



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
**UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL**  
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ



**RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LA GLICOSILACIÓN EN MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**PERTINENCE BIOLOGIQUE DE LA GLYCOSYLATION DANS LES MECANISMES REGULANT L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T ET DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER**

**TESIS / THESE**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE / POUR L'OBTENTION DU GRQDE DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS / DOCTEUR EN SCIENCES**

PRESENTA / POUR

**MSc. Wilton Albeiro GÓMEZ HENAO**

Composición del Jurado / Composition du Jury

Dra. Edda SCIUTTO CONDE Instituto de Investigaciones Biomédicas	Présidente / Examineur
Dra. Ivonne ROSENSTEIN AZOULAY Instituto de Biotecnología	Secretaria / Rapporteur
Dr. Iván MARTINEZ DUNCKER Centro de Investigación en Dinámica Celular	Vocal / Rapporteur
Dr. Agustín RÍOS DE ANDA L'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est	Vocal / Examineur
Dra. Dulce PAPY-GARCÍA Faculté des Sciences et Technologie (UPEC)	Directora de tesis / Directrice de thèse
Dr. Edgar ZENTENO GALINDO Facultad de Medicina (UNAM)	Director de tesis / Directeur de thèse

Supervisores Científicos / Encadrants Scientifiques

Dra. Eda TENORIO ZUMÁRRAGA	Dr. Francisco TORRES QUIROZ
Dr. Minh Bao HUYNH	Dr. Mohand Ouidir OUIDJA

Ciudad Universitaria, CD.MX, Abril / Avril 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se desarrolló como una colaboración científica entre el laboratorio Gly-CRRET de la Université Paris-Est Créteil (UPEC) y el laboratorio de Glicoinmunobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el marco de un convenio de doctorado en cotutela con el Número de Registro: 57157-337-3-III-20. Los fondos económicos para el desarrollo de la actividad experimental fueron obtenidos de las subvenciones PAPIIT IN224011, IN218719, IN204717, IN213818, IN218919 e IN200321 (DGAPA, UNAM, México), por el programa europeo H2020 FET OPEN RIA ArrestAD (subvención No. 737390) y por la Agencia Flamenca para la Innovación y el Emprendimiento (VLAIO; HepSTAD, HBC.2017.0995).

Agradezco el apoyo económico proporcionado por CONACyT a través de la beca con número de registro de becario 742472. También agradezco el apoyo de la Université Paris-EST Créteil a través de la beca para estudiantes en cotutela “decreto N°2015-156 del 11 de febrero de 2015” y aprobado el 13 de diciembre de 2019.

Esta tesis fue dirigida por la Dra. Dulce PAPY-GARCÍA, Profesora e investigadora de la UPEC y por el Dr. Edgar Zenteno Galindo, Profesor SIN III UNAM. También se contó con la asesoría científica de la Dra. Eda Tenorio Zumárraga (UNAM), del Dr. Minh Bao HUYNH y del doctor Mohand Ouidir OUIDJA (ambos pertenecientes a la UPEC).

Ce travail a été développé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire Gly-CRRET de l'Université Paris-Est Créteil (UPEC) et le laboratoire de Glycoimmunobiologie de l'Université Nationale Autonome du Mexique (UNAM), dans le cadre d'une convention doctorale en cotutelle avec le numéro d'enregistrement : 57157-337-3-III-20. Les fonds économiques pour le développement de l'activité expérimentale ont été obtenus à partir des subventions PAPIIT IN224011, IN218719, IN204717, IN213818, IN218919 et IN200321 (DGAPA, UNAM, Mexique), par le programme européen H2020 FET OPEN RIA ArrestAD (subvention No. 737390) et par l'Agence flamande pour l'innovation et l'entrepreneuriat (VLAIO ; HepSTAD, HBC.2017.0995).

Je suis reconnaissant du soutien financier apporté par le CONACyT à travers la bourse avec le numéro d'inscription de boursier 742472. Je suis également reconnaissant du soutien de l'Université Paris-EST Créteil à travers la bourse pour étudiants en tutelle conjointe décret n° 2015-156 du mois de février 11, 2015" et approuvé le 13 décembre 2019.

Cette thèse a été dirigée par le Dr Dulce PAPY-GARCÍA, Professeur et chercheur à l'UPEC et par le Dr Edgar ZENTENO GALINDO, Professeur SIN III UNAM. Il y avait aussi des avis scientifiques du Dr. Eda TENORIO ZUMARRAGA (UNAM), du Dr. Minh Bao HUYNH et du Dr Mohand Ouidir OUIDJA (tous deux de l'UPEC).

*“Para el científico, no existe alegría comparable a la de un descubrimiento por pequeño que sea”*

**Alexander FLEMING**

*“¡¡¡Hoy, andá y cómete el mundo!!!, mañana será otro día”*

**Wilton GÓMEZ**

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Université Pais-Est Cretéil. Agradezco a estas dos casas de estudio por brindarme la posibilidad de formarme en lo académico y en lo científico, pero sobre todo, por permitirme conocer la cultura, la historia, la gastronomía y las diferentes dinámicas sociales de sus respectivos países, esto sin duda es mi mayor aprendizaje a nivel personal.

Al departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (UNAM) y a la Faculté des sciences et technologie (UPEC), por haber aportado el material y los espacios necesarios para desarrollar el proyecto. Al postgrado en ciencias Bioquímicas de la UNAM (MSc. Norma, Sr. Julio, Sra. Adelina y a los diferentes coordinadores) y a L'École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (Mme Brigitte et Mme. Pascal), por su disposición y ayuda durante los trámites administrativos.

Al laboratorio 9 por dejarme desarrollar como científico y académico, permitiendo mi autonomía en la búsqueda de respuestas a preguntas científicas.

Au laboratoire Gly-CRRET, qui m'a appris le travail d'équipe lors de recherches scientifiques et la visualisation de différentes formes de réflexion scientifique à travers le multiculturalisme de ses membres.

A mis Tutores y al Comité tutorial:

Dr. Edgar ZENTENO

Dra. Dulce PAPY-GARCÍA

Dra. Eda TENORIO ZUMÁRRAGA

Dr. Francisco TORRES QUIROZ

Por sus correcciones, guías y aportes en la realización de este trabajo.

Al jurado de examen de grado:

Dra. Edda SCIUTTO CONDE

Dra. Ivonne Jane ROSENSTEIN AZOULAY

Dr. Iván MARTINEZ DUNCKER

Dr. Agustín RÍOS DE ANDA

Por su tiempo y comentarios en la construcción de este manuscrito.

Agradezco a la Dra. Paz Maria DURAN y a los Drs. Rafel SAVEDRA DURAN, Yonathan GARFÍAS BECERRA y Ricardo LASCURAIN. También, al laboratorio nacional de citometría de flujo y al laboratorio 6 (Drs. Ali Pereyra, José Luis Salgado y Eleazar Ramírez). A todos ellos gracias por dejarme usar sus laboratorios en su momento para llevar a cabo parte de mi procedimiento experimental. A la Dra. Deyanira Matus, por dejarme hacer parte del equipo profesoral de la facultad.

Agradezco al equipo técnico Dra. Jacqueline FERNÁNDEZ VARGAS, MSc. Carlos CASTELLANO, Dra. Elia TORRES GUTIÉRREZ y Bio. Olivia REYNOSO DUCOING. Doc Olivia, mil gracias por brindarme todo su conocimiento en el momento en que más los necesitaba, las discusiones técnicas con usted sobre en el estudio de las proteínas me permitieron avanzar mucho en mi trabajo.

Je remercie chaleureusement Dr. Gael LE DOUARON, Dr. Denis BIARD, IGE. Gilles CARPENTIER, Dr. Xavier LAFFRAY, Alexandra SASSI, Sarah LAROUSSI, Sandrine CHANTEPIE et Bertille HUYNH, pour son soutien technique et son enseignement de nouvelles techniques expérimentales. Je remercie également mes collègues doctorants Nicolas REBERGUE, Rafael CASTILLO-NEGRETE, Héloïse MERRICK, Chayma SAADAN, Ivan RAMOS et Aubert DE LICHY, pour leurs contributions à mon travail et leurs enseignements à ma formation.

Je remercie Dr. Mohand Ouidir OUIDJA, pour son aide précieuse et pour m'avoir accordé un espace au sein de son équipe travaillant sur l'expérimentation animale. Cette expérience a beaucoup contribué à ma formation académique et à mes compétences professionnelles.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, pues a través de sus bendiciones he podido cumplir sueños, metas y objetivos.

A mis **padres**, por su consejo, “en la vida hay que volar y seguir los sueños”, esa frase siempre viene a mi mente y a mi corazón en los momentos cuando más añoro estar cerca a ustedes.

A mis queridos hermanos: **Juan, Zulma, Yolima y Cami**, por sus llamadas oportunas en los momentos difíciles, por estar ahí cuando necesito un empuje emocional de esos que hinchan el corazón de tanto amor.

A mis **sobrinos**, porque siempre he procurado ser un ejemplo para ellos y porque he querido demostrarles que en la vida se pueden perseguir sueños y materializarlos a través del trabajo y la perseverancia.

A **Josss**, por su compañía, por escucharme, por estar ahí para darme alientos cuando hubo días difíciles, pero también para felicitarme cuando hubo logros y avances.

Agradezco con el corazón a mis jefes, el **Doctor Zenteno** y a la **Doctora Dulce PAPHY**, agradezco por la oportunidad de haberme permitido formarme a su lado, por su apoyo incondicional en mis estudios superiores, por sus recomendaciones, sus correcciones y por forjar en mi un carácter científico. Pero más importante aún, les agradezco por la confianza que me brindaron y por creer en mis capacidades. Ustedes dos ocupan un lugar muy especial en mi historia de vida.

I also thank Dr. **Eda TENORIO** and Dr. **Minh Bao HUYNH**, both fundamental in my training and whom I consider part of my friends. These two people were the pillars of my experimental and scientific training, since they gave me all their knowledge without misgivings and were there to build my project alongside them.



**Dra. Eda**, no sé si en algún momento le manifesté toda la admiración que le tengo, no solo como científica sino también como mujer. Creo que usted es el claro ejemplo que se puede hacer ciencia de calidad, y de que se puede ser objetivo y riguroso con uno mismo. Gracias por enseñarme a plasmar y construir ideas científicas.

**Minh Bao**, I have greatly admired your work, your logic with ideas and your ability to design strategies to find answers to a scientific question, you are a great scientist. I thank you very much Minh Bao for those discussions and scientific reflections, where the language did not matter (French, English or on some occasions in Spanish).

Al **Doctor Chávez**, gracias por esas conversaciones académicas, siempre me he maravillado con su inmenso conocimiento. Gracias por escucharme mis ideas académicas y por ayudarme a madurar mi pensamiento científico.

A **mis amigos en Colombia**: Caro, Madrigal, Charlie, Javi, Mónica, Mildrey, Wilfer, Jhony, Miller, Jefer y todos los aquellos que siempre esperaron mi llegada para darme un abrazo y compartir conmigo.

A **mis amigos mexicanos**: Daniel Miriles, Viry, Rocha, Gio, Victor y Frank, pues en ellos he encontrado personas muy valiosas.

A **mis amigos en Francia**: Mary, Yule y Lore, Gracias por su incondicional ayuda siempre que lo he necesitado.

A **México**, a toda su gente y su raza, que me dieron la oportunidad de formarme, que me dejaron deslumbrar con sus paisajes y riquezas, y que me dejaron enamorarme de su gastronomía. Ahora me siento hijo de ustedes.

A **Francia**, por dejarme entrar en su país donde muchos quieren llegar y no pueden, por brindarme un futuro y por dejarme ver la multiculturalidad de la humanidad.

A **Colombia**, mi tierra, esa que siempre me recibe con su alegría en cada oportunidad, pero que, a su vez, me ve partir con melancolía en cada despedida.

Finalmente, **agradezco a la vida**, por dejarme vivirla intensamente, por darme oportunidades que he sabido aprovechar y por mostrarme un mundo más allá de todo.

# Contenido

ABREVIATURAS .....	13
ÍNDICE DE FIGURAS .....	14
ÍNDICE DE TABLAS .....	16
RESUMEN (Español, Frances, Inglés) .....	17
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 La glicosilación y su potencial en la regulación de procesos biológicos .....</b>	<b>24</b>
1.1.1 Estructura y síntesis general de los glicanos .....	25
1.1.2 <i>N</i> - y <i>O</i> -glicanos.....	27
1.1.3 Proteoglicanos .....	30
1.1.4 Las glicosilaciones en la salud y en la enfermedad .....	32
<b>1.2 Aspectos glicobiológicos en el desarrollo y función de los linfocitos T .....</b>	<b>34</b>
1.2.1 La activación del linfocito T .....	35
1.2.2 Las lectinas como moléculas estimuladoras .....	38
1.2.3 ALL reconoce <i>O</i> -glicanos que participan en la activación celular .....	39
<b>1.3 Participación de la glicosilación en el desarrollo de neuropatías, la enfermedad de Alzheimer como caso de estudio .....</b>	<b>42</b>
1.3.1 Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer .....	44
1.3.2 Aspectos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer .....	45
1.3.3 La internalización neuronal de los Heparán sulfatos induce el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.....	51
<b>2. OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>54</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 Animales.....	58
3.2 Amortiguadores, Medios de cultivo y Soluciones.....	59
3.3 Cultivos celulares primarios.....	60
3.4 Anticuerpos, lectinas, colorantes .....	63
3.5 Análisis por citometría de flujo .....	65
3.6 Análisis de Microscopía y obtención de imágenes. ....	69
3.7 Análisis de proteínas .....	70
3.8 Controles de especificad de ALL .....	72
3.9 Determinación de IL-2 por la técnica ELISA.....	72
3.10 Primers usados para la cuantificación de transcritos de HS3STs por qPCR .....	73
3.11 Transfección de células HEK.....	73
3.12 Software, programas de cómputo y estadística .....	75
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>

<b>4.1 Tema uno: <i>Dinámica de expresión de las proteínas O-glicosiladas reconocidas por la lectina de Amaranthus Leucocarpus en linfocitos T y su relación con la moesina como mecanismo alternativo de activación celular</i></b> .....	<b>78</b>
4.1.1 Dinámica de expresión de gpALL en linfocitos T tras la activación celular .....	80
4.1.2 Los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> expresan de manera dinámica una forma O-glicosilada de moesina en respuesta al estímulo.....	87
4.1.3 Thr <sup>558</sup> en moesina tiene una alta probabilidad de ser un sitio O-glicosilable .....	90
4.1.4 O-moesina se perfila como una molécula coactivadora que induce una respuesta similar a CD28.....	91
<b>4.2 Tema dos: <i>Mecanismo de internalización de HS-3S en células HEK y su papel durante la formación de oligo-tau</i></b> .....	<b>98</b>
4.2.1 Caracterización de HS3ST2 y HS-3S en las células HEK .....	100
4.2.2 Células HEK <sub>HS3ST2</sub> incrementan la expresión y acumulación intracelular de HS-3S.....	101
4.2.3 Tau y HS3ST2 no inducen recíprocamente su expresión. ....	103
4.2.4 Las células HEK <sub>HS3ST2 + tau</sub> expresan oligo-tau que colocan con HS-3S.....	104
4.2.5 La endocitosis dependiente de caveolina media la Internalización de HS-3S.....	106
4.2.6 Determinación de la expresión de HS-3S en ratones <i>HS3ST2</i> <sup>-/-</sup> .....	111
<b>5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>113</b>
<b>5.1 Discusión Tema uno</b> .....	<b>114</b>
<b>5.2 Discusión Tema Dos</b> .....	<b>120</b>
<b>6. CONCLUSION GENERAL</b> .....	<b>124</b>
<b>7. ARTÍCULOS PUBLICADOS</b> .....	<b>126</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>167</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>175</b>

# Contenu

ABRÉVIATIONS.....	13
INDEX DES FIGURES.....	14
INDEX DU TABLEAU.....	16
RÉSUMÉ (Espagnol, Français, Anglais).....	17
<b>1.INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 La glycosylation et son potentiel dans la régulation des processus biologiques .....</b>	<b>24</b>
1.1.1 Structure et synthèse générale des glycanes .....	25
1.1.2 Les <i>N</i> - et les <i>O</i> -glycanes .....	27
1.1.3 Protéoglycanes.....	30
1.1.4 Glycosylations dans la santé et la maladie.....	32
1.2 Aspects glycobiochimiques dans le développement et la fonction des lymphocytes T	34
1.2.1 Activation du lymphocyte T.....	35
1.2.2 Les lectines comme molécules stimulantes.....	38
1.2.3 ALL reconnaît les O-glycanes impliqués dans l'activation cellulaire .....	39
<b>1.3 Implication de la glycosylation dans le développement des neuropathies, la maladie</b>	
<b>d'Alzheimer comme étude de cas.....</b>	<b>42</b>
1.3.1 Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer.....	44
1.3.2 Aspects physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer.....	45
1.3.3 L'internalisation neuronale des héparanes sulfates induit le développement de la	
maladie d'Alzheimer.....	51
<b>2.OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....</b>	<b>54</b>
<b>3.MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>57</b>
3.1 Animaux.....	58
3.2 Tampons, milieux de culture et solutions.....	59
3.3 Cultures de cellules primaires.....	60
3.4 Anticorps, lectines, colorants.....	63
3.5 Analyse par cytométrie en flux.....	65
3.6 Analyse et imagerie microscopiques.....	69
3.7 Analyse des protéines.....	70
3.8 Contrôles de spécificité du ALL.....	72
3.9 Détermination de l'IL-2 par ELISA.....	72
3.10 Primers utilisés pour la quantification des transcrits HS3ST par qPCR.....	73
3.11 Transfection des cellules HEK .....	73
3.12 Logiciels, logiciels et statistiques.....	75
<b>4.RESULTATS.....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 Premier thème : Dynamique d'expression des protéines O-glycosylées reconnues par la lectine</b>	
<b>d'Amaranthus leucocarpus dans les lymphocytes T et sa relation avec la moésine comme</b>	
<b>mécanisme alternatif d'activation cellulaire.....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Dynamique de l'expression de gpALL dans les lymphocytes T après activation	
cellulaire.....	80

4.1.2	Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> expriment dynamiquement une forme O-glycosylée de la moésine en réponse à une stimulation.....	87
4.1.3	Thr558 dans la moésine a une forte probabilité d'être un site O-glycosilable.....	90
4.1.4	L'O-moésine est en train de devenir une molécule coactivatrice qui induit une réponse de type CD28.....	91
<b>4.2</b>	<b>Deuxième thème : Mécanisme d'internalisation du HS-3S dans les cellules HEK et son rôle lors de la formation d'oligo-tau.....</b>	<b>98</b>
4.2.1	Caractérisation des cellules HS3ST2 et HS-3S dans les cellules HEK.....	100
4.2.2	HEK HS3ST2 augmentent l'expression intracellulaire et l'accumulation de HS-3S.....	101
4.2.3	Tau et HS3ST2 n'induisent pas réciproquement leur expression.....	103
4.2.4	Les cellules HEK <sub>HS3ST2 + tau</sub> expriment des oligo-tau qui colocalisent avec HS-3S.....	104
4.2.5	L'endocytose cavéoline dépendante intervient dans l'internalisation du HS-3S.....	106
4.2.6	Détermination de l'expression de HS-3S chez des souris HS3ST2 <sup>-/-</sup> .....	111
<b>5</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>113</b>
5.1	Discussion.....	114
5.2	Discussion .....	120
<b>6</b>	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>ARTICLES PUBLIÉS.....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>ANNEXE.....</b>	<b>167</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>175</b>

# ABREVIATURAS

ALL	Lectina de <i>Amaranthus Leucocarpus</i> (en su forma nativa o acoplada a Biotina)
APC	Célula presentadora de antígeno
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora de amiloide
A $\beta$	Péptido $\beta$ -amiloide
CS	Condroitín sulfato
DS	Dermatán sulfato
EA	Enfermedad de Alzheimer
EOAD	Early-onset Alzheimer Disease
Fuc	Fucosa
GAG (s)	Glicosoaminoglicano (s)
Gal	Galactosa
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
Glc	Glucosa
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N- Acetilglucosamina
GluA	Ácido Glucurónico
gpALL	Glicoproteínas reconocidas por la lectina de <i>Amaranthus Leucocarpus</i>
GS	Glicosidasas
GT	Glicosiltransferasas
HS	Heparán sulfato
HS-3S	Heparán sulfato 3 sulfatado
HS3ST2	Heparán sulfato sulfotransferasa 2
HSST	Heparán sulfato sulfotransferasas
IdoA	Ácido Idurónico
KS	Keratán sulfato
LOAD	Late-onset Alzheimer Disease
Man	Manosa
MH	Complejo mayor de histocompatibilidad
NDST	N-desacetilasa/N-sulfotransferasas
NFTs	Ovillos neurofibrilares
pMHC	Complejo mayor de histocompatibilidad cargado con el péptido
PSEN1/2	Preselina 1 o 2
p-tau	Proteína tau anormalmente fosforilada
MPT (s)	Modificación (es) postraduccionales (es)
SiA	Ácido siálico
Strp BV 421	Streptavidin Brilliant Violet 421
Strp HRP	Streptavidin Horseradish Peroxidase
TCR	Receptor del linfocito T
Xyl	Xilosa

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modificaciones postraduccionales. ....	24
Figura 2. La variabilidad estructural de las glicosilaciones disminuye la conservación de las estructuras e incrementa el potencial químico de transporte de información.....	25
Figura 3. Estructuras de carbohidratos que conforman las glicosilaciones en mamíferos. ....	26
Figura 4. Formación del enlace glicosídico. ....	27
Figura 5. Estructura de los <i>N</i> - y de los <i>O</i> -glicanos. ....	29
Figura 6. Composición glicosídica de los glicosaminoglicanos. ....	30
Figura 7. Sulfatación del HS.....	31
Figura 8. Progreso en el descubrimiento de los trastornos de la glicosilación.....	33
Figura 9. ALL reconoce timocitos presentes en la medula y en la región cortico medular del timo.....	39
Figura 10. ALL reconoce una <i>O</i> -glicoproteína de 70-kDa expresada en linfocitos T de sangre periférica, nódulos y bazo. ....	40
Figura 11. ALL coestimula células T en presencia de anti-CD3.....	41
Figura 12. Regulación dinámica de la actividad de moesina en el citosol. ....	42
Figura 13. Cronología de los eventos fisiopatológicos de la EA en relación con el curso clínico .....	43
Figura 14. Procesamiento proteolítico de APP y biogénesis de A $\beta$ .....	46
Figura 15. Isoformas de tau en humanos producidas por splicing alternativo en el sistema nervioso central .....	48
Figura 16. Potenciales sitios de fosforilación de tau durante la hiperfosforilación y agregación de la proteína. ....	49
Figura 17. Modelo de conversión conformacional de nucleación favorecido por los HS durante la cinética de formación de fibras amiloides. ....	50
Figura 18. Inmunodetección de HS en tejidos de pacientes con EA.....	51
Figura 19. Evaluación de la especificidad de ALL por linfocitos T.....	80
Figura 20. Estrategia de análisis de datos obtenidos por citometría de flujo. ....	82
Figura 21. ALL reconoce diferentes niveles de expresión de gpALL en células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .....	83
Figura 22. Validación del uso de ALL en experimentos de Lectin-Blot. ....	84
Figura 23. Estrategia de Cell sorting y análisis de pureza postsort. ....	85
Figura 24. La <i>O</i> -glicosilación detectada por ALL incrementa en células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en respuesta a la activación. ....	86
Figura 25. <i>O</i> -moesina es una <i>O</i> -glicoproteína de 70-kDa reconocida por ALL en células CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> ...	88

Figura 26. Dinámica de expresión de moesina en células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .....	89
Figura 27. Predicción de sitios de <i>O</i> -glicosilación en la proteína moesina P26041 (UniProt).....	91
Figura 28. La estimulación a través de moesina induce la expresión de CD69 desde las primeras horas de activación.....	92
Figura 29. Moesina induce la coestimulación celular y la expresión de marcadores de activación en los linfocitos T de manera prolongada.....	94
Figura 30. Moesina induce la proliferación celular en los linfocitos T.....	96
Figura 31. La coestimulación a través de moesina induce la producción de IL-2 en linfocitos T.....	97
Figura 32. Determinación de los niveles de expresión de HS3ST2 y de HS-3S en células HEK .....	101
Figura 33. Las células HEK <sub>HS3ST2</sub> expresan y acumulan HS-3S intracelular.....	102
Figura 34. HS3ST2 y tau no inducen su expresión de manera recíproca.....	103
Figura 35. HS-3S colocaliza fuertemente con tau .....	105
Figura 36. Solo las células HEK <sub>HS3ST2 + tau</sub> expresan oligo-tau.....	106
Figura 37. Solo los HS-3S son internalizados y acumulados intracelularmente.....	107
Figura 38. Los HS-3S son internalizados mediante tráfico endocítico mediado por caveolina.....	109
Figura 39. La Inhibición de los endosomas mediadas por caveolina disminuyen la acumulación intracelular de HS-3S.....	110
Figura 40. La expresión de HS-3S disminuye en ratones <i>KO HS3ST2<sup>-/-</sup></i> , pero la expresión de otros HS no se ven afectada.....	112
Figura 41. Perspectivas en el estudio de la <i>O</i> -moesina en la activación de la célula T.....	119



# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las Heparán sulfotransferasas. ....	32
Tabla 2. Tipos de polarización de los linfocitos T.....	37
Tabla 3. Soluciones Buffer, medios de cultivo y soluciones. ....	59
Tabla 4. Moléculas utilizadas en la determinación de gpALL por citometría de flujo. ....	63
Tabla 5. Características de colorantes utilizados en citometría de flujo. ....	63
Tabla 6. Características de anticuerpos usados en la detección de moléculas de superficie por citometría de flujo.....	63
Tabla 7. Características de moléculas utilizadas ensayos de Lectin- y Western-Blot. ....	64
Tabla 8. Anticuerpos usados en los experimentos de inmunocitoquímica (ICC).....	64
Tabla 9. Características de anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos usados en los experimentos de ICC.....	64
Tabla 10. Moléculas utilizadas en precipitación de O-glicoproteínas. ....	65
Tabla 11. Características del componente óptico del citómetro de flujo MACS QUANT Analyzer 10. ..	67
Tabla 12. Características del componente óptico del citómetro de flujo FACSAria. ....	67
Tabla 13. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de gpALL por citometría de flujo.....	68
Tabla 14. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de moesina por citometría de flujo. ....	68
Tabla 15. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de marcadores de activación y en el análisis de la proliferación celular por citometría de flujo.....	68
Tabla 16. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de marcadores de activación y en el análisis de la proliferación celular, citometro FACSAria. ....	68
Tabla 17. Características del componente óptico del microscopio IX81 DSU Olympus, 60 × NA1.35....	70
Tabla 18. Human primers usados en experimentos de PCR .....	73

# RESUMEN

La glicosilación es una modificación postraduccional que participa en los procesos de regulación y de homeostasis en los sistemas biológicos. La función de la glicosilación está relacionada con procesos de señalización celular, estabilidad estructural, comunicación o como barrera de protección celular. En este trabajo nos enfocamos en evidenciar la importancia de la glicosilación en dos contextos biológicos en los cuales mostramos como la glicosilación tiene un rol fundamental en la activación de los linfocitos T o como la desregulación de la glicosilación puede inducir el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Así evidenciamos la participación de la glicosilación, específicamente de O-glicoproteínas y de proteoglicanos, durante la homeostasis y la desregulación de procesos fisiopatológicos.

