



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POLISIALILADAS EN EL  
LINFOCITO T CD4+**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LYA DINORAH GUTIÉRREZ VALENZUELA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez  
[Centro de Investigación en Dinámica Celular](#)  
[Universidad Autónoma del Estado de Morelos](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich  
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Dr. Tomás David López Díaz  
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Cuernavaca, Morelos. Agosto, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 INSTITUCIONALES**

Agradezco el apoyo otorgado por las siguientes instituciones y laboratorios:

Universidad Nacional Autónoma de México.

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular, UAEM.

Red Temática de Glicociencia en Salud-CONACyT.

Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP), UNAM.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número de beca 888223.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, Cinvestav.

Este trabajo de investigación se realizó con el financiamiento CONACyT Ciencia  
Básica 282454.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez**, por ser mi tutor, por su tiempo y sobre todo por la confianza y el apoyo brindado a lo largo de todos estos años.

A los miembros de mi comité tutor, el **Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich** y el **Dr. Tomás David López Díaz**, por sus múltiples lecciones formativas y por sus aportaciones durante cada evaluación.

A mi grupo de trabajo, en particular a la **Dra. Tania Villanueva**, a la **Lic. Sandra Manrique**, a la **Dra. Kathya Gutiérrez**, a la **Dra. Roberta Salinas** y a la **Lic. Ana María González**, por compartirme sus conocimientos y siempre brindarme su ayuda.

A mis amigos, por escucharme y por las tantas aventuras. A **Sandra Manrique**, gracias por enseñarme el verdadero significado de la amistad.

A mi familia, **Yolanda Valenzuela**, **Laura Valenzuela**, **Luis Valenzuela**, por cuidar y encaminar mis pasos, pero sobre todo agradezco el obsequiarme la mayor riqueza que puede tener un ser humano, el amor.

Finalmente a **Emiliano Galindo**, **Farid Navarrete** y **Sugey Bravo** la vida nunca está completa sin un hermano.

*A mi madre Yolanda Valenzuela Aparicio, por su apoyo incondicional, su amor inagotable y su motivación. Por inspirarme e impulsarme constantemente, pero sobre todo por siempre creer en mí. Gracias por llevarme tomada de tu mano y de tu corazón hasta donde ahora me encuentro. Que la sabiduría, entrega y humildad que te caracterizan se vean reflejadas en este trabajo que has inspirado, tú eres el motor de esta gran aventura.*

**“Todo parece imposible, hasta que se hace”**

Nelson Mandela

## RESUMEN

La sialilación en proteínas es el proceso celular mediado por glicosiltransferasas, a través del cual se adicionan residuos del carbohidrato ácido siálico (Sia) en la posición terminal de las cadenas de los glicanos. La unión entre el Sia y su carbohidrato aceptor se forma a través de enlaces glicosídicos en configuración  $\alpha 2, 3$ ,  $\alpha 2, 6$  y  $\alpha 2, 8$ . Las sialiltransferasas de la familia ST8 son las enzimas responsables de la formación de este último tipo de enlace, el cual es el único que se puede formar entre los residuos de Sia y que además puede permitir la formación de polímeros como el ácido polisiálico (PoliSia).

El PoliSia al igual que el resto de los ácidos siálicos tiene como principal característica la presencia de una carga electronegativa, lo que le confiere propiedades biofísicas particulares a todas aquellas proteínas que lo portan. Varios reportes han evidenciado que la presencia de PoliSia en proteínas como la neuropilina-2 aumenta la capacidad de las células dendríticas para activar a los linfocitos T CD4+.

Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó por primera vez, que la activación *in-vitro* del linfocito T CD4+ naive desencadena un aumento en la síntesis de los genes que codifican para las sialiltransferasas ST8Sia I, ST8Sia II y ST8Sia IV, siendo la primera la responsable de adicionar Sia  $\alpha 2, 8$  en glicolípidos y el resto de adicionar Sia  $\alpha 2, 8$  en glicoproteínas.



El aumento de la expresión de la ST8Sia I, induce la sobreexpresión del gangliósido GD3 y la neoexpresión del gangliósido GD2, lo que sugiere que la activación del linfocito T CD4+ induce un incremento en la expresión de Sia  $\alpha$ 2, 8 no solo en lípidos, sino también en proteínas.

Para elucidar el efecto del aumento de la expresión de las sialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV el presente trabajo verificó que durante la activación del linfocito T CD4+ naive incrementa la expresión de las proteínas con Sia  $\alpha$ 2, 8. Estos hallazgos nos condujeron a determinar la identidad de dichas proteínas y nos permitieron reportar por primera vez que la Anexina A1 es una proteína polisialilada que se expresa en el linfocito T CD4+ activado.

Adicionalmente describimos que el silenciamiento de los genes ST8SIA2 y ST8SIA4 que codifican para la ST8Sia II y ST8Sia IV respectivamente, inducen la sobreexpresión de *IL-2*, *IL-2R* e *IFN*, lo que nos permitió reconocer que el PoliSia funciona como un regulador negativo durante la activación de estas células.

## SUMMARY

Sialylation in proteins is the cellular process mediated by glycosyltransferases, through which residues of sialic acid (Sia) are added to the terminal position of the glycan chains. Sia can be attached to the glycan through  $\alpha 2, 3$ ,  $\alpha 2, 6$  or  $\alpha 2, 8$  bonds. ST8 sialyltransferases are responsible for the formation of this last type of bond, which is the only one that can link several Sia residues and that allows the formation of polymers, such as polysialic acid (PolySia).

PolySia, like the rest of the sialic acids, has as its main characteristic the presence of an electronegative charge, which conveys particular biophysical properties to any protein that share this trait. Several reports have shown that the presence of PolySia in proteins such as neuropilin-2 increases the ability of dendritic cells to activate CD4 + T lymphocytes.

Recently, our research group reported for the first time, that in-vitro naive CD4 + T lymphocytes activation triggers an increase in the synthesis of genes that encodes for the sialyltransferases ST8Sia I, ST8Sia II and ST8Sia IV, the former being responsible for adding Sia  $\alpha 2, 8$  to glycolipids while the rest are adding Sia  $\alpha 2, 8$  in glycoproteins.

The increase in the ST8Sia I expression induces GD3 ganglioside overexpression and GD2 ganglioside neoexpression, which suggests that CD4 + T lymphocytes activation induces an increase in glycans bearing Sia  $\alpha 2, 8$ .

In order to elucidate the effect of increased ST8Sia II and ST8Sia IV sialyltransferases expression, the present work confirmed that during the naive CD4+ T lymphocytes activation, the expression of Sia  $\alpha$ 2, 8 proteins increased. These findings led us to determine the identity of such proteins and allowed us to report for the first time that Annexin A1 is a polysialylated protein that is expressed in activated CD4 + T lymphocytes.

Additionally, we describe that the silencing of the ST8SIA2 and ST8SIA4 genes, that code for ST8Sia II and ST8Sia IV respectively, induces a *IL-2*, *IL-2R* and *IFN $\gamma$*  overexpression, which allowed us to recognize that PolySia works as a negative regulator during activation of these cells.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
El sistema inmune .....	9
La activación del linfocito T CD4+.....	11
La glicosilación .....	16
La sialilación y el ácido siálico.....	17
Las proteínas polisialiladas.....	21
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>31</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
Objetivo general .....	34
Objetivos particulares .....	34
<b>ESTRATEGIA METODOLOGICA</b> .....	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana .....	36
Purificación de linfocitos T CD4+ naive.....	37
Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ naive .....	40

Activación <i>in-vitro</i> de los linfocitos T CD4+ naive .....	41
Lisis celular.....	42
Silenciamiento genético de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV .....	43
Extracción de RNA y PCR en tiempo real .....	44
Inmunoprecipitación de proteínas .....	47
Espectrometría de masas .....	51
Digestión enzimática con Endoneuraminidasa N (Deglicosilación) .....	57
SDS-PAGE y <i>western blots</i> .....	58
Análisis estadístico .....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
El linfocito T CD4+ humano activado expresa proteínas polisialiladas .....	62
El silenciamiento de la <i>ST8SIA2</i> y la <i>ST8SIA4</i> inducen la sobreexpresión de los genes asociados a la activación del linfocito T CD4+ .....	64
El linfocito T CD4+ activado y las células Molt-4 comparten un perfil de proteínas polisialiladas .....	69
Las células Molt-4 expresan Anexina A1 .....	73
El linfocito T CD4+ humano activado expresa Anexina A1 .....	77
Anexina A1 es una proteína susceptible a la digestión enzimática con Endoneuraminidasa N .....	78
<b>DISCUSIONES</b> .....	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>85</b>

<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>99</b>
Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ naive a través de citometría de flujo.....	99
Preparación de coomassie coloidal .....	100
Anexina A1 es una proteína reconocida con el mAb anti-PSA NCAM 12E3 .....	101

## ABREVIATURAS

---

<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>ANXA1</b>	Anexina A1
<b>CMP-Neu5Ac</b>	Citidín monofosfato- ácido 5- <i>N</i> -acetilneuramínico
<b>CMP-Neu5Gc</b>	Citidín monofosfato- ácido 5- <i>N</i> -glicolilneuramínico
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DP</b>	Grado de polimerización
<b>Endo-N</b>	Endoneuraminidasa N
<b>ES-MS/MS</b>	Espectrometría de masas por electrospray
<b>FAT</b>	Traslocador de ácidos grasos
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>ITAM</b>	Inmunoreceptor basado en tirosina
<b>Kdn</b>	Ácido 2-ceto-desoxinonulosónico
<b>Lck</b>	Proteína tirosin cinasa de leucocitos
<b>mA</b>	Miliampers

<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MHC II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
<b>NCAM</b>	Molécula de adhesión de células neurales
<b>Necl-2</b>	Molécula similar a nectina 2
<b>Neu</b>	Ácido neuramínico
<b>Neu5Ac</b>	Ácido 5- <i>N</i> -acetilneuramínico
<b>Neu5Gc</b>	Ácido 5- <i>N</i> -glicolilneuramínico
<b>NK</b>	Asesina natural
<b>NRP-2</b>	Neuropilina-2
<b>pAb</b>	Anticuerpo policlonal
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol bifosfato
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatidil inositol trifosfato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 cinasa
<b>PKB</b>	Proteína cinasa B
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PKD-1</b>	Proteína cinasa D-1
<b>PoliSia</b>	Ácido polisiálico
<b>SynCAM 1</b>	Molécula de adhesión sináptica 1
<b>TCR</b>	Receptor de células T



<b>Th</b>	Linfocito T cooperador
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador
<b>WB</b>	Western blot
<b>PoliSia</b>	Ácido polisiálico
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Sia</b>	Ácido siálico
<b>STs</b>	Sialiltransferasas
<b>SynCAM 1</b>	Molécula de adhesión sináptica 1
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th</b>	Linfocito T cooperador
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador
<b>WB</b>	Western blot

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La activación del linfocito T CD4+.

Figura 2. Estructuras químicas de la familia de los ácidos siálicos.

Figura 3. Molécula de adhesión de células neurales (NCAM).

Figura 4. Neuropilina-2 (NRP-2).

Figura 5. La activación del linfocito T CD4+ conduce al aumento de la expresión de los genes ST8SIA1, ST8SIA2 y ST8SIA4.

Figura 6. La activación del linfocito T CD4+ induce a la sobreexpresión del gangliósido GD3 y a la neoexpresión del gangliósido GD2.

Figura 7. Diglicosilación de proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+.

Figura 8. Silenciamiento de los genes ST8SIA2 y ST8SIA.

Figura 9. El silenciamiento de los genes ST8SIA2 y ST8SIA4 reduce la expresión de ácido polisiálico en las proteínas del linfocito T CD4+ activado.

Figura 10. El silenciamiento de los genes ST8SIA2 y ST8SIA4 conduce a la sobreexpresión de los genes asociados a la activación del linfocito T CD4+.

Figura 11. Las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ activado y de las células Molt-4.

Figura 12. Anexina A1 (ANXA1).

Figura 13. Anexina A1 es una proteína que se expresa en el linfocito T CD4+ activado y en las células Molt-4.

Figura 14. Anexina A1 es una proteína susceptible a la digestión con Endoneuraminidasa N.

Figura 15. ¿El ácido polisiálico será un posible regulador de la expresión de la IL-2?

Figura 16. Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ naive.

Figura 17. Anexina A1 es una proteína polisialilada.

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Proteínas polisialiladas.

Tabla 2. Anticuerpos biotinilados.

Tabla 3. Partículas de infección lentiviral.

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos.

Tabla 5. Identificación de proteínas polisialiladas a través de espectrometría de masas.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

### **El sistema inmune**

El sistema inmune se encarga de proteger al organismo de agentes patógenos potencialmente infecciosos a través de los mecanismos de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa [1].

La inmunidad innata es una respuesta de rápida acción que se encarga de proteger al organismo de las infecciones más comunes, las cuales se eliminan mediante las funciones efectoras de las células inmunitarias que se encargan de reconocer los patrones moleculares que se encuentran altamente conservados en la mayoría de los agentes que causan la enfermedad [2]. Además de células inmunitarias como los macrófagos, las células dendríticas y las células asesinas naturales, este tipo de inmunidad se conforma por barreras físicas como los epitelios y las mucosas y componentes proteicos como el sistema de complemento [1].

En contraste, la respuesta inmune adaptativa es la responsable de promover la memoria inmunológica del organismo y la tolerancia a los antígenos propios, esto permite que al reconocer a un patógeno en una infección futura, el organismo desarrolle mecanismos más potentes y agresivos que erradiquen al agente que está provocando la enfermedad [1].

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad humoral actúa contra los patógenos extracelulares, los cuales se eliminan a través de las funciones efectoras de los linfocitos B; mientras que en la inmunidad celular el mecanismo de defensa se dirige en contra de los patógenos intracelulares los cuales se eliminan a través de las funciones efectoras de los linfocitos T [3].

Con base en su función efectora los linfocitos T han sido clasificados en linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o citotóxicos y linfocitos T NK [4].

Los linfocitos T NK son las células encargadas de promover la inmunidad celular en contra de los tumores y de algunos agentes infecciosos que incluyen bacterias y virus [1, 4]. Los linfocitos T CD8+ o citotóxicos tienen como principal función reconocer y destruir a las células patogénicas a través de la secreción de enzimas citotóxicas [5]. Finalmente los linfocitos T CD4+ reguladores (Treg) y cooperadores (Th) son las células que se encargan de regular la homeostasis del sistema adaptativo celular [6] y de maximizar los mecanismos de eliminación de los diferentes agentes patogénicos a través de la activación de células como los macrófagos, los linfocitos B y los linfocitos T CD8+, los cuales actúan en respuesta a las citocinas específicas que se producen durante el proceso de activación del linfocito T CD4+ [1].

## La activación del linfocito T CD4+

La activación del linfocito T CD4+ se induce después de la presentación de un antígeno patogénico, el cual se expone a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) de una célula presentadora de antígeno (APC) y se reconoce mediante el receptor de células T (TCR) del linfocito [1].

El reconocimiento del antígeno y la estimulación de los receptores CD3, CD4 y el correceptor CD28 inducen una serie de cascadas de señalización río abajo, que conducen a la activación de los factores transcripcionales AP-1 (del inglés *Activator Protein 1*), NFAT (del inglés *Nuclear Factor of Activated T cells*) y NF- $\kappa$ B (del inglés *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que son los tres factores transcripcionales necesarios para la síntesis de interleucina 2 (IL-2), que es la principal citocina que se produce tras el proceso de activación [1, 7-10].

El primer efecto que se observa tras el reconocimiento del antígeno es la inducción de un cambio tridimensional en el complejo del TCR, esta modificación expone las tirosinas de los motivos ITAM (del inglés *tyrosine-based activation motif*) que se encuentran asociadas a los receptores CD3 y zeta [1, 7]. Al mismo tiempo este reconocimiento antigénico permite que el receptor CD4 se una al MHC II y en consecuencia que el dominio citoplasmático del receptor CD4 se una a la proteína tirosin cinasa leucocitaria (Lck) y la active [9, 10].

A continuación Lck en su forma activa fosforila a las tirosinas de los motivos ITAM que fueron expuestas en los receptores CD3 y zita [1, 7]. Los motivos ITAM fosforilados ahora sirven como lugares de acoplamiento para la proteína Zap-70, la cual una vez que se une a estas regiones se vuelve una proteína activa que tiene la capacidad de fosforilar y activar a la proteína LAT (del inglés *Linker of Activated T cells*) [1, 7, 8].

La proteína LAT activada se une directamente a la enzima fosfolipasa C gamma 1 (PLC $\gamma$ 1) y coordina tanto el reclutamiento de Grb2 (del inglés *Growth factor receptor-bound protein 2*) como la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP $_2$ ) [7-9].

El reclutamiento de Grb2 por parte de la PLC $\gamma$ 1 permite la formación del complejo LAT-PLC $\gamma$ 1-Grb2 el cual recluta a la proteína Sos que es un intercambiador de GTP/GDP que induce la activación de la vía de Ras y la MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) ERK, que a su vez activan a c-Fos que es uno de los dos componentes necesarios para la activación del factor transcripcional AP-1 [1, 8-10]. El otro componente necesario para la activación de AP-1 se conoce como c-Jun y este procede de la actividad en paralelo de la Grb2, en la cual se recluta a Vav que es otra proteína intercambiadora de GTP/GDP, esta proteína Vav activa a la vía de la Rac la cual conduce tanto al inicio de la cascada de señalización de la MAPK JNK también conocida como proteína cinasa activada por estrés como a la inducción de la reorganización del citoesqueleto [8-10].

Una vez que c-Fos y c-Jun activan a AP-1, este factor se dirige al núcleo y se une a las regiones reguladoras del gen de IL-2 [1], las cuales se activaran una vez que se recluten los tres factores transcripcionales, anteriormente mencionados [1, 8].

Como previamente se describió, la proteína LAT activada se une directamente a PLC $\gamma$ 1 y coordina tanto el reclutamiento de GRb2 como la hidrolisis del PIP $_2$ , la cual genera inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) [1, 8]. Es importante mencionar que no todo el PIP $_2$  presente en la membrana se hidroliza, una porción de este es fosforilado por la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y producto de esa hidrólisis se genera fosfatidil inositol trifosfato (PIP $_3$ ) [1, 8].

El PIP $_3$  es reconocido por la proteína cinasa D-1 (PKD1) y conduce a la activación de la misma y a la subsecuente fosforilación de la enzima AKT, también conocida como proteína cinasa B (PKB) [1]. La enzima AKT fosforilada inactiva a varios de los miembros proapoptoticos de la familia Bcl-2, lo cual conduce al aumento de la supervivencia del linfocito T CD4+ activado [1, 8].

Por otra parte el PIP $_2$  que si es hidrolizado conduce a la formación de IP3 y DAG [1, 8]. El IP3 queda como una molécula soluble que fácilmente puede difundirse del citosol al retículo endoplásmico y que además tiene la capacidad de estimular la liberación de los depósitos de calcio, lo que conduce a un aumento de calcio libre [1, 8].



El calcio libre actúa como una molécula señalizadora que se une a calmodulina y forma un complejo calcio-calmodulina que es capaz de activar a la enzima calcineurina, la cual se encarga de defosforilar al factor transcripcional NFAT citoplasmático [1, 8]. La defosforilación de NFAT descubre una señal de localización nuclear lo que permite que el NFAT citoplasmático se trasloque al núcleo y se una a las regiones reguladoras del gen de IL-2 [1, 8].

La interacción del calcio citoplasmático libre y el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC), la cual una vez que se encuentra en su forma activa estimula la fosforilación del factor transcripcional NF-KB. Esta fosforilación permite que el factor transcripcional NF-KB pueda translocarse al núcleo y de esta forma se pueda unir a AP-1 y a NFAT para poder activar la síntesis de IL-2 [1, 7-10].

El resultado de la trasducción de señales que se producen durante la activación conducen al inicio de la función efectora del linfocito T CD4+, que se caracteriza por presentar un aumento en la expresión de IL-2 que a su vez desencadena en un aumento de la actividad metabólica del linfocito T CD4+ [1, 7-10]; por incrementar la supervivencia celular debido a la inhibición de los factores proapoptóticos [1, 8]; por experimentar rearrreglos del citoesqueleto [8-10] y por conducir a cambios en los mecanismos enzimáticos que determinan la síntesis de los glicanos asociados a lípidos y a proteínas [11] es decir, la activación del linfocito conduce a cambios en la glicosilación que pueden conllevar a cambios en la función efectora del mismo [12] (Figura 1).

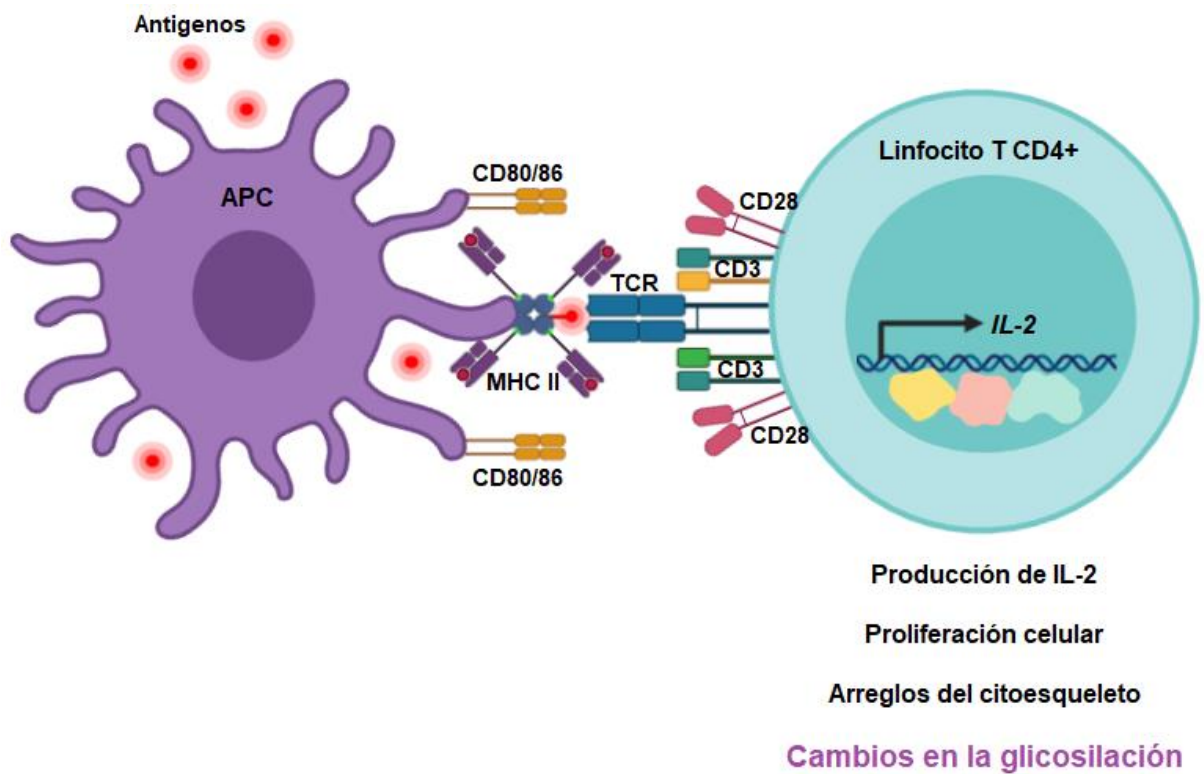


Figura 1. **La activación del linfocito T CD4+.** La activación del linfocito T CD4+ inicia cuando una APC presenta un antígeno procedente de un agente patogénico, este antígeno es reconocido por el TCR de los linfocitos T CD4+ e inmediatamente se induce una cascada de señalización que conduce a la activación de estas células, la cual se caracteriza por la expresión de citocinas como IL-2 e IFN $\gamma$ , por el aumento de la proliferación celular, por la inducción de rearrreglos en el citoesqueleto y cambios asociados a procesos de glicosilación.

