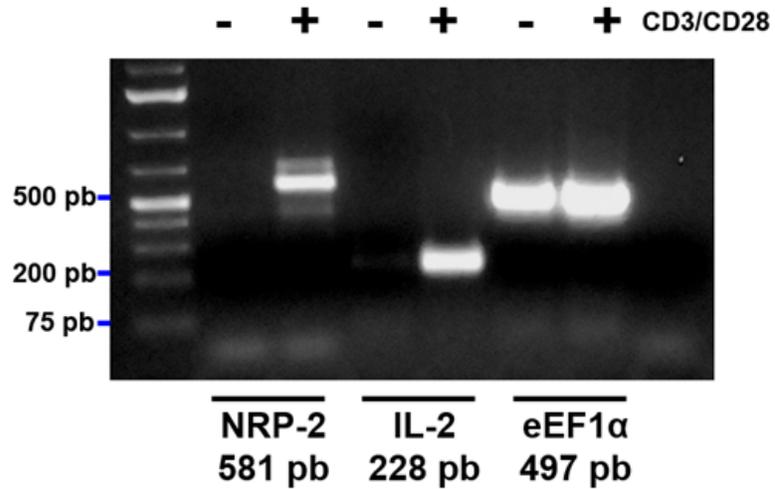


Figura anexa 3. NRP-2 es expresado en linfocitos T CD4+ en la activación, pero no en condiciones de reposo. Análisis mediante PCR semicuantitativo del gen NRP-2 en linfocitos T CD4+ en reposo y activados en presencia de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, así como el gen eEF1 α como gen de referencia. La figura es representativa de tres experimentos independientes.