La O-glicosilación participa y regula de manera activa procesos claves de la respuesta inmune. Particularmente en el linfocito T, se han identificado múltiples glicoproteínas que son requeridas para desencadenar la activación y el desarrollo de las funciones efectoras celulares. Reportes previos, han identificado que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), en presencia de anti- CD3, puede coestimular linfocitos T de manera similar al mecanismo clásico de coactivación a través de CD28. Además, se ha sugerido que una de las O-glicoproteínas reconocidas por ALL en linfocitos T CD4<sup>+</sup> tiene homología con una proteína denominada moesina, sin embargo, no se ha confirmado su identidad en células CD8<sup>+</sup> y su función en los linfocitos T aun no es clara. En este trabajo, mostramos que ALL reconoce una forma O-glicosilada de moesina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, cuya expresión se induce de manera dinámica en respuesta al estímulo. Identificamos por análisis bioinformáticos varios sitios potenciales de O-glicosilación, entre ellos Thr<sup>558</sup>, un aminoácido con un rol fundamental en la regulación de la función de moesina en citosol. A nivel funcional, mostramos como la coestimulación de linfocitos T con anti-moesina, en presencia de anti-CD3, induce la expresión de marcadores de activación CD69 y CD25, la producción de IL-2 y la proliferación celular. en conclusión, nuestros resultados demuestran que existe una forma O-glicosilada de moesina (O-moesina) en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aun no descrita,

cuya función está relacionada con procesos de activación de los linfocitos T de manera no canónica.

Concerniente a la glicosilación de proteoglicanos, nosotros nos interesamos por su rol dentro de un contexto neuropatológico como la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, se ha observado una relación en la expresión del heparán sulfato 3-O-sulfotrasferasa 2 (HS3ST2) con la hiperfosforilación de la proteína tau (p-tau). Además, se ha evidenciado como los heparán sulfatos 3-O-sulfatados (HS-3S) se acumulan de manera anormal al interior de la neurona durante el desarrollo de la enfermedad, donde colocalizan con p-tau, como una característica fisiopatológica de la enfermedad. Sin embargo, los eventos que favorecen la internalización de los HS-3S y su papel durante la taupatia aún se desconocen. Para investigar los mecanismos que involucran la participación del HS-3S en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, desarrollamos un modelo utilizando células HEK293 (HEK) transfectadas con *HS3ST2* y/o *MATP (tau)*. Nuestros resultados muestran que la expresión y acumulación del HS-3S induce la agregación de tau, permitiendo perfilar al HS-3S como una molécula central en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. También, en nuestro modelo celular pudimos determinar en nuestro modelo celular que la endocitosis dependiente de caveolina es uno de los mecanismos de internalización de los HS-3S al interior de las células. Estos resultados nos permitieron avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares que involucran el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Este trabajo de tesis ilustra con resultados originales, la importancia de la glicosilación, específicamente de la O-glicosilación y de los proteoglicanos, en procesos fisiopatológicos. Nosotros ejemplificamos como la glicosilación participa en la respuesta inmunológica y como su desregulación involucra el desarrollo de procesos de neurodegeneración. La comprensión de los procesos que involucran la glicosilación permitirá el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas y moleculares que permitan el mantenimiento de la homeostasis celular y prevengan la enfermedad mediante el desarrollo de nuevas terapias clínicas.

# RÉSUMÉ

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui participe aux processus de régulation et d'homéostasie des systèmes biologiques. Le rôle de la glycosylation est lié aux processus de signalisation cellulaire, à la stabilité structurelle, à la communication ou comme barrière de protection cellulaire. Dans ce travail, nous nous concentrons sur la démonstration de l'importance de la glycosylation dans deux contextes biologiques où nous illustrons comment la glycosylation joue un rôle fondamental dans l'activation des lymphocytes T ou comment la dérégulation de la glycosylation peut induire le développement de maladies neurodégénératives. Ainsi, nous montrerons la participation de la glycosylation, en particulier des O-glycoprotéines et des protéoglycanes, lors de l'homéostasie et de la dérégulation des processus physiopathologiques.

L'O-glycosylation participe et régule de manière active les processus clés de la réponse immunitaire. En particulier dans le lymphocyte T, plusieurs glycoprotéines ont été identifiées comme étant nécessaires pour déclencher l'activation et le développement des fonctions effectrices cellulaires. Des rapports antérieurs, ont identifié que la lectine d'*Amaranthus Leucocarpus* (ALL), en présence d'anti-CD3, peut co-stimuler les lymphocytes T de manière similaire au mécanisme classique de coactivation via CD28. De plus, il a été suggéré que l'une des O-glycoprotéines reconnues par ALL sur les cellules T CD4<sup>+</sup> a une homologie avec une protéine appelée moésine, cependant, son identité dans les cellules CD8<sup>+</sup> n'a pas été confirmée et sa fonction dans les cellules T reste incertaine. Dans ce travail, nous montrons qu'ALL reconnaît une forme O-glycosylée de la moésine sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et qui s'exprime dynamiquement en réponse à l'activation cellulaire. Nous avons identifié par analyse bio-informatique plusieurs sites potentiels de O-glycosylation, par exemple la Thr<sup>558</sup>, un acide aminé qui régule la fonction de la moésine dans le cytosol. Au niveau fonctionnel, nous montrons comment la co-stimulation des lymphocytes T avec l'anti-moésine, en présence d'anti-CD3, induit l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD25, la production d'IL-2 et

la prolifération cellulaire. En conclusion, nos résultats montrent qu'il existe une forme O-glycosylée de la moésine (O-moésine) dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, encore non décrite, et sa fonction est liée à des processus de coactivation non classiques du lymphocytes T.

Concernant la glycosylation des protéoglycanes, nous nous intéressons aux rôles dans contextes neuropathologiques comme celui de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, il a été observé une relation entre l'expression de l'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 2 (HS3ST2) et l'hyperphosphorylation de la protéine tau (p-tau). Il a été montré qu'au cours de la maladie, les héparanes sulfates 3-O-sulfatés (HS-3S) s'accumulent anormalement à l'intérieur du neurone, où ils co-localisent avec la p-tau, comme une caractéristique physiopathologique de la maladie. Cependant, les événements qui favorisent l'internalisation de HS-3S et son rôle au cours de la tauopathie sont encore inconnus. Pour étudier les mécanismes impliquant HS-3S dans le développement de la maladie d'Alzheimer, nous avons développé un modèle utilisant des cellules HEK293 (HEK) transfectées avec *HS3ST2* et/ou *MAPT* (tau). Nos résultats montrent que l'expression et l'accumulation de HS-3S induit l'agrégation de tau, permettant à HS-3S d'être considéré comme une molécule centrale dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Nous avons aussi, réussi à déterminer dans notre modèle cellulaire que l'endocytose dépendante de la cavéoline est l'un des mécanismes d'internalisation des HS-3S dans les cellules. Ces résultats nous ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer.

Ce travail de thèse illustre par des résultats originaux l'importance de la glycosylation, plus précisément de la O-glycosylation et des protéoglycanes, dans les processus physiopathologiques. Nous illustrons comment la glycosylation participe à la réponse immunitaire et comment sa dérégulation implique le développement de processus de neurodégénérescence. La compréhension des processus impliquant la glycosylation permettra le développement de nouvelles stratégies pharmacologiques et moléculaires permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire et la prévention des maladies grâce au développement de nouvelles thérapies cliniques.

# ABSTRACT

Glycosylation is a post-translational modification that participates in regulation and homeostasis processes in biological systems. The role of glycosylation is related to cell signaling processes, structural stability, communication, or as a cell protection barrier. In this work we focus on evidencing the importance of glycosylation in two biological contexts where glycosylation has a fundamental role in the activation of T lymphocytes or where its deregulation can induce the development of neurodegenerative diseases. Thus, we evidence the participation of glycosylation, specifically of O-glycoproteins and proteoglycans, during homeostasis and deregulation of pathophysiological processes.

O-glycosylation actively participates in key processes of the immune response. Particularly in the T lymphocyte, multiple glycoproteins have been identified that are required to trigger the activation and development of cellular effector functions. Previous reports have identified that the *Amaranthus Leucocarpus* lectin (ALL), in the presence of anti-CD3, can costimulate T lymphocytes in a similar way to the classical mechanism of coactivation through CD28. In addition, it has been suggested that one of the O-glycoproteins recognized by ALL on CD4<sup>+</sup> T cells has homology to a protein called moesin, however, its identity in CD8<sup>+</sup> cells has not been confirmed and its function in T cells remains unclear.

In this work, we show that ALL recognizes an O-glycosylated form of moesin on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which is dynamically expressed in response to stimulation. Through bioinformatic analysis, we identified several potential O-glycosylation sites, among them Thr<sup>558</sup>, an amino acid with a fundamental role in the regulation of moesin function in the cytosol. At a functional level, we show how the costimulation of T lymphocytes with anti-moesin, in the presence of anti-CD3, induces the expression of activation markers CD69 and CD25, the production of IL-2 and cell proliferation. In conclusion, our results show that there is an O-glycosylated form of moesin (O-moesin) in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, not yet described, and your function is related to T-lymphocyte activation processes in a non-canonical manner.

Regarding the glycosylation of proteoglycans, we are interested in its role in neuropathological contexts such as Alzheimer's disease. In this context, a relationship has been observed between the expression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2 (HS3ST2) and the hyperphosphorylation of the tau protein (p-tau). In addition, it has been shown that during the development of the disease, 3-O-sulfated heparan sulfates (3S-HS) accumulate abnormally inside the neuron, where they colocalize with p-tau, as a pathophysiological characteristic of the disease. However, the events that favor the internalization of 3S-HS and its role during tauopathy are still unknown. To investigate the mechanisms involved in the involvement of 3S-HS in the development of Alzheimer's disease, we have developed a model using HEK293 (HEK) cells transfected with *HS3ST2* and/or *MAPT* (tau). Our results show that the expression and accumulation of 3S-HS induces tau aggregation, allowing 3S-HS to be outlined as a central molecule in the development of Alzheimer's disease. Also, we were able to determine in our cell model that caveolin-dependent endocytosis is one of the internalization mechanisms of 3S-HS into cells. These results allowed us to advance in the understanding of the molecular mechanisms involved in the development of Alzheimer's disease.

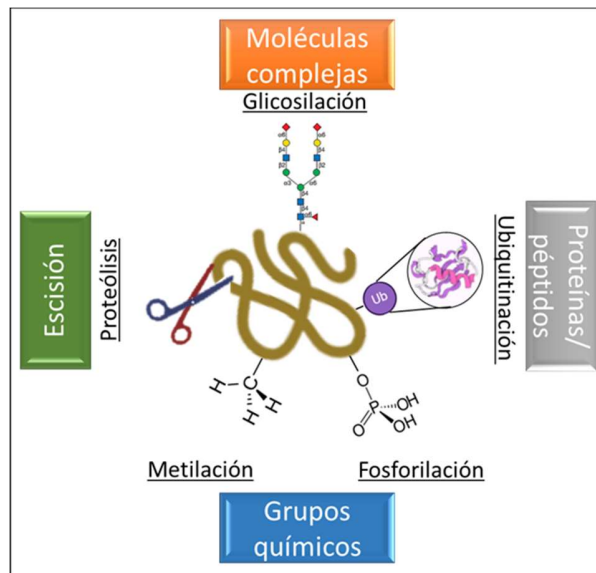
This thesis work illustrates with original results the importance of glycosylation, specifically O-glycosylation and proteoglycans, in pathophysiological processes. We exemplify how glycosylation participates in the immune response and how its deregulation involves the development of neurodegeneration processes. The understanding of the processes that involve glycosylation will allow the development of new pharmacological and molecular strategies that allow the maintenance of cellular homeostasis and prevent disease through the development of new clinical therapies.

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 La glicosilación y su potencial en la regulación de procesos biológicos

Las modificaciones postraduccionales (MPTs) son un proceso que consiste en la adición enzimática de grupos químicos que alteran la estructura molecular de las biomoléculas, y su rol está relacionado principalmente con la regulación de las funciones biológicas y con la conformación estructural de las biomoléculas [1]. Se han descrito y clasificado diferentes MPTs que van desde la escisión de proteínas durante la proteólisis, hasta la adición de moléculas como grupos fosfato o de estructuras complejas tales como polisacáridos (Figura 1; Anexo 1) [2].

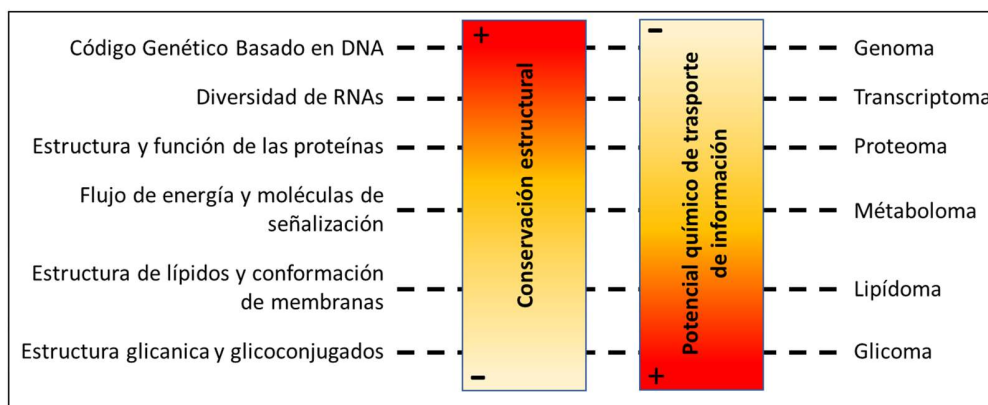


**Figura 1. Modificaciones postraduccionales.** Las MPTs regulan las funciones de las biomoléculas, aportan estabilidad estructural, participan en la interacción ligando-receptor, favorecen procesos de señalización, inducen procesos de reciclaje de biomoléculas o direccionan la biomolécula hacia una localización específica. Existen varias maneras de clasificar las MPTs, aquí mostramos una clasificación de acuerdo con la estructura o función.

La adición de carbohidratos como MPT, es un proceso conocido como glicosilación y se caracteriza por la formación de un enlace glicosídico covalente entre las biomoléculas y un mono u oligosacárido denominado glicano o porción glicosídica [3]. La glicosilación es catalizada por glicosiltransferasas (GT) y glicosidasas (GS), las cuales favorecen la formación del enlace glicosídico y la posterior elongación, edición, hidrólisis y terminación de la cadena glicosídicas; los niveles de expresión de GT y GS,

junto con la disponibilidad del sustrato, son factores claves en la regulación de la síntesis de las glicosilaciones [4].

Se calcula que más del 50% de las proteínas estas modificadas por la adición de glicanos; además, la diversidad en la composición glicosídica se estima en el orden de  $\sim 10^{12}$  estructuras diferentes. La gran divergencia estructural de la glicosilación, hace de este proceso un factor biológico estructuralmente no conservado y con un alto potencial químico en el trasporte de información por encima del genoma, el transcriptoma, proteoma, metaboloma y el lipídoma (Figura 2) [5-7]. La maquinaria necesaria para lograr este nivel de complejidad comprende más de 90 familias de GT y GS que participan en el ensamblaje de la glicosilación, lo que comprende entre el 2-3 % de los genes en mamíferos [8-10].

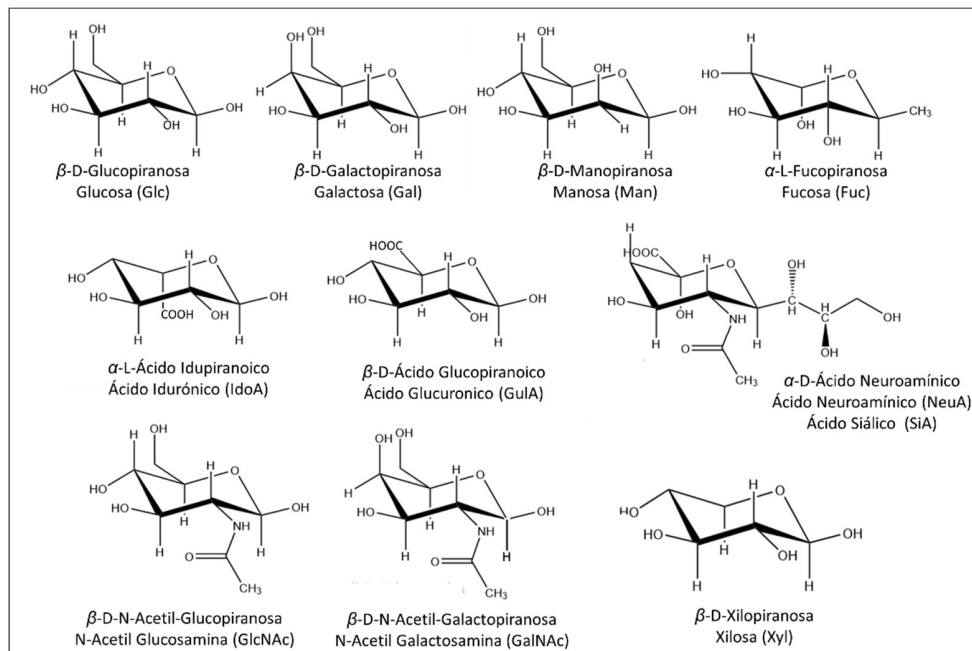


**Figura 2. La variabilidad estructural de las glicosilaciones disminuye la conservación de las estructuras e incrementa el potencial químico de transporte de información.** Las glicosilaciones son altamente divergentes, por lo tanto, su variabilidad estructural es poco conservada, lo que incrementa el potencial químico en el trasporte de información a través de su estructura. Tomado y modificado de *Varki, 2011* [11].

### 1.1.1 Estructura y síntesis general de los glicanos

Las secuencias glicosídicas están constituidas en su mayoría por la combinación y/o repetición de los monosacáridos *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc), Galactosa (Gal), Manosa (Man), Ácido siálico (SiA), Fucosa (Fuc), *N*-Acetilgalactosamina (GalNAc), Glucosa (Glc), Ácido Glucurónico (GluA), Xilosa (Xyl) y Ácido Idurónico (IdoA), con una abundancia relativa en mamíferos de 31.8, 24.8, 18.9, 8.3, 7.2, 4.8, 2.5, 0.3, 0.1 y 0.1 %

respectivamente [12, 13], además se han reportado la presencia de otros carbohidratos menos abundantes (Figura 3; Anexo 2) [14].

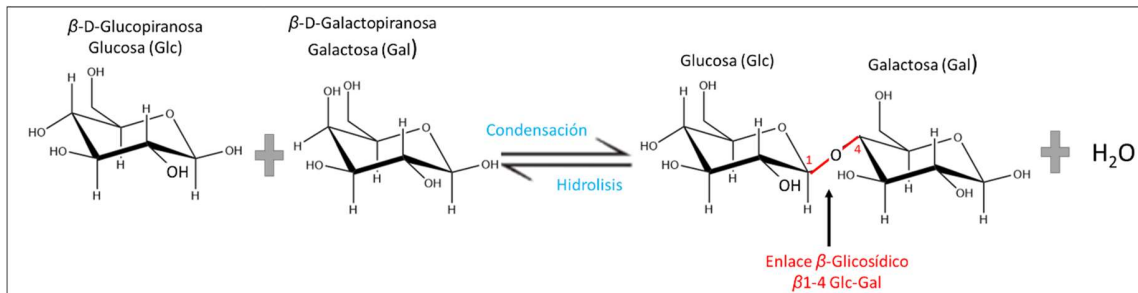


**Figura 3. Estructuras de carbohidratos que conforman las glicosilaciones en mamíferos.** El repertorio de glicosilaciones en mamíferos está compuesto por repeticiones y/o combinaciones de diez carbohidratos principalmente. Las estructuras glicosídicas pueden presentar tanto las conformaciones anoméricas  $\alpha$  ó  $\beta$ , lo que aumenta la variabilidad estructural. El SiA es una nanosa y existe con múltiples patrones de sustitución y la expresión de una estructura específica de SiA es dependiente de múltiples factores.

Durante la síntesis de los glicanos, los carbohidratos son transportados al interior de la célula por los nucleótidos UDP (que acarrea Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, GlcA, Xyl), GDP (que acarrea Man, Fuc) o CMP (que acarrea SiA). Los carbohidratos son donados a las GT para dar paso a la formación del enlace glicosídico del tipo  $\alpha$ - o  $\beta$ -glicosídico entre el extremo reductor del hemiacetal y uno de los grupos hidroxilo del segundo carbohidrato (Figura 4). Con este mismo mecanismo, se favorece la elongación y ramificación del polisacárido dando paso a cadenas con estructuras mono-, bi- y tri-antenarias.

Las glicosilaciones pueden ser clasificadas de diferentes maneras, de acuerdo a su estructura, a sus propiedades fisicoquímicas o de acuerdo al tipo de biomolécula glicosilada: Glicolípidos, Glyco-RNAs, Glicoproteínas o Proteoglicanos; las biomoléculas glicosiladas se denominan de forma general glicoconjugados. Los glicoconjugados son estructuras que participan en diferentes contextos celulares y su localización puede estar

asociada a compartimientos celulares tales como el núcleo, el espacio citosólico, la membrana o la matriz extracelular [3, 15, 16]. En este trabajo centraremos nuestra atención en las glicoproteínas y en los proteoglicanos, como modelos de estudio en la importancia y participación de las glicoproteínas durante los procesos biológicos de nuestro interés.



**Figura 4. Formación del enlace glicosídico.** Reacción en la formación de un enlace glicosídico a través de una condensación aldólica catalizada enzimáticamente. Se ejemplifica la formación de un enlace β1-4 Glc-Gal.

### 1.1.2 N- y O-glicanos

La glicosilación es la MPT más abundante en proteínas, su participación ha sido descrita en diferentes eventos biológicos como la transducción de señales [17, 18] y la comunicación [19, 20], el desarrollo neuronal [21], la respuesta inmune [22], entre otros. Se ha identificado que las glicosilaciones son un componente fundamental en el mantenimiento de la estructura de las proteínas y en algunos casos la porción glicosídica comprende una proporción importante de la estructura molecular de la biomolécula [23, 24]. En mamíferos, se han descrito cuatro tipos principales de glicosilación en proteínas: glicosilación del tipo N-, del tipo O-, manosilación y glipiación. Las del tipo N- y del tipo O- las más abundantes, las más ampliamente descritas y las que presentan mayor versatilidad funcional en procesos biológicos [25, 26].

La N-glicosilación se caracteriza por la formación de un enlace covalente entre la β-D-GlcNAc y la asparagina (Asn) en la secuencia consenso Asn-X-Serina (Ser)/treonina (Thr), este enlace es formado a través del extremo no reductor del GlcNAc y la amida en R de Asn. En la secuencia consenso, "X" puede ser cualquier aminoácido, pero, se ha observado que la eficiencia en la síntesis de los N-glicanos es nula si X= Prolina, baja si

X= Acido aspártico o Glutámico y bastante eficiente si X = Fenilalanina [27]. No obstante, la presencia de un *N*-glicano siempre requiere evidencia experimental, pues Asn-X-Ser/Thr solo determina un sitio potencial *N*-glicosilable [28, 29].

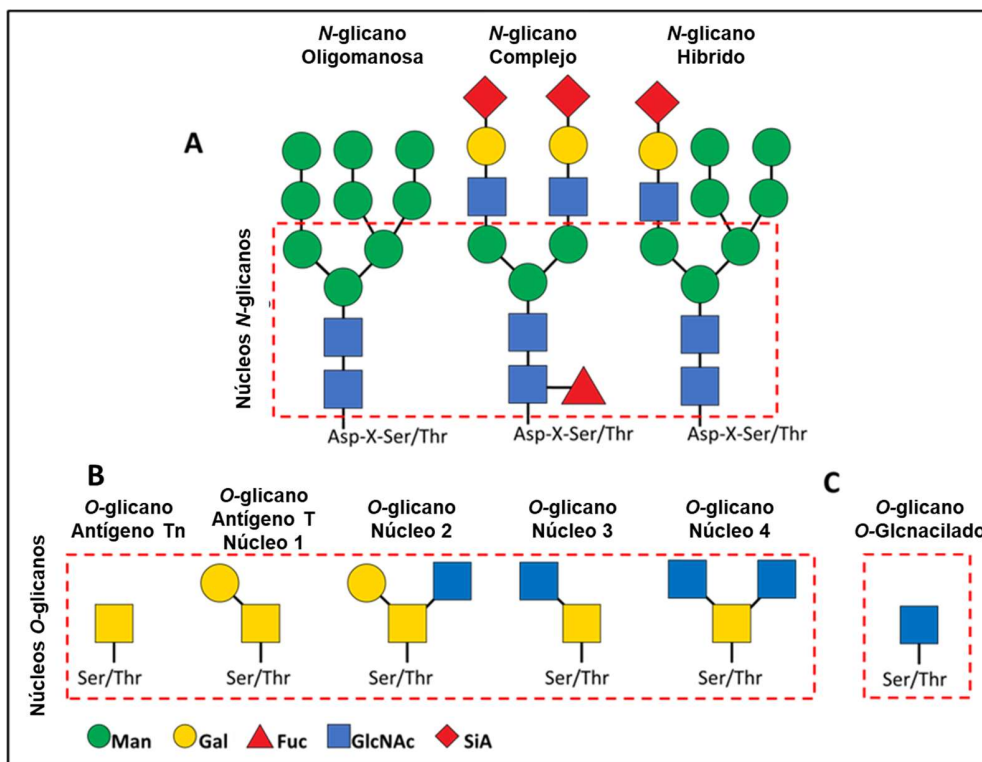
Los *N*-glicanos se sintetizan en cuatro etapas: i) la secuencia GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> es previamente sintetizada sobre una molécula de Dolicol-fosfato en el retículo endoplásmico; ii) una oligo transferasa transfiere el oligosacárido del Dolicol-fosfato hacia la proteína blanco y forma el enlace glicopeptídico; iii) la proteína glicosilada pasa a través del aparato de Golgi, donde la cadena de oligosacáridos es modificada (elongación y maduración del glicano); finalmente, iv) la glicoproteína ya sintetizada es secretada hacia su localización celular o extracelular [30]. Todos los *N*-glicanos tienen en común un núcleo compuesto de Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn-X-Ser/Thr, este núcleo glicosídico posteriormente es elongado dando forma a *N*-glicanos de tipo oligomanosa, *N*-glicanos híbridos o *N*-glicanos complejos (Figura 5).