## **La glicosilación**

Al igual que todas las células eucariotas, la superficie celular del linfocito T CD4+ está cubierta por cadenas de carbohidratos conocidas como glicanos. Estos glicanos pueden ser sintetizados y unidos a macromoléculas como proteínas y lípidos en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi a través de un proceso conocido como glicosilación [13].

Los dos principales tipos de glicosilación proteica descritos en el ser humano son la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación y en ambos casos, las proteínas glicosiladas maduran sus glicanos en el aparato de Golgi a través de la acción de las diferentes proteínas que conforman la maquinaria de glicosilación, las cuales incluyen a los transportadores glicosil-nucleótidos, a las sintetasas y a las enzimas glicosidasas y glicosiltransferasas, que se encargan de mediar la remoción y la adición de diferentes carbohidratos respectivamente [13]. Dentro de los carbohidratos que se encuentran sujetos a la actividad de estas enzimas se incluyen los residuos de glucosa, galactosa, manosa, fucosa y la adición terminal de residuos de ácido siálico (Sia) [13].

## La sialilación y el ácido siálico

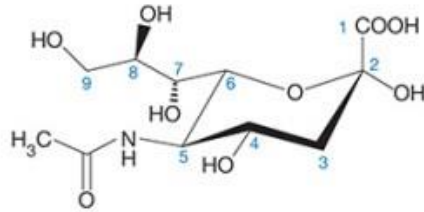
La sialilación en proteínas es el proceso celular mediado por glicosiltransferasas, a través del cual se adicionan residuos del carbohidrato ácido siálico en la posición terminal de las cadenas de los glicanos [14]. Las reacciones de sialilación tienen lugar en el lumen de la región *trans* del aparato de Golgi y son catalizadas por la familia de enzimas sialiltransferasas (STs) las cuales han sido clasificadas en tres subfamilias con base en el tipo de enlace glicosídico formado entre el Sia y su carbohidrato aceptor [13, 14].

De las 20 STs reportadas en humanos, seis corresponden a la familia de las sialiltransferasas ST3 que catalizan enlaces glicosídicos en configuración  $\alpha 2, 3$ ; ocho pertenecen a la familia ST6 que catalizan enlaces en configuración  $\alpha 2, 6$  y seis forman parte de las sialiltransferasas ST8 las cuales se encargan de catalizar enlaces en configuración  $\alpha 2, 8$  [15, 16]; siendo este último tipo de enlace el único que se puede formar entre los residuos de ácido siálico y permitir la formación de polímeros que alcanzan diferentes longitudes; las cadenas más cortas, formadas por dos residuos de Sia se conocen como ácido disiálico, las cadenas sintetizadas por tres y hasta por siete residuos son conocidas como ácido oligosiálico, mientras que el ácido polisiálico (PoliSia) es un homopolímero lineal formado a partir de ocho y hasta por cien residuos de Sia [13].

La familia de los ácidos siálicos esta conformada por monosacáridos de nueve carbonos que comparten características químicas y estructuras relacionadas y comprende a más de 50 formas que incluyen a los cuatro ácidos siálicos denominados “ácidos núcleo”: el ácido neuramínico (Neu), el ácido 5-*N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), el ácido 5-*N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y el ácido 2-ceto-desoxinonulosónico (Kdn) [13, 17, 18] (Figura 2).

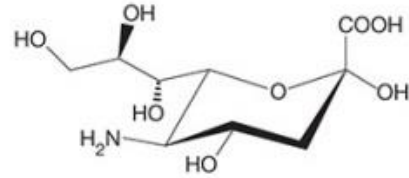
Los ácidos siálicos mejor descritos son el Neu5Ac y el Neu5Gc. El Neu5Ac no solo es el tipo de ácido siálico más común en el ser humano [13] sino que también es el único que ha sido identificado en todos los organismos, particularmente en los vertebrados [13, 19]. A diferencia del Neu5Ac, el Neu5Gc es un tipo de ácido siálico que se expresa en los vertebrados pero que en el ser humano no puede ser sintetizado, esto debido a una mutación inactivante en el gen CMAH que codifica para la enzima CMP-ácido *N*-acetilneuramínico hidroxilasa que convierte el citidín-monofostato-ácido *N*-acetilneuramínico (CMP-Neu5Ac) en citidín-monofostato-ácido *N*-glicolilneuramínico (CMP-Neu5Gc) [13, 19]. Sin embargo, es posible encontrar este carbohidrato en tejidos humanos, ya sea en tejidos sanos debido a su ingesta a través de la dieta o en algunos tejidos tumorales [19, 20].

## Ácidos siálicos



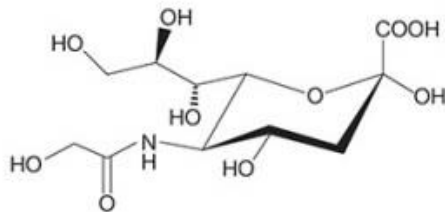
Ácido 5-*N*-acetilneuramínico

**(Neu5Ac)**



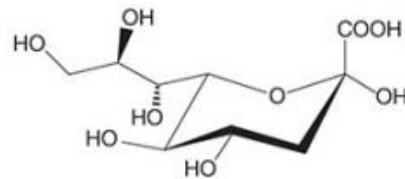
Ácido neuramínico

**(Neu)**



Ácido 5-*N*-glicolilneuramínico

**(Neu5Gc)**



Ácido 2-ceto-desoxinonulosónico

**(Kdn)**

Figura 2. **Estructuras químicas de la familia de los ácidos siálicos.** Todos los miembros de la familia de los ácidos siálicos tienen una estructura común de nueve carbonos, pero varían en el sustituyente unido al C-5 según cada tipo. En el C-1 tienen un grupo carboxilato que aporta la carga negativa característica de esta familia y además llevan una cadena lateral exocíclica de tres carbonos (C-7-C-9) que está sujeta a modificaciones por acetilaciones, metilaciones y sulfataciones [13]. Modificada de *Essentials of Glycobiology. 3rd edition. "Sialic acids and other nonulosonic acids"*.

A pesar de la elevada diversidad estructural de los ácidos siálicos todos los miembros de esta familia tienen como principal característica la presencia de una carga negativa en su forma libre [21], esta singularidad le confiere propiedades biofísicas particulares a todas aquellas proteínas que lo portan [22].

Dada su alta densidad y su ubicación celular, los Sias desempeñan muchas funciones a través de su carga electronegativa entre las que destacan la repulsión de las interacciones célula-célula, la estabilización de proteínas y la unión y el transporte de iones [13].

Varios reportes han evidenciado que la presencia del Neu5Ac en diferentes proteínas humanas se asocia a funciones celulares que involucran la protección a ataques enzimáticos e inmunológicos o el reconocimiento de receptores fisiológicos [21]. Similar al comportamiento descrito para el Sia la presencia del ácido polisiálico en proteínas como la molécula de adhesión de células neurales (NCAM) o la neuropilina-2 (NRP-2) también ha sido vinculada con procesos anti adhesivos que principalmente se establecen a través de la carga negativa característica de esta familia [23], además de que la presencia de PoliSia también ha sido asociada con funciones como la migración celular y la formación y el remodelamiento del sistema neural [24].

## **Las proteínas polisialiladas**

La adición de ácido polisiálico a las proteínas es producto de la actividad enzimática de dos sialiltransferasas de la familia ST8: la ST8Sia II y la ST8Sia IV, enzimas que también se conocen como polisialiltransferasas debido a su capacidad única de modificarse con la adición de ácido polisiálico en un proceso autocatalítico denominado autopolisialilación [25, 26] el cual probablemente representa un requisito previo para el desarrollo de su actividad enzimática [25].

A la fecha se han descrito ocho proteínas humanas que requieren y transportan PoliSia para poder modular su actividad y se muestran a continuación.



Tabla 1. **Proteínas polisialiladas**. La tabla 1 muestra una recopilación de todas las proteínas que a la fecha han sido reportadas como proteínas que necesitan la adición de ácido poliácido para poder modular su actividad.

<b>Proteína polisialilada</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
<b>Molécula de adhesión de células neurales</b>	27, 28, 29
<b>Molécula de adhesión sináptica 1</b>	29, 30, 31
<b>Subunidad <math>\alpha</math> del canal de sodio dependiente de voltaje</b>	32
<b>Importador de ácidos grasos CD36</b>	33
<b>Polisialiltransferasas ST8Sia II</b>	25, 26
<b>Polisialiltransferasas ST8Sia IV</b>	25, 26
<b>Integrina <math>\alpha 5</math></b>	34
<b>Neuropilina 2</b>	23, 29

- **Molécula de adhesión de células neurales**

Descubierta como la primera proteína polisialilada la NCAM también conocida como CD56, es una glicoproteína transmembranal que se expresa en la superficie de las células del linaje neural, en el músculo esquelético y en las células del sistema hematopoyético [29, 35, 36]. Es la proteína polisialilada más abundante y mejor descrita, forma parte de la súper familia de las inmunoglobulinas (Ig) [36] y tiene tres isoformas principales (NCAM-120, NCAM-140 y NCAM-180) [37]. Estructuralmente consiste de cinco dominios de tipo Ig (Ig1-Ig5), con dos sitios en Ig-5 sujetos a polisialilación, dos repeticiones de fibronectina tipo III (FnIII- 1 y FnIII-2), un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático (Figura 3) [ 38].

A través del uso de la *N*-glicosidasa PNGasa F, enzima que cataliza la escisión entre la *N*-acetilglucosamina y la asparagina unidas a través de mecanismo generales de glicosilación, Foley y colaboradores han demostrado que los dos sitios sujetos a la polisialilación, ubicados en el dominio Ig-5 de esta proteína, están asociados a modificaciones por *N*-glicosilación [28]. Estudios previos han evidenciado que la polisialilación del dominio Ig-5 es catalizada por ambas enzimas polisialiltransferasas la ST8Sia II y la ST8Sia IV [27, 28, 29].

Funcionalmente se sabe que el PoliSia de la NCAM desempeña un papel crítico en el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y la regeneración [27] ya que se ha demostrado que este carbohidrato funciona como un "pegamento inteligente" que interactúa en la adhesión célula-célula e induce la activación de las cascadas de señalización intracelular que diferencian a las células neuronales [37].

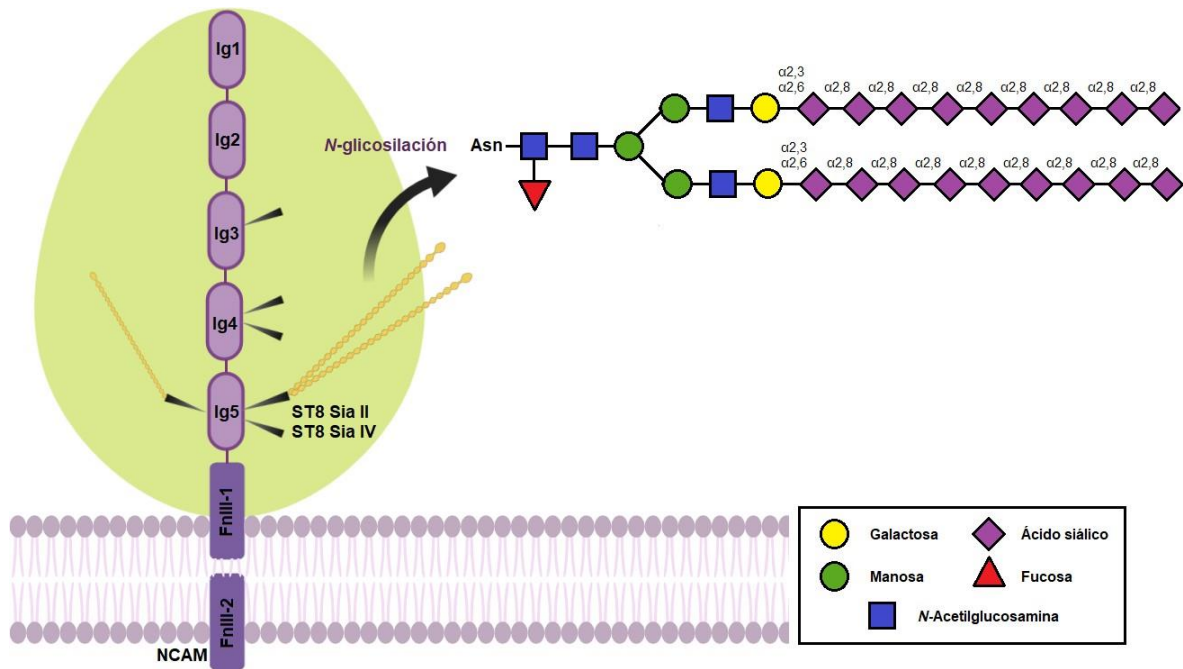


Figura 3. **Molécula de adhesión de células neurales (NCAM)**. La NCAM es la glicoproteína polisialilada más abundante y mejor descrita. Está formada por cinco dominios Ig (Ig1-Ig5), dos repeticiones de fibronectina tipo III (FnIII-1 y FnIII-2), un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. Dentro de las Ig-3, Ig-4 e Ig-5 existen seis sitios sujetos a *N*-glicosilación (marcados por barras negras) pero únicamente dos dominios ubicados en la Ig5 pueden extender su cadena de carbohidratos por la adición de PoliSia [28, 38] a través de la catálisis de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV [27, 28, 29]. Modificado de Schnaar, Gerardy- Schahn & Hildebrandt, 2014.

- **Molécula de adhesión sináptica 1**

Además de la NCAM existen otras moléculas de adhesión post sináptica, como la molécula de adhesión celular sináptica 1 (SynCAM 1), que impulsan el ensamblaje de la sinapsis [38].

La SynCAM 1, también conocida como Cadm1 o Necl-2 (molécula similar a la nectina 2) al igual que la NCAM es una proteína polisialilada miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas que fueron identificadas en el sistema nervioso [38]. Estructuralmente es una proteína de membrana que consiste de tres dominios extracelulares de tipo Ig (Ig-1-Ig-3), con tres sitios en Ig-1 sujetos a polisialilación y un dominio citosólico corto [39].

A través del uso de ratones ST8Sia II <sup>-/-</sup> [40] y ST8Sia IV <sup>-/-</sup> [41] se demostró que la polisialilación del dominio Ig-1 de esta molécula depende exclusivamente de la actividad enzimática de la polisialiltransferasa ST8Sia II [30].

Funcionalmente se sabe que la SynCAM 1 induce la formación de la sinapsis pero se ha reportado que particularmente el PoliSia presente en esta proteína actúa como un modulador del ensamblaje entre las células NG2 y las neuronas [39].

- **Subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje**

Otra de las primeras proteínas polisialiladas en ser reportada fue la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje [32]. Los canales de sodio son proteínas integrales de membrana que permiten el paso de los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) a través de la membrana celular. Estructuralmente están compuestos por dos subunidades proteicas, una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , siendo la subunidad  $\alpha$  la parte central del canal, la cual es funcional por sí misma, incluso si las subunidades  $\beta$  u otras proteínas moduladoras no se expresan [42].

La polisialilación de esta proteína fue reportada en 1992 por Zuber y colaboradores cuando a través del uso del anticuerpo monoclonal (mAb) 735, que reconoce ácido polisiálico con un grado de polimerización (DP) de 8 residuos o más, realizaron una inmunoprecipitación en la que además de identificar las isoformas de la NCAM encontraron la presencia de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje [32].

Si bien la inmunoprecipitación de esta proteína con el mAb 735 sugiere la presencia de ácido polisiálico en ella, no fue hasta que se demostró su susceptibilidad a la digestión con la enzima Endoneuraminidasa N (Endo-N), enzima específica para la remoción de ácido polisiálico en configuración  $\alpha 2, 8$  con un DP=8-11 residuos, que se confirmó que la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje era una proteína polisialilada [32].

- **Importador de ácidos grasos CD36**

El importador de ácidos grasos CD36 también conocido como glicoproteína plaquetaria 4 o traslocador de ácidos grasos (FAT) es otra glicoproteína modificada con la adición de ácido polisiálico que no pertenece a las células del linaje neural.

CD36 es una proteína integral de membrana, miembro de la súper familia de los receptores de barrido de clase B que se encarga de importar los ácidos grasos al interior de la célula [33] y además actúa como receptor para una amplia gama de ligandos que incluye ligandos de naturaleza proteica como el colágeno [43] o la trombospondina [44] y ligandos de naturaleza lipídica como la lipoproteína oxidada de baja densidad [45, 46].

A diferencia del CD36 plaquetario el CD36 de la leche materna está sujeto a modificaciones de polisialilación, lo cual alude a que el PoliSia en esta proteína está asociado con el desarrollo neonatal [33].

Gracias a su resistencia a la digestión enzimática con la enzima PNGasa F y a su susceptibilidad al tratamiento de  $\beta$ -eliminación, tratamiento químico que en condiciones alcalinas remueve la unión de los O-glicanos, se demostró que la polisialilación de esta proteína está asociada exclusivamente a modificaciones por O-glicosilación [33].

- **Neuropilina 2**

Al igual que el importador de ácidos grasos CD36 la NRP-2 es otra proteína polisialilada en la que se ha demostrado que el ácido polisiálico unido a ella se encuentra asociado exclusivamente a modificaciones por O-glicosilación [47]. La neuropilina-2 es un receptor transmembranal de la familia de las semaforinas que se expresa en la superficie de las células dendríticas humanas, en las células neuroendocrinas situadas a lo largo del tracto digestivo humano, en las células pancreáticas y en algunas células malignas [23].

Estructuralmente esta proteína está conformada por cinco dominios, dos dominios CUB (a1 y a2) que comparten homología con los factores de unión del complemento C1r/C1s; dos dominios homólogos al factor de coagulación V/VIII (FV/VIII), denominados b1 y b2, y un dominio MAM (meprina / proteína A5 / fosfotirosina fosfatasa  $\mu$ ) nombrado c [47] (Figura 4).

Cuando se identificó la polisialilación de la NRP-2 se reportó la presencia de los transcritos de ambas polisialiltransferasas sin embargo, se observó que durante la maduración de las células dendríticas existía un aumento en la expresión de la polisialiltransferasa ST8Sia IV el cual coincidía con la aparición del ácido polisiálico superficial [23]. Pero no fue hasta 2013 que Rollenhagen y colaboradores lograron confirmar que la NRP-2 es una proteína que es polisialilada exclusivamente por la polisialiltransferasa ST8Sia IV y además que esta enzima actúa selectivamente sobre los O-glicanos de tipo mucina que se agrupan en los dominios b2 y c [47].

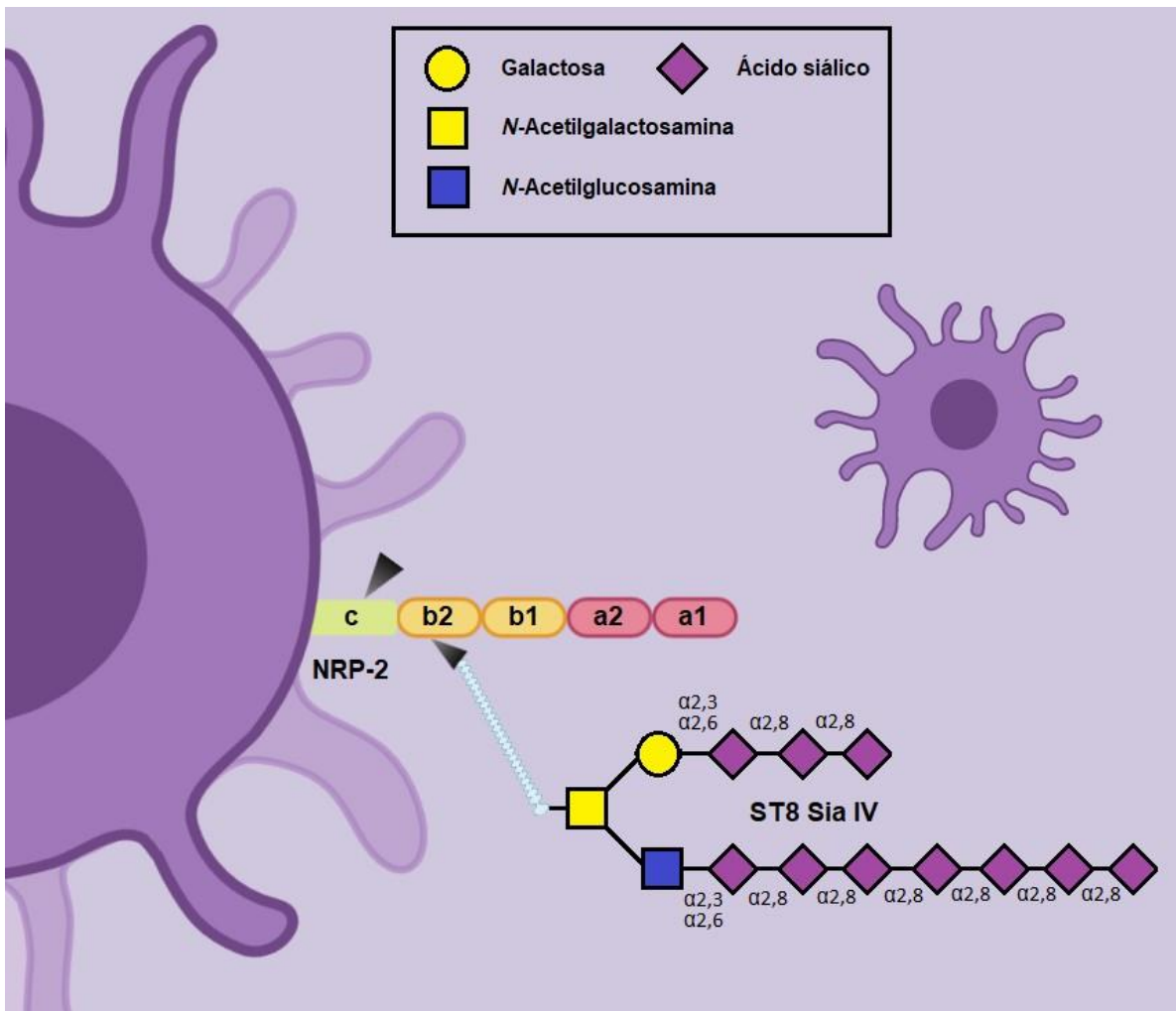


Figura 4. **Neuropilina-2 (NRP-2)**. La NRP-2 es una glicoproteína que actúa como un receptor transmembranal de la familia de las semaforinas. Está formada por cinco dominios extracelulares, dos dominios CUB (a1 y a2), dos dominios de homología con el factor de coagulación V/VIII (FV/VIII) (b1 y b2) y un dominio MAM (c). De los sitios sujetos a modificaciones por O-glicosilación únicamente los dominios b2 y c pueden extender su cadena de carbohidratos con la adición de ácido polisialílico a través de la catálisis enzimática de la polisialiltransferasa ST8Sia IV [47].



Estudios previos han demostrado que la eliminación superficial del ácido polisiálico de las células dendríticas o APC, ya sea a través del silenciamiento génico de la polisialiltransferasa ST8Sia IV o del bloqueo de la unión de la NRP-2 polisialilada a través del uso de anticuerpos específicos, aumenta la capacidad de las células dendríticas para activar a los linfocitos T CD4+, lo que sugiere que la NRP-2 polisialilada es una proteína multifuncional que ayuda a regular la actividad de las células dendríticas [23].

Como se ha descrito únicamente existen reportes de ocho proteínas humanas modificadas por la adición de ácido polisiálico, de las cuales solamente una, la proteína NRP-2, está asociada con el sistema inmunológico. Al igual que como ha sucedido con las células del linaje neural el hallazgo de una proteína en células que puedan englobar a todo un sistema, permite explorar nuevos campos que muy probablemente nos permitan identificar proteínas polisialiladas.

## ANTECEDENTES

Además de la presencia de Sia en las células dendríticas, en 2015 Villanueva-Cabello y colaboradores evidenciaron por primera vez que la activación *in-vitro* (vía anti-CD3/anti-CD28) del linfocito T CD4+ humano desencadena un aumento en la síntesis de los genes que codifican para las sialiltransferasas ST8Sia I, ST8Sia II y ST8Sia IV (Figura 5). Si bien estas tres enzimas se encargan de unir ácido siálico en configuración  $\alpha 2, 8$ , tanto el sustrato que reconocen como el DP que pueden formar es diferente [48]. La ST8Sia I también llamada GD3 sintasa es la enzima responsable la unión del Sia a los glicoesfingolípidos sialilados mejor conocidos como gangliósidos, mientras que las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV son las enzimas encargadas de la adición de residuos de Sia en las proteínas [25, 26, 48].

Adicionalmente nuestro grupo de investigación también reportó que la activación del linfocito T CD4+ conduce a la sobreexpresión del gangliósido GD3 (Figura 6A) y a la neoexpresión del gangliósido GD2 (Figura 6B) [48]. Este hallazgo sugiere que el aumento en la adición del Sia  $\alpha 2, 8$  durante la activación del linfocito T CD4+ podría ocurrir no solo en gangliósidos sino también en proteínas.

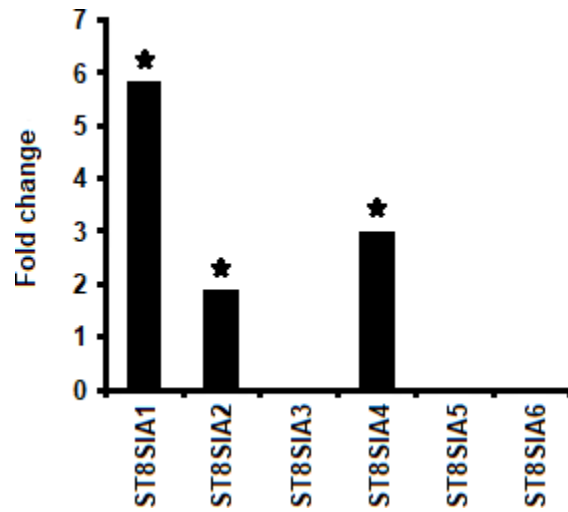


Figura 5. La activación del linfocito T CD4+ conduce al aumento en la expresión de los genes **ST8SIA1, ST8SIA2 y ST8SIA4**. Análisis de la expresión de los genes que codifican para cada una de las seis sialiltransferasas de la familia ST8. La gráfica muestra las veces de cambio de la expresión de cada uno de estos genes, comparando la expresión de los linfocitos T CD4+ humanos activados a 72h (estimulados vía anti-CD3/anti-CD28) con respecto a la condición de reposo de estas mismas células [48].

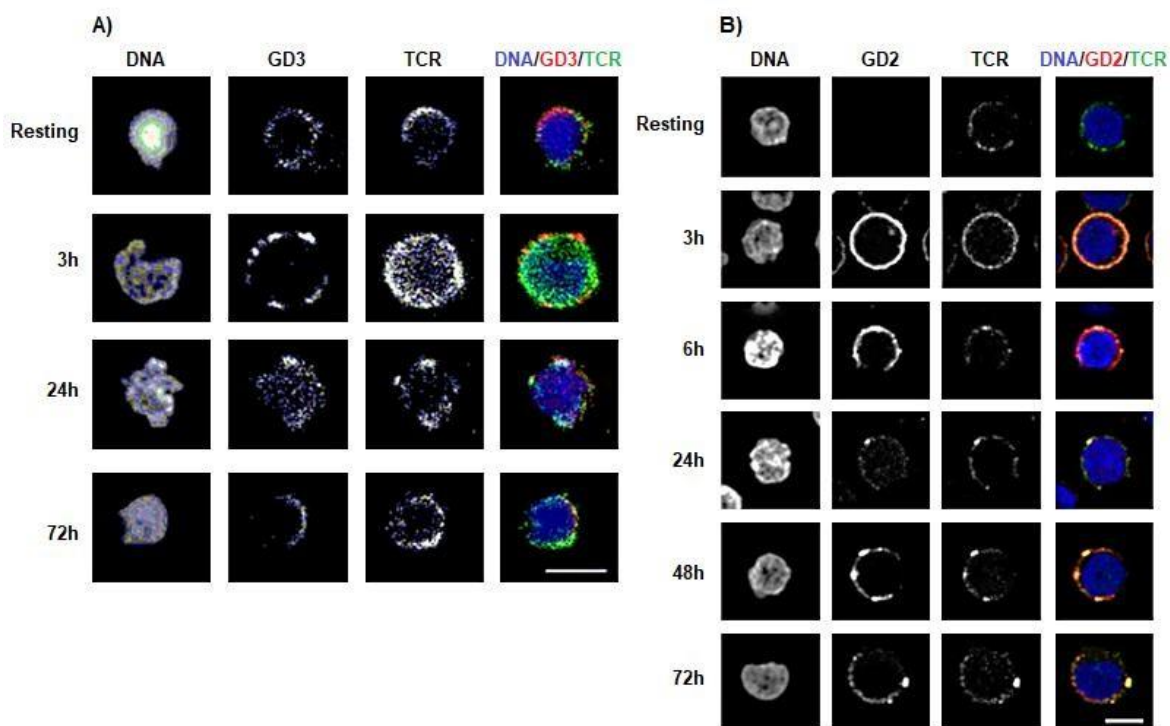


Figura 6. La activación del linfocito T CD4+ induce a la sobreexpresión del gangliósido GD3 y a la neoexpresión del gangliósido GD2. (A) Microscopía confocal de la expresión y la localización del gangliósidos GD3 y el TCR de los linfocitos T CD4+ en reposo y activados a 3, 24 y 72h en presencia de los estímulos anti-CD3/anti-CD28. (B) (A) Microscopía confocal de la expresión y la localización del gangliósidos GD2 y el TCR de los linfocitos T CD4+ en reposo y activados a 3, 6, 24, 48 y 72h en presencia de los estímulos anti-CD3/anti-CD28 [48].

## **HIPÓTESIS**

La activación del linfocito T CD4+ aumenta la expresión de las proteínas polisialiladas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la expresión e identidad de las proteínas polisialiladas presentes en el linfocito T CD4+ activado.

### **Objetivos particulares**

- Identificar la expresión de las proteínas polisialiladas presentes en el linfocito T CD4+ activado.
- Determinar la identidad de las proteínas polisialiladas presentes en el linfocito T CD4+ activado.
- Evaluar la función del ácido polisiálico durante la activación del linfocito T CD4+.

## ESTRATEGIA METODOLOGICA

**Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana**

**Purificación de linfocitos T CD4+ naive**

- Método de MACS

**Activación *in-vitro* de los linfocitos T CD4+ naive**

- Vía anti-CD3/anti-CD28

**Identificación de las proteínas polisialiladas expresadas en el linfocito T CD4+ activado**

- Citometría de flujo
- *Western blot*
- Deglicosilación de proteínas
- Inmunoprecipitación de proteínas
- Espectrometría de masas

**Evaluación de la función del ácido polisialico durante la activación del linfocito T CD4+**

- Silenciamientos mediados por shRNA
- PCR en tiempo real

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana**

Para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), se obtuvo sangre periférica humana procedente de paquetes leucocitarios (buffy coats) de hombres adultos sanos de entre veinte y treinta años de edad la cual se procesó a través de un gradiente de densidad de sacarosa Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) bajo condiciones estériles siguiendo el protocolo descrito a continuación. Se diluyeron 4 ml de sangre periférica humana en una proporción 1:1 con 4 ml de solución salina estéril (PBS 1x, EDTA 2mM pH 7.4), a continuación se adicionaron 3 ml de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) a un tubo de 15 ml y sobre este se agregaron 4 ml de sangre diluida de forma cuidadosa para no romper el gradiente formado por el histopaque. Posteriormente dicho tubo se centrifugó a 250 g durante 30 minutos a una temperatura de 22°C. Concluido el tiempo de centrifugación se obtuvo un gradiente del cual se aislaron las PBMCs. Las células recuperadas se lavaron en tres ocasiones con solución salina bajo los estándares de centrifugación previamente descritos y posteriormente se pusieron en cultivo celular con medio Advanced RPMI 1640 (Gibco™) suplementado (3% de FBS (Gibco™), 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, Glutamina 2mM) en una incubadora a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Purificación de linfocitos T CD4+ naive**

A partir de las PBMCs previamente incubadas se purificaron los linfocitos T CD4+ naive a través de selección negativa utilizando un kit de purificación de células T CD4+ naive humanas MACS (Miltenyi Biotec) mediante la siguiente técnica.

Se colectaron las PBMCs y se centrifugaron a una velocidad de 250g durante 5 minutos a una temperatura de 8°C, se descartó el medio de cultivo y la pastilla celular se resuspendió en 5 ml de solución de bloqueo (PBS 1x, EDTA 2mM, BSA 0.5% pH 7.2) para poder cuantificar las células mediante el método de conteo de Neubauer. Una vez cuantificadas, las células fueron centrifugadas bajo los estándares ya mencionados y se descartó en su totalidad la solución de bloqueo.

Por cada  $10^7$  células se adicionaron 40  $\mu$ l de solución de bloqueo y 10  $\mu$ l del coctel de anticuerpos biotinilados (Tabla 2), dicha mezcla se homogenizó por pipeteo suave y se incubó durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente por cada  $10^7$  células se adicionaron 30  $\mu$ l de solución de bloqueo y 20  $\mu$ l de microperlas magnéticas anti-biotina, las células fueron resuspendidas mediante pipeteo suave e incubadas durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Al finalizar la incubación se adicionaron 5 ml de solución de bloqueo y se realizó un lavado celular para eliminar el exceso de anticuerpo y de perlas magnéticas (partículas no adheridas).



Una vez que se concluyó el lavado se descartó la porción sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 500 µl de solución de bloqueo.

Nota: Antes de hacer pasar las células por la columna magnética, la columna fue lavada en dos ocasiones con 500 µl de solución de bloqueo.

Enseguida se hicieron pasar las PBMCs etiquetadas por la columna, y se recuperó la fracción que eluye (CD4+/CD45RA+). La columna se lavó en tres ocasiones con 500 µl de solución de bloqueo y también se recuperó el eluyente, que representa la fracción enriquecida de los linfocitos T CD4+ naive. Posteriormente se recuperó la fracción positiva de las células retenidas en la columna magnética y se determinó la eficiencia de la purificación a través de citometría de flujo mediante los marcadores anti-CD4 FITC/anti-CD45RA PECy7.

Tabla 2. **Anticuerpos biotinilados.** La tabla 2 muestra los anticuerpos presentes en el coctel de anticuerpos biotinilados (Miltenyi Biotec #130096533) y los tipos celulares que son reconocidos y excluidos a través del uso de este kit.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Células excluidas</b>
<b>anti-CD8</b>	Linfocitos T CD8
<b>anti-CD14</b>	Monocitos diferenciados
<b>anti-CD16</b>	Neutrófilos, macrófagos y células NK.
<b>anti-CD19</b>	Linfocitos B
<b>anti-CD36</b>	Plaquetas, monocitos, macrófagos maduros y células vasculares endoteliales
<b>anti-CD45RO</b>	Linfocitos T de memoria
<b>anti-CD56</b>	Células NK, linfocitos B y linfocitos T
<b>anti-CD123</b>	Monocitos, macrófagos y megacariocitos
<b>anti-CD256a (Glicoforina A)</b>	Eritrocitos
<b>TCR<math>\gamma</math>/<math>\delta</math></b>	Linfocitos T presentes en tejidos epiteliales

### **Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ naive**

Para medir el grado de pureza obtenido en la metodología anterior se colectó una fracción de las células purificadas, la cual fue teñida con un tratamiento de anticuerpos anti-CD4 FITC (OKT4 e-Bioscience)/anti-CD45RA PE-Cy7 (HI100 Tonbo-Bioscience).

Recién terminada la purificación se tomaron 100 µl de las células naive y se centrifugaron a una velocidad de 250 g durante 5 minutos a una temperatura de 4°C, la fracción sobrenadante se desechó y la pastilla celular se incubó durante 1h a una temperatura de 4°C en 100 µl de una solución que contenía anti-CD4 FITC (0.25 µg/test) diluido en solución de bloqueo. Al finalizar la incubación se realizaron dos lavados con PBS 1x y las células se fijaron durante 20 minutos a una temperatura de 4°C en 200 µl de paraformaldehído (PFA) 4%, transcurrido el tiempo de fijación las células se lavaron en dos ocasiones con PBS 1x bajo los estándares de centrifugación ya descritos. Concluido el proceso de fijación celular las células se incubaron durante 20 minutos en solución de bloqueo y posteriormente se realizó un lavado con PBS 1x. Al finalizar el bloqueo se procedió a incubar las células en 50 µl del anticuerpo anti-CD45RA (0.25 µg/test) diluido en solución de bloqueo durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS 1x y se adquirieron los resultados mediante citometría de flujo.

Nota: En el presente trabajo únicamente se ocuparon linfocitos T CD4+ naive con un grado de pureza mayor al 90% (Anexo 1).

### **Activación *in-vitro* de los linfocitos T CD4+ naive**

Para estimular la activación de los linfocitos T CD4+ naive, estas células se incubaron en presencia de los estímulos anti-CD3 (OKT3 eBioscience)/anti-CD28 (CD28.6 eBioscience).

El anticuerpo anti-CD3 (OKT3 eBioscience) fue adherido en una placa de 24 pozos dos horas previas al cultivo celular en una solución PBS 1x/anti-CD3 (0.5 µg/test) a una temperatura de 37°C. Al terminar el tiempo de incubación los pozos fueron lavados en dos ocasiones PBS 1x y a continuación se cultivaron las células naive en una relación 1 millón de células por ml de medio Advanced RPMI 1640 suplementado. Finalmente se añadió 1 µg/ml del anticuerpo anti-CD28 (CD28.6 eBioscience) para completar el estímulo de activación. Los linfocitos se mantuvieron en cultivo celular durante 72h en un proceso de activación tardía y al finalizar el tiempo de activación estas células fueron colectadas y centrifugadas a una velocidad de 250g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fracción sobrenadante fue descartada y la pastilla celular fue lavada en dos ocasiones con 200 µl de PBS 1x. Una vez realizado el segundo lavado se removió la totalidad del material sobrenadante de la pastilla celular y posteriormente dicha pastilla se almaceno a -80°C.

## **Lisis celular**

Para extraer las proteínas totales de todos los tipos celulares empleados en este trabajo se siguió el siguiente procedimiento. Nota: Todas las pastillas celulares empleadas para la lisis celular permanecieron congeladas por lo menos 24h.

A cada pastilla celular se le adicionaron entre 100-200  $\mu$ l de *buffer* de lisis (Tris-HCl 25mM pH: 7.4, 0.5% Tritón x-100 (BioRad), inhibidor de proteasas complete (Roche Cat. No. 11697498001), EDTA 2mM) según su tamaño. Enseguida la pastilla celular fue disgregada en su totalidad mediante pipeteo suave y a continuación dicha mezcla homogénea se incubó en agitación durante 30 minutos a una temperatura de 4°C y una velocidad de 150 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron centrifugadas a máxima velocidad (13 500 rpm) durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Finalmente se colectó la fracción sobrenadante, con cuidado de no tomar la pastilla formada en el fondo y se almacenó a -80°C.

## Silenciamiento genético de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV

Para realizar el silenciamiento genético de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV se implementó la siguiente metodología.

A partir de 80 000 linfocitos T CD4+ naive (por condición) se realizó una infección de 12h con los silenciamientos de partículas lentivirales que se muestran en la Tabla 3, cada tratamiento se realizó con una multiplicidad de infección de 2.5.

Una vez transcurrido el tiempo de infección los linfocitos T CD4+ fueron lavados en dos ocasiones con 100 µl de PBS 1x y arrestados durante 24h en medio Advanced RPMI 1640 (Gibco). Al finalizar el arresto celular se procedió a estimular la activación tardía de los linfocitos T CD4+ en presencia de los estímulos de anti-CD3/anti-CD28 bajo las condiciones descritas en el apartado “Activación *in-vitro* de linfocitos T CD4+”.

Tabla 3. **Partículas de infección lentiviral.** La tabla 3 muestra las diferentes partículas de infección lentiviral utilizadas para el silenciamiento de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV, todos los tratamientos de infección fueron adquiridos a través de Santa Cruz Biotechnology.

<b>Infección</b>	<b>Silenciamiento</b>	<b>Cat. No.</b>
Control de partículas lentivirales shRNA	Control negativo	Sc-108080
Partículas lentivirales ST8Sia II shRNA	ST8Sia II	Sc-89953-v
Partículas lentivirales ST8Sia IV shRNA	ST8Sia IV	Sc-92058-v

## **Extracción de RNA y PCR en tiempo real**

Concluido el proceso de activación de los linfocitos T CD4+ infectados con los silenciamientos de las partículas lentivirales se procedió a evaluar la expresión de los genes ST8SIAII, ST8SIAIV, IL-2, IL-2R, IFN- $\gamma$  y eEF1 $\alpha$  RT.

Para ello cada condición de infección se colectó en un microtubo de 1.5 ml, todos los microtubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a un temperatura de 4°C, el medio sobrenadante de cada uno se colectó en nuevos microtubos y se almacenó a -80°C. Cada pastilla celular se resuspendió en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, finalmente todas las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Al día siguiente se descongelaron todos los tubos con Trizol y a cada uno se le adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo, a continuación se procedió a agitar cada tubo durante aproximadamente 30 segundos e inmediatamente todos los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Terminado el proceso de centrifugación se recuperó (por separado) la fase acuosa de cada tubo en un tubo nuevo y enseguida se le añadieron 500  $\mu$ l de isopropanol a cada uno. Los tubos fueron invertidos en tres ocasiones y posteriormente se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, concluido este tiempo los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos a una temperatura de 4°C.

La fase sobrenadante se decantó y sobre cada tubo se adicionó 1 ml de etanol al 75% frío. Los tubos se centrifugaron nuevamente bajo el protocolo previamente mencionado. Al finalizar esta centrifugación se removió la totalidad del etanol y se procedió a secar la pastilla de ácido ribonucleico (RNA), una vez seca se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich Cat. No. W4502).

A continuación se procedió a determinar la concentración del RNA a través de una cuantificación espectrofotométrica (260nm). A partir de 1 µg de RNA se sintetizó el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor del kit de la transcriptasa reversa M-MLV (Sigma-Aldrich Cat. No. M 1302). Posteriormente se realizó la amplificación de los genes de interés utilizando los oligonucleótidos de la tabla 4, empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), para ello se utilizó el kit Maxima SYBR Green/Rox 2x qPCR Master mix (2) (Thermo Fisher Scientific Cat. No. K0021) y se siguió el protocolo sugerido por el proveedor.



**Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos.** La tabla 4 muestra los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes de interés a partir de qPCR. La reacción de qPCR se realizó en un termociclador ABI 5700 (Applied Biosystems). Los datos se adquirieron en un sistema de detección StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems). La expresión de los genes se normalizó con la expresión del gen interno eEF1 $\alpha$ .

<b>Gen</b>		<b>Secuencia</b>
<b>eEF1<math>\alpha</math> RT</b>	Sentido	5'-GGCATCGACAAAAGAACCAT-3'
	Antisentido	5'-CCATTCCAACCAGAAATTGG-3'
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Sentido	5'-GCAGAGCCAAATTGTCTCC-3'
	Antisentido	5'-GGACATTCAAGTCAGTTACC-3'
<b>IL-2</b>	Sentido	5'-ATGCACAAGCTCTGCCACTC-3'
	Antisentido	5'-CTGTATCCCTGGACGCACT-3'
<b>IL-2R</b>	Sentido	5'-CTTTCACTTAAGACCCAGGGAC-3'
	Antisentido	5'-CACATGAATGTTGTTTCAGATCCC-3'
<b>ST8Sia II</b>	Sentido	5'-CACAGCTTCGTCATCAGGTG-3'
	Antisentido	5'-GTGGCATTGACCAAGTCCTC-3'
<b>ST8Sia IV</b>	Sentido	5'-GACGCAACTCATCGGAGATG-3'
	Antisentido	5'-CACTGACACATCTCGTTCTGC-3'

## **Inmunoprecipitación de proteínas**

- **IP de proteínas polisialiladas**

Una vez que se obtuvieron los lisados de los linfocitos T CD4+ se procedió a separar las proteínas polisialiladas de las proteínas totales a través de una inmunoprecipitación con el mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience).

Por cada 400 µg de proteínas totales se adicionaron 20 µl de la proteína L-agarosa (Santa Cruz Biotechnology Cat. No. Sc-2636) ambas soluciones se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 4°C en un orbital giratorio. Transcurrido el tiempo de incubación el contenido se centrifugó a una velocidad de 5000 rpm durante 4 minutos a una temperatura de 4°C. A continuación se colectó la fracción sobrenadante en un microtubo de 1.5 ml nuevo y por cada 400 µg de proteínas se adicionó 1 µg del mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience), la muestra fue homogenizada e incubada durante 16h en un orbital giratorio a una temperatura de 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 80 µl de la proteína L-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) sobre la muestra, la cual nuevamente se incubó durante 24h en un orbital giratorio a una temperatura de 4°C.

Concluido el tiempo de incubación el complejo proteínas polisialiladas-mAb anti-PSA NCAM12E3-proteína L-agarosa se centrifugó a 5 000 rpm durante 4 minutos a una temperatura de 4°C.

La fracción sobrenadante (fracción no unida) se colectó y se procedió a eluir las proteínas polisialiladas asociadas a la proteína L-agarosa.

Para ello al complejo previamente mencionado se le realizaron dos lavados con 200  $\mu$ l de *buffer* de unión (Fosfato de sodio 0.1M, cloruro de sodio 0.15M), cada lavado se centrifugó a 5 000 rpm durante 4 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se colectó la fracción sobrenadante y sobre la proteína L-agarosa precipitada se adicionaron 100  $\mu$ l de *buffer* de elución (Glicina 0.1M), a continuación esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en un orbital giratorio. Finalmente se le adicionaron 10  $\mu$ l de *buffer* de neutralización (Tris1M) y se procedió a centrifugar la muestra bajo los estándares previamente mencionados. La fracción sobrenadante (proteínas polisialiladas) se colectó y se almacenó a -80°C.

- **IP de Anexina A1**

Para poder separar la proteína Anexina A1 del resto de las proteínas presentes en los lisados totales de los diferentes tipos celulares se procedió a realizar una inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal (pAb) anti-Annexin A1 (Anxa 1 Abcam). Para ello se utilizó un kit de inmunoprecipitación de proteína G Dynabeads™ (Invitrogen Cat. No. 10007D).

En un microtubo de 1.5 ml se incubaron de 500 µg a 1 mg del lisado total de proteínas con 3 µg del pAb anti-Annexin A1 durante 16h en un orbital giratorio a una temperatura de 4°C. Concluido el tiempo de incubación se procedió a homogenizar las Dynabeads™ (Invitrogen) mediante pipeteo suave y se colectaron 50 µl de ellas en microtubo 1.5 ml nuevo, a continuación el microtubo se colocó sobre un imán DynaMag™-2 (Invitrogen Cat. No. 12321D) y se descartó el material sobrenadante. El microtubo fue retirado del imán DynaMag™-2 y las Dynabeads™ fueron incubadas con el complejo proteínas totales-pAb anti-Annexin A1 durante 2h en un orbital giratorio a temperatura ambiente.