Otro tipo de glicosilación abundante en proteínas es la *O*-glicosilación. La *O*-glicosilación está formada por la unión covalente entre la GalNAc y el hidroxilo en Ser o Thr, a diferencia de los *N*-glicanos, no existe una secuencia consenso que señale sitios potenciales de *O*-glicosilación. La síntesis de la *O*-glicosilación inicia en el *cis*-Golgi donde una de las *N*-acetil-galactosamina transferasa (ppGalNAcT-1 a 24) trasfiere el azúcar del nucleótido GalNAc-UDP a la proteína blanco, dando paso a la formación del antígeno Tn. Posteriormente, se adicionarán uno o dos carbohidratos más sobre el antígeno Tn, generando cuatro tipos de núcleos en la *O*-glicosilación (Figura 5). Los núcleos pueden ser elongados posteriormente en el Golgi mediante la adición de GalNAc, Gal, GlcNAc y Fuc en diferentes combinaciones. Finalmente, las cadenas glicosídicas pueden sujetas a la acción de Sialil-transferasas, acetiltransferasas o sulfotransferasas que flanquean o modifican la estructura glicosídica[31].

Algunas proteínas altamente *O*-glicosiladas, *O*-glicoproteínas del tipo mucina, se caracterizan por tener una alta densidad de cadenas de *O*-glicanos, representando en algunos casos entre el 50 y el 90% del peso total del glicoconjugado. En la mayoría de los casos, las mucinas adquieren una conformación lineal y se asemejan a una “escobilla”, donde la glicosilación se extiende perpendicularmente al eje de la proteína

central, esta conformación facilita la sulfatación de algunos carbohidratos (Gal, GalNAc y GlcNAc), lo que contribuye a las propiedades fisicoquímicas de los O-glicanos de tipo mucina [32].

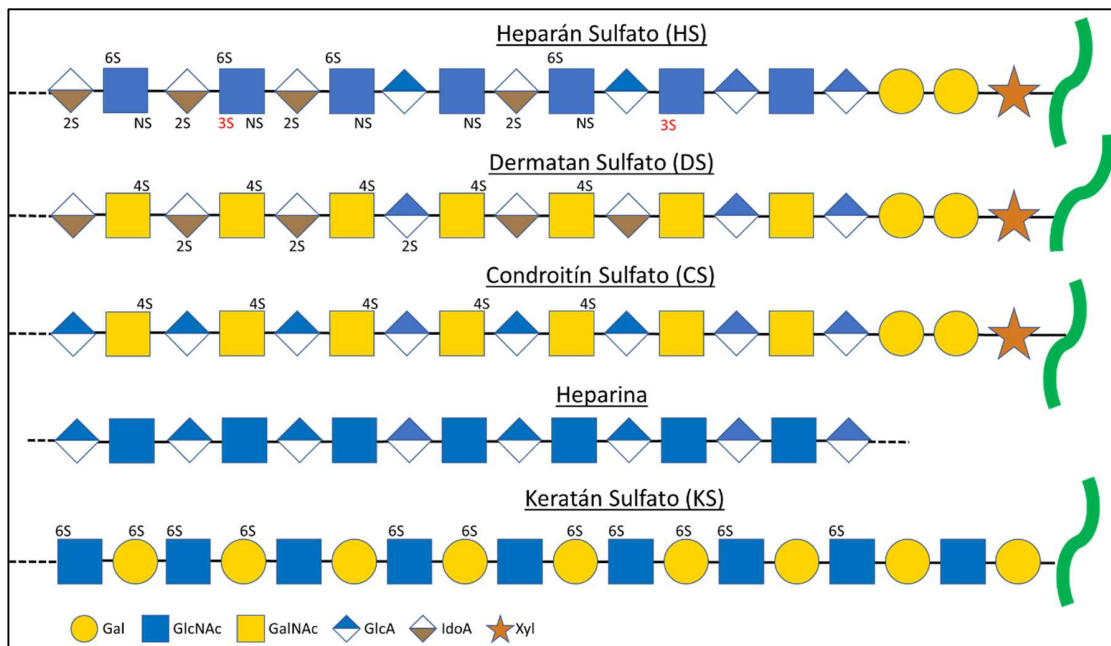
La O-GlcNacilación (O-GlcNAc), es otro tipo de O-glicosilación que se caracteriza por la adición de un solo monómero de GlcNAc sobre la proteína y se expresa dentro del núcleo, la mitocondria o en el espacio citosólico. La O-GlcNAc carece de modificaciones estructurales por la adición de otros monosacáridos o grupos químicos como sulfatos [33]. Se ha descrito que la O-GlcNAc puede ser adicionada o removida sobre la proteína como un mecanismo de regulación de la activación o desactivación de las funciones de la proteína; en algunos casos, el proceso de regulación mediado por la O-GlcNAc está relacionado con la fosforilación, donde hay una sinergia dinámica entre ambas MPTs para regular la actividad biológica (Anexo 3) [34, 35].



**Figura 5. Estructura de los N- y de los O-glicanos. (A)** Clasificación de las N-glicosilaciones presentes en mamíferos; **(B)** Representaciones esquemáticas de los tipos de núcleos en la formación de los O-glicanos tipo mucina; **(C)** O-glicano del tipo O-GlcNAc. **(A-B)** representan estructuras base o núcleos que pueden ser elongadas por la adición de otros carbohidratos o grupos químicos.

### 1.1.3 Proteoglicanos

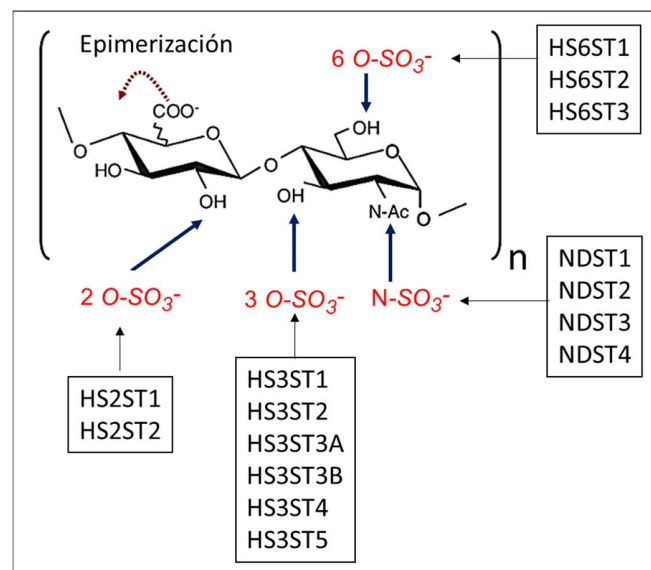
Los proteoglicanos consisten en una o más cadenas lineales de glicosaminoglicanos (GAGs) unidos de manera covalente a una proteína central, suelen ser estructuras robustas y con una alta densidad de cargas eléctricas. La función y distribución de los proteoglicanos se ha descrito en diferentes contextos biológicos y su expresión se han relacionado con diferentes patologías (Anexo 4). Los GAGs estas formados por repeticiones disacarídicas compuestas por GlcNAc o GalNAc y de un ácido urónico (GlcA o IdoA) o Gal a lo largo de su estructura y su composición son tejido específico. Los GAGs se clasifican como dermatán sulfato (DS), keratán sulfato (KS), condroitín sulfato (CS), heparán sulfato (HS) y heparina, siendo este último el único GAG soluble no asociado a una proteína central (Figura 6) [36]. Los GAGs has sido descritos en la membrana y en la matriz extracelular, donde participan en procesos como adhesión y comunicación celular, además sirven como barrera protectora y como andamiaje molecular en el manteniendo la homeostasis tisular [37, 38].



**Figura 6. Composición glicosídica de los glicosaminoglicanos.** El heparán sulfato (HS), el sulfato de condroitina (CS) y el sulfato de dermatán (DS) tienen un tallo común (GlcA-Gal-Gal Xyl). La sulfatación en posición 3 de los HS (3S) es poco frecuente. Los patrones de sulfatación son diferentes para cada GAG y normalmente suelen ocurrir en bloques a lo largo de la cadena. La heparina no se une covalentemente a un núcleo proteico.

Se ha descrito la participación de los HS en el desarrollo de algunas enfermedades como cáncer y enfermedades neurodegenerativas [39]. Los HS están formados sobre un núcleo proteico de sindecanos y glicicanos en la membrana celular y por un núcleo proteico de agrina, perlecanos o colágeno tipo XVIII en su forma secretada [40]. Tanto en los HS secretados como los HS membranales, la formación del enlace glicosídico se da en la secuencia consenso X-X-Ser-Gly-X-X. Los HS están formados por [GlcNAc-GlcA/IdoA]<sub>20-150</sub> y se caracterizan por tener una alta heterogeneidad estructural debido al grado de epimerización entre  $\beta$ -D-GlcA/L-IdoA, a las modificaciones sobre el GlcNAc (GlcNAc, GlcNS, GlcN) y a los patrones de sulfatación en C3 y C6 de la glucosamina, así como en el C2 del ácido urónico. Se ha sugerido que la complejidad estructural de los HS esta influenciada por el tipo de tejido donde se sintetizan los HS, por el microambiente o proceso biológico o por daños patológicos o enfermedad [41, 40].

La sulfatación en los HS catalizada por una familia de enzimas denominadas heparán sulfato sulfotransferasas (HSST), que se subclasifican de acuerdo con la posición sobre la cual adicionan el grupo sulfato (Figura 7, Tabla 1).



**Figura 7. Sulfatación del HS.** Las HSST modifican la estructura de los HS mediante la adición de grupos sulfatos en diferentes posiciones y de manera no secuencial a lo largo de la cadena glicánica. Las NDST son una subclase de HSST bifuncionales que presentan una actividad *N*-desacetilasa y *N*-sulfotransferasa, convirtiendo un residuo de glucosamina *N*-acetilada en un residuo de *N*-sulfoglucosamina.



La sulfatación en C3 de la GlcNA es una rara sulfatación llevada a cabo por HS3STs y los niveles de la sulfatación en esta posición varía según la fuente de HS y la disponibilidad de la enzima. En las células endoteliales de rata, el 1% de los carbohidratos que conforman los HS están 3 O-sulfatados y este porcentaje incrementa hasta 5-10% en la membrana basal [42-45]. En un contexto neuropatológico, se ha evidenciado que la expresión del HS-3S está incrementada en la enfermedad de Alzheimer, pero su participación en el desarrollo de la enfermedad aún no está clara [46, 47].

**Tabla 1. Características de las Heparán sulfotransferasas.**

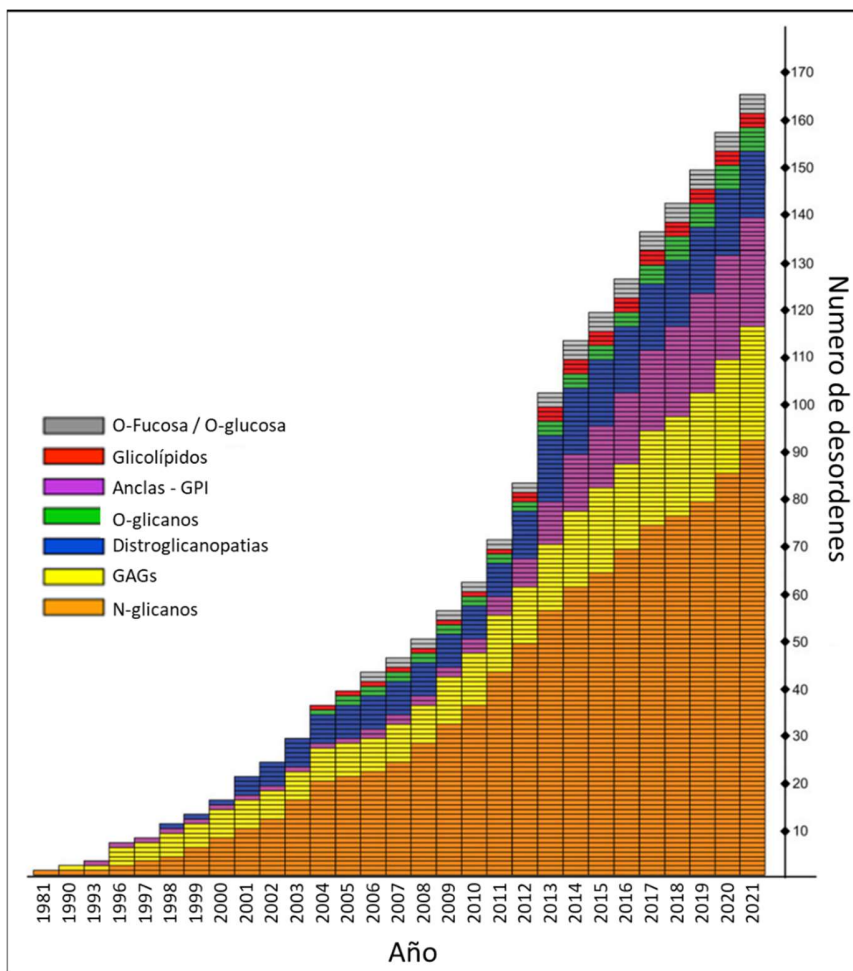
Enzimas	Subtipos	Posición de sulfatación	Observación
HS2ST	-1, -2	Sulfatación sobre C2 de GlcA/IdoA	Inhibe la epimerización del carbohidrato
HS3ST	-1, -2, -3A1, -3B1, -4 y -5	Sulfatación sobre C3 de GlcN	Rara sulfatación, su abundancia incrementa en procesos fisiopatológicos
HS6ST	-1, -2 y -3	Sulfatación sobre C6 de GlcN	
NDST	-1, -2, -3 y -4	Sulfatación sobre el grupo amino de GlcN	Acoplamiento enzimático de bifuncional que rara vez actúan de manera autónoma, lo que explica la presencia de pequeñas cantidades de residuos de GlcNA no sustituidos

#### 1.1.4 Las glicosilaciones en la salud y en la enfermedad

El avance de la investigación biomédica ha permitido la comprensión de la participación de las glicosilaciones en las funciones biológicas de las biomoléculas, en la homeostasis celular y en el mantenimiento de los sistemas biológicos, además ha permitido conocer su rol en el desarrollo de algunas enfermedades y patologías (Figura 8).

En la respuesta inmune, la participación de la glicosilación se ha descrito en contextos como: i) Procesos infecciosos, donde las interacciones entre patógenos y huéspedes involucran el reconocimiento de los glicanos [48]. Como en el SARS-CoV-2, donde la *N*-glicoproteína spike (S) se une al receptor de superficie ACE2 de la célula diana a través de su porción glicosídica [49, 50]. ii) Estabilidad estructural, por ejemplo, en moléculas como anticuerpos, donde las porciones glicosídicas asociadas a su región cristalizable mantienen la estructura de la inmunoglobulina [51, 52]. iii) Interacción entre receptores

glicosídicos y ligandos tipo lectina, como en el caso de las selectinas, implicadas en el tráfico de células del sistema inmunitario [53]. Finalmente, iv) Procesos de señalización celular, donde los glicanos participan como un componente de las vías señalizadoras. Por ejemplo, se ha observado que Zap-70 y LCK, dos moléculas de la cascada de activación de los linfocitos, son O-GlcNAcizadas durante la estimulación de las células [16].



**Figura 8. Progreso en el descubrimiento de los trastornos de la glicosilación.** Numero acumulado de trastornos relacionados con la glicosilación y el año de su descripción. En los primeros años, el descubrimiento inicial se basó en pruebas bioquímicas convincentes y en años posteriores, pruebas genéticas concluyentes. Tomado y modificado de Ajit Varki, 2022 [54]

Otra de las áreas que ha permitido elucidar las funciones de las glicosilaciones es la neurociencia. Estudios de análisis glicomicos han establecido que aproximadamente el 70% de las proteínas en cerebro están glicosiladas, cuya dinámica de expresión se modula durante el desarrollo del cerebro en neonatos [55-57]. Estudios en modelos

animales revelaron que los glicoproteínas interactúan con las proteínas organizadoras de sinapsis neuronal [58]. También, se ha logrado determinar que en la sinapsis neuronal algunas moléculas como NCAM2, Cadherina y L1CAM son altamente glicosiladas y su porción glicosídica juega un rol fundamental en la traducción de la señales [59]. Por otra parte, se ha observado que en algunas enfermedades neurodegenerativas hay una desregulación de la glicosilación [60-62]. Por ejemplo, en muestras obtenidas postmortem de pacientes Alzheimer se ha encontrado una disminución sustancial de la glicosilación en la proteína tau al tiempo que incrementan los niveles de fosforilación sobre la proteína, sugiriendo que los cambios en la glicosilación de tau podrían estar influyendo en los niveles de fosforilación de tau.

Con el fin de aportar nuevas evidencias de la participación de la glicosilación, investigamos la importancia de la glicosilación en dos contextos biológicos: uno inmunológico y otro neuronal. En el contexto inmunológico, exploramos la existencia y el rol de una O-glicoproteína en procesos de coactivación celular. En el contexto neuronal, nosotros evaluamos el papel de las HS3STs en la agregación de la proteína tau y los mecanismos de internalización de los HS-3S utilizando un modelo celular de taupatías.

## 1.2 Aspectos glicobiológicos en el desarrollo y función de los linfocitos T

Los linfocitos son los principales grupos celulares que participan de la respuesta inmune adaptativa, se caracterizan por responder de manera específica contra diferentes agentes patógenos y por proveer protección frente a una reinfección. Se calcula que hay alrededor de  $10^{12}$  linfocitos en la sangre, en la linfa, en los espacios tisulares y en órganos linfoides, y se subclasifican en tres principales poblaciones de acuerdo a su fenotipo y función: linfocitos B (células B), linfocitos NK y linfocitos T (células T; Anexo 5). Los linfocitos T comprenden el 80% del total de los linfocitos en circulación y fenotípicamente se caracterizan por la expresión del receptor del linfocito T (TCR) en la membrana celular. El TCR reconoce antígenos peptídicos unidos el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresado en las células presentadoras de antígeno (APC) [63].

Los linfocitos T llevan a cabo su maduración por aproximadamente 3 semanas en el timo. El timo es un órgano bilobulado que involuciona con la edad; su estructura está compuesta por una corteza externa y por una medula interna, donde se ubican respectivamente los linfocitos T inmaduros y los linfocitos T maduros listos para su egreso a circulación [64]. Durante su maduración en el timo, los linfocitos T modifican drásticamente la expresión de moléculas en la membrana celular y empiezan a expresar moléculas como TCR y CD3, las cuales están implicadas en los procesos de señalización y activación celular. Durante la maduración, las células T se diferencian fenotípicamente en dos subpoblaciones celulares, linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>) o linfocitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>); cada una de estas subpoblaciones poseen un mecanismo de respuesta efectora de acuerdo al contexto o proceso inmunológicos. En mamíferos, durante la maduración de los linfocitos T, alrededor del 98% de las células que ingresaron al timo son eliminadas y solo el 2% egresan como células T maduras en una relación 2:1 entre las células T CD4<sup>+</sup> : CD8<sup>+</sup>. Muchas de las moléculas involucradas durante la maduración de los linfocitos T son glicoproteínas, las cuales juegan un rol importante en los diferentes procesos biológicos. Por ejemplo, se ha demostrado que la glicosilación del TCR mejora la avidéz con su ligando, sugiriendo que este puede ser un factor clave durante la selección de células T inmunocompetentes con la capacidad de unirse a MHC y discriminando antígenos propios [65].

### 1.2.1 La activación del linfocito T

La activación de las células T inicia con la interacción entre la célula T y la APC, este primer contacto induce la reorganización y formación de la sinapsis inmunológica en la superficie celular. La sinapsis inmunológica comprende la interacción entre ligandos y receptores con funciones de adhesión y señalización que conduce a la regulación de la activación y al desarrollo de las funciones efectoras de las células T [66].

La activación de la célula T esta inducida principalmente por tres señales estimuladoras [67]. La primera es la señal estimuladora, proporcionada por la interacción entre el complejo TCR/CD3 y el MHC, el cual está cargado con el péptido antigénico (pMHC; MHC

II para las células CD4<sup>+</sup> o por el MHC I para las células CD8<sup>+</sup>). La segunda es la señal coestimuladora, proporcionada por los receptores CD80/86 de la APC que se unen al correceptor CD28 en la membrana de la célula T. La tercera señal está dada la síntesis y secreción de citocinas como IL-2, una citocina autocrina que interactúa con CD25 y favorece la activación, la proliferación celular y el desarrollo de las funciones efectoras de la célula T [67].

La señal coestimuladora a través de CD28 es fundamental en la activación celular, pues exagera la señalización intracelular, promueve la expresión de moléculas de activación como CD69 y CD25 e induce la síntesis de citocinas que mantienen la supervivencia, expansión y desarrollo de las funciones efectoras celulares [68]. La ausencia de la segunda señal induce la apoptosis o un estado de anergia donde la célula ya no podrá activarse, incluso en presencia de todas las señales [69]. Se han descrito otras moléculas en las células T como CD2, LFA-1; pero ninguna de las señales inducidas a través de ellas ha resultado con la intensidad suficiente para activar, propagar y mantener la activación de la célula T de manera similar a CD28 [70]. Teniendo en cuenta la importancia que tiene la señal coestimuladora en la respuesta inmune, se desconoce si existen otras moléculas que induzcan una señal coestimuladora similar a la señalización clásica mediada por CD28, incluso, no está del todo claro como pacientes con deficiencia de CD28 suplen la señalización coestimuladora que induce la activación de las células T [71].

Uno de los objetivos de la activación celular es el desarrollo de las respuestas efectoras las cuales son diferenciales entre las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En las células T CD4<sup>+</sup>, la respuesta efectora se polariza y expresa un perfil específico de citocinas según el tipo de microorganismo, agente infeccioso o daño potencialmente dañino presente en el evento inmunológico (tabla 2). La polarización en las células CD4<sup>+</sup> se divide en tres etapas: la transcripción de genes específicos para citocinas específicas de la respuesta, el compromiso de la vía de polarización específica y la amplificación de la señal que inhibe a su vez la síntesis de otras citocinas [72].

**Tabla 2. Tipos de polarización de los linfocitos T.**

Tipo de polarización	Citocinas inductoras de la polarización	Citocinas efectoras	Polarización en respuesta a
Th1	IL-2, IL-12	IFN- $\gamma$	Eliminación de bacterias y virus intracelulares, inmunidad antitumoral; autoinmunidad órgano-específico; activación y reclutamiento de monocitos.
Th2	IL-2, IL-4	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL13	Eliminación de parásitos helmínticos y en enfermedades alérgicas
Th17	IL-2, IL-23, IL-6, TGF- $\beta$	IL-17A, IL-17F, IL-22	Eliminación de bacterias extracelulares; autoinmunidad órgano-específico; movilización y quimiotaxia de neutrófilos.
Th9	IL-2, TGF- $\beta$ , IL4	IL-9	Eliminación de parásitos; asma; proliferación y activación de mastocitos
Th22	IL-2, IL-6, TNF	IL-22	Inducción de respuestas inmunes epidérmicas; remodelación de tejidos
T <sub>reg</sub>	TGF- $\beta$	TGF- $\beta$ , IL-10	Regulación de la respuesta inmune proinflamatoria
Tfh	IL-6, IL-21	IL-21	Cooperación con las células B, en los de centros germinales.

Contrastando, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> desarrollan sus funciones efectoras a partir del reconocimiento de células infectadas, cancerígenas o tumorales. El mecanismo efector de las células CD8<sup>+</sup> está mediado por la producción y secreción de gránulos citoplasmáticos que transportan perforinas y granzima, las cuales perforan la membrana de la célula blanco para facilitar su eliminación [73]. De manera comparativa se ha sugerido que, el desarrollo de la respuesta efectora citotóxica del linfocito T CD8<sup>+</sup> es mucho más rápida en comparación con los mecanismos efectores de las células T CD4<sup>+</sup>, pues la polarización del linfocito T CD4<sup>+</sup> es un proceso que se desarrolla en múltiples etapas [74, 75]. La glicosilación juega un rol importante durante la activación de la célula T y el desarrollo de las funciones efectoras. Se ha demostrado que la glicosilación es una parte fundamental en las funciones de las moléculas que participan de la activación celular. Por ejemplo, CD28 es una *N*-glicoproteína, con abundantes porciones glicosídicas a lo largo de su estructura, esto favorece la elongación y estabilidad estructural de CD28 y media la afinidad con su ligando CD80/86. Durante este trabajo publicamos un artículo de revisión titulado ***“Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell”***, donde se describe la participación de la glicosilación en las moléculas que inducen la activación celular (ver capítulo artículos publicados) [76].

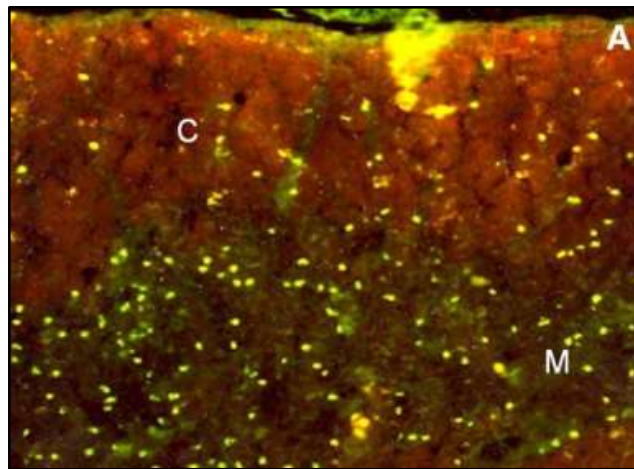
### 1.2.2 Las lectinas como moléculas estimuladoras

Las glicoproteínas interactúan con ligandos tipo lectinas como galectinas o siglecs que reconocen secuencias glicosídicas durante los procesos biológicos. Las lectinas son proteínas que se unen a porciones glicosídicas y presentan una afinidad por los carbohidratos de manera específica y reversible [77, 78]. Las lectinas reconocen mono u oligosacáridos específicos que se encuentran solubles o en glicoconjugados, interesantemente, se ha observado que algunas interacciones lectina-glicoproteína son estabilizadas por los aminoácidos presentes en la estructura de la glicoproteína. Como en el caso de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), específica O-glicanos del tipo Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O- $\alpha$ -Ser/Thr o antígeno T, donde se ha observado que las glicoproteínas reconocidas por ALL (gpALL) estabilizan su interacción con la lectina a través de los aminoácidos adyacentes al enlace glicopeptídico [79-82].

Las lectinas extraídas a partir de animales y plantas han sido usadas como herramientas biotecnológicas en el estudio de glicoproteínas, estas moléculas son usadas diversas técnicas como Lectin Blot, ELISA, microarreglos o como herramienta en la glicofenotipificación celular por citometría de flujo [83]. Por ejemplo, la lectina aglutinante obtenida de cacahuete (PNA), que reconoce O-glicosilaciones del tipo Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc, es usada para identificar subpoblaciones celulares como CD8 naïve [84, 85]. *In vitro*, las lectinas han sido clásicamente usadas como moléculas miogénicas en ensayos de activación celular [86, 87]. Por ejemplo, Linfocitos T murinos cultivados *in vitro* en presencia de anti-CD3 y coestimulados con ALL, tienen la capacidad de proliferar y expresar marcadores propios de la activación, pero aún se desconoce la identidad de la gpALL que induce la activación. Lo anterior demuestra como las lectinas son herramientas moleculares que permiten el estudio de la activación inmunológica de las células T.