Al final de esta incubación el microtubo fue colocado sobre el imán DynaMag™-2 y se colectó la fracción sobrenadante en un nuevo tubo (fracción no unida). Enseguida el complejo asociado a las Dynabeads™ se lavó en 3 ocasiones con 150 µl de *buffer* de lavado (Invitrogen Cat. No. 10007D), todas las fracciones sobrenadantes fueron colectadas en un mismo microtubo. En el último lavado todo el complejo fue transferido a un nuevo microtubo de 1.5 ml.

Finalmente se adicionaron 20  $\mu$ l de *buffer* de elución (Invitrogen Cat. No. 10007D) sobre el complejo de las Dynabeads™ y se incubó durante 30 minutos en un orbital giratorio a temperatura ambiente, a continuación el microtubo fue colocado nuevamente sobre el imán DynaMag™-2 y la fracción sobrenadante (Anexina A1) se colectó en un nuevo tubo. La muestra fue almacenada a -80°C hasta su uso futuro.

## **Espectrometría de masas**

Para conocer la identidad de las proteínas polisialiladas cada muestra previamente inmunoprecipitada se resolvió en un gel SDS-poliacrilamida 7.5% durante 5 minutos a 40 mA constantes en un *buffer* de corrida (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 3 mM). Posterior al tiempo de migración el gel se fijó durante 30 minutos en una solución metanol-ácido acético 50:10 y a continuación se lavó en tres ocasiones con agua miliQ. Concluido el tiempo de lavado, el gel se tiñó durante 24h con coomassie coloidal (Coomassie Brilliant Blue G-250, ThermoFisher) (Anexo 2). Finalmente el gel fue neutralizado con una solución Tris base-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M pH: 6.5 y metanol al 25%.

Las bandas reveladas a través de la tinción con coomassie coloidal se cortaron y enviaron a tres unidades de servicio de espectrometría de masas para su análisis:

1. *Plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU du Québec.*
2. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, Cinvestav.
3. Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), UNAM.

- **Análisis de le Plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU du Québec**

Las proteínas de la muestra fueron solubilizadas en 30  $\mu\text{L}$  (PRM1) o 60  $\mu\text{L}$  (PRM2) de bicarbonato de amonio 50 mM y desoxicolato de sodio al 1% y calentadas a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. A continuación fueron reducidas con DTT 0.2 mM durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y alquiladas con yodoacetamida 0.9 mM durante 20 minutos a la misma temperatura [49, 50].

La digestión de la muestra se realizó con tripsina (0.05  $\mu\text{g}$  de PRM1 o 0.2  $\mu\text{g}$  de PRM2) la cual se incubo toda una noche a una temperatura de 37°C. La reacción de la digestión fue detenida mediante una acidificación con acetonitrilo al 3%, TFA al 1% y ácido acético al 0.5% [49, 50].

Previo a la inyección de la muestra los péptidos se purificaron en una columna C-18 y se secaron al vacío. Posteriormente se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1% y se analizaron mediante espectrometría de masas.

Los péptidos fueron separados en un cromatógrafo de líquidos de fase reversa a nano escala utilizando una columna cromatográfica PicoFrit (New objective) con ReproSil 3 $\mu\text{m}$ , de 15 cm x 0.075 mm de diámetro interno. La separación de los péptidos se realizó en una columna cromatográfica y la elución de los mismos se realizó con un gradiente del 5-35% del disolvente B (acetonitrilo-ácido fórmico al 0.1%) durante 35 minutos a un flujo de 300 nL/min.

Los picos fueron analizados mediante espectrometría de masas por electrospray (ES-MS/MS) en un equipo Ekspert NanoLC425 (Eksigent) acoplado a un espectrómetro de masas 5600+ (Sciex, Framingham, MA, EE. UU.). La identificación de los péptidos y las proteínas se realizó en el software Scaffold (versión Scaffold\_4.7.1, Proteome Software Inc., Portland, OR).



- **Análisis del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales,  
Cinvestav**

La banda fue procesada bajo el protocolo “*In-gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes*” [51].

Los péptidos tripsinizados fueron separados en una columna C18 (HSS T3, Waters, Milford, MA) de 1.8  $\mu\text{m}$  con dimensiones de 75  $\mu\text{m}$  X 150 mm en un equipo UPLC ACQUITY M-Class (Waters, Milford, MA) con un flujo de 400 nL/min de las fases móviles (fase A: ácido fórmico al 0.1% en agua, fase B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo). Los péptidos separados se analizaron en un espectrómetro de masas (Synapt G2-Si, Waters, Milford, MA) con ionización por electropray (ESI) y movilidad iónica (IMS).

La generación de los archivos que contenían los espectros de MS y de MS/MS se desconvolucionaron y se compararon contra una base de datos invertida de Homo sapiens \*.fasta extraída de <https://www.uniprot.org/> usando el software Protein Lynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 (Waters, Milford, MA).

- **Análisis de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria**

La banda del gel se cortó en fragmentos más pequeños y estos se destiñeron durante 12h con metanol al 50% y ácido acético al 5% en una proporción 1:1. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se incubaron en dos ocasiones con bicarbonato de amonio 100 mM durante 15 minutos. Se redujeron con DTT 50 mM durante 45 minutos y se alquilaron con yodoacetamida 30 mM durante 2h. A continuación se lavaron en tres ocasiones con bicarbonato de amonio 100 mM y se deshidrataron completamente con acetonitrilo grado LC-MS (J.T. Baker) al 100%.

Las proteínas fueron digeridas con 30  $\mu$ L de tripsina de porcino modificada (20 ng/ $\mu$ L) durante 18h a una temperatura de 37°C. Los péptidos de la digestión se extrajeron con acetonitrilo grado LC-MS (J.T. Baker) al 50% y ácido fórmico grado analítico (J.T. Baker) al 5% mediante sonicación.

Los péptidos se secaron totalmente y se resuspendieron en 20  $\mu$ L de ácido fórmico al 1%. Posteriormente fueron desalados y concentrados por Ziptip C18 y finalmente eluidos con 12  $\mu$ L de fase móvil acetonitrilo 97:3 + 0.1% de ácido fórmico utilizando agua grado LC-MS (J.T. Baker).

Los péptidos se separaron utilizando una columna C18 (nanoACQUITY UPLC) de 1.8  $\mu\text{m}$  con dimensiones de 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm, un flujo de 0.4 nL/min de la fase móvil (fase A: ácido fórmico al 0.1% en agua, fase B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo) y una temperatura de 35°C. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de líquidos nanoACQUITY (Waters). El modo de ionización fue ESI y se realizó en un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo modelo Synapt G2S (Waters). El software utilizado para el procesamiento de datos fue Protein Lynx Global Server 2.5.1<sup>TM</sup> (Waters). Para la identificación de proteínas se usó la base de datos Uniprot-Human extraída de <https://www.uniprot.org/>.

### **Digestión enzimática con Endoneuraminidasa N (Deglicosilación)**

Con el fin de inferir si las proteínas detectadas con el mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience) que reconoce un DP $\geq$ 5 residuos de Sia, efectivamente son proteínas polisialiladas realizamos una digestión también conocida como deglicosilación, con la enzima Endoneuraminidasa N (ABC Scientific Cat. No. Abc-0020). Como previamente se mencionó la Endo-N es una enzima específica para la remoción de ácido siálico en configuración  $\alpha$ 2, 8 a partir de un DP= 8-11 residuos, por lo tanto es una enzima que escinde ácido polisiálico.

El tratamiento de digestión con la enzima Endon N se realizó utilizando 0.0875 unidades de enzima (0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l), las cuales se adicionaron directamente a la muestra. Posteriormente dicha muestra se homogenizo mediante pipeteo suave y se incubo durante 12h a una temperatura de 37°C. El tratamiento de digestión enzimática fue analizado mediante *western blot* (WB) siguiendo el protocolo de identificación de proteínas con el mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience) descrito a continuación.

## SDS-PAGE y western blots

- **Anti-PSA NCAM**

A través de la técnica de *western blot* se identificaron los pesos moleculares de las proteínas polisialiladas reactivas al mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience).

En un gel SDS-poliacrilamida 7.5% se cargaron 100 µg de proteínas y se resolvieron a 40 mA constantes en un *buffer* de corrida (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 3 mM). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore) durante 2h a 300 mA constantes en un *buffer* de transferencia (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM y 20% de Metanol).

Una vez que ocurrió la transferencia, la membrana PVDF se bloqueó durante 1h a temperatura ambiente en 30 ml de solución de bloqueo (Tbst 0.2%, 5% de leche Svelty libre de grasa) a una velocidad de agitación de 60 rpm. Posterior al tiempo de incubación la membrana fue lavada brevemente con 40 ml de Tbst 0.2 %. A continuación la membrana fue incubada durante 16h con el mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience) en una solución compuesta por 15 ml de Tbst 0.2%, 5% de leche Svelty libre de grasa y 1 µg del mAb anti-PSA NCAM (12E3 eBioscience).

Una vez concluida la incubación, la membrana fue lavada cuatro veces cada 15 minutos con 40 ml de Tbst 0.2% a una velocidad de 85 rpm. Enseguida se incubó el anticuerpo secundario cabra anti-ratón IgM HRP (A90-101P Bethyl Laboratories) durante 1h a temperatura ambiente en una solución que contiene 20 ml de Tbst 0.2%, 80 µl de FBS y 1 µg del anticuerpo cabra anti-ratón IgM HRP (A90-101P Bethyl Laboratories).

Al finalizar la incubación la membrana se lavó en cuatro ocasiones cada 20 minutos con 40 ml de Tbst 0.2% y una velocidad de agitación de 85 rpm. Finalmente la membrana se reveló con ECL (GE) siguiendo las especificaciones del proveedor.

- **Anti-Annexin A1**

Para identificar la presencia de la proteína Anexina A1 a través de la técnica de *western blot* aplicamos la siguiente metodología.

En un gel SDS-poliacrilamida 7.5% se cargaron por lo menos 100  $\mu\text{g}$  de la proteína de interés la cual se resolvió a 40 mA constantes en un *buffer* de corrida (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 3 mM). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore) durante 2h a 300 mA constantes en un *buffer* de transferencia (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM y 20% de Metanol).

Una vez que ocurrió la transferencia, la membrana PVDF se bloqueó durante 2h en 30 ml de solución de bloqueo (Pbst 0.2%, 5% de leche Svelty libre de grasa) con una velocidad de agitación de 60 rpm. Posterior al tiempo de incubación la membrana fue lavada brevemente con 40 ml de Pbst 0.2 % y enseguida se incubó durante 16h con el pAb anti-Annexin A1 (Anxa 1 Abcam) en una solución compuesta por 5 ml de Pbst 0.2%, 3% de leche Svelty libre de grasa y 1  $\mu\text{g}$  del pAb anti-Annexin A1 (Anxa 1 Abcam).

Al concluir la incubación de la membrana esta fue lavada en cuatro ocasiones cada 15 minutos con 40 ml de Pbst 0.2% a una velocidad de agitación de 85 rpm y enseguida se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG HRP durante 2h a temperatura ambiente en una solución que contiene 20 ml de Pbst 0.2%, 3% de leche Svelty libre de grasa y 1  $\mu\text{g}$  del anticuerpo cabra anti-conejo IgG HRP.

Al finalizar la incubación la membrana se lavó en cuatro ocasiones cada 15 minutos con 40 ml de Pbst 0.2% y una velocidad de agitación de 85 rpm. Finalmente la membrana se reveló con ECL (GE) siguiendo las especificaciones del proveedor.

### **Análisis estadístico**

Los experimentos normalizados fueron sometidos a la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov (KS). La significancia estadística de cada uno de los experimentos se calculó con base al ajuste de cada caso (prueba t de *Student* y ANOVA), el análisis de estas pruebas se realizó con el software Prisma GraphPad. Los valores  $P < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.



## RESULTADOS

### **El linfocito T CD4+ humano activado expresa proteínas polisialiladas**

Para determinar si la sobreexpresión de los genes ST8SIAII y ST8SIAIV, que codifican para las polisialiltransferasa ST8Sia II y ST8Sia IV respectivamente, conducen a un incremento de la sialilación  $\alpha 2, 8$  en las proteínas del linfocito T CD4+ humano activado realizamos una inmunoprecipitación con el mAb anti-PSA NCAM 12E3, anticuerpo que ya se ha reportado reconoce proteínas polisialiladas [52]. Esta inmunoprecipitación posteriormente fue sometida a un tratamiento de deglicosilación con la enzima Endo N.

A través del uso de la técnica de WB evaluamos los resultados de esta digestión (Figura 7) y encontramos que a diferencia del tratamiento control (carril 1) el tratamiento de deglicosilación (carril 2) pierde la susceptibilidad de reconocimiento por parte del mAb anti-PSA NCAM 12E3, lo que sin duda demuestra que las proteínas del linfocito T CD4+ activado que se reconocen con este anticuerpo son proteínas polisialiladas.

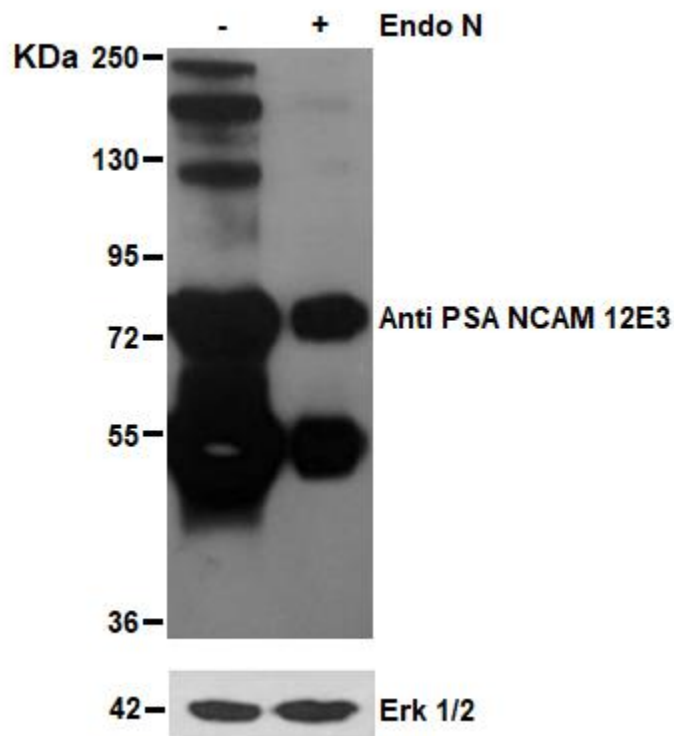


Figura 7. **Deglicosilación de las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+.** Parte superior: WB de la expresión de las proteínas polisialiladas reconocidas por el mAb anti-PSA NCAM 12E3 y visualizadas con el anticuerpo anti-ratón IgM acoplado a peroxidasa. En este WB se identifican los pesos moleculares de las proteínas polisialiladas presentes del linfocito T CD4+ en condiciones control (carril 1) y en condiciones de digestión (carril 2). La expresión en cada condición se comparó usando el anticuerpo anti-Erk 1/2 (Invitrogen) como control de carga. En ambos carriles se cargaron 250  $\mu$ g de las proteínas del linfocito T CD4+ inmunoprecipitadas con el mAb anti-PSA NCAM 12E3. La figura muestra el resultado representativo de cinco experimentos independientes.

## El silenciamiento de la *ST8SIA2* y la *ST8SIA4* inducen la sobreexpresión de los genes asociados a la activación del linfocito T CD4+

Para evaluar el papel funcional que desempeña el ácido polisiálico durante el proceso de activación del linfocito T CD4+, realizamos un silenciamiento genético de la *ST8SIA2* y de la *ST8SIA4* mediado por partículas lentivirales shRNA.

Para validar la eficacia de este experimento cuantificamos la expresión relativa de cada silenciamiento mediante la técnica de qPCR, a partir de la cual logramos identificar los porcentajes de pérdida de la expresión de ambos genes, evidenciando una pérdida mayor al 90% para la *ST8SIA2* (Figura 8A) y una pérdida cercana al 60% para la *ST8SIA4* (Figura 8B).

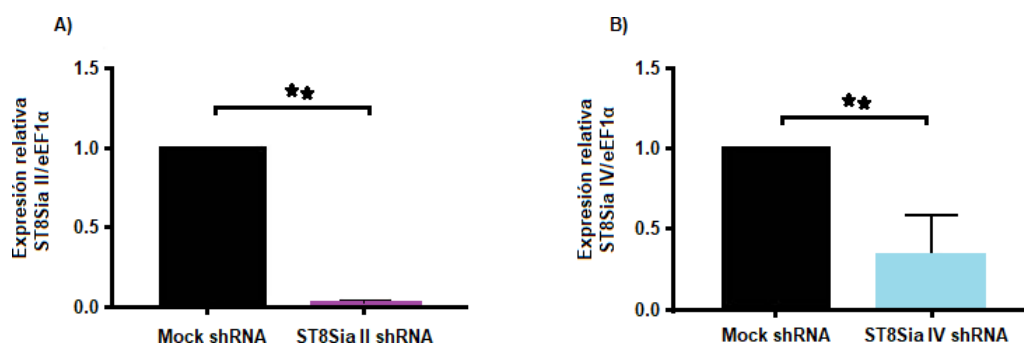


Figura 8. **Silenciamiento de los genes *ST8SIA2* y *ST8SIA4*.** Expresión relativa del silenciamiento de la *ST8SIAII* (A) y la *ST8SIAIV* (B) en linfocitos T CD4+ activados. En negro se observa la expresión relativa de las polisialiltransferasas infectadas con el control lentiviral (Mock shRNA), mientras que en morado y azul se observa la expresión relativa del silenciamiento de la *ST8Sia II* y la *ST8Sia IV* respectivamente. La expresión de estos silenciamientos se normalizó con el gen interno eEF1α. Las gráficas muestran la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Error de significancia \*\*P<0.001.

Para evaluar si el silenciamiento de las sialiltransferasas no solo disminuía la expresión genética, sino también la expresión proteica evaluamos la expresión de la polisialilación de las células *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* silenciadas mediante WB (Figura 9).

Como se puede observar, en los carriles que se encuentran los linfocitos T CD4+ *ST8SIAII* silenciados (carril 2) y *ST8SIAIV* silenciados (carril 3) se reduce la intensidad de reconocimiento por parte del mAb anti-PSA NCAM 12E3 comparado con el silenciamientos control (Mock shRNA) (carril 1), lo que evidencia que el silenciamiento además de disminuir la expresión genética de cada una de las polisialiltransferasas también disminuye la expresión de Sia  $\alpha$ 2,8 en las proteínas del linfocito T CD4+ activado.

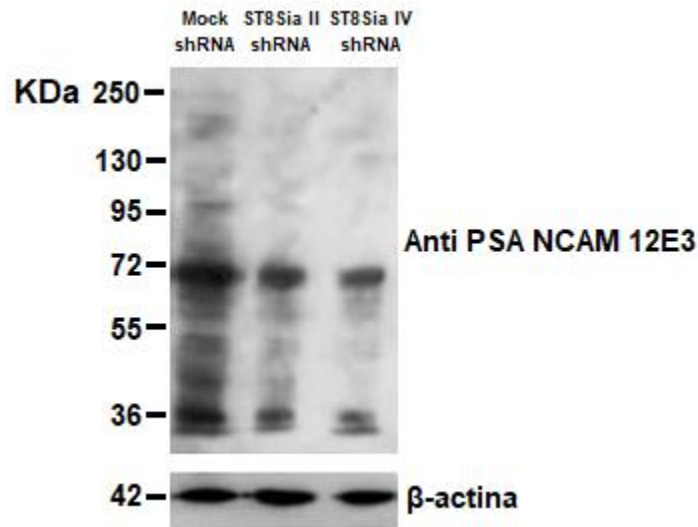


Figura 9. **El silenciamiento de los genes ST8SIA2 y ST8SIA4 reduce la expresión de ácido polisiálico en las proteínas del linfocito T CD4+ activado.** Parte superior: WB de la expresión de las proteínas polisiálicas reconocidas por el mAb anti-PSA NCAM 12E3 y visualizadas con el anticuerpo anti-ratón IgM acoplado a peroxidasa. En este WB se reconoce el perfil de las proteínas polisiálicas presentes del linfocito T CD4+ en condiciones control (mock shRNA) (carril 1) y en condiciones de silenciamiento genético ST8SIAII (carril 2) y ST8SIA IV (carril 3). La expresión en cada condición se comparó usando el anticuerpo anti-β-actina como control de carga. En todos los carriles se cargó el lisado celular de 100 000 linfocitos. La figura muestra el experimento representativo de tres replicas independientes.

Para determinar el papel funcional del ácido polisiálico y de la polisialilación del linfocito T CD4+ activado realizamos varias mediciones en las células *ST8SIAII* y *ST8SIAIV* silenciadas donde cuantificamos los niveles de expresión de los genes de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), que se ha reportado es una citocina efectora que se produce tras la estimulación antigénica del linfocito T CD4+ [53]; de IL-2 que sabemos es la principal citocina que se produce tras el proceso de activación [1, 7-10] y del receptor de IL-2 (IL-2R) [1, 7].

A través de qPCR se identificó que los silenciamientos de la *ST8SIA2* y de la *ST8SIA4* conducen a la sobreexpresión de los genes asociados a la activación del linfocito T CD4+. Esta sobreexpresión se determinó con respecto a la expresión de los genes presentes en las células infectadas con las partículas lentivirales control (Mock shRNA). Se observa que *INF $\gamma$*  se expresó 4 veces más en las células *ST8SIA2* silenciadas y 4.8 veces más en las células con el silenciamiento para *ST8SIA4* (Figura 10A); sorpresivamente *IL-2* se sobreexpresó 25 veces más en las células *ST8SIA2* silenciadas y 4.5 veces más en las células con el silenciamiento del gen *ST8SIA4* (Figura 10B); finalmente la expresión *IL-2R* aumento 2 veces en las células *ST8SIA2* silenciadas y 3 veces en las células *ST8SIA4* silenciadas (Figura 10C).

Con estos resultados logramos evidenciar que el ácido polisiálico presente en las proteínas del linfocito T CD4+ está estrechamente involucrado en los procesos regulatorios de la activación de estas células.

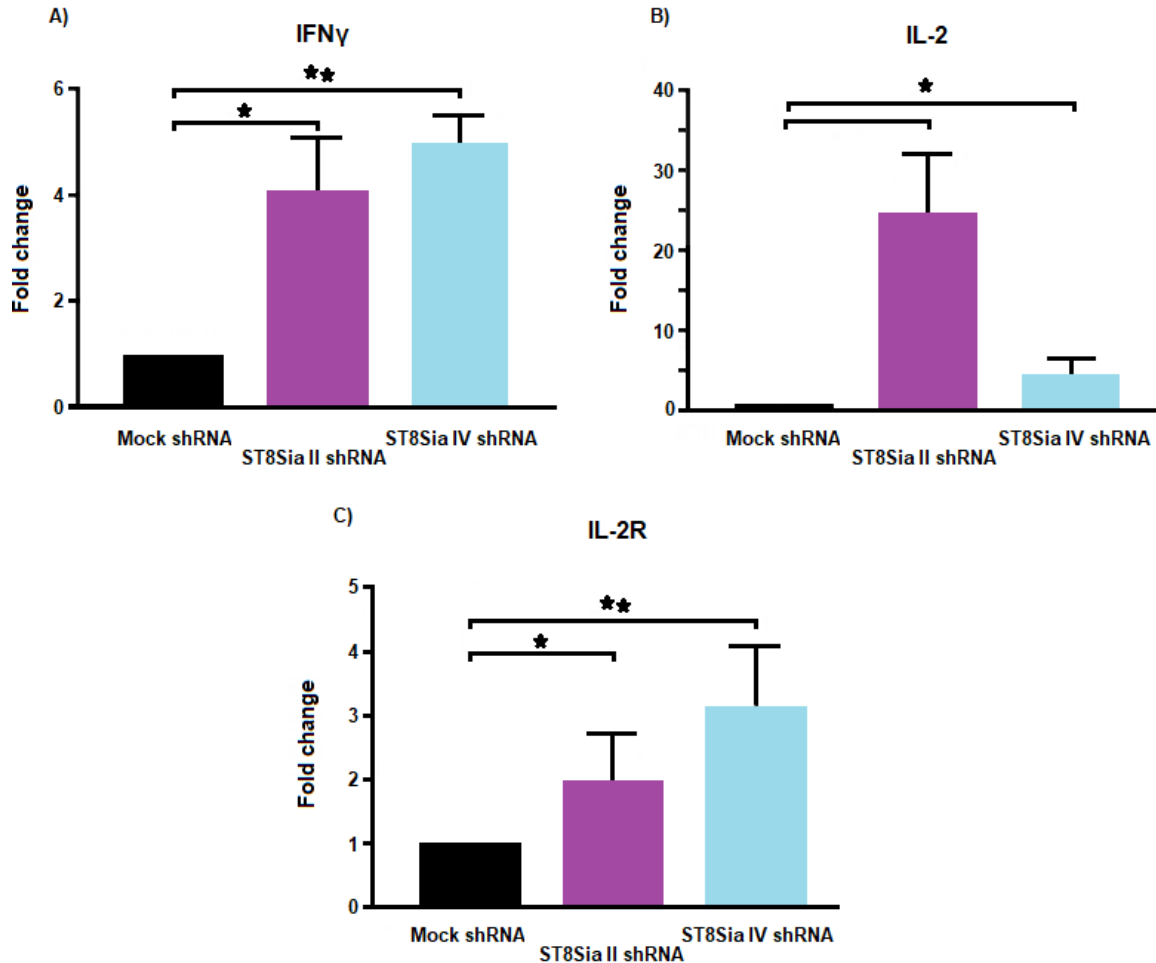


Figura 10. **El silenciamiento de los genes ST8SIA2 y ST8SIA4 conduce a la sobreexpresión de los genes asociados a la activación del linfocito T CD4+.** Expresión de *IFN $\gamma$*  (A), *IL-2* (B) e *IL-2R* (C) expresada como veces de cambio. La barra negra representa la expresión genética de las células control (mock shRNA), la barra morada la expresión genética de las células *ST8SIAII* silenciadas y la barra azul la expresión genética de las células *ST8SIAIV* silenciadas. La expresión de estos silenciamientos se normalizó con el gen interno eEF1 $\alpha$ , mientras que el análisis estadístico se calculó con la prueba t de *Student* comparando cada silenciamiento con las células Mock control. Error de significancia en barras \* P<0.05, \*\* P<0.001. Se muestran la media de tres experimentos independientes.

## **El linfocito T CD4+ activado y las células Molt-4 comparten un perfil de proteínas polisialiladas**

Si bien hasta ahora habíamos logrado identificar la presencia de proteínas polisialiladas en el linfocito T CD4+ humano activado y además demostramos que el ácido polisiálico presente en ellas está involucrado en el proceso de la activación, aún desconocíamos la identidad de las mismas.

Para poder determinar la identidad de las proteínas polisialiladas realizamos una inmunoprecipitación con el mAb anti-PSA NCAM 12E3, la cual posteriormente enviamos a un servicio de espectrometría de masas para su análisis (*Plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU du Québec*).

Los resultados de esta espectrometría evidenciaron la identidad de diversas proteínas que se expresan en múltiples localizaciones celulares, pero debido a nuestro interés particular en las proteínas superficie, filtramos los resultados de modo que únicamente se mostraran las proteínas que se expresan en la superficie de la membrana celular.

La única proteína de membrana que se logró identificar en esta espectrometría de masas fue la  **$\alpha$ -enolasa**. La enolasa del ser humano se manifiesta en tres isoenzimas conocidas como  $\alpha$ -enolasa,  $\beta$ -enolasa y  $\gamma$  enolasa y las cuales se expresan en la mayoría de los tejidos [54].



La  $\alpha$ -enolasa es una enzima multifuncional que además de catalizar la conversión del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis tiene la capacidad para servir como receptor de plasminógeno en la superficie de una variedad de células hematopoyéticas, epiteliales y endoteliales, lo que sugiere que esta proteína puede desempeñar un papel importante en el sistema fibrinolítico intravascular y pericelular [54]. Por otra parte su papel en los trastornos autoinmunes sistémicos e invasivos [54] y su capacidad de unión a las estructuras del citoesqueleto indican que esta enzima puede desempeñar un papel crucial en una variedad de procesos fisiopatológicos [55]. A pesar de que se ha reportado que esta proteína participa en procesos autoinmunes no se ha reportado que esta enzima se asocie con el proceso de activación del linfocito T CD4+, de modo que la  $\alpha$ -enolasa no fue elegida como proteína de interés.

Si bien en este primer estudio de espectrometría de masas no se identificó la cantidad de proteínas de membrana que esperábamos, estos resultados nos permitieron conocer nuevas estrategias que posteriormente nos permitieron identificar más proteínas.

Como previamente se mencionó nuestra investigación está dirigida al estudio de las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ activado, pero debido a los elevados costos que se generaron durante la obtención de las estas células nuestra investigación comenzó a verse limitada, por lo que tuvimos que buscar nuevas alternativas que nos permitieran sustituir el uso de los linfocitos T CD4+.

Las células Molt-4 son una línea celular que además de compartir la naturaleza de origen con los linfocitos TCD4+ también comparten sus características fisiológicas. Las células Molt-4 al igual que los linfocitos T CD4+ proceden de sangre periférica humana pero a diferencia de las células empleadas en estos experimentos (linfocitos T CD4+ sanos) esta línea celular proviene de un hombre con leucemia linfoblástica aguda, un tipo particular de leucemia que mantiene estable la población de los linfocitos T [56].

Para determinar si esta línea celular nos podría ser de utilidad procedimos a comparar el perfil de las proteínas polisialiladas reconocidas con el anti-PSA NCAM 12E3 de ambos tipos celulares (Figura 11). Como se puede observar, los perfiles de las proteínas polisialiladas reconocidas en el linfocito T CD4+ activado (carril 1) y en las células Molt-4 (carril 2) son altamente similares.

El conjunto de estos resultados y considerando la naturaleza biológica de esta línea propusimos que las células Molt-4 sirven como un modelo comparable que permite extrapolar información de estas células al linfocito T CD4+.

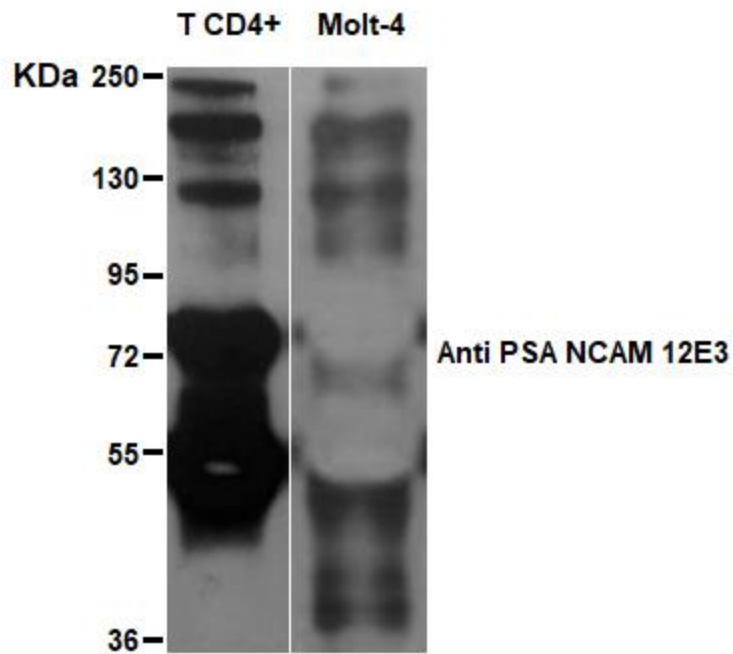


Figura 11. **Las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ activado y de las células Molt-4.** WB de la expresión de las proteínas polisialiladas reconocidas por el mAb anti-PSA NCAM 12E3 y visualizadas con el anticuerpo anti-ratón IgM acoplado a peroxidasa. El WB muestra los pesos moleculares de las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ activado (carril 1) y de las células Molt-4 (carril 2). En ambos carriles se cargaron 250  $\mu$ g de las proteínas polisialiladas previamente inmunoprecipitadas con el mAb anti-PSA NCAM 12E3. La figura muestra el experimento representativo de tres experimentos independientes.

## **Las células Molt-4 expresan Anexina A1**

Una vez que identificamos que las células Molt-4 comparten un perfil de proteínas polisialiladas con el linfocito T CD4+ activado, procedimos a enviar muestras de las proteínas polisialiladas de las células Molt-4 a diferentes servicios de espectrometría de masas para poder continuar con su identificación.

Los servicios de identificación espectrométrica fueron los siguientes:

1. *Plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU du Québec.*
2. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, Cinvestav.
3. Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), UNAM.

Tal y como se describió en el apartado anterior, la primera espectrometría masas que realizamos nos permitió conocer nuevas estrategias que favorecen la cobertura de reconocimiento de los péptidos durante la detección espectrométrica. Una de estas técnicas consistió en eliminar el Sia  $\alpha 2$ , 8 de nuestras muestras a través de una deglicosilación, ya que las cargas negativas de este carbohidrato pueden intervenir con la detección de los iones al momento de volatilizar las muestras, de modo que se puede afectar el rango de resolución y reconocimiento de péptidos.

Con base en esta información las siguientes muestras que enviamos a los diferentes servicios de espectrometría de masas fueron de proteínas polisialiladas deglicosiladas. Los resultados de estas tres espectrometrías nuevamente se filtraron de modo que únicamente se mostraran las proteínas que se expresan en la superficie de la membrana celular.

**Tabla 5. Identificación de proteínas polisialiladas a través de espectrometría de masas.** La tabla 5 resume las proteínas de membrana identificadas en los diferentes servicios de espectrometría de masas.

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular (KDa)</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Localización celular</b>
<b><i>Plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU du Québec.</i></b>			
<b><math>\alpha</math>-enolasa</b>	47	17	Membrana celular y citoplasma
<b>Anexina A1</b>	39	51	Membrana celular, citoplasma, endosoma y núcleo
<b>Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, Cinvestav.</b>			
<b><math>\alpha</math>-enolasa</b>	47	13.36	Membrana celular y citoplasma
<b>Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, UNAM.</b>			
<b><math>\alpha</math>-enolasa</b>	47	12.67	Membrana celular y citoplasma

Al igual que en el primer servicio enviado a *le Plateforme protéomique du Centre de recherche du CHU*, los servicios del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales y de la USAII muestran la identificación de la  $\alpha$ -enolasa. En contraste, los resultados obtenidos en el segundo servicio realizado en Québec, muestra la identificación de la proteína **Anexina A1**.

Anexina A1 (ANXA1) anteriormente conocida como lipocortina 1 es una proteína multifuncional que pertenece a la súper familia de las anexinas, que son proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio que se expresan en la mayoría de las células eucariotas [57].

Estructuralmente está formada por un dominio central que a su vez está compuesto por cuatro repeticiones similares, cada una de aproximadamente 70 aminoácidos de largo. Cada repetición está compuesta por cinco  $\alpha$ -hélices y un motivo característico de “tipo 2” (GxGT-(38 aminoácidos)-D/E) para que permite la unión de los iones de calcio [58] (Figura 12).

Funcionalmente se ha reportado que la Anexina A1 participa como un efector de la respuesta mediada por los glucocorticoides y como un regulador del proceso inflamatorio, potenciando las cascadas de señalización que se encienden durante la activación del linfocito T [59] y además que participa en la diferenciación de las células T al aumentar la expresión de CD69 y CD25 (IL-2RA) [59, 60].

La adición de ANXA1 recombinante a los linfocitos T activados vía anti-CD3/ anti-CD28 conduce al aumento de la activación y de la proliferación de estas células [59], esto debido a que la adición de ANXA1 incrementa la expresión de FPR1 y en consecuencia se produce un aumento en la estimulación de las vías de la AKT y de la MAPK ERK [61] y la subsecuente activación de los factores transcripcionales AP-1, NFAT y NF-KB [59].

Adicional a estos reportes donde se demuestra la importancia de ANXA1 durante la activación del linfocito T CD4+ también se ha demostrado que esta proteína tiene regiones *N*-glicosiladas (Asn-42) [62], lo cual la situó como nuestra principal proteína de interés.

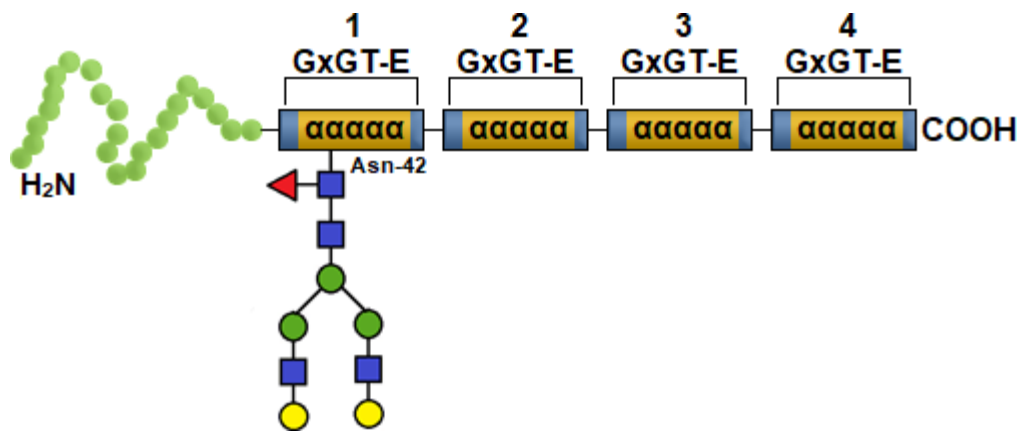


Figura 12. **Anexina A1 (ANXA1)**. Anexina A1 es una proteína glicosilada formada por una región amino terminal única y una 'región núcleo' seguida de un carboxilo terminal. La "región núcleo" está formada por cuatro repeticiones que contienen cinco  $\alpha$ -hélices y un sitio de unión a calcio (GxGT-D/E). En la posición 42 de la "región núcleo" de esta proteína hay una Asn sujeta a *N*-glicosilación. Modificada de Moss & Morgan, 2004.

### **El linfocito T CD4+ humano activado expresa Anexina A1**

Para demostrar que Anexina A1 es una proteína que no solo se encuentra presente en las células Molt-4, sino también en los linfocitos T CD4+ activados realizamos un WB sobre las proteínas polisialiladas de ambos tipos celulares y lo revelamos contra el pAb anti-Anexinn A1.

Como se puede observar en la figura 13 en ambos tipos celulares el pAb anti-Anexinn A1 reconoce una proteína que corresponde a los aproximadamente 36 KDa, la cual coincide con el peso molecular de ANXA1. Este hallazgo generó la hipótesis de que la proteína Anexina A1 que se expresa en el linfocito T CD4+ activado está sujeta a modificaciones de polisialilación.



Figura 13. **Anexina A1 se expresa en el linfocito T CD4+ activado y en las células Molt-4.** WB de la expresión de Anexina A1. Los carriles 1 y 2 representan las proteínas polisialiladas (previamente inmunoprecipitadas con el mAb anti-PSA NCAM 12E3) del linfocito T CD4+ humano activado y de las células Molt-4 respectivamente. El carril 3 representa el control positivo de esta proteína (lisado de células A549). En todos los carriles se cargaron 250 µg de proteína. La figura muestra el experimento representativo de tres experimentos independientes.



## **Anexina A1 es una proteína susceptible a la digestión enzimática con Endoneuraminidasa N**

Para confirmar que la Anexina A1 que se expresa en el linfocito T CD4+ activado efectivamente está sujeta a modificaciones de polisialilación realizamos una inmunoprecipitación de esta proteína con el pAb anti-Annexin A1 la cual posteriormente digerimos con un tratamiento de deglicosilación tal como Zuber y colaboradores lo realizaron cuando identificaron la polisialilación de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dependiente de voltaje [32].

Para evaluar los resultados de estos experimentos realizamos un WB que revelamos con el mAb anti-PSA NCAM 12E3 (Figura 14). En el carril 1 se observa el control positivo para Anexina A1, mientras que en los carriles 2 (tratamiento control) y 3 (digestión enzimática) se visualiza la inmunoprecipitación de esta proteína. Como se puede observar, en el tratamiento de digestión (carril 3) existe una pérdida del reconocimiento por parte del mAb anti-PSA NCAM 12E3, lo que hace referencia a la susceptibilidad de esta proteína al tratamiento de deglicosilación con la Endoneuraminidasa N y en consecuencia confirma que la Anexina A1 es una proteína modificada con la adición de ácido polisiálico. Para sustentar estos resultados también realizamos dos WB adicionales, uno donde evidenciamos la expresión de ANXA1 en las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ (Anexo 3A) y otro donde reconocimos la expresión de ácido polisiálico en la proteína Anexina A1 (Anexo 3B) lo cual efectivamente demuestra que Anexina A1 es una proteína polisialilada.

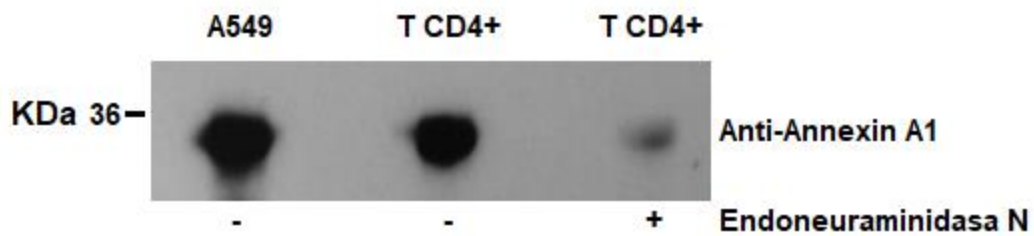


Figura 14. **Anexina A1 es una proteína susceptible a la digestión con Endoneuraminidasa N.** WB de la expresión de Anexina A1. El WB identifica el peso molecular (36 KDa aproximadamente) de la proteína Anexina A1 reconocida en el control positivo (células A549) (carril 1) y en las inmunoprecipitaciones con el pAb anti-Annexin A1 que se realizaron sobre los linfocitos T CD4+ humanos activados (carril 2 y 3). El carril 2 representa la muestra control y el carril 3 la digestión enzimática con la Endo-N. El tratamiento de digestión enzimática se realizó utilizando 0.0875 unidades de enzima (0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). En todos los carriles se cargaron 250  $\mu\text{g}$  de proteína Anexina A1. La figura muestra el resultado representativo de tres experimentos independientes.

## DISCUSIONES

El ácido polisiálico es un homopolímero lineal sintetizado a partir de ocho residuos de ácido siálico por la acción de las polisialiltransferasas ST8Sia II y ST8Sia IV. En 2015 Villanueva y colaboradores reportaron que durante la activación del linfocito T CD4+ naive existe una sobreexpresión de los genes ST8SIAII y ST8SIAIV, que codifican para la síntesis de ambas polisialiltransferasas, que conduce a un incremento en la sialilación  $\alpha 2, 8$  *de novo* de estas células. Este hallazgo sugirió que existía un aumento de la adición de Sia 2, 8 en las proteínas que se expresan en el linfocito T CD4+ activado [48].

Para demostrar esta hipótesis realizamos varias inmunoprecipitaciones con el mAb anti-PSA NCAM 12E3, con las que aislamos las proteínas polisialiladas presentes en el linfocito T CD4+ activado, posteriormente esas proteínas fueron deglicosiladas con un tratamiento de digestión enzimática con Endoneuraminidasa N [32] y posteriormente visualizadas a través del uso de la técnica de WB.

Derivado de estos experimentos logramos identificar la susceptibilidad de las proteínas polisialiladas, inmunoprecipitadas con el mAb anti-PSA NCAM 12E3, al tratamiento de deglicosilación con la enzima Endo-N (Figura 7) lo que nos permitió evidenciar que las proteínas del linfocito T CD4+ que se reconocen con este anticuerpo efectivamente son proteínas polisialiladas.

Posteriormente este trabajo demostró que el silenciamiento de la *ST8SIA2* y *ST8SIA4* disminuye no solo la expresión del mRNA que codifica para ambas polisialiltransferasas (Figura 8), sino que también disminuye el reconocimiento de las proteínas polisialiladas por parte del mAb anti-PSA NCAM (Figura 9), lo que nuevamente confirma la hipótesis de que durante la activación de linfocito T CD4+ existía un aumento de la adición de Sia 2, 8 no solo en lípidos, sino también en proteínas.

Adicional a estos hallazgos logramos demostrar que el silenciamiento de los estos genes incrementa la expresión de *IL-2*, *IL-2R* e *IFN $\gamma$* , genes que fuertemente vinculados con el proceso de activación.

Como se demostró en la figura 9 el silenciamiento de cada gen produce un perfil proteico similar de perdida de PoliSia, pero en el caso de los genes se observaron diferentes comportamientos. *IFN $\gamma$*  se sobreexpresó 4 veces más en las células *ST8SIAII* silenciadas y 4.8 veces más en las células con el silenciamiento para *ST8SIAIV* (Figura 10A); sorpresivamente *IL-2* se sobreexpresó 25 veces más en las células *ST8SIAII* silenciadas y 4.5 veces más en las células con el silenciamiento del gen *ST8SIAIV* (Figura 10B); finalmente la expresión *IL-2R* aumento 2 veces en las células *ST8SIAII* silenciadas y 3 veces en las células *ST8SIAIV* silenciadas (Figura 10C).

Como se puede observar la sobreexpresión de *IL-2R* e *IFN $\gamma$*  fue mayor en las células *ST8SIA4* silenciadas mientras que la sobreexpresión de *IL-2* fue intensamente superior en las células *ST8SIA2* silenciadas.

Esto demuestra que el ácido polisiálico sintetizado por cada polisialiltransferasa podría desempeñar un papel diferente durante el proceso de activación del linfocito T CD4+.

Si bien hasta ahora habíamos logrado identificar la presencia de proteínas polisialiladas en el linfocito T CD4+ humano activado y además habíamos demostrado que el ácido polisiálico que se expresa en estas células, aún desconocíamos la identidad de las mismas. Gracias a la técnica de espectrometría de masas logramos identificar que Anexina A1 es una proteína que se expresa en las células Molt-4 y en el linfocito T CD4+.

ANXA1 es una proteína glicosilada [62] que se sabe se expresa en las células del sistema inmune de muchos mamíferos [59], sin embargo, nunca se había descrito que esta proteína pudiese tener modificaciones por la adición de ácido polisiálico, pero el presente trabajo logró evidenciar que esta proteína no solo puede ser reconocida por el mAb anti-PSA NCAM 12E3 (Anexo 3B), sino que también es susceptible al tratamiento de deglicosilación con la enzima Endoneuraminidasa N (Figura 14). Estos hallazgos nos permitieron reportar por primera vez que la Anexina A1 es una proteína polisialilada.

A través del uso de ratones *ANXA1<sup>-/-</sup>* se ha demostrado que el silenciamiento genético de la Anexina A1 deteriora la capacidad del linfocito T de responder a estímulos a través de la estimulación del TCR [59], lo que se traduce en una disminución de la fosforilación de a MAPK ERK y la enzima AKT, una disminución en la activación de los factores de transcripción AP-1, NFAT y NF-KB y en consecuencia una disminución en la expresión de IL-2 [59].