### 1.2.3 ALL reconoce O-glicanos que participan en la activación celular

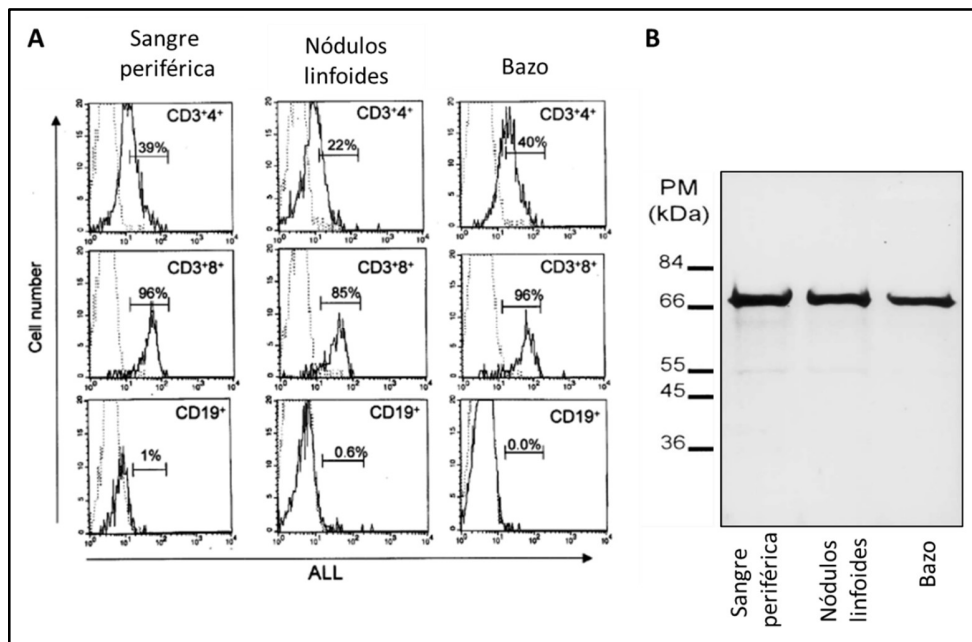
En el estudio de las funciones y estructura de las glicosilaciones se ha demostrado la utilidad de lectinas como herramienta que reconoce de manera específica secuencias sacarídicas [88]. Trabajos previos reportaron que, ALL reconoce células T maduras localizados en la médula y en la unión cortico-medular del timo, pero no en la corteza; estos resultados sugirieron que los O-glicanos reconocidos por ALL se expresan de manera dinámica durante el proceso de maduración de las célula T (Figura 9) [89].



**Figura 9. ALL reconoce timocitos presentes en la médula y en la región cortico medular del timo.** Cortes histológicos tímicos murinos fueron marcados con ALL-FITC (verde) y con PNA-Streptavidin Cy3 (rojo), luego fueron analizados por microscopía de fluorescencia. ALL presenta especificidad por SiAGal $\beta$ (1,3)GalNAc $\alpha$ 1,O-Ser/Thr y PNA presenta especificidad por Gal $\beta$ (1-3)GalNAc  $\alpha$ 1,O-Ser/Thr. Se observa que PNA se une a células de la corteza tímica (C) y ocasionalmente a algunas células presentes en la médula (M); contrariamente, ALL reconoce células en la médula. Tomado y modificado de *Álvarez et al.*, 2006 [89].

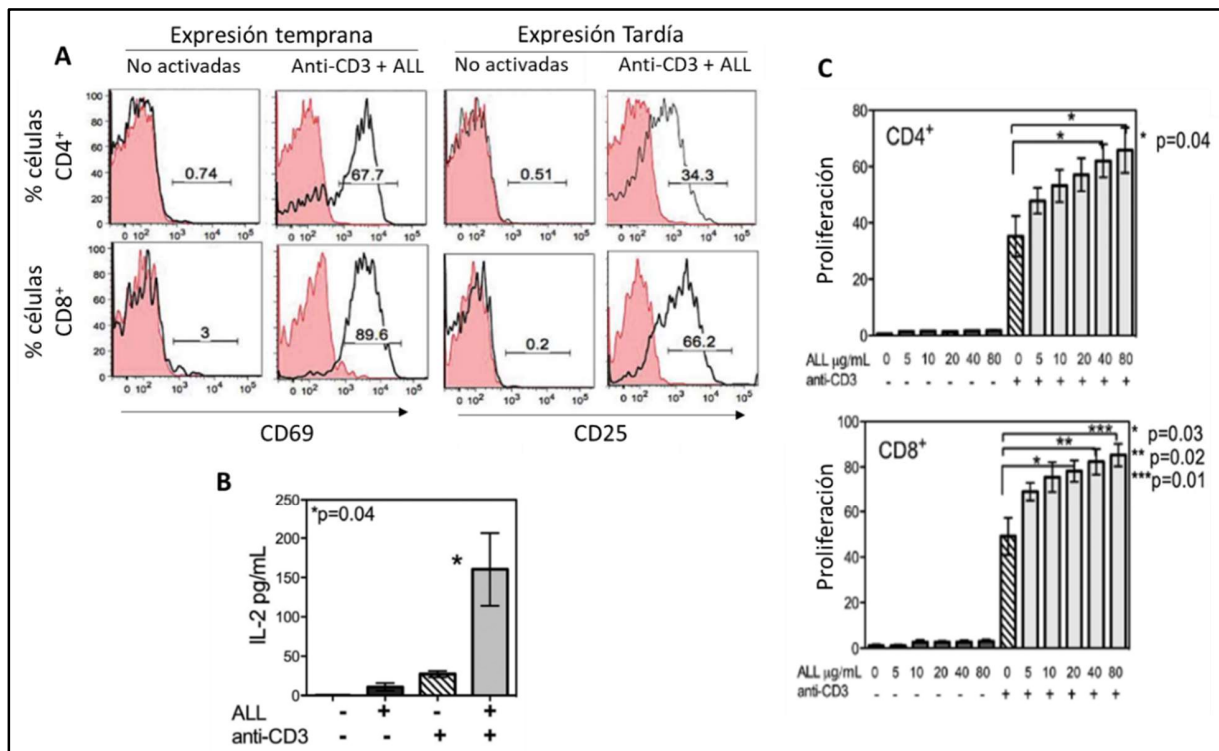
ALL reconoce de manera diferencial subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> obtenidas de diferentes órganos como timo, nódulos linfoides y bazo y se evidencio como ALL reconoce diferentes O-glicoproteínas obtenidas de extractos proteicos de linfocitos T totales, pero muestra una mayor afinidad por una proteína de 70-kDa. Se desconoce si la proteína de 70-kDa reconocida por ALL se expresa similarmente en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y si sus niveles de expresión cambian en respuesta a procesos celulares como la activación celular (Figura 10) [90].





**Figura 10.** ALL reconoce una O-glicoproteína de 70-kDa expresada en linfocitos T de sangre periférica, nódulos y bazo. **(A)** Células T recién extraídas de diferentes órganos fueron comarcadas con ALL-FITC y con anti-CD3, -CD4, -CD8 o con -CD19 y analizadas por citometría de flujo; **(B)** células frescas obtenidas de diferentes órganos fueron marcadas con ALL y posteriormente las células fueron lisadas, luego el lisado celular fue eluido a través de una columna cromatográfica para la recuperación gpALL. Tomado y modificado de Ortiz, 2002 [90].

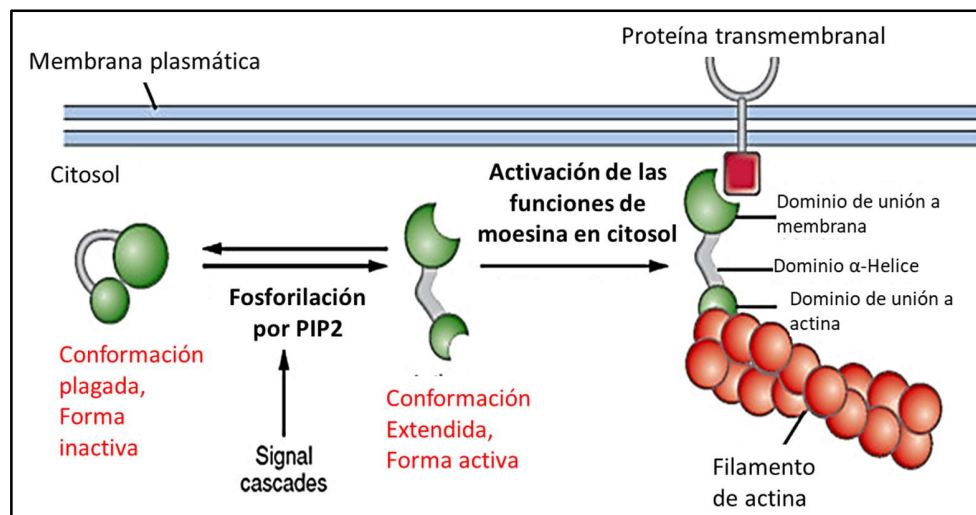
Estudios previos mostraron que la estimulación de linfocitos T *in vitro* con ALL, en presencia de anti-CD3, induce la expresión de marcadores de activación como CD69, CD25, así como la proliferación celular y la expresión de IL-2 (Figura 11) [91]. Estos resultados sugirieron la existencia de una gpALL con función coestimuladora semejante a CD28. También, Arenas *et al.* demostró en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la existencia de una gpALL de 70-kDa asociada a balsas lipídicas y cuyo análisis por espectrometría de masas permitió identificar una homología del 40% con moesina, pero se desconoce aún si esta homología es similar en linfocitos T CD8<sup>+</sup> [92].



**Figura 11.** ALL coestimula células T en presencia de anti-CD3. Esplenocitos obtenidos de nódulos linfoides fueron cultivados y estimulados como se indica en cada figura; **(A)** células no estimuladas o estimuladas con anti-CD3 + ALL, fueron marcada con anti-CD4, -CD8, -CD69, -CD25 para evaluar la expresión de los marcadores de activación CD69 (activación temprana) y CD25 (activación tardía); **(B)** detección de IL-2 en sobrenadante de células T cultivadas o no en presencia de ALL; **(C)** evaluación de la proliferación celular en respuesta a diferentes concentración de ALL como molécula coestimuladora. Tomado y modificado de Urrea, 2011 [91]

La moesina ha sido descrita como una proteína no glicosilada de 68.7-kDa, que forma parte de la familia de proteínas ERM (Familia Ezrina, Radixina, Moesina; FERM), expresada en células endoteliales, plaquetas y linfocitos T [93]. Las funciones de moesina han sido relacionadas con procesos de polimerización de actina y su actividad está modulada por la fosforilación sobre Thr<sup>558</sup> que regula el equilibrio dinámico entre su forma activa (forma abierta) y su forma inactiva (forma plegada) (Figura 12) [94]. Se ha demostrado que los ratones *Moe<sup>-/-</sup>* presentan una desregulación de los procesos de maduración de los timocitos y el número linfocitos T en circulación se ven disminuidos en comparación con ratones WT [95]. También se ha demostrado que la supresión de moesina por siRNA en linfocitos T afecta la producción y secreción de IL-2 [96]. Se ha propuesto que esta proteína tiene una posible contribución a señalización de las células

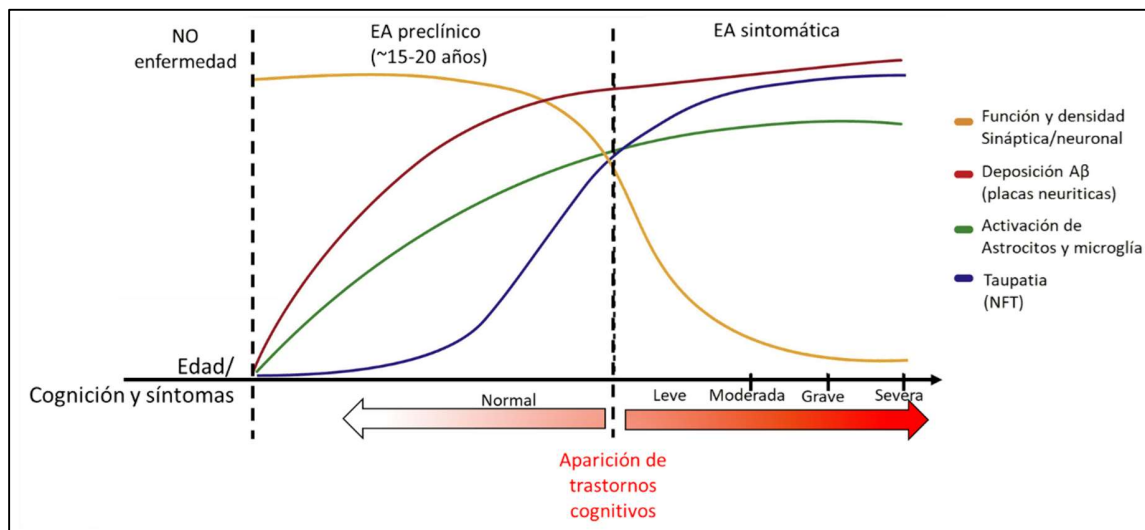
T [97], sin embargo, los mecanismos que regulan la participación de la moesina en la homeostasis, activación o desarrollo de las funciones efectoras de las células T aun no son claros, como tampoco han sido descritas glicofomas de moesina expresadas en la membrana de la célula T, pues su localización ha sido asociada clásicamente al citosol.



**Figura 12. Regulación dinámica de la actividad de moesina en el citosol.** Cuando moesina están en su forma inactiva plegada, las proteínas no pueden asociarse con los filamentos de actina ni con las proteínas transmembranales, sin embargo, tras la fosforilación mediada por PIP2 sobre Thr<sup>558</sup> adquiere una forma conformacional extendida y permite la unión a proteínas transmembranales y filamentos de actina. Tomado y modificado de *Gennerly, 2020*, [98].

### 1.3 Participación de la glicosilación en el desarrollo de neuropatías, la enfermedad de Alzheimer como caso de estudio

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad que genera un trastorno cerebral irreversible asociado con la pérdida de las funciones cerebrales y de la memoria. La EA se define como una enfermedad neurodegenerativa lentamente progresiva y sus principales características fisiopatológicas son la formación de placas amiloides, la agregación e hiperfosforilación de tau y por la acumulación intracelular de HS (Figura 13), las cuales aparecen y van madurando de manera dinámica con conforme avanza la enfermedad [99].



**Figura 13. Cronología de los eventos fisiopatológicos de la EA en relación con el curso clínico.** La fisiopatología de la EA empieza en una fase preclínica caracterizada por el inicio en el depósito de amiloide, por cambios neuro inflamatorios tempranos (como la activación de la microglía), por la disfunción sináptica y por la formación de ovillos neurofibrilar tau (NFTs). Luego hay una segunda etapa caracterizada por la aparición de los trastornos cognitivos, por la diseminación patológica de los agregados de tau, por la pérdida de sinapsis y por la neurodegeneración. La segunda etapa se puede clasificar mediante el uso de la escala Clinical Dementia Rating (CDR) que cataloga la cognición en cognición normal, leve, moderada, grave y severa. Tomada y modificada de Holtzman, 2019 [99].

En la actualidad, la EA es el tipo de demencia más recurrente y según la WHO, la EA fue la séptima causa de muerte más común en adultos mayores de 65, de los cuales el 65% de los decesos fueron mujeres [100]. En los últimos 20 años el número de casos se ha duplicado y se estima que 152 millones de personas serán diagnosticadas con la patología para el 2050 [101]. En la mayoría de los casos, la aparición de la EA ocurre después de los 65 años, lo que se conoce como Late-onset Alzheimer Disease (LOAD), donde los pacientes presentan dificultad para recordar hechos observados, disminución de la velocidad psicomotora y deterioro cognitivo, y suele confundirse con el proceso de envejecimiento normal [102]. Los casos en los que la EA inicia antes de los 65 años (Early-onset Alzheimer Disease, EOAD) constituyen menos del 5% y su desarrollo está íntimamente relacionado con factores genéticos de tipo familiar o factores genéticos esporádicos.

En EOAD del tipo familiar, la enfermedad se induce por heredabilidad autosómica dominante y se presenta a edades tempranas (~30 a 50 años) en aproximadamente el 30% de los casos. La tasa de evolución de la EA inducida por heredabilidad autosómica

dominante es bastante rápida y se correlaciona con la desregulación génica de la proteína precursora de amiloide (*APP*) o de la preselina 1 ó 2 (*PSEN1/2*), lo cual favorece la formación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) altamente toxico [103].

En el caso de EAOD de tipo esporádico, la enfermedad aparece alrededor de los 65 años. En este caso los pacientes experimentan pérdida de la memoria temprana, seguido de otros síntomas como deterioro progresivo en el aprendizaje y en la memoria, deterioros posteriores en la atención compleja, en la función ejecutiva, en el lenguaje, en la función espacial y en el comportamiento social, entre otros [103].

### 1.3.1 Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer

Desde finales de los años 80's se ha venido haciendo un esfuerzo por asociar y caracterizar los mecanismos moleculares que participan en desarrollo de la enfermedad. La EA es considerada una enfermedad multifactorial, donde diversos aspectos químicos, biológicos y físicos pueden predisponer o contribuir al desarrollo de la patología [104]. El factor de riesgo que más contribuye con enfermedad es la edad, pues se sabe que el deterioro cognitivo avanza conforme progresa la adultez en condiciones normales, aumentando hasta en un 19% el riesgo en personas entre 75 – 84 años y hasta en un 35-50% en personas mayores a 85 años [105, 106].

A nivel nutricional se ha observado que la ausencia de algunos minerales, nutrientes y fuentes de energía podrían llevar al desarrollo de ovillos neurofibrilares (NFTs) debido a deficiencia nutricional [107, 108]. Estudios han demostrado que la obesidad y diabetes pueden conducir a la muerte neuronal y a la formación de placas amiloideas, aumentando el riesgo en individuos que expresan el alelo *APOE4* y/o en personas de mediana edad diagnosticadas con diabetes [109-111]. También, se ha establecido que los individuos con mutaciones en los genes *APP* y *PSEN1/2* tienden a desarrollar síntomas de EOAD familiar a edades tempranas y estas mutaciones son consideradas como factores de riesgo causativos. Por ejemplo, Las mutaciones en *PSEN1/2* (cromosoma 14 y cromosoma 1 respectivamente) son mutaciones que inducen la escisión de *APP* y a su vez conlleva a la formación de una variedad de péptidos  $A\beta$  y al desarrollo de la

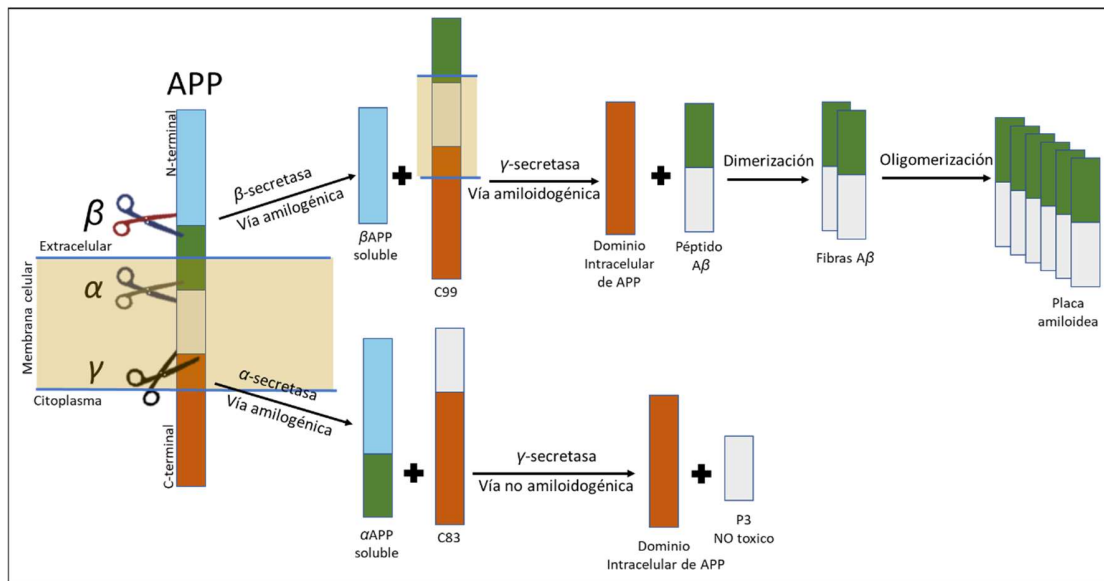
neurodegeneración [112-114]. Se han identificado otros genes como *Bin1* o *APOE* cuya expresión correlaciona con el avance de EA, sin embargo, aún no son claros sus mecanismos de participación ni su potencial uso como herramientas en el diagnóstico temprano de la enfermedad (Anexo 6) [115, 116].

### 1.3.2 Aspectos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno molecular, celular y biológico, y su diagnóstico fisiopatológico está dado clásicamente por la acumulación de  $A\beta$ , por la formación NFTs y por acumulación de HS al interior de las neuronas, esta última descrita como una lesión que precede a la formación y acumulación de p-tau [117, 118].

#### 1.3.2.1 Péptido $\beta$ -Amiloide y la formación de placas amiloideas

El péptido  $A\beta$  es el constituyente principal de las placas neuríticas amiloides o placas amiloideas y ha sido identificado como un componente relevante en la fisiopatología de la en EA [119].  $A\beta$  se produce mediante la escisión secuencial de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP) por acción de la  $\beta$ -secretasa y de la  $\gamma$ -secretasa en la vía amilogénica (Figura 14). En esta vía la enzima  $\beta$ -secretasa escinde APP en el extremo N terminal, liberando  $\beta$ APP soluble y el fragmento C99 unido a la membrana. Luego, el complejo  $\gamma$ -secretasa (conformado por las proteínas PRES1/2, por el potenciador de preselina, por la APH y por la nicastrina) se une al fragmento de APP (C99) liberando el fragmento C-terminal y  $A\beta$ . Después los péptidos  $A\beta$  se agregan espontáneamente y se depositan en oligómeros solubles, fibrillas y placas amiloideas, induciendo la lesión neuronal y posiblemente la agregación de tau, pues los mecanismos por los cuales  $A\beta$  induce la agregación de tau aún son debatibles [120, 121]. También existe una vía alternativa denominada vía no amiloidogénica, donde se previene la generación de  $A\beta$ .



**Figura 14. Procesamiento proteolítico de APP y biogénesis de Aβ.** La APP es una glicoproteína transmembrana con un gran dominio luminal y un dominio citoplasmático corto y se procesa a través de vías amiloídicas o no amiloídicas. La vía amiloídica es el proceso de biogénesis de Aβ: la β-secretasa escinde primero la APP, lo que produce fragmentos solubles de βAPP y un fragmento β C-terminal (C99), luego C99 es escindido aún más por la γ-secretasa, generando un dominio intracelular APP y Aβ que posteriormente comenzará la formación de fibrillas y placas amiloides. La vía no amiloídica es una forma innata de prevenir la generación de Aβ, ya que APP es reconocida primero por la α-secretasa dentro del dominio Aβ, generando fragmentos solubles de αAPP y fragmento C-terminal α (C83). A continuación, C83 es escindido por γ-secretasa, produciendo fragmentos no tóxicos P3 y un dominio intracelular APP.

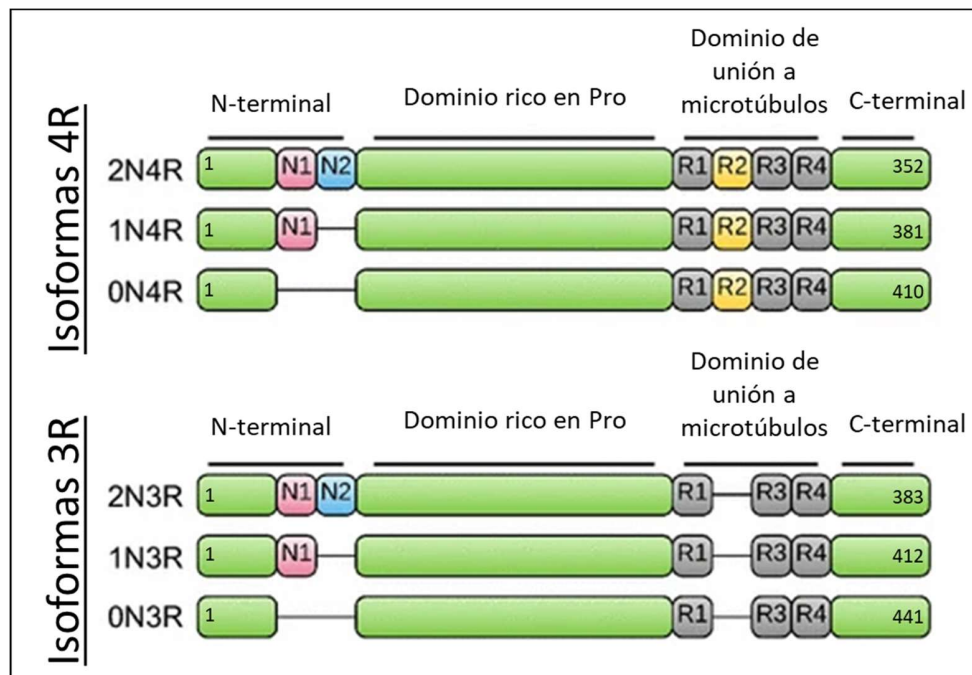
Aβ es un péptido de 39-43 aminoácidos, con diferentes conformaciones estructurales, donde predominan las isoformas Aβ<sub>40</sub>, altamente soluble y la forma insoluble Aβ<sub>42</sub>. Bajo condiciones fisiológicas, más del 90% de Aβ está en forma de Aβ<sub>40</sub> mientras que menos del 5% está como Aβ<sub>42</sub>, siendo esta última la isoforma más propensa a agregarse. Se ha encontrado que los pacientes con EA presentan un incremento en los niveles de Aβ<sub>42</sub>, lo cual, incrementa la proporción Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub> debido a la disminución de los niveles de la forma Aβ<sub>40</sub> soluble [122-124]. La formación de placas amiloides ha sido propuesto como el inductor central en el desarrollo de la enfermedad [125]; sin embargo, los mecanismos por los cuales las placas amiloides inducen el desarrollo de la fisiopatología y de las características clínicas de la enfermedad aun no son claras.

### 1.3.2.2 Fosforilación y agregación de tau

La proteína tau es codificada por el gen *MAPT* sobre el cromosoma 17 y su expresión está asociada casi de manera exclusiva en el cerebro [126]. Su estructura está compuesta por una región *N*-terminal, por un dominio rico en Pro, por un dominio de unión a microtúbulos y por una región *C*-terminal y su conformación desplegada es altamente hidrofílica. Durante la síntesis de tau, el empalme alternativo de sus axones (8 de 16) favorece la síntesis de 6 isoformas distintas (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R y 2N4R) que se expresan diferencialmente durante el desarrollo del cerebro, estas isoformas se diferencian principalmente en su región *N*-terminal y en el dominio de unión a microtúbulos (Figura 15) [127]. Se ha identificado que la proporción en los niveles de expresión de los diferentes isómeros de tau está relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades. Por ejemplo, un aumento en la proporción de los isómeros 4R:3R relaciona con demencia frontotemporal-17, caso contrario en la enfermedad de Pick, pero con relación a EA aún no está claro el patrón de la relación 4R:3R [128].

Las funciones de tau están relacionadas con el ensamblaje de microtúbulos y la estabilización de axones neuronales; sin embargo, los ratones jóvenes *knockout* para tau no tienen un fenotipo de desarrollo grave y su capacidad de aprendizaje espacial no se ve alterada, pero presentan problemas con la maduración neuronal en cultivo celular y la plasticidad sináptica se ve alterada [129-131]. Tau es una proteína con múltiples sitios potencialmente modificables por MPTs como la acetilación, la *O*-GlcNAcilación y la fosforilación (Anexo 7); estas MPTs pueden estar presentes tanto en condiciones fisiológicas como el desarrollo de taupatías [132].



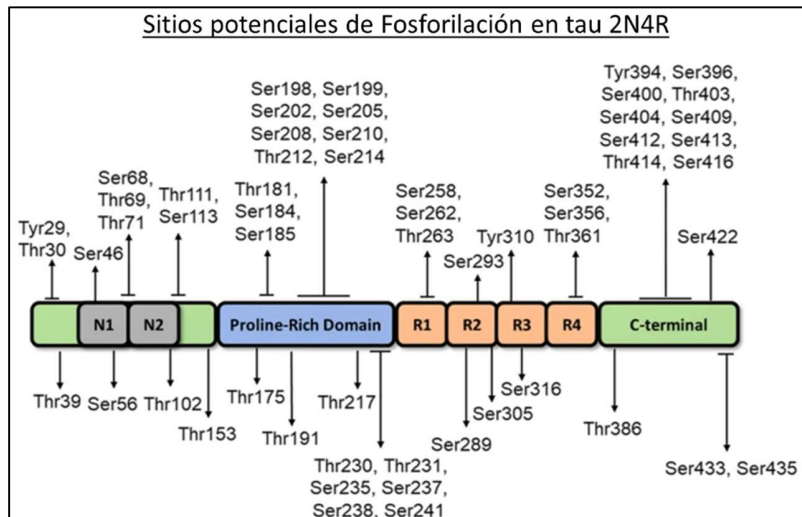


**Figura 15. Isoformas de tau en humanos producidas por splicing alternativo en el sistema nervioso central.** seis isoformas de tau, con pesos moleculares que van desde 48-67 kDa, son generadas a partir de splicing alternativo del gen *MAPT*. Las secuencias codificadas por los exones dos y tres en la región N-terminal de tau no están presentes en (0N), o están presentes solas (1N, exón dos) o en combinación (2N, exón dos y tres). La región central de tau comprende el dominio rico en prolina. El empalme alternativo del exón 10 en el dominio de unión a microtúbulos (MTBD) da como resultado isoformas de tau 3R o 4R.

La fosforilación anormal de tau es la causa más común en el desarrollo de taupatías, pues la hiper fosforilación disminuye su afinidad por los microtúbulos y promueve su agregación y fibrilación. Se ha observado que la O-Glcnaclación asociada a tau inhibe la hiperfosforilación y la agregación de la proteína (Figura 16) [133].

Tau es generalmente una proteína soluble que se despliega en forma nativa, pero, en las condiciones adecuadas y bajo desregulación de la fosforilación, se agregará secuencialmente en oligómeros, fibrillas y finalmente NFTs insolubles, estas conformaciones sobrecargan gradualmente las neuronas, afectando las funciones celulares fundamentales y causando la muerte neuronal. Se ha observado que durante las etapas tempranas de la enfermedad, se inician los procesos de oligomerización de tau; en este punto, las manifestaciones clínicas de la enfermedad aún no se hacen evidentes, pero conforme avanza la oligomerización se induce la formación de NFTs y la potencialización de la patología. Actualmente se considera que la comprensión de los

estadios tempranos de la enfermedad y sus mecanismos como la agregación de tau, es una oportunidad para desarrollar estrategias terapéuticas que detengan el avance de la EA y de las taupatías relacionadas.

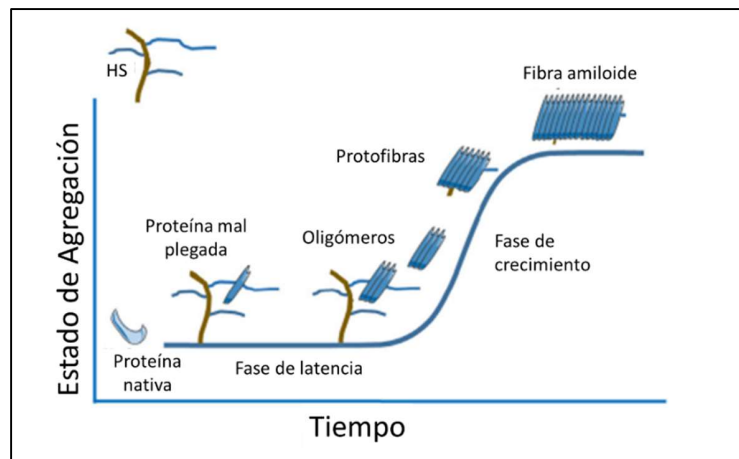


**Figura 16. Potenciales sitios de fosforilación de tau durante la hiperfosforilación y agregación de la proteína.** Esquema representativo de tau 2N4R donde se observan los potenciales sitios de fosforilación durante el desarrollo de la taupatía. Tomado de Yuxing Xia, 2021, [134]

### 1.3.2.3 Heparán sulfatos y su relación con lesiones neurodegenerativas

Como previamente se señaló, los HS clásicamente están asociados a la membrana y a la matriz extracelular, sin embargo, desde los años 90's se empezó a describir la acumulación de HS al interior de la neuronas como una nueva lesión en pacientes con diagnóstico postmortem de EA [135]. Estudios han mostrado que los HS contribuyen a la estabilidad estructural y al plegamiento patológico de proteínas en forma de placas. Por ejemplo, durante la formación de las placas amiloides, los HS participan como núcleos precursores que aceleran catalíticamente el proceso de formación de oligomerización y formación de las placas (Figura 17) [136-139]. La interacción de placas amiloides y los HS se demostró en ratones Tg2576 donde los HS colocalizan con depósitos de  $A\beta$  de las placas neuríticas [140]; además, ratones que sobreexpresan la heparanasa, presentaron una disminución significativa de placas amiloides  $A\beta$ , sin alterar la proporción de  $A\beta_{40}$  y

A $\beta$ 42 [141]. Análisis estructurales sugieren que A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 interactúan con los HS a través de residuos 12-18 (Ac-VHHQKLV-NH<sub>2</sub>), esta interacción se ve favorecida por los grupos sulfato de los HS y se ha observado que la desulfatación del HS suprime estas interacciones [142, 143].



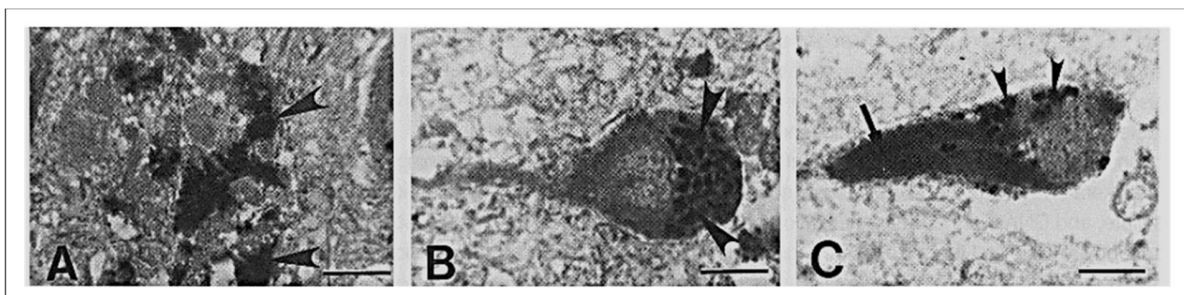
**Figura 17. Modelo de conversión conformacional de nucleación favorecido por los HS durante la cinética de formación de fibras amiloides.** Este modelo en dos fases supone la formación inicial de complejos oligoméricos esféricos que se convierten lentamente en proto fibras, seguida de la formación de fibras amiloides. Las cadenas de HS pueden participar al proceso de amiloidosis en la fase de latencia o nucleación, y en la fase de polimerización o de crecimiento. En la primera etapa permiten la formación de un núcleo de monómeros seguida por la segunda etapa que incluye una extensión rápida de proto fibras y la formación de fibras amiloides. Tomado y modificado de *Auriane Maiza, 2018, [134]*

Por otro lado, experimentos *in vitro* han evidenciado la dependencia de tau por los HS durante su agregación y la interacción tau-microtúbulos se ve perturbada por la presencia de HS, promoviendo el desmontaje de los microtúbulos. Interesantemente se ha observado que la interacción de tau con HS induce la exposición de sitios sobre tau altamente susceptibles a la fosforilación, lo que facilita su fosforilación anormal [144-146]. En este sentido, se ha identificado que la secuencia <sup>275</sup>VQIINK<sup>280</sup>, presente en el dominio R2 de tau, es uno de los sitios donde se lleva a cabo la interacción tau-HS; se ha descrito también que el dominio R3 adyacente está implicado en la formación de las fibras de tau; estas dos evidencias han llevado a proponer que la interacción de HS con R2 induce cambios conformacionales en R3 que promueven nucleación y posterior agregación [147, 148]. Otros trabajos han demostrado que los HS colocalizan al interior de las neuronas con los NFTs, sugiriendo la importancia de HS en la lesión neuropatológica mediada por NFTs y rompiendo el dogma de la localización extracelular de los HS [149, 150].

En resumen, los HS pueden ser agentes desreguladores de la homeostasis de la proteína tau, favoreciendo su fosforilación anormal e induciendo su agregación, esto sugiere que los HS pueden ser un factor clave en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

### 1.3.3 La internalización neuronal de los Heparán sulfatos induce el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer

Desde finales del siglo XX se ha reportado la participación de los HS en la formación de placas neuríticas y se ha evidenciado su acumulación en la matriz extracelular y al interior de las neuronas en pacientes diagnosticados con EA (Figura 18). Se ha observado que la acumulación de HS correlaciona con la disminución de la actividad metabólica, la disminución de las dendritas y la muerte celular y se ha sugerido que su aparición precede a la formación de placas  $A\beta$  y de NFTs. Además, se ha sugerido que los HS son un componente esencial en la formación de los NFTs, donde la interacción tau-HS es el evento clave que conduce a la formación de p-tau como precursor de NFTs. Sin embargo, los mecanismos que correlacionan la acumulación de HS y la agregación de tau en las neuronas durante la neurodegeneración de pacientes con EA aún no están claros [145, 150].



**Figura 18. Inmunodetección de HS en tejidos de pacientes con EA.** Tejidos de hipocampos de pacientes de 72 años de edad diagnosticados con EA fueron marcados con el ab HK-249. **(A)** detección de HS en depósitos de  $A\beta$  (puntas de flecha) en una placa neurítica; **(B)** detección de inclusiones de HS en inclusiones de neuronas piramidales; **(C)** detección de inclusiones de HS en neuronas (que se cree que son gránulos de lipofuscina; puntas de flecha) y filamentos (flecha) en una NFTs. Las barras de escala corresponden a 11  $\mu\text{m}$ . Tomado y modificado de Alan Snow, 1990 [135].

Los HS son estructuras glicosídicas que pueden ser modificadas por la adición de grupos sulfatos mediante la acción de HSST y son estas sulfataciones las que favorecen la interacción con proteínas como tau. Reportes previos mostraron que los HS-2S y los HS-NS no presentan una interacción fuerte con tau, contrariamente, los HS-6S y HS-3S mostraron una mayor afinidad por tau [151, 152].

Fisiológicamente, los HS-6S son muy abundantes en todos los tejidos, pero los HS-3S son un tipo de HS extremadamente raros. Se calcula que, en tejidos como el endotelio solo el 1% de los HS totales corresponde a HS-3S y de manera similar sucede en otros órganos. La dificultad para obtener grandes cantidades de HS-3S, aún no se ha podido establecer la relación de HS-3S/HS en diferentes tejidos. [153, 154]. Teniendo en cuenta la relativa abundancia de HS-6S, nosotros hipotetizamos que los HS-6S no participan durante el desarrollo de EA y, por el contrario, la sobreexpresión de una sulfatación rara como HS-3S producto de un estímulo ambiental, genético o biológico, si podría estar induciendo la desregulación de la homeostasis celular en el cerebro que conlleve al desarrollo de taupatías como EA.

Análisis genómicos, han establecido que tres de los genes responsables de la 3-O-sulfatación, *HS3ST2*, *HS3ST4* Y *HS3ST5*, son expresados en el cerebro en diferentes proporciones. Previamente, nuestro laboratorio demostró en un modelo de pez cebra con la mutación tau<sub>P301L</sub> humana, que la inhibición en la expresión de HS3ST2 repercute en la fosforilación de tau durante la fosforilación anormal. *In vitro*, se ha demostrado que las células pueden internalizar los HS-3S e interactúan con tau, promoviendo su fosforilación [46], pero los mecanismos que favorecen la internalización de los HS-3S son desconocidos. La acumulación intracelular de los HS es un fenómeno raro en condiciones fisiológicas normales, pero se ha observado su internalización en algunas líneas celulares de hepatocitos y de cáncer [155, 156]; Evidencias han sugerido en estos modelos que, la internalización de HS esta mediada por endosomas dependientes de clatrina o de caveolina y se ha descrito que estos mecanismos de endocitosis son altamente activos en las neuronas como un método para captar macromoléculas extracelulares e internalizarlas hacia el citosol.

Una de las grandes dificultades en la investigación de la EA ha sido el estudio en pacientes con la enfermedad, pues el diagnóstico molecular de la fisiopatología se desarrolla postmortem. Una estrategia para el análisis de la patología es utilizando modelos animales y celulares que permitan replicar, en parte, la biología de la taupatia [157]. HEK-293 (HEK) son células que derivan de riñón embrionario, descritas desde 1970 y ampliamente usadas en neurociencia. Estudios genéticos han identificado que las células HEK se originaron a partir de una célula neuronal, sin embargo, carecen de la expresión de proteínas neuronales como tau y otras [158]. En este trabajo, nosotros pretendemos determinar si la expresión controlada de *HS3ST2* en células HEK favorece la agregación de tau de manera autónoma. También quisimos explorar un posible mecanismo de internalización y acumulación de HS al interior de las células HEK como modelo de taupatia, esto permitirá responder preguntas relacionadas con el desarrollo de la patología que aún no están claras. Además, hemos evaluado la expresión de HS-3S en un modelo animal *knockout HS3ST2<sup>-/-</sup>* (KO) como perspectiva experimental en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad.

En los últimos años se ha avanzado en la comprensión de la implicación de la glicosilación en los procesos celulares que mantienen homeostasis celular o participan en los procesos de la enfermedad. A continuación, expondremos los objetivos generales de nuestros casos de estudio con los cuales aportamos evidencia a la ***Relevancia biológica de la glicosilación en mecanismos de regulación de la activación de linfocitos T y en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.***

## 2. OBJETIVOS GENERALES

- **Tema 1: Dinámica de expresión de las proteínas O-glicosiladas reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en linfocitos T y su relación con la moesina como mecanismo alternativo de activación celular**

El glicoma de las células T influye directamente en las funciones y procesos celulares como la activación celular, el desarrollo de la respuesta efectora, en la generación de células de memoria, entre otros. Por lo tanto, conocer los mecanismos y moléculas que inducen y regulan la activación celular ha sido relevante en el estudio de la biología de los linfocitos T.

Gran parte de las moléculas que participan de la activación son glicoproteínas donde su porción glicosídica tiene un rol fundamental y el estudio de su estudio ha sido abordado utilizando lectinas. En este trabajo se evaluó la participación de estructuras O-glicosiladas de tipo mucina reconocidas por ALL. Esta lectina reconoce una O-glicoproteína de 70 kDa expresada en linfocitos T CD4<sup>+</sup> homologa a moesina. Ensayos *in vitro* demostraron que células T cultivadas en presencia de anti-CD3 y coestimuladas con ALL son activadas de manera similar al efecto que induce CD28. Entender el mecanismo por el cual ALL induce una señal coestimuladora no canónica se convierte en un importante avance en la comprensión de la activación del linfocito T, pues hasta a la fecha se desconocen otras moléculas con funciones similares a CD28 que favorezcan una vía alterna de la activación celular. Por lo tanto, nosotros **hipotetizamos** que, **la O-glicoproteína de 70-kDa reconocida por ALL en linfocitos T, es una forma O-glicosilada de moesina que participa durante la respuesta inmunológica de las células T como mecanismo alterno de coactivación celular**, lo cual podría perfilar esta molécula como blanco molecular para el diseño de nuevas estrategias clínicas y farmacológicas en el desarrollo de terapias con inmunomoduladores[159].

**Objetivo general: Determinar la existencia de una forma O-glicosilada de moesina expresada en linfocitos T y evaluar su participación dentro de los procesos de coactivación celular**



➤ Tema 2: **Mecanismo de internalización de HS-3S en células HEK293 y su papel durante la formación de oligo-tau**

La EA es una patología neurodegenerativa que con una prevalencia actual de más de 50' millones de personas en el mundo y su aparición afecta progresivamente la calidad de vida de los pacientes y de sus familias. Esta enfermedad se caracteriza por la disminución de los procesos de aprendizaje, por el deterioro cognitivo y por la pérdida de la memoria. La internalización y acumulación de heparán sulfatos en las neuronas desde etapas tempranas de la enfermedad es un factor clave en la fisiopatología del Alzheimer. Experimentos *in vitro*, han demostrado que la agregación de tau puede promoverse por la presencia de heparina, lo que sugiere que su microambiente rico en HS podría desempeñar un papel crucial en la formación de agregados de tau. Evidencia sugiere que, los heparán sulfatos 3-O sulfatados (HS-3S), son quienes se acumulan intracelularmente, sin embargo, aún no se tiene certeza de los mecanismos que subyacen a la internalización de los HS-3S y que conllevan al desarrollo de la taupatia de la EA. Igualmente, se desconoce cómo los HS, clásicamente expresados en la membrana y en la matriz extracelular, son trasladados hacia interior de las neuronas en la EA. Teniendo en cuenta hallazgos en modelos celulares de cáncer donde se observa la internalización de HS, nosotros **hipotetizamos** que, **los HS-3S son internalizados a través de vías endocíticas y su acumulación al interior de la neurona favorece la agregación de Oligo-tau**. Elucidar la participación de los HS en las neuronas durante la EA, permitirá el avance hacia la comprensión de la enfermedad, y perfilará a los HS y a sus mecanismos como posibles blancos farmacológicos en desarrollo de estrategias para detener el avance de la enfermedad.

**Objetivo General: Evaluar si la endocitosis está implicada en los mecanismos de internalización de HS-3S donde favorece la agregación de oligo-tau y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Animales

Para la obtención de esplenocitos y purificación de células T se utilizaron ratones de la cepa *Balb/C* machos de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de entre 28-30 g. Los animales fueron mantenidos en condiciones de esterilidad y libres de patógenos en el bioterio de la facultad de medicina de la UNAM con ciclos fijos de luz y oscuridad. Todos los protocolos fueron aprobados por la comisión de ética para la investigación con animales de la facultad de medicina bajo el proyecto número 099602-08.

Para la obtención de células primarias de hipocampo, fueron utilizados ratones *knock out HS3ST2 (KO- HS3ST2<sup>-/-</sup>)*; de acuerdo con experimento se usaron ratones entre 2 y 8 meses de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones de esterilidad y libres de patógenos en el bioterio del laboratorio Gly-CRRET con ciclos fijos de luz y oscuridad. Los ratones se trataron de acuerdo con la Directiva Europea número 86/609 (Consejo de la CEE para la protección de los animales en la investigación experimental y otras utilidades científicas) y las directrices para el uso de animales de laboratorio (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.).

## 3.2 Amortiguadores, Medios de cultivo y Soluciones

**Tabla 3. Soluciones Buffer, medios de cultivo y soluciones.**

Solución	Formulación	Concentración
ACK lysing buffer	NaCl <sub>(s)</sub> KHCO <sub>3(s)</sub> EDTA-Na <sub>2(s)</sub> H <sub>2</sub> O <sub>(l)</sub> MQ.	150 mM 10 mM 100 mM
RPMI-1640 completo	Piruvato de sodio (GIBCO, USA) L-Glutamina (GIBCO, USA) HEPES (GIBCO, USA) Aminoácidos no esenciales (GIBCO, USA) Suero bovino fetal (SFB, Byproducts, México) Penicilina (GIBCO, USA) Streptomycin (GIBCO, USA) $\beta$ -mercaptoetanol (SIGMA, USA) RPMI-1640 (GIBCO, USA)	1 mM 2 mM 25 mM 0.1 mM 10 % 100 U/mL 100 $\mu$ g/mL 100 $\mu$ g/mL 50 mM
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	L-Glutamina (SIGMA, USA) HEPES (SIGMA, USA) Suero caprino fetal (SCF, SIGMA, USA) Penicilina (SIGMA, USA) Streptomycin (SIGMA, USA) DMEM (SIGMA, USA)	2 mM 10 mM 10 % 100 U/mL 100 $\mu$ g/mL
Solución de lavado para Inmunofluorescencias (SLI).	SBF NaN <sub>3</sub> PBS	1 % 0.1 %
Buffer RIPA	Tris HCl NaCl Na <sub>3</sub> O <sub>4</sub> V NP-40 Dodecil Sulfato de Sodio Deoxicolato de Sodio EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Merk, USA) H <sub>2</sub> O <sub>(l)</sub> MQ.	25 mM 150 mM 2 mM 2 % 0.2 % 1 % 1X
Solución de inhibidores de proteasas/ fosfatasas	Na <sub>3</sub> O <sub>4</sub> V EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Merk, USA) PBS	2 mM 1X
Solución SDS-PAGE	Tris-Base Glicina Dodecil Sulfato de Sodio H <sub>2</sub> O <sub>(l)</sub> MQ.	0.3 % 1.44 % 0.1 %
Buffer de transferencia	Tris-Base Glicina CH <sub>3</sub> OH H <sub>2</sub> O <sub>(l)</sub> MQ.	0.3 % 1.44 % 20 %
Tris-buffered saline (TBS), pH 7.5	Tris-HCl <sub>(s)</sub> , NaCl <sub>(s)</sub>	10 mM 150 mM
T-TBS ó T-PBS	Tween 20 TBS ó PBS	0.1 %
Solución de bloqueo para inmunocitoquímica.	BSA PBS	3 %
Laemmli buffer	Tris HCl, pH 6.8. Dodecil Sulfato de Sodio glycerol, Azul de bromophenol (Biorad) $\beta$ -mercaptoethanol	0.125 M 4 % 20 % 0.004% 10 %

### 3.3 Cultivos celulares primarios

#### ➤ Obtención y cultivo de esplenocitos y linfocitos T purificados

Los esplenocitos fueron obtenidos de animales sacrificados por dislocación cervical siguiendo la norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). La extracción del bazo se realizó mediante incisión lateral en un ambiente aséptico, los esplenocitos se obtuvieron por perfusión del órgano con 10 mL PBS, el extracto celular obtenido fue transferido a un tubo de 15 mL estéril y se dejaron precipitar los restos de tejido por 10 min, luego la suspensión celular fue colectada y centrifugada a 1500 rpm durante 5 min, el pellet celular fue lavado con PBS, seguidamente el pellet se suspendió en 1.5 mL ACK lysing buffer y se incubó por 3.5 min a temperatura ambiente (TA) para lisar los eritrocitos, la lisis fue parada con 10 mL de PBS; posteriormente las células fueron centrifugadas y lavadas 2 veces con PBS para eliminar debris y restos celulares. Se determinó la viabilidad celular por el test de exclusión de tinción con azul de tripano (Sigma, USA), las células fueron suspendidas en medio de cultivo a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Para los ensayos de citometría de flujo,  $1 \times 10^5$  esplenocitos ó  $5 \times 10^4$  linfocitos T purificados fueron cultivados por pozo en placas de 96 (Sarstedt, USA) con 200  $\mu$ L en RPMI-1640 completo e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, igualmente para los experimentos de obtención de extractos proteicos de linfocitos T fueron sembrados  $1 \times 10^6$  esplenocitos en 2 mL en RPMI-1640 en placas de 24 pozos (Sarstedt, USA); en ambos casos experimentales las células fueron estimuladas con 3  $\mu$ g/mL de anti-CD3 soluble (145-2C11, in house purified), con 0.3  $\mu$ g/mL de anti-CD28 soluble (37.51; Tonbo Biosciences) o con 5  $\mu$ g/mL de ALL soluble (in house purified [160]), los estímulos fueron utilizados solos o en combinación según se indica en cada ensayo; posteriormente las células fueron cosechadas a diferentes tiempos y lavadas 2 veces con PBS para su posterior análisis o experimento.

➤ Obtención y Cultivo de células neuronales de hipocampo

Las Células primarias de hipocampo fueron obtenidas a partir de embriones murinos *HS3ST2*<sup>-/-</sup> o WT recuperados a los 16 días de gestación. Después de recuperados los cerebros, fueron retiradas las meninges para posterior extracción del hipocampo. Los hipocampos fueron embebidos en 20 mL de medio HBSS de disección, después los hipocampos fueron centrifugados a 1000 rpm por 1 min y el sobrenadante fue intercambiado por medio HBSS de disección nuevo y se repitió el paso anterior. Posteriormente, los hipocampos fueron embebidos por 12 min a 37°C en 2 mL de solución HBSS suplementada con HEPES (5%), DNase (0.5%) y tripsina (2.5%) para la disociación química del tejido, la reacción fue parada mediante la adición de 5 volúmenes de FBS; seguidamente se prosiguió a una disociación mecánica de los restos de tejidos en solución por trituración de la suspensión con una pipeta Pasteur flameada. La suspensión fue mezclada con 20 mL de DMEM, FBS (10%) y penicilina y estreptomina (0.1%), la mezcla fue centrifugada durante 10 min a 1000rpm (este paso se repitió dos veces). Luego el sobrenadante fue retirado y el botón celular fue resuspendidos en solución Neuro basal B27 (2%), glutamax (0.3%) penicilina y estreptomina (0.1%), luego las células fueron incubadas en IBDS de 8 pozos a una concentración de 25.000 células/poso en un volumen de 200  $\mu$ L; después de 2 h el medio fue remplazado por medio condicionado obtenido de cultivos primarios de células gliales. Las células fueron cultivadas por 20 días a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Luego las células fueron fijadas en metanol al 100% a -20°C durante 3 min y se almacenaron en PBS hasta su uso.