Contrastando esta información con los resultados obtenidos en este trabajo, donde evidenciamos que el silenciamiento de la *ST8SIA2* conduce a la sobreexpresión de *IL-2*, podemos hipotetizar que el ácido polisiálico presente en la proteína Anexina A1 es catalizado por la polisialiltransferasa ST8Sia II y además que el ácido polisiálico presente en esta proteína participa como un regulador de la expresión de IL-2 que evita una activación exacerbada (Figura 15). Con base en esta nueva hipótesis creemos que sería muy importante continuar con el estudio de la polisialilación de Anexina A1.

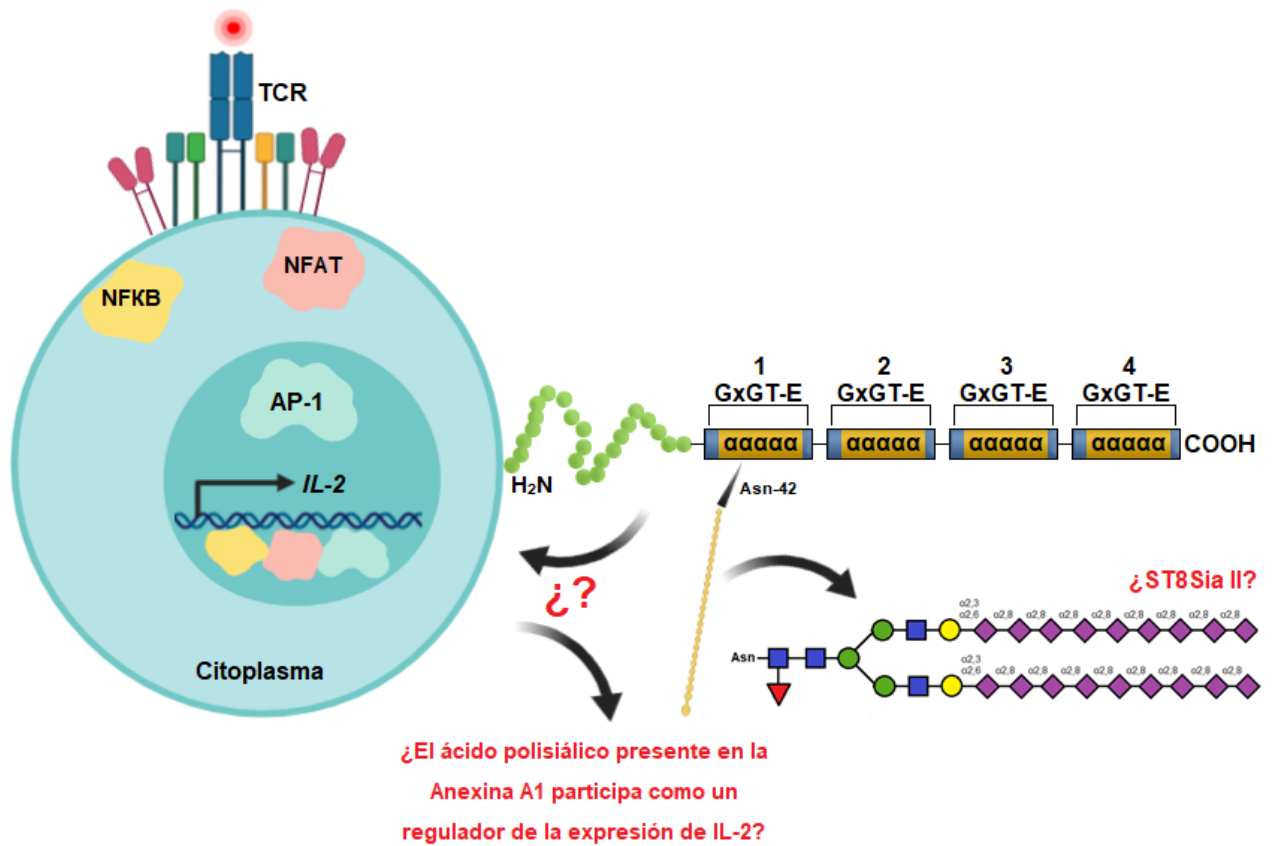


Figura 15. ¿El ácido polisiálico será un posible regulador de la expresión de la IL-2?

## CONCLUSIONES

1. El linfocito T CD4+ activado expresa proteínas polisialiladas que son reconocidas por el mAb anti-PSA NCAM 12E3.
2. En el linfocito T CD4+ activado el silenciamiento de la *ST8SIA2* y la *ST8SIA4* inducen a la sobreexpresión de los genes IL-2, IL-2R e IFN $\gamma$ .
3. En el linfocito T CD4+ activado el silenciamiento de la *ST8SIA2* y la *ST8SIA4* disminuyen la capacidad del mAb anti-PSA NCAM 12E3 de reconocer proteínas polisialiladas.
4. El linfocito T CD4+ activado y las células Molt-4 comparten un perfil de proteínas polisialiladas reconocidas por el mAb anti-PSA NCAM 12E3.
5. El linfocito T CD4+ activado y las células Molt-4 expresan Anexina A1.
6. Anexina A1 es una proteína polisialilada que se expresa en la superficie del linfocito T CD4+ activado.



## **PERSPECTIVAS**

- Caracterizar estructural y funcionalmente el ácido polisiálico de la proteína Anexina A1 presente en el linfocito T CD4+ humano activado.
- Evaluar la contribución que cada una de las polisialiltransferasas tiene en la polisialilación de la proteína Anexina A1.
- Continuar los estudios de espectrometría de masas y determinar la identidad del resto de las proteínas reconocidas con el mAb anti-PSA NCAM 12E3.
- Evaluar la polisialilación de las proteínas del linfocito T CD4+ humano activado con el mAb 735.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015) *Cellular and Molecular Immunology* (8th edition) Elsevier Inc.
- 2) Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., & Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>
- 3) Kaufmann S. (2019). Immunology's Coming of Age. *Frontiers in immunology*, 10, 684. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00684>
- 4) Petrie, H. T., & Kincade, P. W. (2005). Many roads, one destination for T cell progenitors. *The Journal of experimental medicine*, 202(1), 11–13. <https://doi.org/10.1084/jem.20050990>
- 5) Tupin, E., Kinjo, Y., & Kronenberg, M. (2007). The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature reviews. Microbiology*, 5(6), 405–417. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1657>
- 6) Pacholczyk, R., & Kern, J. (2008). The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology*, 125(4), 450–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02992.x>
- 7) Goyette, J., Nieves, D. J., Ma, Y., & Gaus, K. (2019). How does T cell receptor clustering impact on signal transduction?. *Journal of cell science*, 132(4), jcs226423. <https://doi.org/10.1242/jcs.226423>

- 8) Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., & Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology*, 8(8), 607–618. <https://doi.org/10.1038/nri2368>
- 9) Neefjes, J., Jongstra, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nri3084>
- 10) Stern, L. J., Potolicchio, I., & Santambrogio, L. (2006). MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Current opinion in immunology*, 18(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.005>
- 11) Zhu, X., Miao, X., Wu, Y., Li, C., Guo, Y., Liu, Y., Chen, Y., Lu, X., Wang, Y., & He, S. (2015). ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Experimental cell research*, 335(2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.020>
- 12) Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G., & Rabinovich, G. A. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature immunology*, 8(8), 825–834. <https://doi.org/10.1038/ni1482>
- 13) Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., & Seeberger, P. H. (Eds.). (2015). *Essentials of Glycobiology*. (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 14) Bi, S., & Baum, L. G. (2009). Sialic acids in T cell development and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(12), 1599–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.027>
- 15) Li, Y., & Chen, X. (2012). Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(4), 887– 905. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4040-1>
- 16) Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8), 727–737. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01301-3](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01301-3)
- 17) Angata, T., & Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews*, 102(2), 439–469. <https://doi.org/10.1021/cr000407m>
- 18) Chen, X., & Varki, A. (2010). Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS chemical biology*, 5(2), 163–176. <https://doi.org/10.1021/cb900266r>
- 19) Varki A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, 2(1), 25–40. <https://doi.org/10.1093/glycob/2.1.25>
- 20) Samraj, A. N., Läubli, H., Varki, N., & Varki, A. (2014). Corrigendum: involvement of a non-human sialic Acid in human cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 83. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00083>

- 21) Schauer R. (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena, Germany)*, 107(1), 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2003.10.002>
- 22) Drake, P. M., Nathan, J. K., Stock, C. M., Chang, P. V., Muench, M. O., Nakata, D., Reader, J. R., Gip, P., Golden, K. P., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Troy, F. A., 2nd, & Bertozzi, C. R. (2008). Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(10), 6850–6858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6850>
- 23) Curreli, S., Arany, Z., Gerardy-Schahn, R., Mann, D., & Stamatou, N. M. (2007). Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *The Journal of biological chemistry*, 282(42), 30346–30356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702965200>
- 24) Wu, J., Zhan, X., Liu, L., & Xia, X. (2018). Bioproduction, purification, and application of polysialic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(22), 9403–9409. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9336-3>
- 25) Mühlhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *The EMBO journal*, 15(24), 6943–6950.

- 26)Close, B. E., & Colley, K. J. (1998). In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *The Journal of biological chemistry*, 273(51), 34586–34593. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34586>
- 27)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. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), 36808–36817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204632200>
- 28)Foley, D. A., Swartzentruber, K. G., & Colley, K. J. (2009). Identification of sequences in the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV that are required for the protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule, NCAM. *The Journal of biological chemistry*, 284(23), 15505–15516. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809696200>
- 29)Mühlenhoff, M., Rollenhagen, M., Werneburg, S., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2013). Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochemical research*, 38(6), 1134–1143. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-0979-2>

- 30) Rollenhagen, M., Kuckuck, S., Ulm, C., Hartmann, M., Galuska, S. P., Geyer, R., Geyer, H., & Mühlenhoff, M. (2012). Polysialylation of the synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM 1) depends exclusively on the polysialyltransferase ST8Siall in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 35170–35180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375642>
- 31) Werneburg, S., Mühlenhoff, 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(7), 1240–1255. <https://doi.org/10.1002/glia.22815>
- 32) Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., & Roth, J. (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *The Journal of biological chemistry*, 267(14), 9965–9971.
- 33) Yabe, U., Saccto, C., Matsuda, T., & Kitajima, K. (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 278(16), 13875–13880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300458200>
- 34) Nadanaka, S., Sato, C., Kitajima, K., Katagiri, K., Irie, S., & Yamagata, T. (2001). Occurrence of oligosialic acids on integrin alpha 5 subunit and their involvement in cell adhesion to fibronectin. *The Journal of biological chemistry*, 276(36), 33657–33664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011100200>

- 35)Maness, P. F., & Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience*, 10(1), 19–26. <https://doi.org/10.1038/nn1827>
- 36)Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?. *Frontiers in immunology*, 8, 892. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00892>
- 37)Ditlevsen, D. K., Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). NCAM-induced intracellular signaling revisited. *Journal of neuroscience research*, 86(4), 727–743. <https://doi.org/10.1002/jnr.21551>
- 38)Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E. T., & Südhof, T. C. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapseassembly. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5586), 1525–1531. <https://doi.org/10.1126/science.1072356>
- 39)Galuska, S. P., Rollenhagen, M., Kaup, M., Eggers, K., Oltmann-Norden, I., Schiff, M., Hartmann, M., Weinhold, B., Hildebrandt, H., Geyer, R., Mühlenhoff, M., & Geyer, H. (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), 10250–10255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912103107>



- 40) Angata, K., Long, J. M., Bukalo, O., Lee, W., Dityatev, A., Wynshaw-Boris, A., Schachner, M., Fukuda, M., & Marth, J. D. (2004). Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), 32603– 32613. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403429200>
- 41) Eckhardt, M., Bukalo, O., Chazal, G., Wang, L., Goridis, C., Schachner, M., Gerardy-Schahn, R., Cremer, H., & Dityatev, A. (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(14), 5234–5244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05234.2000>
- 42) Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 411–425. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.5>
- 43) Tandon, N. N., Kralisz, U., & Jamieson, G. A. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *The Journal of biological chemistry*, 264(13), 7576–7583.

- 44) Silverstein, R. L., Baird, M., Lo, S. K., & Yesner, L. M. (1992). Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 267(23), 16607–16612.
- 45) Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), 11811–11816
- 46) Nicholson, A. C., Frieda, S., Pearce, A., & Silverstein, R. L. (1995). Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(2), 269–275. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.2.269>
- 47) Rollenhagen, M., Buettner, F. F., Reismann, M., Jirno, A. C., Grove, M., Behrens, G. M., Gerardy-Schahn, R., Hanisch, F. G., & Mühlenhoff, M. (2013). Polysialic acid on neuropilin-2 is exclusively synthesized by the polysialyltransferase ST8SialV and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. *The Journal of biological chemistry*, 288(32), 22880–22892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.463927>

- 48) Villanueva-Cabello, T. M., Mollicone, R., Cruz-Muñoz, M. E., López-Guerrero, D. V., & Martínez-Duncker, I. (2015). Activation of human naïve Th cells increases surface expression of GD3 and induces neoexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. *Glycobiology*, 25(12), 1454–1464. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv062>
- 49) Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*, 68(5), 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
- 50) Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., & Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical chemistry*, 75(6), 1300–1306. <https://doi.org/10.1021/ac026136s>
- 51) Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- 52) Colley, K. J., Kitajima, K., & Sato, C. (2014). Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(6), 498–532. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.976606>

- 53) Yu, S. F., Zhang, Y. N., Yang, B. Y., & Wu, C. Y. (2014). Human memory, but not naive, CD4+ T cells expressing transcription factor T-bet might drive rapid cytokine production. *The Journal of biological chemistry*, *289*(51), 35561–35569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608745>
- 54) Zhu, X., Miao, X., Wu, Y., Li, C., Guo, Y., Liu, Y., Chen, Y., Lu, X., Wang, Y., & He, S. (2015). ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Experimental cell research*, *335*(2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.020>
- 55) Pancholi V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *58*(7), 902–920. <https://doi.org/10.1007/pl00000910>
- 56) Ziegler, A., & Milstein, C. (1979). A small polypeptide different from beta2-microglobulin associated with a human cell surface antigen. *Nature*, *279*(5710), 243–244. <https://doi.org/10.1038/279243a0>
- 57) Horlacher, T., Noti, C., de Paz, J. L., Bindschädler, P., Hecht, M. L., Smith, D. F., Fukuda, M. N., & Seeberger, P. H. (2011). Characterization of annexin A1 glycan binding reveals binding to highly sulfated glycans with preference for highly sulfated heparan sulfate and heparin. *Biochemistry*, *50*(13), 2650–2659. <https://doi.org/10.1021/bi101121a>
- 58) Moss, S. E., & Morgan, R. O. (2004). The annexins. *Genome biology*, *5*(4), 219. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-219>

- 59) D'Acquisto, F., Merghani, A., Lecona, E., Rosignoli, G., Raza, K., Buckley, C. D., Flower, R. J., & Perretti, M. (2007). Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood*, *109*(3), 1095–1102. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-022798>
- 60) Ernst, S., Lange, C., Wilbers, A., Goebeler, V., Gerke, V., & Rescher, U. (2004). An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *172*(12), 7669–7676. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7669>
- 61) Jorritsma, P. J., Brogdon, J. L., & Bottomly, K. (2003). Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *170*(5), 2427–2434. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2427>
- 62) Goulet, F., Moore, K. G., & Sartorelli, A. C. (1992). Glycosylation of annexin I and annexin II. *Biochemical and biophysical research communications*, *188*(2), 554–558. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91091-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91091-4)

## ANEXOS

### Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ naive a través de citometría de flujo

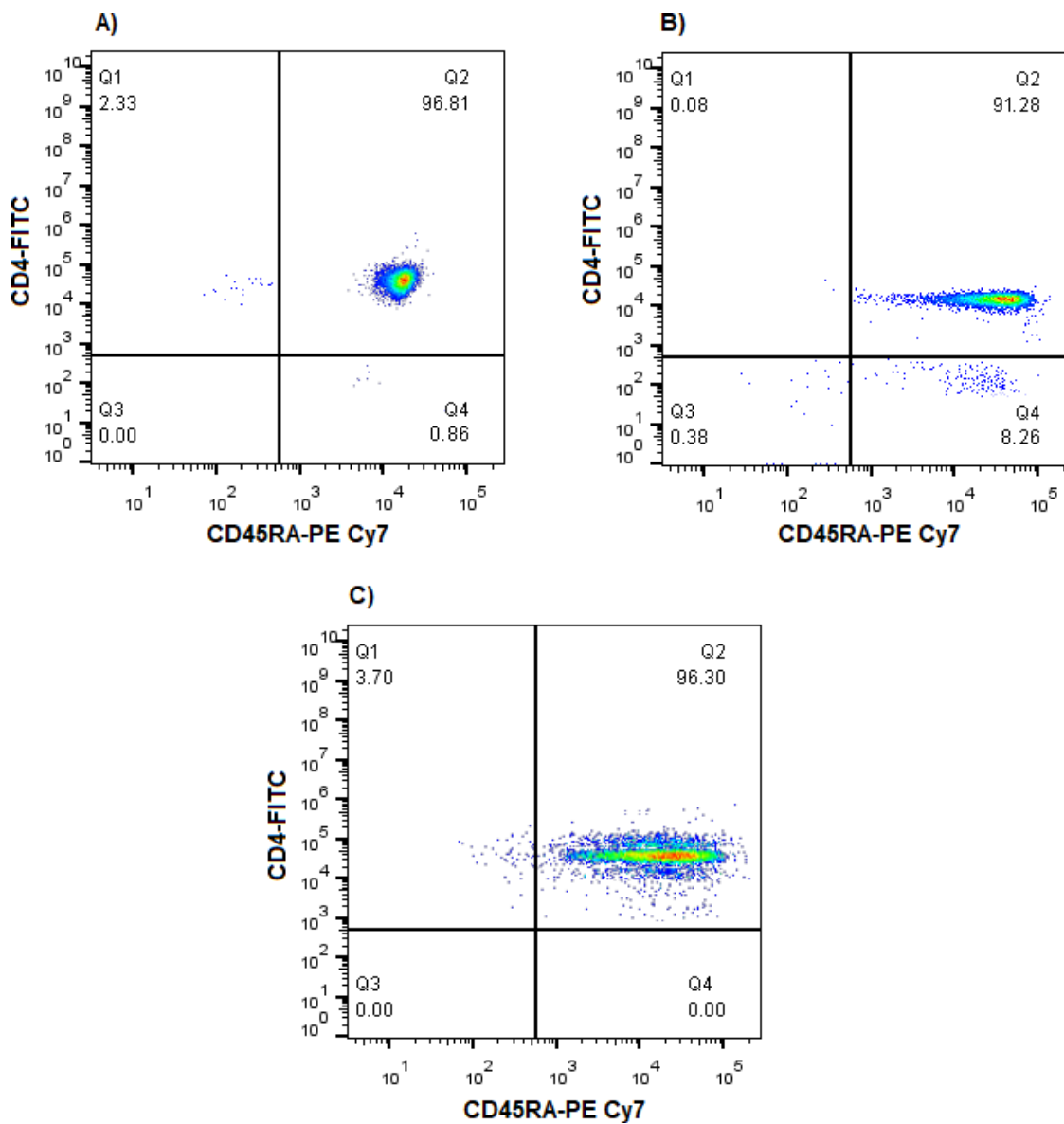


Figura 16. Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ naive.

La figura 16 muestra el análisis de citometría de flujo por el cual se determinó la pureza de los linfocitos T CD4+ naives. Todos los Dot-Plots (A, B y C) muestran una doble tinción con los anticuerpos anti-CD4-FITC/anti-CD45RA-PE Cy7. En el eje de las X se pueden observar las células CD45RA+ mientras que en el eje de las Y se visualizan las células CD4+. La imagen muestra la pureza de tres experimentos independientes. Para todos los experimentos de citometría de flujo se adquirieron 10000 eventos los cuales posteriormente se analizaron con el software FlowJo v10.

### **Preparación de coomassie coloidal**

Para preparar 100 ml de coomassie coloidal se realizó la siguiente metodología. Se disolvieron 10 g de sulfato de amonio en 30 ml de agua miliQ. A continuación dicha solución se filtró con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore) y enseguida se le adicionaron 10 ml de ácido fosfórico y 0.12 g de azul de coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250, ThermoFisher). La solución fue homogenizada durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionaron 10 ml de metanol. La solución continuó en agitación durante 30 minutos más y finalmente se aforó a 100 ml con agua miliQ.

### **Anexina A1 es una proteína reconocida con el mAb anti-PSA NCAM 12E3**

Para sustentar que Anexina A1 es una proteína modificada por la adición de ácido polisiálico realizamos dos WB uno donde evidenciamos la expresión de ANXA1 en las proteínas polisialiladas del linfocito T CD4+ (Figura 17A) y otro donde reconocimos la expresión de ácido polisiálico en la proteína Anexina A1 (Figura 17B) lo cual efectivamente demuestra que Anexina A1 es una proteína polisialilada. Como se puede observar en ambos WB se logra identificar una banda de aproximadamente 36 KDa, la cual coincide con el peso molecular de esta proteína. En la figura 17A se observa el reconocimiento de la proteína Anexina A1 en una inmunoprecipitación de las proteínas polisialiladas que se expresan en el linfocito T CD4+, mientras que la figura 17B corresponde a la detección de proteínas polisialiladas (reconocidas por el mAb anti-PSA NCAM 12E3) en una inmunoprecipitación de ANXA1. El conjunto de estos resultados y los mostrados en la figura 14 confirman que efectivamente Anexina A1 es una proteína polisialilada.



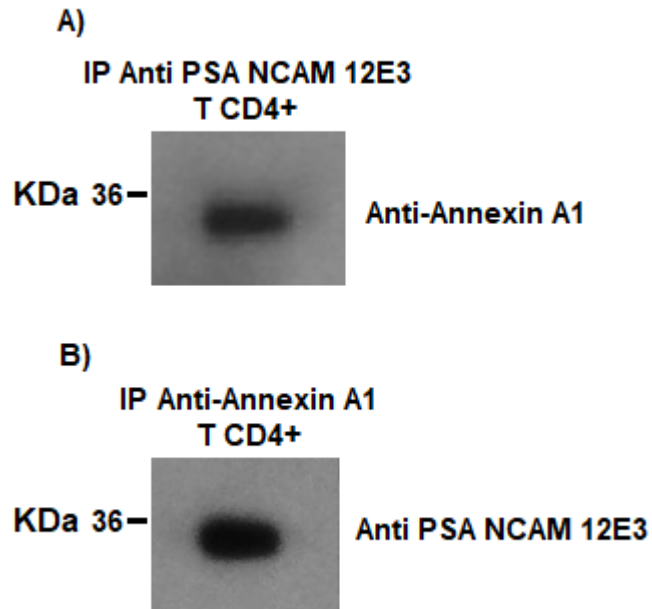


Figura 17. **Anexina A1 es una proteína polisialilada.** (A) WB de la expresión de proteínas polisialiladas reconocidas por el pAb anti-Annexin A1. (B) WB de la expresión de la proteína Anexina A1 reconocida por el mAb anti-PSA NCAM 12E3. Ambos WB identifican el peso molecular (36 KDa aproximadamente) de la Anexina A1 la cual a través de dos diferentes inmunoprecipitaciones se reconoce como una proteína polisialilada. Ambos WB fueron cargados con 250 µg de la proteína procedente de las inmunoprecipitaciones previamente mencionadas. La figura muestra el resultado representativo de tres experimentos independientes.