➤ Obtención y cultivo primario de células gliales de rata para la obtención de medio condicionado

Células gliales corticales fueron cultivadas para recuperar el medio condicionado usado posteriormente en los cultivos primarios de células de hipocampo. Para ello cerebros de ratas Sprague Dawley de 4-5 días de edad fueron recuperados, luego las meninges y el hipocampo fueron removidos; las regiones corticales cercanas al

hipocampo fueron extraídas para cada animal y almacenadas en 20 mL de medio de disección compuesto por HBSS (50 mL; Gibco 14170-088), HEPES (0.1%; Gibco 15630-056), penicilina y estreptomycinina (0.1%; life technologies). Después las cortezas fueron centrifugadas a 1000 rpm por 1 min, y el sobrenadante fue intercambiado por medio HBSS de disección nuevo y se repitió el paso anterior. Después de los lavados con HBSS el sobrenadante fue removido y el tejido fue embebido durante 15 min a 37°C en 10 mL de HBSS, HEPES, penicilina y estreptomycinina, DNase (0.05%; pharma Biotech, 27-0516-01) y tripsina (2.5%, Sigma T6763) para disociación química del tejido, la actividad de la tripsina fue inhibida con FBS (5 %; Gibco 10270-098). Se procedió a una disociación mecánica por trituración de la suspensión con una pipeta Pasteur flameada y al final las células fueron suspendidas en 20 mL de DMEM (Gibco 61965-026), FBS (10%) y penicilina y estreptomycinina (0.1%), para luego ser centrifugadas durante 10 min a 1000 rpm; el sobrenadante fue reemplazado con 20 mL de DMEM nuevo y se repitió el paso anterior. Posteriormente, el sobrenadante fue retirado y el botón celular de cada animal fue resuspendidos en 1 mL de medio que contenía DMEM, FBS (10%) y penicilina y estreptomycinina (0.1%); luego las células de cada animal fueron cultivadas en flasks T75 y el volumen del medio fue ajustado a 13 mL por flasks (P0); a las 24 h el medio fue cambiado por medio DMEM nuevo y las células fueron cultivadas a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Después de 6 días de cultivo, las células fueron pasadas (P0 a P1). Al noveno día, con una confluencia aproximada del 80% fue cambiando por medio neuro basal Gibco; 21103-049), B27 (2%, Gibco 17504044) Glutamax (0.3%, Gibco 35050-038) y penicilina estreptomycinina (0.1%) y la 1/3 o 2/3 de la suspensión celular fue pasada a un flasks (P2); después de 24 h, el medio condicionado sobrante en el flasks P1 fue recuperado, pasado por un filtro 0.22 µm, congelado y conservado a -20°C por 6 semanas máximo. Después de 3 días el medio de P2 fue removido y reemplazado con por medio neuro basal (Gibco; 21103-049), B27 (2%, Gibco 17504044) Glutamax (0.3%, Gibco 35050-038) y penicilina estreptomycinina (0.1%), y el medio recuperado del flasks pasado por un filtro 0.22 µm, congelado y conservado a -20°C por 6 semanas máximo.

### 3.4 Anticuerpos, lectinas, colorantes

A continuación, se describen las características de todos los anticuerpos, moléculas de detección y colorantes utilizados en el presente trabajo.

**Tabla 4. Moléculas utilizadas en la determinación de gpALL por citometría de flujo.**

Molécula	ALL biotinilada (ALL)	Streptavidin (Strp)
Tipo	Lectina	Molécula de detección
Especificidad	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O- $\alpha$ -Ser/Thr	Biotina
Acoplado a	Biotina	Brillant violet 421 (BV 421)
Concentración	13.75 $\mu$ g/mL	0.15 $\mu$ g/mL
Referencia	Mar2019-1	405225
fabricante	Producida in house	Biolegend, USA

**Tabla 5. Características de colorantes utilizados en citometría de flujo.**

Colorante	Uso	Dilución	Referencia	Fabricante	Experimento
Ghost Dye Red 780	Viabilidad	1:1000	13-0865	TONBO BIOSCIENCES, USA	IFT
7-AAD	Viabilidad	2:3500	A1310	Thermo Fisher, usa	CS
CFSE	Proliferación	1:1000 (5 $\mu$ M)	65-0850-85	Invitrogen, USA	Proliferación

IFT: Inmunofenotipificación, CS: Cell sorting

**Tabla 6. Características de anticuerpos usados en la detección de moléculas de superficie por citometría de flujo.**

Especificidad	Clona	Fluorocromo	Concentración	Referencia	Fabricante	Experimento
CD4	RM4-5	APC	1.25 $\mu$ g/mL	20-0042	TONBO BIOSCIENCE, USA	IFT
	GK1.5	FITC	1.50 $\mu$ g/mL	130102541	Miltenyi Biotec, Germany	CS
CD8	53-6.7	PerCP-Vio 700	0.75 $\mu$ g/mL	130120825	Miltenyi Biotec, Germany	IFT
	53-6.7	PE Vio 770	22.5 $\mu$ g/mL	130119123	Miltenyi Biotec, Germany	IFT/CS
moesin	EP1863Y	PE	1.70 $\mu$ g/mL	ab210983	Abcam, USA	IFT
CD69	REA937	PE Vio 770	0.75 $\mu$ g/mL	130115577	Miltenyi Biotec, Germany	IFT
CD25	REA568	PE	1 $\mu$ g/mL	130121133	Miltenyi Biotec, Germany	IFT

IFT: Inmunofenotipificación, CS: Cell sorting



**Tabla 7. Características de moléculas utilizadas en ensayos de Lectin- y Western-Blot.**

anticuerpo	Tipo	Especificidad	Concentración	Referencia	Fabricante
ALL biotinilada (ALL) <sup>a</sup>	Lectina	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O- $\alpha$ -Ser/Thr	1.1 $\mu$ g/mL	Mar2019-1	Producida in house
moesin	Anticuerpo acoplado a HRP	moesina	0.1 $\mu$ g/mL	ab207629	Abcam, USA
HS3ST2	anticuerpo	HS3ST2	0.5 mg/mL	PA5-26522	Thermo-Fischer Scientific
K9JA	anticuerpo	t-tau	22 $\mu$ g/mL	A0024	Conejo
GAPDH	anticuerpo	GAPDH	1:10.000	PA1-987	Thermo Fisher Scientific,
$\alpha$ -tub	anticuerpo	$\alpha$ -tub	1:10.000	T9026-100UL	Sigma
10E4	anticuerpo	HS totales	1:50	370255-1	amsbio

a: La detección de ALL se realizó utilizando 0.14  $\mu$ g/mL de Streptavidin-HRP (Strp-HRP; Ref SA-5004, Vector laboratories)

**Tabla 8. Anticuerpos usados en los experimentos de inmunocitoquímica (ICC)**

anticuerpo	Especificidad	Concentración	Referencia	Uso	Fabricante
HS3ST2	HS3ST2	0.5 mg/mL	PA5-26522	ICC	Thermo-Fischer Scientific
HS4C3	HS-3S	20 $\mu$ g/mL	P5254 G886	ICC	Radboud University Medical Center, the Netherlands
VSV (mouse)	HS4C3	0.1 $\mu$ g/mL		ICC	
VSV (Rabbit)	HS4C3	0.1 $\mu$ g/mL	V4888	ICC	Sigma
T22	Oligo-tau tempranos	10 $\mu$ g/mL	ABN454	ICC	Merk
K9JA	t-tau	22 $\mu$ g/mL	A0024	ICC	Conejo

**Tabla 9. Características de anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos usados en los experimentos de ICC.**

Anticuerpo			Características del fluorocromo		Microscopio
Tipo	Fluorocromo	Hecho en	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	
IgG anti-mouse	Cy3	cabra	554	568	Rojo
IgG anti-rabbit	Alexa fluor 647	Mono	650	665	Verde
IgG anti-rabbit	Alexa fluor 488	Mono	490	525	Verde
IgG anti-donkey	Alexa fluor 488	Mono	490	525	Verde

Tabla 10. Moléculas utilizadas en precipitación de O-glicoproteínas.

Molécula	ALL biotinilada (ALL)	moesina
<b>Característica</b>		
<b>Clona</b>	-----	EP1863Y
<b>Tipo</b>	Lectina	anticuerpo
<b>Especificidad</b>	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O- $\alpha$ -Ser/Thr	moesina
<b>Acoplado a</b>	Biotina	-----
<b>Concentración</b>	330 $\mu$ g/mL	12.9 $\mu$ g/mL
<b>Referencia</b>	Mar2019-1	ab52490
<b>Fabricante</b>	Producida in house	Abcam, USA
<b>Molécula de captura</b>	Streptavidin	Proteína A
<b>Kit de separación</b>	Streptavidin MicroBeads	$\mu$ MACS Protein A Microbeads
<b>Referencia Kit de separación</b>	130-074-101	130-071-001
<b>Fabricante Kit de separación</b>	Miltenyi Biotec, Germany	Miltenyi Biotec, Germany

### 3.5 Análisis por citometría de flujo

➤ Inmunofluorescencia indirecta de gpALL

Cien mil células fueron suspendidas en 100  $\mu$ L de solución de ALL/PBS, e incubadas por 30 min (4°C, en oscuridad), seguido de dos lavados con 200  $\mu$ L SLI (lavado), luego las células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de Strp B.V 421/SLI e incubadas por 30 min (4°C, en oscuridad) y lavadas (2X); posteriormente las células fueron marcadas con los anticuerpos para la detección de moléculas de superficie.

➤ Inmunofluorescencia directa, detección de moléculas de superficie en experimentos de citometría de flujo

Para la detección de moléculas de superficie, cien mil células en fueron incubadas por 30 min (4°C, en oscuridad) con 100  $\mu$ L de solución de inmunomarcaje (SLI + anticuerpos acoplados a fluorocromos) de acuerdo a cada experimento, tablas 12-15, el marcate fue parado con la adición de 100  $\mu$ L de SLI seguido de 2 lavados; después las células fueron teñidas con Ghost Dye Red 780 como colorante de células no viables, finalmente las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS para su análisis por citometría de flujo. Para los experimentos de Cell sorting,  $1 \times 10^8$  células fueron marcadas en 0.5 mL de solución

de inmunomarcaje, incubadas y lavadas, luego las células fueron teñidas con 7-AAD como colorante de células no viables.

➤ Tinción de viabilidad

Cien mil células fueron incubadas con 100  $\mu\text{L}$  del colorante Ghost Dye Red 780/PBS durante 10 min en oscuridad, la reacción de tinción fue parada con 500  $\mu\text{L}$  de SLI, luego las células fueron lavadas (2X) y fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de PBS o PFA 1% (en el caso de la evaluación de la cinética de expresión de moesina en linfocitos T). En los experimentos de Cell Sorting las células fueron resuspendidas en 10 mL del colorante 7-AAD/PBS durante 10 min en oscuridad, luego las células fueron lavadas (2X) y resuspendidas en PBS a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL.

➤ Ensayos de proliferación celular de linfocitos T

Doce millones y medio de células fueron teñidas con CFSE/PBS por 5 min, a temperatura ambiente y en oscuridad con agitaciones ocasionales [161]. La tinción fue parada con la adición de cinco volúmenes de una solución al PBS + SBF 10%; luego las células fueron lavadas (2X) e inmediatamente usadas en cultivo celular como se describió previamente; setenta y dos horas después las células fueron lavadas varias veces con solución de lavado y marcadas con anticuerpos para la detección de moléculas de superficie y el colorante de viabilidad Ghost Dye Red 780.

➤ Cell Sorting

Para la purificación de las células T  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ ,  $1 \times 10^8$  Esplenocitos frescos o estimulados por 48 h con anti-CD3/CD28 fueron marcados con anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE Vio 770 y con 7-AAD como previamente se describió, luego las células fueron sorteadas en FACSAria y colectadas en tubos de 15 mL estériles con 2 mL de SFB. Las células fueron sorteadas usando gates  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  a partir de subpoblación de linfocitos

viables. La pureza de cada población fue alrededor del  $\geq 95\%$ . Al final las células fueron lavadas (3X), y lisadas inmediatamente para la obtención de extractos proteicos.

➤ Características técnicas del citómetro de flujo utilizado

Para los experimentos de detección de gpALL, detección de moléculas de superficie y ensayos de proliferación celular se usó un citómetro de flujo MACS QUANT Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Germany) con las siguientes características ópticas.

**Tabla 11. Características del componente óptico del citómetro de flujo MACS QUANT Analyzer 10.**

Laser	Canales de detección	Filtro (nm)
Laser violeta 405 nm	V1	450/50
Laser azul 488 nm	B1	525/50
	B2	655/40
	B3	655-730
	B4	750 lp
Laser rojo 635 nm	R1	655-730
	R2	750 LP
Laser azul 488 nm	FSC	488/10
	SSC	488/10

Para los experimentos de Cell Sorting se usó un citómetro de flujo FACSAria (Beckton Dickinson, USA) con las siguientes características ópticas.

**Tabla 12. Características del componente óptico del citómetro de flujo FACSAria.**

Laser	Canales de detección	Filtro (nm)
Laser azul 488 nm	FL1	530/30
	FL2	576/26
	FL3	610/20
	FL4	675/20
	FL5	780/60
Laser rojo 633 nm	FL6	660/20
	FL7	780/60
Laser azul 488 nm	FSC	488/10
	SSC	488/10

**Tabla 13. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de gpALL por citometría de flujo.**

Anticuerpo		Características de los fluorocromos			Citometro
Parámetro	Fluorocromo	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	Laser de Excitación (nm)	Canal de Detección
ALL	BV 421	407	421	405	V1
CD8	PE-Vio770	565	775	488	B4
CD4	APC	650	660	640	R1
Viabilidad	Ghost Dye 780	633	780	640	R2

**Tabla 14. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de moesina por citometría de flujo.**

Anticuerpo		Características de los fluorocromos			Citometro
Parámetro	Fluorocromo	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	Laser de Excitación (nm)	Canal de Detección
moesin	PE	496	488	488	B2
CD8	PE-Vio770	565	775	488	B4
CD4	APC	650	660	640	R1
Viabilidad	Ghost Dye 780	633	780	640	R2

**Tabla 15. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de marcadores de activación y en el análisis de la proliferación celular por citometría de flujo.**

Anticuerpo		Características de los fluorocromos			Citometro
Parámetro	Fluorocromo	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	Laser de Excitación (nm)	Canal de Detección
Proliferación	CFSE	488	517	488	B1
CD25	PE	496	488	488	B2
CD8	PerCP Vio 700	482	704	488	B3
CD69	PE-Vio770	565	775	488	B4
CD4	APC	650	660	640	R1
Viabilidad	Ghost Dye 780	633	780	640	R2

**Tabla 16. Panel de anticuerpos utilizado en la detección de marcadores de activación y en el análisis de la proliferación celular, citometro FACSria.**

Anticuerpo		Características de los fluorocromos			Citometro
Parámetro	Fluorocromo	Excitación Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	Laser de Excitación (nm)	Canal de Detección
CD4	FITC	495	521	488	FL1
Viabilidad	7-AAD	488	647	488	FL4
CD8	PE-Vio770	565	775	488	FL5

➤ Cinéticas de expresión de gpALL y de moesina en linfocitos T

Para la cinética de expresión de gpALL células frescas o cultivadas por 24, 48 o 72 h fueron cosechadas y marcadas con ALL/Strp BV 421, luego las células fueron marcadas con anti-CD4 y anti-CD8, y finalmente teñidas con Ghost Dye Red 780. Para la cinética de expresión de moesina, esplenocitos frescos o cultivados por 24, 48 o 72 h fueron

cosechados y marcados con anti-CD4 y anti-CD8, luego las células fueron teñidas con Ghost Dye Red 780, después las células fueron suspendidas en PFA 1% por 40 min en oscuridad y finalmente fueron marcadas con anti-moesina; en ambos casos, las células fueron analizadas inmediatamente utilizando un citometro MACS QUANT Analyzer 10. En todos los casos, el marcaje fue parado con 100  $\mu$ L de SLI y lavadas (2X) antes del próximo marcaje/tinción.

### 3.6 Análisis de Microscopía y obtención de imágenes

#### ➤ Inmunocitoquímica (ICC)

Para los experimentos de inmunocitoquímica (ICC), se cultivaron aproximadamente 50.000 células en cubreobjetos de vidrio. Después de la transfección y el cultivo como se indica, las células se fijaron en metanol al 100% a -20°C durante 3 min, luego las células fueron bloqueadas con PBS/BSA 3% y posteriormente se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente a TA, seguido de 2 lavados con PBS, luego se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 h bajo las mismas condiciones. Para revelar la tinción de HS4C3, se utilizó un anticuerpo anti-VSV, seguido de un anti-mouse Cy3. Como control de especificidad del ab HS4C3, las células fueron tratadas previamente con una mezcla de heparitinasa I, II y III (Iduron, Inglaterra) usadas a 2, 0,2 y 0,2 U/mL respectivamente durante 12 h a 37°C, luego las células fueron lavadas con PBS y se procedió a al marcaje como se describió previamente.

#### ➤ Microscopia

*Stack images 60 ×* fueron obtenidas con el software CellSens de un microscopio confocal invertido de disco giratorio (IX81 DSU Olympus, 60 × NA1.35) acoplado a una cámara Orca Hamamatsu RCCD. Se obtuvieron imágenes de 20 × con el mismo microscopio en configuración no confocal. Los núcleos se marcaron con 1  $\mu$ g/mL de DAPI por 7 min (Sigma, USA). Las imágenes se procesaron con el software ImageJ (W.

Rasband, Instituto Nacional de Salud). Las características del componente óptico se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 17. Características del componente óptico del microscopio IX81 DSU Olympus, 60 × NA1.35.

Excitación	Fluorescencia	Fluorocromos utilizados
UV	Blue	DAPI
Blue	Green	Alexa Fluor 488
Green	Red	Cy3, Alexa Fluor 647
Red	IR cercano	-----

### 3.7 Análisis de proteínas

#### ➤ Extracción de proteína

Para la obtención de proteína a partir de linfocitos totales o de linfocitos purificados,  $1 \times 10^7$  células fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de buffer RIPA, la suspensión fue sonicada (30 sg, 4°C), incubada (30 min, 4°C) con agitaciones fuertes en vortex cada 10 min, y centrifugada a 10,000 rpm (20 min, 4°C); el sobrenadante fue recuperado y trasferido a un tubo Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit 10-kDa (Merck, USA) para eliminar los detergentes mediante centrifugación a 10,000 rpm (15 min, 4°C), seguidamente este extracto concentrado fue diluido en 300  $\mu\text{L}$  de solución de inhibidores de proteasas/fosfatasa y nuevamente centrifugado (3X); finalmente se determinó la concentración de proteína usando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, USA) y se ajustó la concentración final a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con solución de inhibidores de proteasas/fosfatasa.

#### ➤ SDS-PAGE

Veinte microgramos de proteína obtenida a partir de linfocitos o 10  $\mu\text{g}$  de proteína obtenida a partir de células HEK fueron mezclados con Laemi Sample Buffer (Bio-Rad, USA) +  $\beta$ -mercaptoetanol (10%; Sigma- Aldrich, USA) en una relación 1:4, después la mezcla fue incubada a 95°C durante 5 min para la desnaturalización de las proteínas; luego las proteínas fueron separadas en un gel de electroforesis 10 % SDS-poliacrilamida (PAGE) usando pesos moleculares estándar de amplio espectro, Precision Plus Dual

Color (10-250-kDa; Bio-Rad, USA) como referencia; inmediatamente el gel fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P membrane (PVDF, Millipore Corp, USA) previamente activada por inmersión en metanol (15 sg), H<sub>2</sub>O MQ (2 min) y buffer de transferencia (10 min). La membrana transferida fue incubada por 15 min en Ponceau S Solution (Sigma-Aldrich, USA) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor para verificar la calidad de la transferencia y además como indicador de control de carga en los experimentos de identificación de gpALL.

➤ Lectin- y Western-Blot

Para el Lectin-Blot, la membrana PVDF fue bloqueada con T-PBS + 3% BSA durante 1 h (temperatura ambiente), luego la membrana fue incubada con ALL/PBS durante toda la noche (4°C) y lavada con T-PBS (3X, 5 min c/u, agitación suave); luego la membrana fue incubada con Streptavidin-HRP/T-PBS (Strp-HRP; Vector laboratories, USA) + Blotto-non-fat dry milk (5%; Santa Cruz Biotechnology) por 1 h (temperatura ambiente); finalmente la membrana fue lavada (5X) con T-PBS + Triton X-100 (0.2%). Para el Wester-Blot, la membrana PVDF fue bloqueada por 1 h (temperatura ambiente) con T-TBS + 3% BSA durante 1 h (temperatura ambiente), luego la membrana fue incubada con anti-moesina HRP/TBS durante toda la noche (4°C) y lavada (5X) con T-TBS + Triton X-100 (0.2%); en ambos casos las membranas fueron reveladas usando Immobilon Western Chemilum HRP Subtrate (Merk, Germany) sobre una película auto radiográfica de Kodak Biomax (Sigama-Aldrich, USA).

➤ Precipitación de O-glicoproteínas

Los ensayos de inmunoprecipitación de moesina se realizaron utilizando, 5  $\mu$ L de mAbs anti-moesina sin conjugar (EP1863Y; Abcam, USA) en 200  $\mu$ L de proteínas del lisado obtenido, la mezcla se incubó toda la noche a 4°C en oscuridad sobre un agitador, después se adicionaron 50  $\mu$ L de  $\mu$ MACS Protein A Microbeads (Miltenyi Biotec, Germany) y se incubó nuevamente la mezcla por 2 h a 4°C en agitación; el



inmunoprecipitado fue separado, eluido y lavado de acuerdo a las recomendaciones del proveedor con buffer Laemmli 4X + 10%  $\beta$ -mercaptoetanol precalentado a 95°C. Para la inmunoprecipitación de gpALL, 200  $\mu$ L del extracto de proteínas fueron incubados toda la noche con 30  $\mu$ L de ALL, luego se adicionó 100  $\mu$ L de  $\mu$ MACS Streptavidin (Miltenyi Biotec, Germany) y se llevó nuevamente a incubación por 2 h a 4°C en agitación; finalmente las gpALL precipitadas fueron lavadas con PBS y eluidas con 500 mM de GalNAc. Los precipitados fueron sometidos a electroforesis inmediatamente.

### 3.8 Controles de especificidad de ALL

Para los ensayos de inhibición de la interacción entre la lectina-glicano por citometría de flujo, ALL fue pre-incubada en 200 mM de GalNAc/PBS por 10 min a temperatura ambiente, luego las células fueron marcadas como previamente se describió utilizando la mezcla ALL + GalNAc. Para los ensayos de eliminación de O-glicanos mediante reacción de  $\beta$ -eliminación, la membrana de PVDF fue incubada en una solución de 55 mM NaOH/PBS por 16h (40°C, agitación) [162], luego se realizaron lavados con PBS (5X, 5 min c/u, agitación) y finalmente la membrana fue incubada con ALL para el desarrollo del Lectin-Blot como previamente se describió.

### 3.9 Determinación de IL-2 por la técnica ELISA

Linfocitos T purificados fueron estimulados por 48 h como se describió antes, después el sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C hasta su uso para la cuantificación de la concentración de IL-2 de acuerdo con las recomendaciones del proveedor usando Mouse IL-2 ELISA Matched Antibody Pair Kit (Tonbo Biosciences, USA). El límite de detección del Kit es de 2 pg/mL.

### 3.10 Primers usados para la cuantificación de transcritos de HS3STs por qPCR

Tabla 18. Human primers usados en experimentos de PCR

Gen	Forward primer	Reverse primer	Tamaño de amplicon
<i>HS3ST1</i>	GAACGAGGTCCACTTCTTCG	TTCTCCACTGTGAGCTGGTG	104
<i>HS3ST2</i>	GGAACCCCACTTCTTTGACA	GTCGAGGAGCCTTTGAGTG	133
<i>HS3ST3A</i>	TCACAGGTGGGGTCCAAG	GTTCTCTCCGCCGAGTT	152
<i>HS3ST3B</i>	CATCATCGGACGGTCATCTT	AAACACGTGCCAGGACAAAT	157
<i>HS3ST4</i>	AAGAGCAAAGGTCGGACTCA	ACCCTCTCCTGTTCCCACT	131
<i>HS3ST5</i>	CCTGCTTAAAATGCTGAACC	TACCACTCAATGCCCTTACC	101
<i>MAPT</i>	AAGGTCAGCTTGTGGGTTTC	TGGCTCATTAGGCAACATCC	
<i>B2M<sup>a</sup></i>	GCTCCGTGGCCTTAGCTGT	ACGTGAGTAAACCTGAATCTTTGGA	
<i>RPL37A<sup>a</sup></i>	ATTGAAATCAGCCAGCACGC	AGGAACCACAGTGCCAGATCC	

a: los genes B2M y/o RPL37A fueron usados como “house keeping genes” para la normalización [163].

### 3.11 Transfección de células HEK

#### ➤ Plásmidos

Las secuencias de ADNc para la expresión de tau humana (gen *MAPT*, NM\_005910, Eurofins, Francia) y del gen *HS3ST2* de longitud completa humana (NM\_006043, Eurofins, Francia), fueron clonados en plásmidos pEBV replicativos que contenían cartuchos de transcripción individuales para la expresión bajo selección con hygromicina (*HS3ST2*) y puromicina (*MAPT*) [164]. Las secuencias de construcción se confirmaron mediante secuenciación de ADN (Eurofins Genomics, datos no mostrados). El diseño de los plásmidos y las transfecciones fueron en colaboración con Dr. Denis BIARD de CEA.

#### ➤ Extracción de RNA y RT-qPCR

La extracción de ARN se realizó con RNA-Bee (Bioconnect, Francia). La concentración de ARN se midió con un Nanodrop 2000 (Thermoscientific). Después la suspensión fue tratada con ADNasa (Ambion, Inglaterra), luego la síntesis de ADN complementario (ADNc) con el kit Affinity Script Multiple Temperature cDNA (Agilent) se

realizó utilizando 1  $\mu\text{g}$  de ARN, el ciclo térmico de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones 25°C durante 10 min, a 50°C durante 60 min y a 70°C durante 15 min. La expresión génica se analizó en ADNc molde mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando el kit Brilliant III Ultra-fast SYBR\* (Agilent Technologies) en un termociclador Agilent AriaMx.