## Immunology

# Polysialic acid is expressed in human naïve CD4+ T cells and is involved in modulating activation

Tania M Villanueva-Cabello<sup>2,3</sup>, Lya D Gutiérrez-Valenzuela<sup>2,3</sup>, Delia V López-Guerrero<sup>4</sup>, Mario E Cruz-Muñoz<sup>5</sup>, Héctor M Mora-Montes<sup>6</sup>, and Iván Martínez-Duncker<sup>2,1</sup>

<sup>2</sup>Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mor 62209, México, <sup>3</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor 62210, México, <sup>4</sup>Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mor 62350, México, <sup>5</sup>Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mor 62350, México, and <sup>6</sup>Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto 36050, México

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: Tel: +52-777-3297000; Fax: +52-777-3297020; e-mail: duncker@uaem.mx

Received 9 September 2018; Revised 28 March 2019; Editorial decision 11 April 2019; Accepted 13 April 2019

## Abstract

The activation of human naïve CD4+ T cells, responsible for orchestrating the immune response, has been reported to cause increased *de novo* sialylation and overexpression of the genes coding for polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV, suggesting the potential of CD4+ T cells to synthesize polysialic acid (PSA), a type of glycosylation not previously described in these cells. PSA has been found as a post-translational modification in a limited number of mammalian proteins, having a very relevant role in modulating interactions due to its characteristic biophysical properties. In this work, we confirm that human CD4+ T cells express both polysialyltransferases and synthesize PSA, as assessed with the anti-PSA monoclonal antibody (mAb) 12E3. The expression of PSA in resting cells was found restricted to a cell subpopulation (PSA+), that after anti-CD3/anti-CD28 mAbs mediated activation, increased in percentage and mean fluorescence intensity (MFI) expression. Additionally, through *ST8SialII* and *ST8SialIV*-silencing and by measuring the mRNA of IL-2, IL-2R and IFN- $\gamma$ , we show that PSA is involved in modulating the activation response of CD4+ T cells.

Key words: Activation, CD4+, cytokine, polysialic, polysialyltransferases

## Introduction

Human naïve CD4+ T cells are the subset of T lymphocytes responsible for orchestrating the adaptive immune response through the secretion of cytokines (Olsen and Sollid 2013). The effector mechanisms set up by these cells depend on the activation of signaling cascades, ignited after T cell receptor recognition of peptidic fragments of antigen bound to the major histocompatibility complex molecules

of antigen presenting cells (Mazzon and Viola 2007). Although the activation of naïve CD4+ T cells is characterized by a reduction of  $\alpha$ 2,3 and  $\alpha$ 2,6 sialylation (Toscano et al. 2007), we reported that it is in fact accompanied by an overall increase in the *de novo* sialylation (Villanueva-Cabello et al. 2015), suggesting that activation increases synthesis of Sia $\alpha$ 2,8 epitopes, as was demonstrated through the observation of activation-induced overexpression of the

disialo-ganglioside GD3 (Sia $\alpha$ 2,8Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer) and the neoexpression of the disialo-ganglioside GD2 (GalNAc $\beta$ 1,4[Sia $\alpha$ 2,8Sia $\alpha$ 2,3]Gal $\beta$ 1,4Glc-Cer). In this regard, we also reported that human naïve CD4+ T cells express the polysialyltransferase genes *ST8SIAII* and *ST8SIAIV* and that activation upregulates them, suggesting the potential of these cells to synthesize and overexpress polysialic acid (PSA), a polymer of sialic acid (Sia) not previously reported in these cells.

PSA is known to promote anti-adhesive properties, mainly through its highly negative charge and linear structure (Muhlenhoff et al. 2001), and to function as a molecule reservoir due to its structural hydrodynamic storage capacity (Kanato et al. 2008; Isomura et al. 2011; Ono et al. 2012). To date, a small number of human glycoproteins have been identified to carry and require PSA for modulating their activity, including: the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV, the  $\alpha$  subunit of the voltage-dependent sodium channel, the  $\alpha$ 5 integrin, the importer of fatty acids CD36, the neuropilin type 2 molecule (NRP-2), the synaptic adhesion molecule (SynCAM 1) and the neural cell adhesion molecule (NCAM) that is one of the best studied polysialylated proteins (Zuber et al. 1992; Angata et al. 2002; Bennet 2002; Yabe et al. 2003; Curreli et al. 2007; Foley et al. 2009; Galuska et al. 2010; Ahrens et al. 2011; Muhlenhoff et al. 2013; Werneburg et al. 2015). Dendritic cells, natural killer (NK) cells and certain types of T cells (including NK T cells) are known to express NCAM (also known as CD56) (Drake et al. 2008; Van Acker et al. 2017).

In this work, we have identified that human naïve CD4+ T cells express PSA and that anti-CD3/anti-CD28 mAbs mediated activation increases the percentage of PSA+ cells as well as their mean fluorescence intensity (MFI). The silencing of *ST8SIAII* and *ST8SIAIV* revealed an increased *IL-2*, *IL-2R* and *IFN $\gamma$*  expression, indicating that PSA is involved in avoiding an exacerbated activation response in CD4+ T cells.

## Results

### Human CD4+ T cells express polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV and synthesize PSA

Naïve CD4+ T cells were isolated from the peripheral blood of healthy human donors and activated in the presence of anti-CD3/anti-CD28 mAbs. To determine if the *ST8SIAII* and *ST8SIAIV* were being translated, expression was assessed through western blot using anti-ST8SiaII and anti-ST8SiaIV polyclonal antibodies. The lysates from resting and activated CD4+ T cells were analyzed at 24, 48 and 72 hours post-activation (h.p.a.). Expression of protein products corresponding to ST8SiaII and ST8SiaIV was confirmed in resting cells and shown to be significantly increased in activated cells since 24 h.p.a. for ST8SiaII (Figure 1A) and since 48 h.p.a. for ST8SiaIV (Figure 1B). Afterwards, we proceeded to detect the presence of PSA through western blot using the anti-PSA mAb 12E3, an antibody characterized to detect a degree of polymerization (DP)  $\geq$  5 (Sato et al. 1995). Lysates from resting and activated human CD4+ T cells were analyzed at 24, 48 and 72 h.p.a. (Figure 1C). Several proteins were observed to be reactive to the anti-PSA mAb and in a pattern shared by resting and activated cells. To determine specificity of the anti-PSA mAb 12E3, cell lysates from activated CD4+ T cells were submitted to digestion with the bacteriophage K1 endoneuraminidase N (EndoN) (Finne and Makela 1985) and analyzed by Western blot (Figure 1D), observing that the anti-PSA mAb 12E3 binding

was reduced by EndoN, thus confirming that PSA is the specific binding epitope of this mAb.

### PSA is expressed in a subpopulation of naïve CD4+ T cells and activation induces its overexpression and surface redistribution

To further characterize the expression in surface of PSA in human CD4+ T cells, binding of the anti-PSA mAb 12E3 was assessed in resting and activated human naïve CD4+ T cells by flow cytometry at 24, 48 and 72 h.p.a. The analysis shows that not all resting CD4+ T cells bind mAb 12E3 (PSA-) and that the percentage of reactive cells (PSA+) varies among donors, with activation significantly increasing the percentage and mean fluorescence intensity (MFI) of this PSA+ subpopulation (Figure 2A and B). Additionally, cell surface distribution of PSA was characterized through confocal microscopy and staining with the anti-PSA mAb 12E3, in both resting and activated CD4+ T cells at 72 h.p.a., observing that activation shifts PSA from an aggregated pattern towards a dispersed phenotype (Figure 2C).

To further characterize the role of polysialyltransferase expression in PSA synthesis, flow cytometry was performed using anti-ST8SiaII, anti-ST8SiaIV antibodies and the anti-PSA mAb 12E3 in resting and activated naïve CD4+ T cells at 72 h.p.a. (Figure 3). A majority of resting CD4+ T cells was found to be ST8Sia II+ or ST8SiaIV+, with activation increasing significantly the percentage of ST8SiaII+ cells but not ST8SiaIV+ cells (Figure 3A and B). Also, the MFI of ST8SiaII and ST8SiaIV was significantly increased after activation (Figures 3C and D). Interestingly, although a high percentage of activated cells are positive for ST8SiaII or ST8SiaIV polysialyltransferases, not all express PSA (Figure 3E and F). To determine specificity of the anti-PSA mAb 12E3, activated CD4+ T cells were incubated with EndoN and subject to flow cytometry, observing that EndoN treated cells had a significant reduction in the binding of the anti-PSA mAb 12E3 (Figure 3G and H).

### Silencing of ST8SiaII and ST8SiaIV polysialyltransferases increases expression of activation related genes

To determine the functional role of ST8SiaII and ST8SiaIV in CD4+ T cells, we induced shRNA mediated-gene silencing in activated CD4+ T cells. Expression of *ST8SIAII* was reduced in more than 90% (Figure 4A) and in nearly 60% for *ST8SIAIV* (Figure 4B). The protein levels of the ST8SiaII and ST8SiaIV measured by Western blot at 72 h.p.a. confirms an efficient reduction in the expression of both enzymes in ST8 polysialyltransferase-silenced activated CD4+ T cells with respect to mock shRNA-activated CD4+ T cells (Figure 4C and D). It can be observed that silencing of both polysialyltransferases clearly reduced binding of the anti-PSA mAb 12E3, again confirming binding specificity, as well as a clear functional effect of silencing on PSA expression (Figure 4E).

Real-time PCR measurement of activation related genes was performed at 72 h.p.a. by measuring genes coding for interferon-gamma (*IFN- $\gamma$* ), an effector cytokine produced after continuous antigenic stimulation in naïve CD4+ T lymphocytes (Yu et al. 2014), interleukine-2 (*IL-2*) and the interleukine-2 receptor (*IL-2r*) (Wei et al. 2013) (Figure 5). An overexpression of *IFN- $\gamma$*  was determined in *ST8SIAII-silenced* (4-fold) and *ST8SIAIV-silenced* (4.8-fold) activated CD4+ T cells compared to mock shRNA (Figure 5A). The *IL-2* was also upregulated in *ST8SIAII-silenced* (25-fold) and

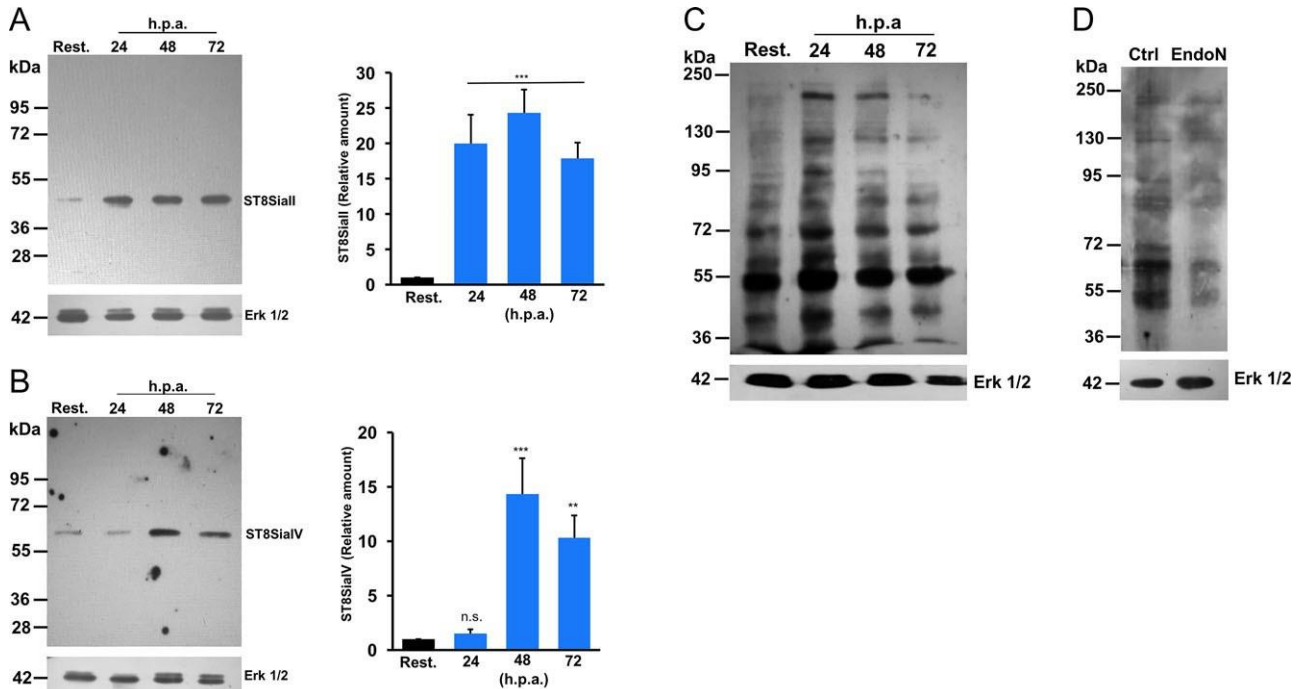


Fig. 1. Expression of polysialyltransferases and polysialylated proteins in CD4+ T cells. (A and B) A representative Western blot of protein lysates obtained from resting and activated CD4+ T cells at 24, 48 and 72 h.p.a., probed with rabbit polyclonal anti-ST8SialII or anti-ST8SialIV antibodies. Expression in each condition was compared using total Erk 1/2 as a loading control and recognized by mouse IgG anti-Erk 1/2. Relative amount was calculated using Fiji (ImageJ) software by normalization to Erk 1/2 expression. \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$ . Data are the mean  $\pm$  SD of seven independent experiments. (C) Western blot analysis of protein extracts from resting and activated CD4+ T cells at 24, 48 and 72 h.p.a., probed with anti-PSA mAb 12E3. The immune complex was visualized with horseradish peroxidase secondary antibody conjugated anti-mouse IgM. Expression in each condition was compared using total Erk 1/2 as a loading control. (D) Western blot analysis of CD4+ T whole lysate obtained at 72 h.p.a., probed with the anti-PSA mAb 12E3, after non-treated (Ctrl) and EndoN treatment for 12 h at 37°C. Expression in each condition was compared using total Erk 1/2 as a loading control.

*ST8SIAIV-silenced* (4.5-fold) activated CD4+ T cells compared to mock (Figure 5B). Whereas that of *IL-2R* expression was increased in *ST8SIAII-silenced* (2-fold) and *ST8SIAIV-silenced* (3-fold) activated CD4+ T cells compared to mock (Figure 5C). These results demonstrate that the depletion of the upregulation of ST8SialII and ST8SialIV polysialyltransferases induces an abnormal overexpression of genes related to activation.

## Discussion

We previously reported that the expression of *ST8SIAII* and *ST8SIAIV* is upregulated after the activation of human naïve CD4+ T cells (Villanueva-Cabello et al. 2015), suggesting a potential translation of these genes and the ability to synthesize PSA. Nakano et al. using anti-PSA mAb SEAM3, reported the presence of PSA in human T and B lymphocytes, but no further characterization was performed (Nakano et al. 2011). In this work, we confirmed translation of *ST8SIAII* and *ST8SIAIV* and the presence of PSA bearing proteins in cell lysates from resting and activated human CD4+ T cells (Figure 1), assessed with a well-characterized anti-PSA mAb 12E3 (Seki and Arai 1991; Sato et al. 1995; Hanashima et al. 2013). The observed results obtained from digestion of cell lysates (Figure 1D) or live cells (Figure 3G and H) with EndoN, a neuraminidase specific for PSA, demonstrate that anti-PSA mAb 12E3 binding is reduced, thus confirming specificity of the antibody and the presence of PSA. The residual binding of the anti-PSA mAb 12E3 could be a result of the presence of oligoSia (DP < 7) not susceptible to EndoN but that is recognized by the anti-PSA mAb 12E3

(Sato et al. 1995; Jakobsson et al. 2015). Further studies are required to identify and functionally characterize these PSA+ proteins, including the DP of their PSA. Through PCR analysis we have determined that resting and activated CD4+ T cells do not express the gene coding for NCAM, the most studied polysialylated protein identified in human tissues (data not shown), other candidate proteins include NRP-2, sodium channels, CD36 and the ST8SialII and ST8SialIV polysialyltransferases.

Surprisingly, although CD4+ T cells were shown to express ST8SialII and ST8SialIV, only a subpopulation of resting CD4+ T cells express PSA (PSA+), with the percentage and MFI of this subpopulation increasing after activation since 24 h.p.a. (Figure 2A and B). This indicates not only that PSA+ cells increase their expression, but that activation induces resting PSA- cells to neoexpress PSA. Further studies should address the presence of resting and activated CD4+ T cells, shown to express ST8SialII or ST8SialIV, that do not synthesize PSA (Figures 3E and F), whether this occurs because of inactive enzymes or absent protein substrates. It is particularly interesting to have observed resting naïve CD4+ T cells with distinct PSA phenotypes, as one would assume that these cells are highly homogeneous. In this regard, it has been shown that thymocytes from ST8SialIV<sup>-/-</sup> null mice, are unable to access the thymus for maturation, indicating that PSA is involved in migration processes of T cells (Drake et al. 2009). Further studies should address if PSA expression in CD4+ T cells is associated to recent emigration from the thymus or other migration processes.

Also, we demonstrate that the surface localization of PSA changes after activation, as assessed by confocal microscopy (Figure 2C). In resting conditions, PSA is located in well-located clusters, that upon

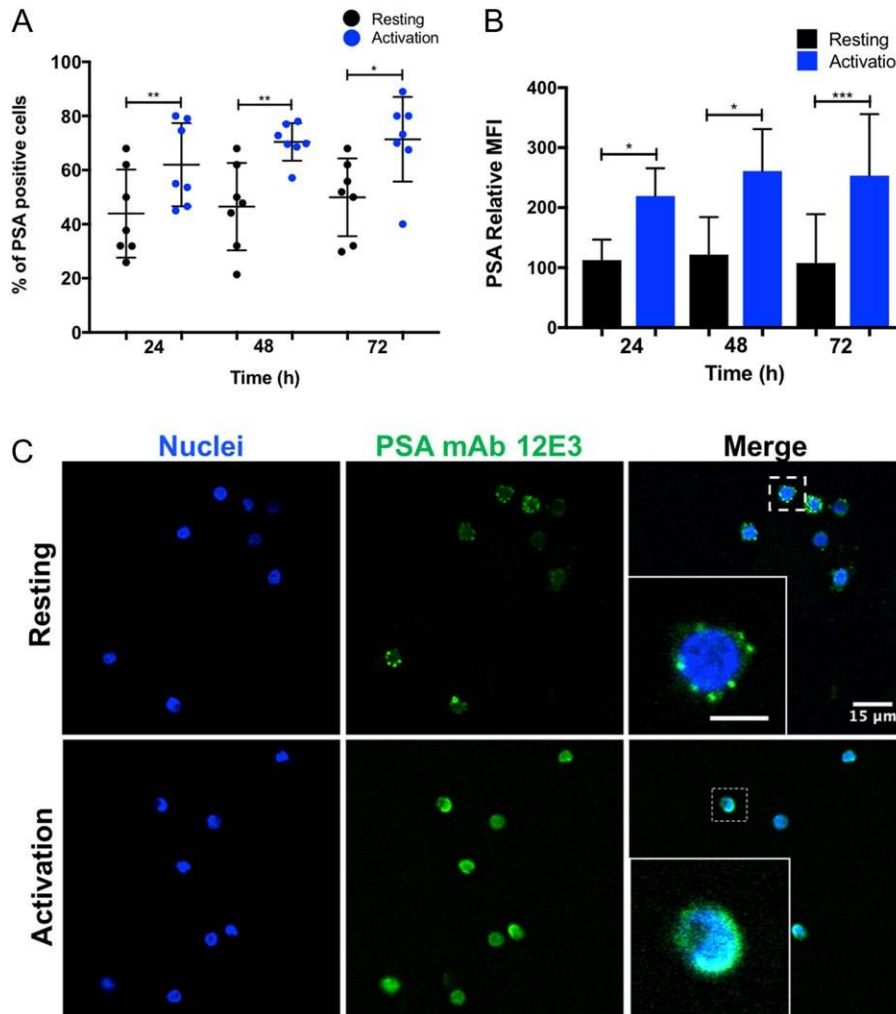


Fig. 2. Expression and distribution of PSA is modified after activation. (A) Percentage of CD4+ T cells reactive for anti-PSA mAb 12E3 obtained by flow cytometry in resting (black dots) and activated (blue dots) naive CD4+ T cells for 24, 48 and 72 h. (B) Relative mean fluorescence intensity (MFI) of CD4+ T cells for anti-PSA mAb 12E3 in resting (black bar) and activated (blue bar) conditions at 24, 48 and 72 h.p.a. The mean fluorescence was normalized and expressed as relative expression (%). \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ . Data are the mean  $\pm$  SD of seven independent experiments. (C) Confocal microscopy of PSA and nuclei in resting and activated naive CD4+ T cells 72 h.p.a. Cells were stained with mouse IgM anti-PSA mAb 12E3 followed by PE conjugated anti-mouse IgM antibody (green) and Hoechst 33342 to visualize DNA (blue). Localization of PSA was assessed by confocal microscopy with an Olympus FV1000 Laser Confocal Microscope (Olympus, Miami, FL) with a 60X S/1.3 oil objective and with a 2X digital zoom. The images are representative of three independent experiments. Scale bar represent 15  $\mu$ m.

activation appear to dynamically rearrange, suggesting that PSA+ proteins may play a role in activation through the rearrangement of cell membrane structures. Previous studies have shown that the polysialylated protein NCAM and the tyrosine kinase receptor EphA3 interact forming clusters in the cell surface through the induction with Ephrin-A5 in GABAergic cortical interneurons in culture (Sullivan et al. 2016). Through this binding, NCAM improves the autophosphorylation of this receptor and the activation of RhoA GTPase, demonstrating a role of NCAM in the activation of EphA3 signaling through clustering. In this context, it would be important to study whether the PSA+ proteins from CD4+ T cells perform a similar role through the interaction with other receptors or molecules.

It can be observed that silencing of STSialI or ST8SialIV in activated cells, reduces in a similar fashion the binding of the anti-PSA mAb 12E3 (Figure 4E). We have verified that hairpin sequences and knockdown effects are specific for each enzyme (data not shown).

This could suggest that both enzymes are required for PSA synthesis, but it is known that in the absence of one enzyme, the other enzyme can generally fulfill the polysialylation of protein substrates to a certain degree (Galuska et al. 2006; Oltmann-Norden et al. 2008), although certain proteins like SynCam 1 and NRP-2 are known to be exclusively polysialylated by ST8SialII and IV, respectively (Muhlenhoff et al. 2013). Cooperation between both enzymes has been described in regard to elongation of PSA but not in its initiation (Angata et al. 1998). Another possibility that could explain these results is that initiation of PSA could be reduced in all protein substrates because silencing of either enzyme could be affecting the expression of genes involved in the synthesis of glycan structures required to initiate polysialylation in proteins, including autopolysialylation of ST8SialII and ST8SialIV that is known to modulate enzyme activity (Close et al. 2001; Bhide et al. 2018). Activation is known to be accompanied by important modifications in the glycosylation

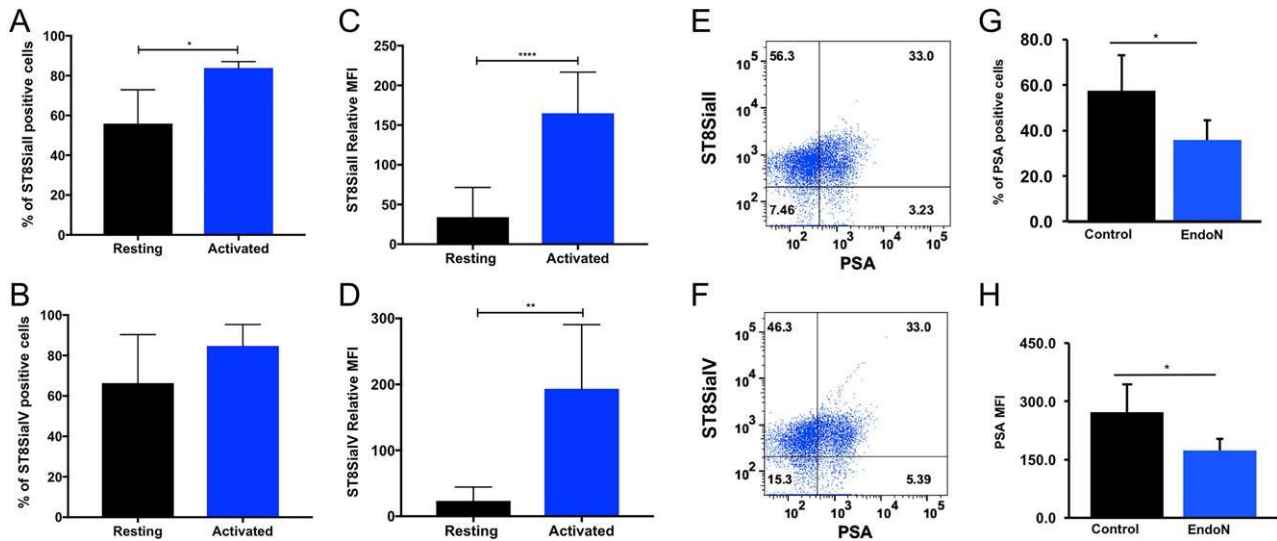


Fig. 3. ST8SialII and ST8SialIV are overexpressed in activated CD4+ T cells. Flow cytometry analysis indicating binding of anti-ST8SialII and anti-ST8SialIV antibodies in CD4+ T cells at 72 h.p.a. (A and B) Percentage of positive CD4+ T cells for anti-ST8SialII and anti-ST8SialIV antibodies in resting (black bar) and activated (blue bar) cells. (C and D) Relative mean fluorescence intensity (MFI) for anti-ST8SialII and anti-ST8SialIV antibodies in resting (black bar) and activated (blue bar) cells. The mean fluorescence was normalized and expressed as relative expression (%).  $***P < 0.0001$ ,  $**P < 0.001$ ,  $*P < 0.05$ . Data are the mean  $\pm$  SD of seven independent experiments. (E and F) Dot plots showing activated CD4+ T cells positive for PSA and ST8SialII or ST8SialIV. The dot plots are representative of four independent experiments. (G) Percentage of PSA+ CD4+ T cells in non-treated control cells (black bar) and EndoN-treated cells (blue bar). (H) Mean fluorescence intensity (MFI) for PSA in 72 h.p.a. control non-treated CD4+ T cells (black bar) or EndoN-treated cells (blue bar).  $*P < 0.05$ . Data are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

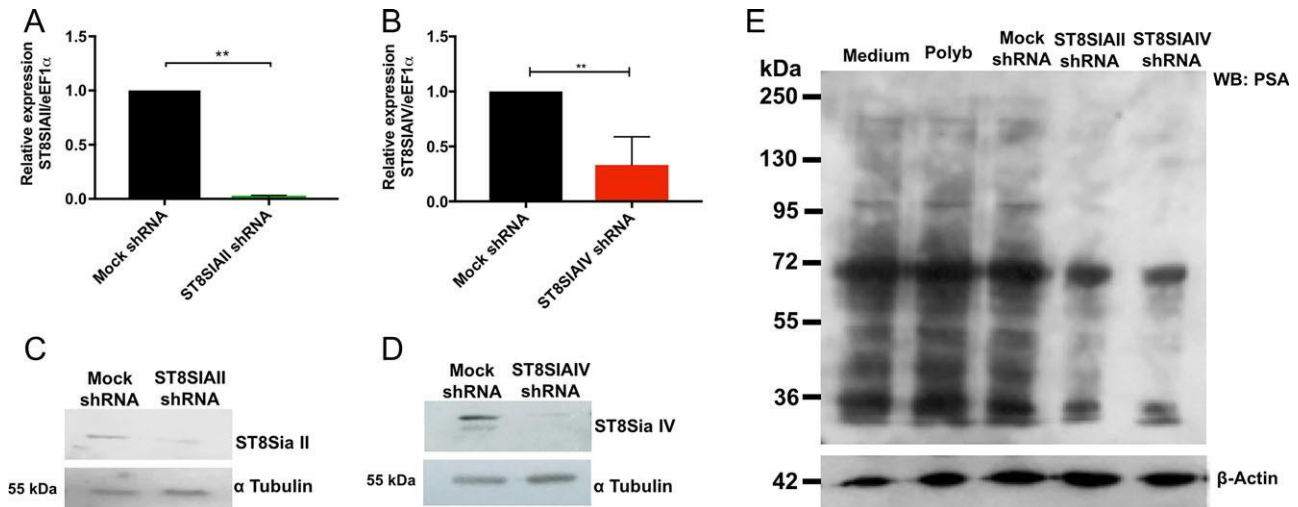


Fig. 4. PSA expression in activated CD4+ T cells is reduced after silencing of polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV. Relative expression of *ST8SialII* (A) and *ST8SialIV* (B) after 72 h.p.a. of specific polysialyltransferase-silencing (green and red bars) or mock shRNA-activated CD4+ T cells (black bars) detected by real-time PCR. For the data normalization, the relative expression of *ST8SialII* and *ST8SialIV* was calculated with respect mock shRNA-activated CD4+ T cells.  $**P < 0.001$ . Data are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. (C and D) Western blot analysis of protein extracts from 72 h.p.a. mock shRNA and *ST8SialII* or *ST8SialIV*-silenced CD4+ T cells probed with rabbit polyclonal anti-ST8SialII or anti-ST8SialIV antibodies. Expression in each condition was compared using total  $\alpha$  tubulin as a loading control recognized by mouse IgG anti- $\alpha$  tubulin. Representative of three independent experiments. (E) Western blot analysis of protein extracts obtained from 100,000 CD4+ T cells at 72 h.p.a. The medium, polybrene, mock shRNA, *ST8SialII* shRNA and *ST8SialIV* shRNA conditions were probed with mouse IgM anti-PSA mAb 12E3. The immune complex was visualized with a secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgM. Expression in each condition was compared using total  $\beta$ -actin as a loading control. Western blot image is representative of three independent experiments.

profile of T cells (Comelli et al. 2006) and we have demonstrated that ST8SialII and ST8SialIV silenced CD4+T cells have an aberrant activation profile characterized by an exacerbated response (Figure 5). Further studies are required to address the polysialylation mechanisms in place and the glycosylation of protein substrates.

As mentioned previously, *ST8SialII* and *ST8SialIV*-silencing was shown to increase the expression of activation related genes *IFN $\gamma$* , *IL-2* and *IL-2R*. Although the expression of these genes is higher in *ST8SialII*-silenced and *ST8SialIV*-silenced cells, differences were observed. The expression of *IFN $\gamma$*  and *IL-2R* was higher in

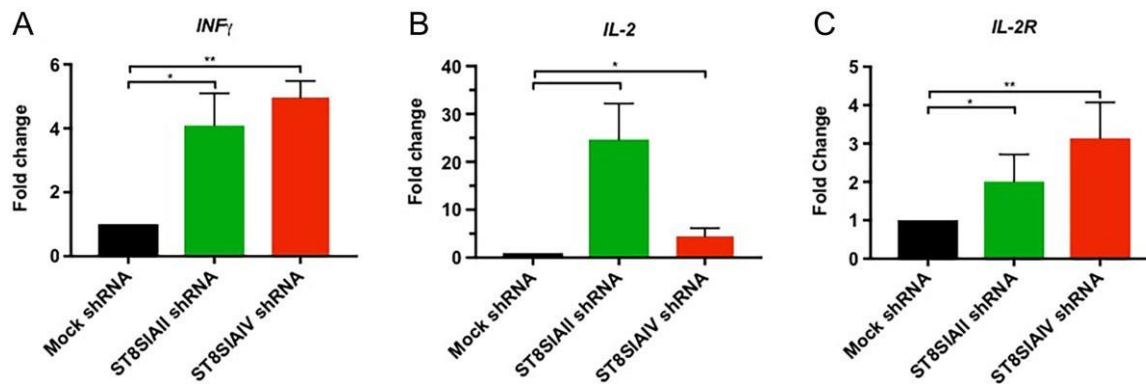


Fig. 5. ST8SialI and ST8SialIV polysialyltransferase-silencing increases IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-2R expression in CD4+ T cell activation. (A, B and C) mRNA expression of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-2R expressed as Fold change was determined by real-time PCR in mock shRNA-activated CD4+ T cells (black bars) or specific ST8SIAII (green bars) or ST8SIAIV (red bars) silenced CD4+ T cells. The gene expression expressed as relative expression or fold change was normalized to the house keeping gene eEF1 $\alpha$ . Fold change level is indicated in each bar. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . Data are representative of three independent experiments.

ST8SIAIV-silenced compared to ST8SIAII-silenced cells (Figures 5A and C), and the expression of IL-2 in ST8SIAII-silenced cells was higher respect to ST8SIAIV-silenced cells (Figure 5B).

This data indicates that PSA expressed in CD4+ T cells is involved in modulating activation, apparently having a role in avoiding an exacerbated response. Further studies should address the role of polysialylated proteins and the pathways involved in this modulation. Previous studies have demonstrated that polysialylation of NRP-2 expressed in mature dendritic cells, is involved in activation of CD4+ T cells (Curreli et al. 2007). It will be interesting to assess in further studies if PSA+ proteins in CD4+ T cells are linked to the PSA-associated activation mechanisms identified in dendritic cells.

We consider that this study contributes to advancing the knowledge regarding a previously unidentified expression and functional role of PSA in human naïve CD4+ T cells, a type glycosylation that has been shown, without exception, to modulate cell function.

## Materials and methods

**Purification and activation of human naïve CD4+ T cells**  
Peripheral blood was obtained from healthy volunteers with informed consent from the Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, Cuernavaca, Mexico, and with the approval of the Bioethics Committee of the Cell Dynamics Research Center of the Morelos State Autonomous University. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Histopaque density gradient (Histopaque-1077 Sigma-Aldrich) and human naïve CD4+ T cells were further purified by negative selection using magnetic beads according to the manufacturer's protocol (Naïve CD4+ T Cell Isolation Kit II, Miltenyi). The naïve CD4+ T cell isolation procedure as yielded >90% of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells, as assessed by flow cytometry. The purified cells were cultured in Advanced RPMI 1640 (Gibco) supplemented medium with 3% of Fetal Bovine Serum (Gibco), Glutamine 2 mM and Penicillin (1 U/ml) plus Streptomycin (1  $\mu$ g/ml) (Gibco) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The naïve CD4+ T cells were then stimulated at different times with plate-bound anti-human CD3 monoclonal antibody (5  $\mu$ g/ml; OKT3 eBioscience) and soluble anti-human CD28 monoclonal antibody (1  $\mu$ g/ml; CD28.2 eBioscience). The activation was confirmed by assessing the CD69 marker expression by flow cytometry after 16 h.p.a.

## Flow cytometry

To determine PSA expression, resting or activated CD4+ T cells were fixed with 4% PFA and incubated with mouse IgM anti-PSA mAb (5  $\mu$ g/ml; clone 12E3, eBioscience) or isotype control mouse IgM (5  $\mu$ g/ml, eBioscience) in blocking buffer (0.5% BSA, 2% FBS and 1x PBS) for 1 h on ice, washed and incubated with PE conjugated anti-mouse IgM secondary antibody (0.3  $\mu$ g/ml; eBioscience).

Resting and 72 h.p.a. CD4+ T cells were stained for detection of ST8SialI and ST8SialIV polysialyltransferases, cells were treated with fixation/permeabilization buffer (intracellular saponin-dependent staining, Cytofix/Cytoperm BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. After washing with 1x BD Perm/Wash solution, the cells were incubated with rabbit anti-human ST8SialI IgG antibody or rabbit anti-human ST8SialIV IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min on ice. After washing with 1x Perm/Wash, the secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit IgG (2  $\mu$ g/mL, Molecular Probes) was incubated for 30 min on ice. For endoneuraminidase N (EndoN) digestion, 72 h p.a. CD4+ T cells were incubated during 2 h at 37°C with 5  $\mu$ g/ml of EndoN (*Escherichia coli* K1 bacteriophage neuraminidase; ABC scientific). Surface PSA in non-treated (Control) and EndoN treated was determined by flow cytometry and staining as previously described. All measurements obtained by flow cytometry were made after acquiring ten thousand events in FACSCanto II (FACSDiva acquisition) flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc.).

## Immunofluorescence analysis

Naïve CD4+ T cells were immunostained to assess PSA surface distribution.  $1 \times 10^6$  cells/ml of CD4+ T cells were adhered onto poly-L-lysine-coated slides by incubating at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> overnight. After washing with 1x PBS, fixing with 4% formaldehyde, and blocking with blocking buffer (0.5% BSA, 2% FBS and 1x PBS), the cells were incubated overnight at 4°C with mouse IgM anti-PSA mAb (5  $\mu$ g/ml; clone 12E3, eBioscience). Subsequently, cells were washed three times with 1x PBS and then incubated during 2 h at room temperature with the PE conjugated anti-mouse IgM antibody (0.3  $\mu$ g/ml; eBioscience). The cells were washed three times with PBS and stained with Hoechst 33342 (0.1  $\mu$ g/ml; Sigma) to

visualize DNA and mounted with mounting solution (1:1, Glycerol: PBS). The resting and 72 h.p.a. CD4+ T cells were visualized with an Olympus FV1000 Laser Confocal Microscope (Olympus, Miami, FL) with a 60X S/1.3 oil objective and with a 2X digital zoom. Only one section was obtained with pinhole closed to zero. Images were processed with the public domain software ImageJ 1.49a (NIH) and Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.).

### SDS-PAGE and western blot

Resting and anti-CD3/anti-CD28-activated CD4+ T cells were collected, washed with PBS 1x and centrifuged. The cellular pellet was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for during at least one day. The proteins were solubilized from pellet in lysis buffer containing 25 mM Tris-HCL, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, protein inhibitor cocktail EDTA-free (Roche). CD4+ T cells were incubated on ice for 30 min and the lysate was centrifuged at  $18,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The whole lysates were collected and stored until use at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The amount of protein in the supernatant was determined by the Bradford method using BioRad protein assay kit. To denature, samples were boiled in anionic denaturing detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) for 10 minutes. For SDS-PAGE 50 to 100  $\mu\text{g}$  of proteins from each whole lysate were resolved onto a 7.5% SDS-PAGE under reducing conditions at constant 40 mA. The gel was electrotransferred by wet method to a PVDF membrane (Millipore) during 2 h at 300 mA. Membranes were blocking with 5% m/w nonfat dry milk, 1x TBS 0.2% Tween-20 at room temperature (RT) during 1 h with gentle shaking. The membranes were incubated with mouse IgM anti-PSA mAb (1:10,000; clone 12E3, eBioscience), mouse IgG anti-Erk1/2 (1:5000; C-9 Santa Cruz Biotechnology), mouse IgG anti- $\alpha$  tubulin (1:5000; eBioscience), rabbit IgG anti- $\beta$  actin (1:5000; Cell Signaling Technology); rabbit IgG anti-ST8SialI (1:1000; H-136 Santa Cruz Biotechnology) or rabbit IgG anti-ST8SialIV (1:1000; H-70 Santa Cruz Biotechnology) at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle shaking, overnight. The blots were washed and subsequently incubated with 1:10,000 dilution of secondary antibody HRP-conjugated goat anti-mouse IgM (Bethyl Laboratories), HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) or goat HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) and developed using an ECL chemiluminescence substrate kit (General Electric) and exposed to Kodak X-ray film. The relative amount of ST8SialI and ST8SialIV was determined by using public domain software ImageJ 1.49a (NIH).

For endoneuraminidase N (EndoN) digestion, activated CD4+ T cells were processed as previously indicated and protein extracts (75  $\mu\text{g}$ ) were incubated with during 12 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with 0.5  $\mu\text{g}$  of EndoN (*Escherichia coli* K1 bacteriophage neuraminidase; ABC scientific) (Galuska et al. 2006). The heat-inactivated control (Ctrl) and EndoN samples were boiled for 10 min. Samples were analyzed by SDS-PAGE and western blot using mouse IgM anti-PSA mAb 12E3 as previously described.

### Retroviral transductions

Purified human naïve CD4+ T cells for each condition were incubated during 12 h in supplemented culture medium alone or with polybrene (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma), a polycation used for enhancement of lentiviral transduction, and the following lentiviral constructs: Control mock shRNA or ST8SialI-shRNA and ST8SialIV-shRNA (Santa Cruz Biotechnology). ShRNAs and lentiviral vectors were custom designed by the manufacturer. A multiplicity of infection (MOI) of 2.5 was used for transduction of CD4+ T cells. The efficiency of

transduction for lentiviral particles was previously evaluated for CD4+ T cells using this lentivirus-based system showing to be an efficient method for gene silencing through shRNA stable expression (Villanueva-Cabello et al. 2015). After 12 h of incubation with lentiviral particles, the naïve CD4+ T cells were washed and arrested for 24 h in supplemented medium. The non-transduced and transduced cells were incubated in presence of anti-CD3/anti-CD28 mAbs during 72 h. The cells of each condition were divided for real-time PCR for *IL-2*, *IL-2R* and *IFN- $\gamma$*  and western blot analysis for PSA.

### Isolation of RNA and real time PCR

Total RNA was isolated from control and silenced-activated CD4+ T cells using Trizol Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. For real time PCR analysis of gene expression, the M-MLV Reverse Transcriptase (Life Technologies) was used to synthesize cDNA from 500 ng of RNA. Primers used are listed in the Supplementary data, Table S1. Real time PCR was performed using a Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) with the StepOnePlus Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems). The reaction was conducted for 40 cycles using the following parameters:  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $55^{\circ}\text{C}$  or  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 s. The determination of Fold Change was performed using the relative quantification method for comparison (comparative method Ct) and was calculated using  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. The fold change was calculated normalized to *eEF1 $\alpha$*  gene as control.

### Statistical analysis

All results were subject to the Kolmogorov Smirnov normality test. Based on the classification of the samples, the statistical significance was calculated with the *t* test and two-way ANOVA with LSD post-hoc test that conformed to each case with Prism software (GraphPad). *P* values  $<0.05$  were considered statistically significant.

### Supplementary data

Supplementary data is available at *Glycobiology* online.

### Acknowledgments

We thank the assistance to Dr. J. Arturo Pimentel and the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada-UNAM for acquisition of confocal images.

### Conflict of interest statement

None declared.

### Funding

IMD and TMV were supported by grant RT-279765 from Red Temática-Glicociencia en Salud - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Ciencia Básica-CONACYT grant 282454 and the Sociedad Latinoamericana de Glicobiología, A.C. TMV was recipient of scholarship 245192 from CONACYT.

### Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; EndoN, endoneuraminidase N; h.p.a., hours post-activation; *IL-2*, interleukine-2 gene; *IL-2R*, interleukine-2 receptor gene; *IFN- $\gamma$* , interferon gamma gene; mAb, monoclonal antibody; MFI, mean fluorescence



intensity; MHC, Major Histocompatibility complex; NCAM, neural cell adhesion molecule; NRP-2, neuropilin-2; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PSA, polysialic acid; SynCAM1, synaptic adhesion molecule; *ST8SIAII*, sialyltransferase ST8SiaII gene; *ST8SIAIV*, sialyltransferase ST8SiaIV gene; ST8SiaII, sialyltransferase ST8SiaII enzyme; ST8SiaIV, sialyltransferase ST8SiaIV enzyme; TCR, T cell receptor.

## References

- 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<sup>+</sup> channel Nav1.4 in Chinese hamster ovary cells. *Pharmacology*. 87: 311–317.
- Angata K, Suzuki M, Fukuda M. Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. *J Biol Chem*. 1998;273:28524–28532.
- 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.
- Bennet ES. 2002. Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop domain I. *J Physiol*. 583(3):675–690.
- Bhide GP, Joseph LZ, Karen JC. 2018. Autopolysialylation of polysialyltransferases is required for polysialylation and polysialic acid chain elongation on select glycoprotein substrates. *J Biol Chem*. 293(2):701–716.
- Close BE, Jennifer MW, Tracy JB, Clement PG, Lucy JB, Karen JC. 2001. The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiology*. 11:997–1008.
- Comelli EM, 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J Immunol*. 177(4):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.
- Drake PM, Nathan JK, Stock CM, Chang PV, Muench MO, Nakata D, Reader JR, Gip P, Golden KP, Weinhold B et al. 2008. Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. *J Immunol*. 181(10):6850–6858.
- Drake PM, Stock CM, Nathan JK, Gip P, Golden KP, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Bertozzi CR. 2009. Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:11995–12000.
- Finne J, Makela PH. Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid. *J Biol Chem*. 1985; 260:1265–1270.
- Foley DA, Swartzentruber KG, Colley KJ. 2009. Identification of sequences in the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV that are required for the protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule, NCAM. *J Biol Chem*. 284:15505–15516.
- Galuska SP, Oltmann-Norden I, Geyer H, Weinhold B, Kuchelmeister K, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Muhlenhoff M. 2006. Polysialic Acid Profiles of Mice Expressing Variant Allelic Combinations of the Polysialyltransferases ST8Sia III.
- Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R et al. 2010. Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:10250–10255.
- Hanashima S, Sato C, Tanaka H, Takahashi T, Kitajima K, Yamaguchi Y. 2013. NMR study into the mechanism of recognition of the degree of polymerization by oligo/polysialic acid antibodies. *Bioorg Med Chem*. 21: 6069–6076.
- 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.
- Jakobsson E, Schwarzer D, Jokilampi A, Finne J. 2015. 'Endosialidases: versatile tools for the study of polysialic acid'. *Top Curr Chem*. 367:29–73.
- 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.
- Mazon C, Viola A. 2007. From Tango to Quadrilla. *Cell Adh Migr*. 1:7–12.
- Muhlenhoff M, Manegold A, Windfuhr M, Gotza B, Gerardy-Schahn R. 2001. The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases. *J Biol Chem*. 276:34066–34073.
- Muhlenhoff M, Rollenhagen M, Werneburg S, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. 2013. Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochem Res*. 38:1134–1143.
- Nakano TA, Steirer LM, Moe GR. 2011. The expression profile of De-N-acetyl Polysialic Acid (NeuPSA) in normal and disease human tissue. *J Biol Chem*. 286:40343–40353.
- Olsen I, Sollid LM. 2013. Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods*. 390:106–112.
- Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Muhlenhoff M. 2008. Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem*. 283(3):1463–1471.
- Ono S, Hane M, Kitajima K, Sato C. 2012. Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid. *J Biol Chem*. 287:3710–3722.
- Sato C, Kitajima K, Inoue S, Seki T, Troy FA II, Inoue Y. 1995. Characterization of the antigenic specificity of four different Anti-( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 8-linked polysialic acid) antibodies using lipid-conjugated oligo/polysialic acids. *J Biol Chem*. 270:18923–18928.
- 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.
- 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.
- Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG et al. 2007. Differential glycosylation of Th1, Th2 and Th17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*. 8:825–834.
- Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. 2017. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol*. 8:892.
- 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 neoeexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. *Glycobiology*. 25:1454–1464.
- 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.
- Yabe U, Sato C, Matsuda T, 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.
- Yu SF, Zhang YN, Yang BY, Wu CY. 2014. Human memory, but not naive, CD4<sup>+</sup> T cells expressing transcription factor T-bet might drive rapid cytokine production. *J Biol Chem*. 289:35561–35569.
- 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.