➤ Transfección de células HEK y cultivo celular

Células de riñón embrionario humano *wild-type* (HEK), fueron cultivadas y expandidas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma, USA) suplementado con suero de cabra fetal (FCS) al 10%, 100 U/mL de penicilina, estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , glutamina 2 mM, HEPES 10 mM (productos Sigma, USA), e incubadas en 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Luego  $1 \times 10^5$  células HEK fueron transfectadas con JetPrime (Ozyme, Francia) para expresar HS3ST2 bajo selección con higromicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) siguiendo las recomendaciones del proveedor, la expresión de HS3ST2 fue confirmada (línea celular HEK<sub>HS3ST2</sub>); De manera similar para la generación de las líneas celulares que expresan tau sola (línea celular HEK<sub>tau</sub>) o en conjunto con HS3ST2 (línea celular HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>), se tomaron  $1 \times 10^5$  células HEK o HEK<sub>HS3ST2</sub> respectivamente y fueron transfectadas con tau, se mantuvieron bajo selección con puromicina (0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los vectores pEBV vacíos se usaron para seguir los efectos de la transfección y la selección en las células. Las células HEK fueron proporcionadas por el Dr. A. Delaunay, CEA Saclay, Francia. Para los ensayos de inhibición, las células fueron incubadas con Dinastore, Filipin o Genestein a una concentración de 100 mM, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o 200 mM respectivamente, luego las células fueron lavadas y fijadas como se describió.

### 3.12 Software, programas de cómputo y estadística

➤ Análisis de datos de citometría de flujo

Los datos de citometría de flujo fueron procesados en FlowJo software V.10.6.2 (Beckton Dickinson), las estrategias de análisis utilizadas son descritas en la descripción de los resultados de cada experimento.

➤ Análisis de imágenes de Lectin- y Western-Blot

Las bandas sobre la película auto radiográfica de Kodak Biomax del Lectin- o Western-Blot fueron capturadas utilizando ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, USA) utilizando una fuente de excitación Epi-white light y registrando un tamaño de pixel de 6,45 x 6,45 micras; seguidamente las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando Lab 6.0.1 software (Bio-Rad, USA).

➤ Predicción de sitio de O-Glicosilación

Para la predicción de sitios potencialmente O-glicosilables, se usó la secuencia de moesina murina UniPotKB P26041 (MOES\_MOUSE) reportada en el Protein Data Bank (PDB). La secuencia primaria fue analizada en NetOGlyc 4.0 server. Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> (12/11/2020).

➤ Análisis de imágenes de microscopia

Las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia o microscopia confocal se procesaron con el software ImageJ (W. Rasband, Instituto Nacional de Salud); para los análisis se usaron algunas herramientas de software diseñadas por Gilles Carpentier responsable de la plataforma de microscopia del Gly-CRRET, disponibles en: <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?lang=en>, 08/08/2022.

➤ Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 9.2. Las barras representan el error estándar (SD) o el error estándar de la media (SEM) para dos o tres experimentos diferentes, cada uno realizado por duplicado o triplicado, como se indica en cada experimento. La significación se analizó mediante la prueba t o ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Turkey o Bonferroni's tests como se indica, como se indica (\*\* P < 0,001; \* P < 0,01; \* P < 0,05; ns = no significativo).

## 4. RESULTADOS

#### 4.1 Tema uno: *Dinámica de expresión de las proteínas O-glicosiladas reconocidas por la lectina de Amaranthus Leucocarpus en linfocitos T y su relación con la moesina como mecanismo alternativo de activación celular*

La activación del linfocito T es un proceso que requiere múltiples señales para inducir la respuesta celular y el desarrollo de mecanismos efectores; muchas de las moléculas que participan en la activación son glicoproteínas las cuales participan en procesos de adhesión y señalización. En este capítulo nosotros aportamos evidencia de la existencia de una O-glicoproteína a través de la cual se puede inducir una señal de coestimulación que favorece la activación de la célula T.

➤ **Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar las dinámicas de expresión de las glicoproteínas reconocidas por ALL durante la activación de la célula T.
- ✓ Evaluar si hay cambios en los niveles de expresión de moesina durante la activación de la célula T.
- ✓ Determinar la presencia de una forma O-glicosilada de moesina mediante ensayos de inmunoprecipitación con ALL.
- ✓ Evaluar si la coestimulación de células T con anti-moesina en presencia de anti-CD3 induce la expresión de marcadores de activación.
- ✓ Evaluar si tras la activación de la célula T con anti-CD3/moesin se induce la producción de IL-2 y se promueve el desarrollo de la proliferación celular.

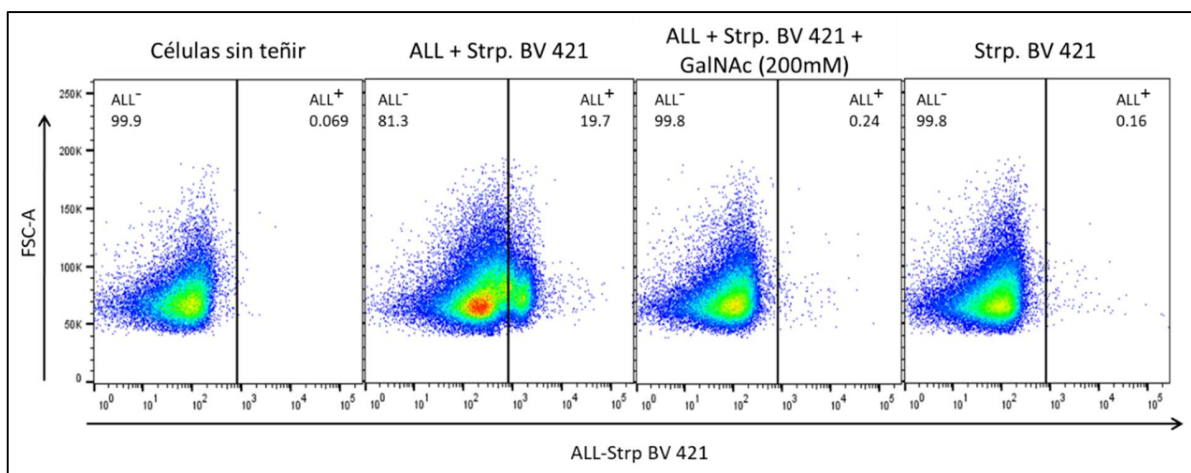
Algunos de los resultados presentados aquí fueron publicados en: **Gómez-Henao W, Saavedra R, Chávez-Sánchez FR, Lascurain R, Zenteno E, Tenorio EP. Expression Dynamics of the O-Glycosylated Proteins Recognized by *Amaranthus leucocarpus* Lectin in T Lymphocytes and Its Relationship with Moesin as an Alternative Mechanism of Cell Activation.** Front Immunol. 2021 nov 30; 12:788880. doi: 10.3389/fimmu.2021.788880. PMID: 34917095; PMCID: PMC8669815. (ver artículos publicados).



#### 4.1.1 Dinámica de expresión de gpALL en linfocitos T tras la activación celular

La glicosilación responde dinámicamente en respuesta al ambiente celular y a los procesos biológicos [165, 166]. Sabemos que las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> no activadas expresan diferencialmente gpALL, pero aún se desconoce si esta diferenciabilidad se mantiene después de la activación celular.

Teniendo en cuenta que ALL es una lectina no comercial [80], primero validamos el uso de ALL en ensayos de citometría de flujo. Para ello, esplenocitos murinos fueron marcados con ALL, luego, fueron incubados con Strp BV 421 (ALL/Strp BV 421) como molécula de detección, después las células fueron teñidas con Ghost Dye Red 780 y analizadas por citometría de flujo. Los resultados muestran que el 19.7% de las células T no activadas expresan el glicofenotipo gpALL<sup>+</sup> (Figura 19). El porcentaje de células gpALL<sup>+</sup> disminuyó a cero cuando las células fueron incubadas con Strp BV 421 en ausencia de ALL, resultados similares se observaron cuando las células fueron incubadas con ALL/Strp BV 421 en presencia de GalNAc 200 mM soluble en ensayos de competición de la interacción de ALL con sus ligandos [79]. Estas observaciones muestran que ALL puede ser usada en experimentos por citometría de flujo para la evaluación de las dinámicas de expresión de gpALL bajo nuestras condiciones experimentales.



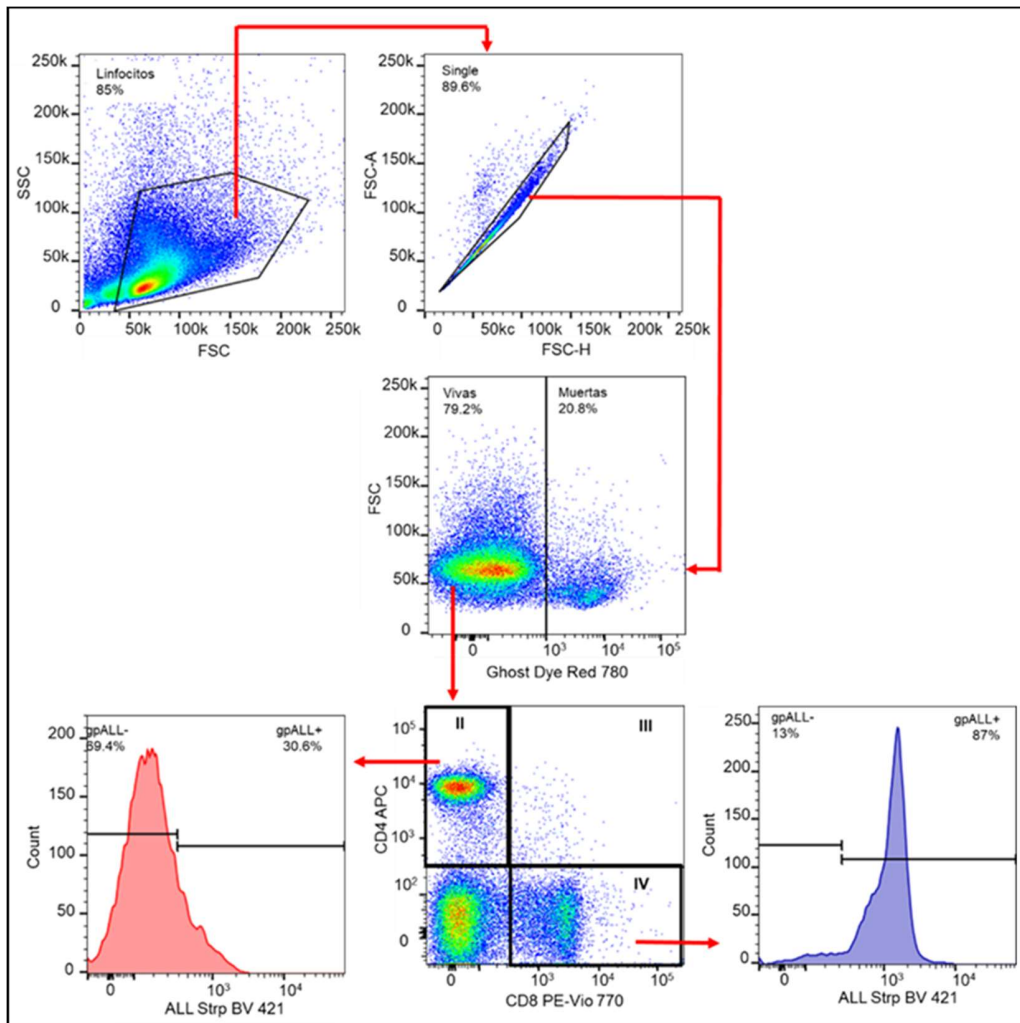
**Figura 19. Evaluación de la especificidad de ALL por linfocitos T.** Los Esplenocitos totales fueron marcados con ALL + Strp BV 421, o con ALL + Strp BV 421 + GalNAc 200mM o solo con Strp BV 421, luego las células fueron teñidas con Ghost Dye Red 780 y analizadas por citometría de flujo. Los linfocitos fueron seleccionados por las características FCS y SSC, selección celular por singles y exclusión de células muertas. El análisis se desarrolló usando FlowJo software V.10.6.2

Luego, nosotros evaluamos la cinética de expresión de gpALL en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> durante el estímulo. Esplenocitos cultivados en presencia de anti-CD3/CD28 durante 24, 48 y 72 h fueron marcados con ALL/ Strp BV 421, anti-CD4 APC, anti-CD8 APC Vio 770, teñidas con Ghost Dye Red 780 e inmediatamente analizadas por citometría de flujo. Los datos obtenidos fueron analizados bajo la siguiente estrategia: selección de células por sus características de tamaño granularidad, seguido de selección de Single Cells, posteriormente se excluyeron células no viables y finalmente fueron definidas las subpoblaciones CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) en los cuadrantes I, II, III y IV respectivamente. La expresión de gpALL se analizó sobre las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Figura 20)<sup>1</sup>.

La cinética de expresión de gpALL mostró que, el 30% de las células CD4<sup>+</sup> no estimuladas expresan en el fenotipo gpALL<sup>+</sup>. Tras la activación con anti-CD3/CD28 el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>gpALL<sup>+</sup> se duplica a las 24 h y continúa incrementando hasta alcanzar su máximo a las 48 h, donde un 90% de las células T CD4<sup>+</sup> expresan gpALL; a las 72 h posactivación se observa que el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>gpALL<sup>+</sup> disminuye hasta 80% (Figura 21 A, C). Contrariamente, el 88% de los linfocitos CD8<sup>+</sup> no activados son gpALL<sup>+</sup> y se mantienen así durante las siguientes 72 h con pequeñas variaciones (3-10%, Figura 21 B-C). Contrastando, encontramos que los niveles de expresión de gpALL (IMF) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y en CD8<sup>+</sup> aumenta 4.7 y 4.3 veces respectivamente tras 48 h de activación en comparación con las células no activadas, decreciendo 1.2 veces a las 72 h en las células CD4<sup>+</sup> y 1.5 veces en las células CD8<sup>+</sup> (Figura 21D).

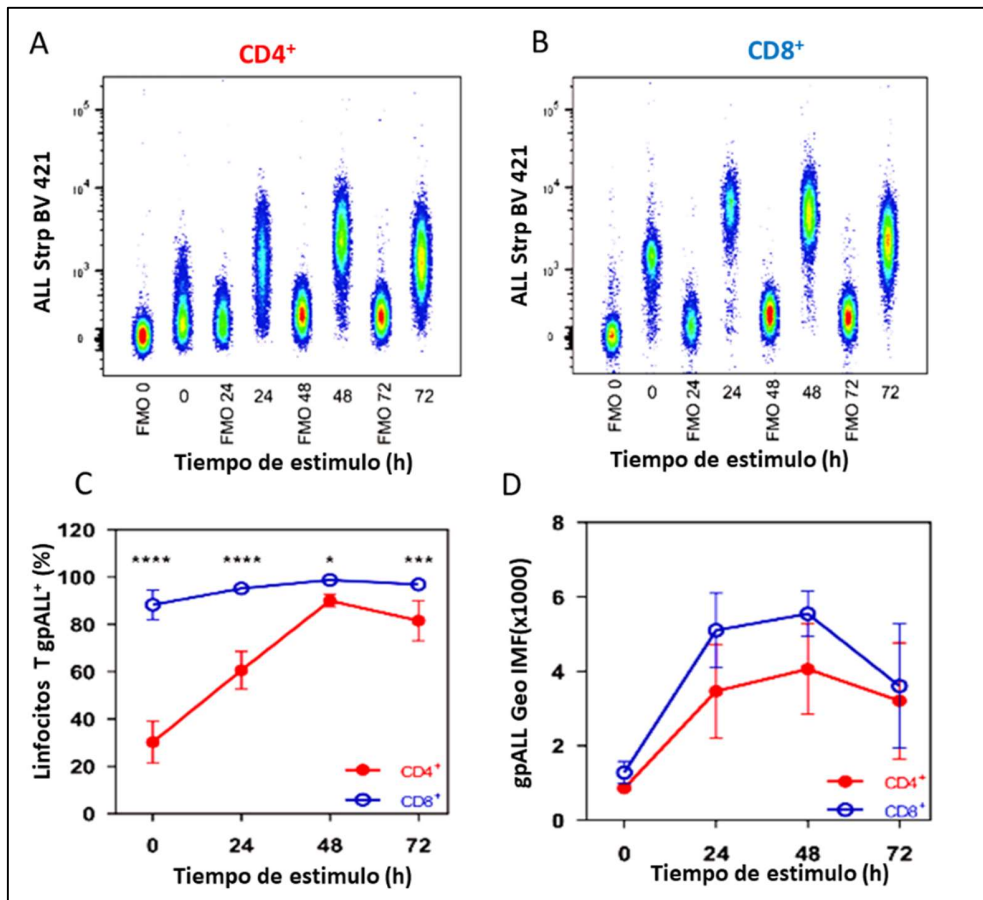
---

<sup>1</sup> Esta estrategia de análisis fue usada en los experimentos de fenotipificación por citometría de flujo descritos más adelante (moesina, CD69, CD25, CFSE).



**Figura 20. Estrategia de análisis de datos obtenidos por citometría de flujo.** Datos de citometría de flujo obtenidos a partir de esplenocitos marcados con anti-CD4 APC, anti-CD8 PE Vio 770, ALL + Strp BV 421, y teñidos con Ghost Dye Red 780. Para la estrategia de análisis los linfocitos T fueron definidos por sus características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC), luego se realizó una selección de single cells, seguido de una exclusión de células muertas mediante la selección de células no marcadas con Ghost Dye Red 780 y se definieron las subpoblaciones de interés CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> viables (cuadrante I y cuadrante IV respectivamente). Sobre cada subpoblación se analizó la expresión de gpALL.

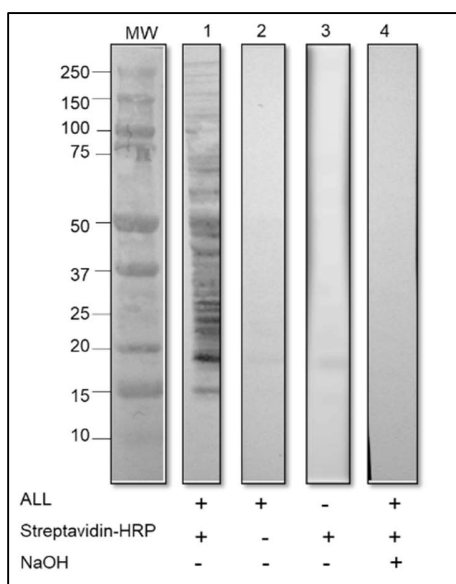
Estos resultados nos sugieren que tras el estímulo con anti-CD3/CD28, las gpALL se expresan de manera diferencial en células T, siendo una expresión constitutiva en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y una expresión inducida en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Con respecto a los niveles de expresión de gpALL, se observan dinámicas de expresión similares en ambas subpoblaciones celulares, sin embargo, estos resultados no permiten discriminar si todas las gpALL poseen la misma dinámica de expresión o si los resultados son consecuencia a un grupo solo de ellos.



**Figura 21.** ALL reconoce diferentes niveles de expresión de gpALL en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Esplenocitos murinos BALB/C fueron estimulados con anti-CD3/CD28 y cosechados a las 24h, 48h y 72h. Las células se tiñeron con anti-CD4, anti-CD8, ALL strp BV 421, Ghost Dye Red 780 e inmediatamente fueron analizadas por citometría de flujo. Los datos fueron analizados como previamente se describió. (A) CD4<sup>+</sup> y (B) CD8<sup>+</sup>; (C) porcentaje de células CD4<sup>+</sup>gpALL<sup>+</sup> y de células CD8<sup>+</sup>gpALL<sup>+</sup>; (D) IMF de gpALL en cada subpoblación. (A-B) Datos representativos, (C-D) datos de 2 experimentos diferentes con 3 ratones por grupo; los datos fueron analizados usando one-way ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparison test entre CD4<sup>+</sup>(círculos rojos) y CD8<sup>+</sup> (círculos azules) a los diferentes tiempos de cosecha. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021

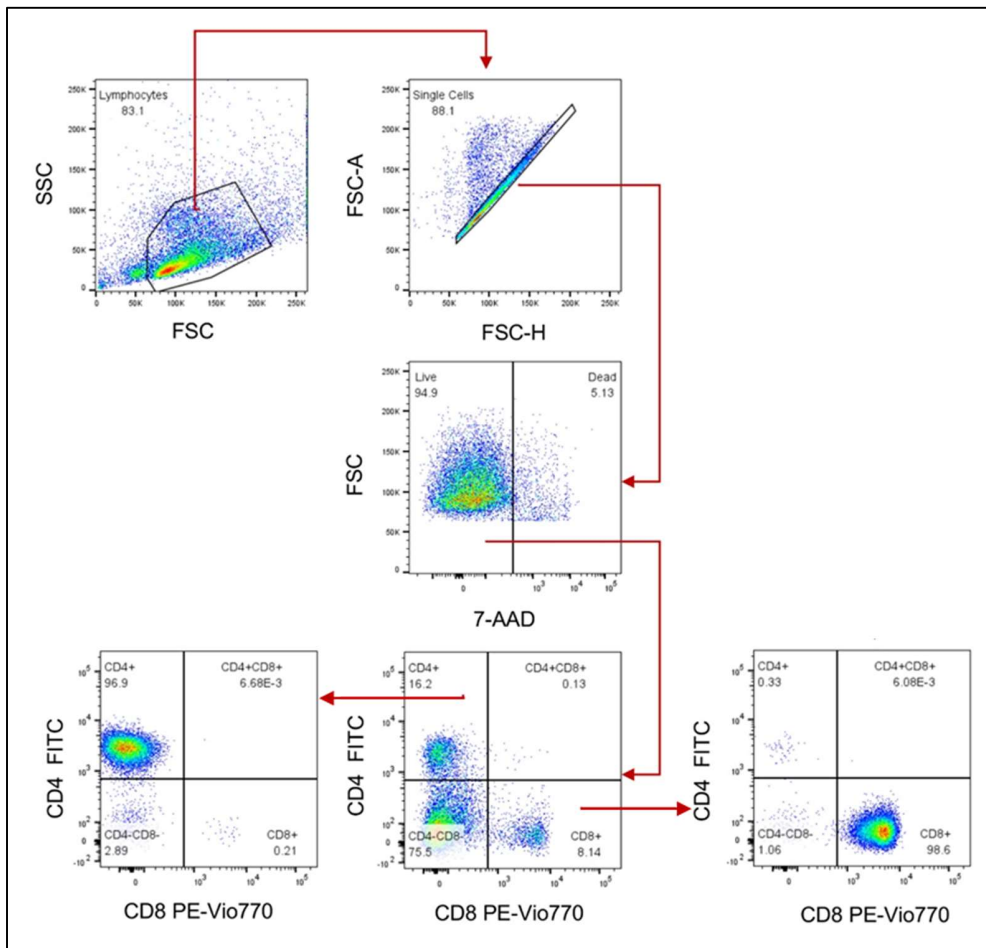
Con la finalidad de evaluar las diferencias en la expresión de gpALL en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras el estímulo con anti-CD3/CD28, desarrollamos experimentos de Lectin-Blot. Al igual que en los experimentos de citometría de flujo, primero validamos las condiciones de uso de ALL/Strp HRP utilizando extractos proteicos obtenidos a partir de esplenocitos estimulados por 48 h (Figura 22). Los resultados muestran 21 bandas en el Lectin-Blot con pesos moleculares que varían entre 15-250-kDa (carril 1), estas señales se pierden cuando la membrana es incubada solo con ALL en ausencia de Strp HRP o

viceversa (carril 2-3). Al realizar la remoción de los O-glicanos mediante una reacción de  $\beta$ -eliminación con NaOH (carril 4) [162], se observa pérdida en el reconocimiento de ALL. Estos resultados validan el uso de ALL en ensayos de identificación de glicanos del tipo *Gal* $\beta$ 1-3*GalNAc*-O- $\alpha$ -Ser/Thr por Lectin-Blot.



**Figura 22. Validación del uso de ALL en experimentos de Lectin-Blot.** Extractos proteicos fueron obtenidos de linfocitos totales estimulados por 48 h con anti-CD3/CD28. Las muestras fueron analizadas por Lectin-Blot usando ALL + Strp-HRP (carril 1), solo con ALL (carril 2), solo con Strp-HRP (carril 3), o tratadas con NaOH 0.005M para escindir los O-glicanos por reacción de  $\beta$ -eliminación seguido de una incubación con ALL + Strp-HRP (carril 4).

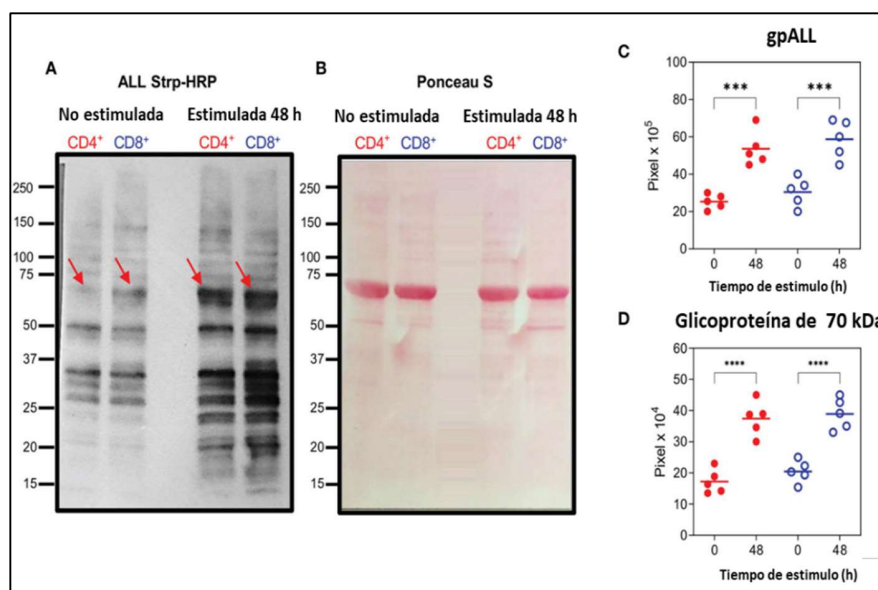
Teniendo validadas las condiciones y la especificidad de ALL en ensayos de Lectin-Blot, nosotros quisimos identificar los cambios en los patrones O-glicoprotéicos reconocidos por ALL en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras 48 h de activación; tiempo en el cual se observó mayor porcentaje de células gpALL<sup>+</sup> y mayor IMF para ambas subpoblaciones en los análisis previos de citometría de flujo (Figura 21). Para ello, esplenocitos fueron estimulados con anti-CD3/28 y cultivados por 48 h, luego células activadas y no activadas fueron marcadas con anti-CD4 Fitc, anti-CD8 PE vio 770 y teñidas con 7-AAD para exclusión de células muertas. Luego, las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron purificadas por Cell Sorting (Figura 23), posterior a la separación celular se realizó un análisis postsort para la determinación de la pureza celular, obteniendo un 96.9% y un 98.6% de pureza en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> respectivamente.



**Figura 23. Estrategia de Cell sorting y análisis de pureza postsort.** Esplenocitos frescos o estimulados con anti-CD3/CD28 fueron marcados con anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE Vio 770, y teñidos con 7-AAD y sorteados inmediatamente. Para la separación y purificación de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los esplenocitos fueron definidos por sus características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC), luego se realizó una selección de single seguido de una exclusión de células muertas mediante la selección de células no marcadas con 7-AAD. Las subpoblaciones de interés CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron definidas (cuadrante I y cuadrante IV respectivamente), separadas y colectadas en SFB, seguidamente se analizó un análisis de pureza de cada subpoblación enriquecida.

Luego, a partir de las células purificadas se obtuvieron extractos proteicos y fueron analizados por Lectin-Blot. Los resultados muestran la presencia de 7 bandas en extractos proteicos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> no activados y 15 bandas en extractos de células activadas CD4<sup>+</sup>. En linfocitos T CD8<sup>+</sup> se observa que el número de bandas pasa de 11 a 16 tras la activación; tanto en extractos de CD4<sup>+</sup> como en extractos de CD8<sup>+</sup> las bandas observadas varían entre 20-150 kDa (Figura 24A). Al comparar la intensidad acumulada de las gpALL en ambas subpoblaciones celulares observamos que después de la activación celular, los niveles de expresión de gpALL incrementan 1.1 veces linfocitos T

CD4<sup>+</sup> y 0.8 veces en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 24C). Estos resultados concuerdan con los resultados de citometría de flujo donde observamos un incremento en los niveles de expresión de gpALL en ambas subpoblaciones celulares en respuesta al estímulo anti-CD3/CD28 (Figura 21D). También se observa que el nivel de intensidad de cada banda reconocida por ALL es diferente para cada señal, lo que nos sugiere diferentes niveles de expresión de cada una de las gpALL en respuesta al estímulo.



**Figura 24. La O-glicosilación detectada por ALL incrementa en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en respuesta a la activación.** Extractos proteicos fueron obtenidos de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> separadas por cell sorting a partir de células no estimuladas o estimuladas por 48 h con anti-CD3/CD28. Las muestras fueron analizadas por Lectin-Blot usando ALL Strp HRP. **(A)** O-glicoproteínas reconocidas por ALL en extractos de células no estimuladas (Carril 1 y 2) o estimuladas (Carril 3 y 4), las flechas rojas indican la O-glicoproteína de 70 kDa reconocida por ALL y previamente reportada [92]; **(B)** Los perfiles de proteína transferidos a una membrana de PVDF y marcados con Ponceau S son mostrados como control de carga; **(C)** Cuantificación de la intensidad acumulada del número total de bandas por línea; **(D)** Cuantificación de la banda de 70 kDa reconocida por ALL. **A** y **B** corresponden a datos representativos de 5 experimentos diferentes. Los datos fueron analizados usando ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparison test entre células CD4<sup>+</sup> (círculos rojos) y CD8<sup>+</sup> (círculos azules); \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021

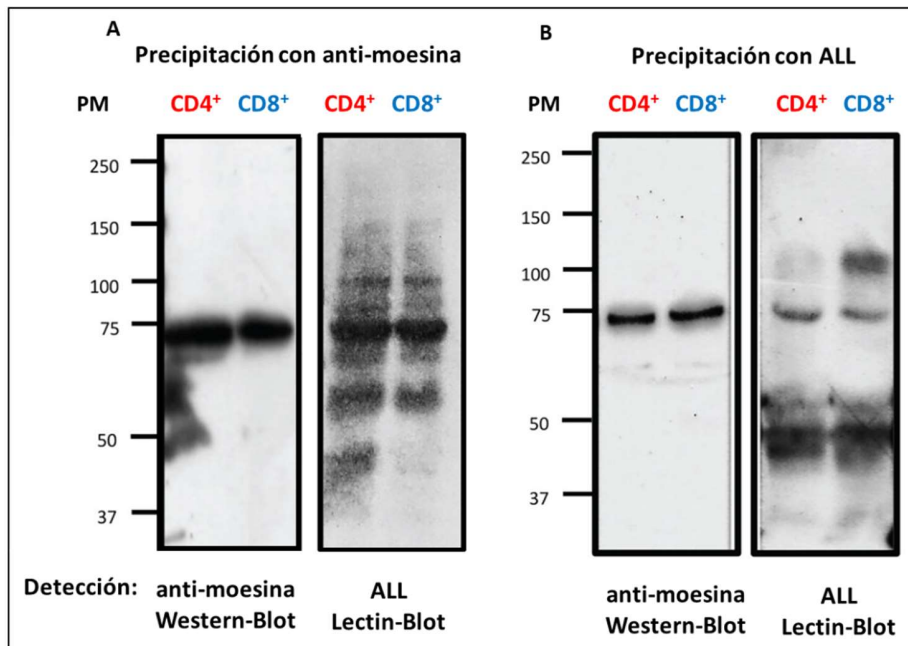
Nosotros nos interesamos por la señal en 70-kDa, que se expresa diferencialmente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y cuyo nivel de expresión incrementa 1.2 veces en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y 0.9 veces en las células CD8<sup>+</sup> tras la activación. Trabajos previos, habían identificado una O-glicoproteína de 70-kDa expresada en linfocitos T CD4<sup>+</sup> con homología del 40% con moesina [92], sin embargo, aún no se ha evidenciado en linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

#### 4.1.2 Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expresan de manera dinámica una forma O-glicosilada de moesina en respuesta al estímulo

Los resultados anteriores nos llevan a preguntarnos si la señal de 70-kDa observada en el Western-Blot de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> corresponde a la O-glicoproteína homologa a moesina, para ello usamos extractos proteicos obtenidos a partir de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimuladas por 48 h con anti-CD3/CD28 y purificadas por Cell Sorting como previamente fue descrito.

Los extractos obtenidos fueron utilizados en ensayos de precipitación y reconocimiento cruzado con anti-moesina y ALL/Strp HRP sin ser sometidos a condiciones desnaturalizantes. Primero, realizamos una inmunoprecipitación con anti-moesina, el producto obtenido fue analizado por Lectin-Blot utilizando ALL/Strp HRP y se realizó un Western-Blot con anti-moesina como control (Figura 25A). Los resultados mostraron de manera equivalente 5 bandas reconocidas por ALL en ambas subpoblaciones, con pesos molecular de 150, 100, 80, 70 y 60-kDa, y una banda adicional de 45-kDa expresada solo en las células CD4<sup>+</sup>; en ambos casos, la O-glicoproteína de 70-kDa fue la más prominente y su peso molecular concordó con la moesina observada en el Western-Blot control. Paralelamente nosotros realizamos una precipitación de glicoproteínas usando ALL y el precipitado fue analizado por Western-Blot con anti-moesina, y se realizó un Lectin-Blot con ALL/Strp-HRP como control. Los resultados mostraron que anti-moesina reconoce una única banda de 70-kDa inmunoprecipitada con ALL, sin embargo, en el control, se observan 5 bandas reconocidas por ALL en células CD4<sup>+</sup> y 4 en células CD8<sup>+</sup>, entre las que se incluye la señal a 70-kDa que concuerda con el Western-Blot (Figura 25B). Estos resultados sugieren que ALL reconoce en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> una forma O-glicosilada de moesina (O-moesina) aun no descrita en la literatura.

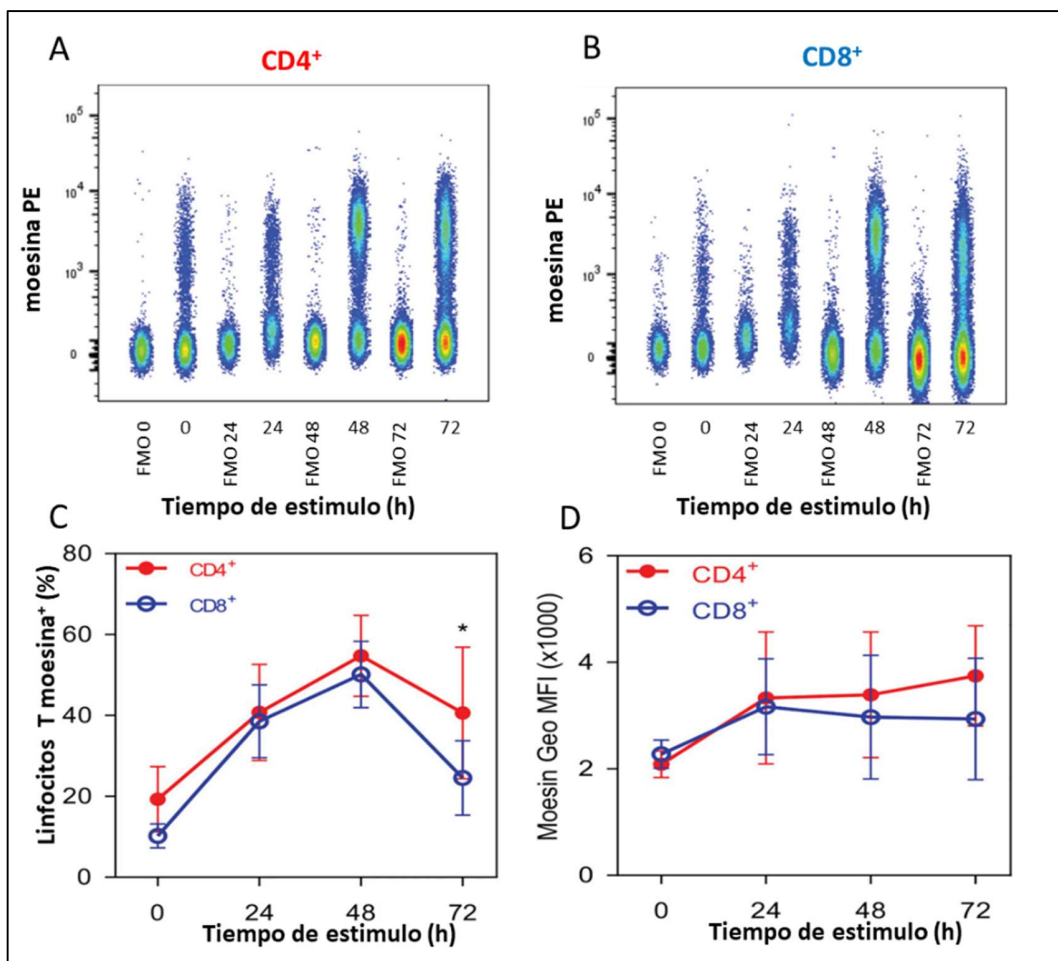




**Figura 25. O-moesina es una O-glicoproteína de 70-kDa reconocida por ALL en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.** Extractos proteicos fueron obtenidos de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> separadas por Cell Sorting a partir de esplenocitos estimulados por 48 h con anti-CD3/CD28, seguidamente se obtuvieron precipitados usando un sistema de perlas magnéticas con **(A)** anti-moesina o **(B)** ALL, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por Western-Blot con anti-moesina (A y B panel izquierdo) o por Lectin-Blot con ALL (A y B panel derecho) respectivamente. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021

Teniendo en cuenta que la banda en 70-kDa cambia su intensidad en respuesta a la activación celular por 48 h (Figura 24D), nosotros evaluamos si la cinética de expresión de moesina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> utilizando anti-moesina también cambia. Para ello, esplenocitos fueron cultivados en presencia de anti-CD3/CD28 por 24, 48 y 72 h, posteriormente las células fueron marcadas con anti-CD4 APC, anti-CD8 PerPE Vio 770 y con anti-moesina PE e inmediatamente las células fueron analizadas por citometría de flujo. Los resultados muestran que 19.2% de las células CD4<sup>+</sup> no activadas expresan el fenotipo moesina<sup>+</sup>, este porcentaje se duplica a las 24 h de estímulo y alcanza el 54.8% a las 48 h, posteriormente el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>moesina<sup>+</sup> decrece hasta el 40.2% a las 72 h (Figura 26). En CD8<sup>+</sup>, el 10.25% de las células no estimuladas son moesina<sup>+</sup>, tras la activación por 24 h este porcentaje se incrementa hasta el 38.5% y sigue aumentando hasta el 50.2% a las 48 h posactivación; luego se observa una disminución hasta el 24.5% en las células CD8<sup>+</sup>moesina<sup>+</sup> a las 72 h (Figura 26). Al analizar la IMF de moesina encontramos que, los niveles de expresión de moesina en membrana celular

alcanzaron su máximo a las 72 h en las células CD4<sup>+</sup> con un aumento de 1.8 veces en comparación con las células no estimuladas; en CD8<sup>+</sup>, se evidenció un máximo en la IMF a las 24 h, con un aumento de 1.4 veces en comparación con las células no estimuladas (Figura 26). Estos resultados nos sugieren que la expresión de moesina en la membrana de ambas subpoblaciones es inducible tras la activación y el porcentaje de expresión se comporta de manera similar en ambas subpoblaciones, pero los niveles de expresión se comportan de manera diferencial entre ambas subpoblaciones.



**Figura 26. Dinámica de expresión de moesina en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.** Esplenocitos murinos BALB/C fueron estimulados, cosechados, teñidos y analizados como se describió previamente. Análisis representativo de la expresión de moesina en (A) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y (B) CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>; (C) Porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y (B) CD4<sup>-</sup>moesina<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>moesina<sup>+</sup>; (D) Niveles de expresión de moesin. (A-B) Datos representativos de 2 experimentos diferentes con 3 ratones por grupo, los datos fueron analizados usando one-way ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparison test entre CD4<sup>+</sup> (círculos rojos) y CD8<sup>+</sup> (círculos azules) a los diferentes tiempos de cosecha. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021.

### 4.1.3 Thr<sup>558</sup> en moesina tiene una alta probabilidad de ser un sitio O-glicosilable

Moesina ha sido descrita como una proteína intracelular y a la fecha no se ha caracterizado la presencia de porciones glicosídicas en su estructura. Con el objetivo de evaluar la existencia de posibles sitios de O-glicosilación en moesina, nosotros sometimos la secuencia de aminoácidos UniPotKB P26041 (MOES\_MOUSE) a un análisis bioinformático utilizando el *Software NetOGlyc 4.0*. Los resultados mostraron que en la estructura primaria de moesina tiene en total 22 sitios potencialmente Ser/Thr O-glicosilables con una probabilidad superior al 50 %. En el dominio FERM (aminoácidos en color rojo, Figura 27) solo Thr<sup>66</sup> puede ser O-glicosilado con una probabilidad del 51%, en el dominio central (aminoácidos en color amarillo, Figura 27) hay 13 sitios con probabilidades de ser O-glicosilados (Thr<sup>358</sup>, Thr<sup>369</sup>, Ser<sup>384</sup>, Ser<sup>407</sup>, Thr<sup>413</sup>, Ser<sup>419</sup>, Ser<sup>429</sup>, Ser<sup>440</sup>, Thr<sup>459</sup>, Thr<sup>465</sup>, Ser<sup>468</sup>, Thr<sup>469</sup>, Ser<sup>504</sup>) y en el dominio característico de moesina (aminoácidos en color azul, Figura 27) existen 8 posiciones potencialmente glicosilables, Thr<sup>509</sup>, Thr<sup>510</sup>, Thr<sup>526</sup>, Ser<sup>527</sup>, Ser<sup>536</sup>, Thr<sup>539</sup>, Thr<sup>558</sup> y Thr<sup>567</sup>. Los aminoácidos Thr<sup>369</sup>, Thr<sup>465</sup>, Ser<sup>468</sup>, Thr<sup>469</sup>, Thr<sup>539</sup>, Thr<sup>558</sup> tienen la mayor probabilidad de ser O-glicosilados con un 87%, 81%, 93%, 95%, 84% y 89% respectivamente. Nos llama la atención que Thr<sup>558</sup> sea uno de los aminoácidos con mayor probabilidad de ser O-glicosilado, pues se ha reportado que este aminoácido es fundamental para los procesos de fosforilación que regulan la activación/inhibición de moesina en citosol. Estos resultados nos sugieren la posible participación de Thr<sup>558</sup> en la glicosilación de moesina.

123	MPKTISVRVT	TMDAELEFAI	QPNTTGKQLF	DQVVKTIGLR	EVWFFGLQYQ	DTKAFSTWLK	60
	↓51%						
612	LNKKVTAQDV	RKESPLLKFK	RAKFYPEDVS	EELIQDITQR	LFFLQVKEGI	LNDDIYCPEE	120
121	TAVLLASYAV	QSKYGDFNKE	VHKSGYLAGD	KLLPQRVLEQ	HKLNKDQWEE	RIQVWHEEHR	180
181	GMLREDAVLE	YLKIAQDLEM	YGVNYFSIKN	KKGSELWLGV	DALGLNIYEQ	NDRLTPKIGF	240
241	PWSEIRNISF	NDKKFVIKPI	DKKAPDFVfy	APRLRINKRI	LALCMGNHEL	YMRRRKPDIT	300
						↓57%	
301	EVQOMKAQAR	EEKHQKQMER	ALLENKKKR	ELAEKEKEKI	EREKEELMEK	LKQIEEQTKK	360
	↓87%		↓69%		↓65%	↓64%	↓62%
361	AQQELEECITR	RALELEQERK	RAQSEAEKLA	KERQEAEAK	EALLQASRDO	KKTQEQLASE	420
	↓64%	↓66%		52%↓	81%↓	95%↓	
421	MAELTARISQ	LEMARKKES	EAVEWQQKAQ	MVQEDLEKTR	AELKTA MSTP	HVAEPAENEH	480
		54%↓	64%↓	81%↓	93%↑	72%↓	84%↓
481	DEQDENGAEA	SAELRADAMA	KDRSEEERTT	EAEKNERVQK	HLKALTSELA	NARDESKHTA	540
		84%↓	58%↓		67%↑	76%↑	
541	NDMIHAENMR	LGRDKYKTLR	QIRQGNTKQR	IDEFESM			577

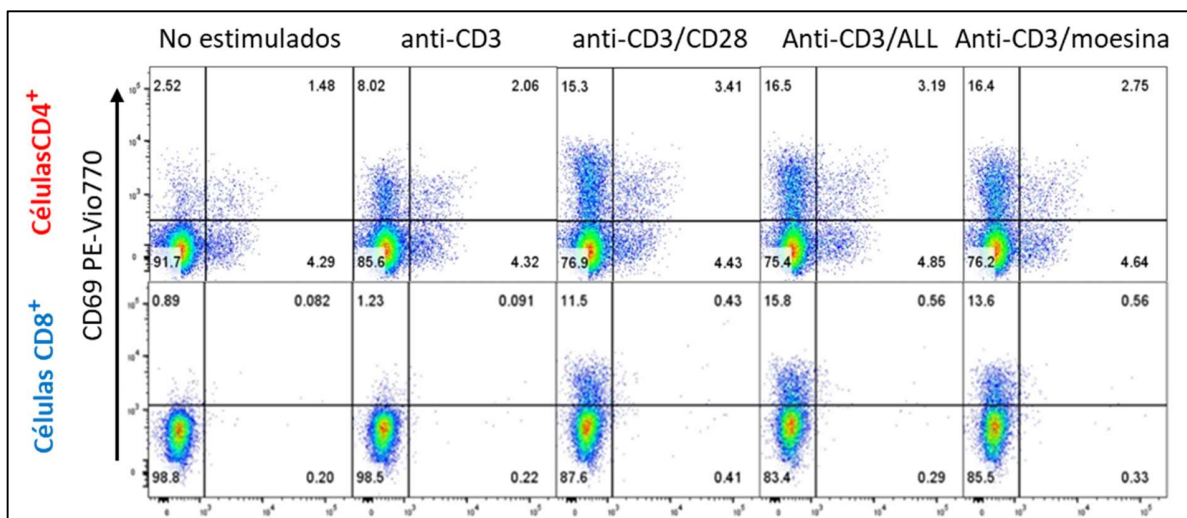
**Figura 27. Predicción de sitios de O-glicosilación en la proteína moesina P26041 (UniProt).** La secuencia de aminoácidos de moesina P26041 (MOES\_MOUSE) fue analizada usando *O-Gly Net 2,0* para determinar sitios posibles de O-glicosilación, en rojo región FERM, en verde región central, morado región Moesina. Las flechas indican los aminoácidos con probabilidad superior al 50 % de ser O-glicosilados, los cuadros rojos demarcan los sitios con probabilidad superior al 80 %, los porcentajes indican la probabilidad de ser O-glicosilados en cada posición. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021.

#### 4.1.4 O-moesina se perfila como una molécula coactivadora que induce una respuesta similar a CD28

Trabajos previos mostraron que, ALL induce una señal coestimuladora en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de manera similar a CD28; sin embargo, se desconoce si esta señal se da a través de O-moesina. Para abordar esto, linfocitos T purificados fueron teñidos con CFSE, cultivados y estimulados con anti-CD3/moesin o con anti-CD3/CD28 o con anti-CD3/ALL. Luego las células fueron cosechadas, marcadas y analizadas por citometría de flujo. Los anticuerpos y moléculas utilizadas fueron Ghost Dye Red 780 como marcador de células no viables, anti-CD4 APC, anti-CD8 PerCP Vio 700, anti-CD69 PE Vio 770 y con anti-CD25 PE, estos dos últimos como marcadores de activación temprana y tardía respectivamente. Los datos fueron procesados como previamente se describió.

Los resultados muestran que tras 6 h de estímulo con anti-CD3/CD28 el 15.3 % de las células CD4<sup>+</sup> y el 11.5 % de las células CD8<sup>+</sup> expresan el marcador temprano de activación CD69 (Figura 28, columna 3). En las células estimuladas con anti-

CD3/moesina, se observa que el 16.4% de las células CD4<sup>+</sup> y el 13.6 % de las células CD8<sup>+</sup> expresan CD69 y con el estímulo anti-CD3/ALL, el 16.4 % de las células CD4<sup>+</sup> y 15 % el CD8<sup>+</sup> son CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Figura 28, Columnas 3 y 4). Cuando las células T son estimuladas únicamente con anti-CD3 solo el 8 % de las células CD4<sup>+</sup> y el 1.23 % de las células CD8<sup>+</sup> expresan el fenotipo de activación temprana CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Figura 28, Columnas 2), este porcentaje decrece casi a cero cuando las células son estimuladas sin la presencia de anti-CD3, pero si con anti-moesina o con anti-CD28 o con ALL (datos no mostrados). Estos resultados nos indican que las células responden a la activación temprana con anti-CD3/moesina de manera similar a la anti-CD3/CD28.

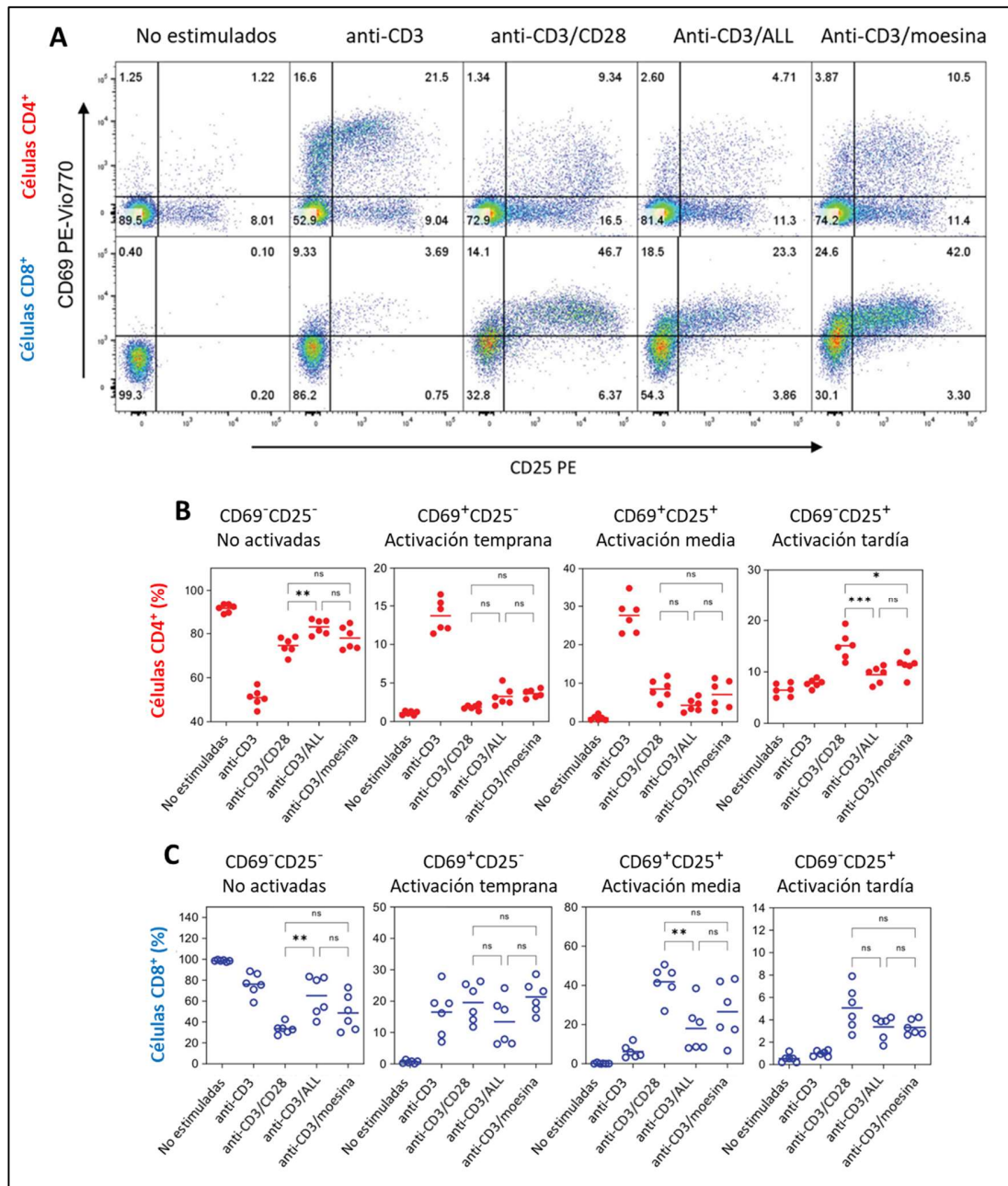


**Figura 28.** La estimulación a través de moesina induce la expresión de CD69 desde las primeras horas de activación. Esplenocitos fueron sometidos a separación por selección negativa. Las células purificadas fueron estimuladas con anti-CD3 solo o en presencia de anti-CD28 (anti-CD3/CD28) o anti-moesina (antiCD3/moesina) o ALL (anti-CD3/ALL) y colectadas después de 6 h, seguidamente las células fueron marcadas con anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-CD25, Ghos Dye Red 780 y analizadas por citometría de flujo. La estrategia de análisis se desarrolló como se describió previamente. Análisis representativo de la expresión de los patrones de expresión de CD69 y CD25 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras 6 h de estímulo, datos representativos de 2 experimentos independientes con tres animales por grupo.

Para determinar si la respuesta al estímulo con anti-CD3/moesina se mantiene en el tiempo, evaluamos la expresión de CD69 y CD25 a las 72 h posactivación (Figura 29). Los resultados muestran que, en células CD4<sup>+</sup> tras el estímulo con anti-CD3/CD28, con anti-CD3/ALL o con anti-CD3/moesina, el fenotipo de activación temprana (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) es expresado por el 1.34 %, el 2.60 % y por el 3.87 % respectivamente (Figura 29B). Al

analizar la activación media encontramos que, el 9.35 %, 4.71 % y el 10.5 % de las células CD4<sup>+</sup> activadas con anti-CD3/CD28, con anti-CD3/ALL o con anti-CD3/moesina respectivamente expresan el fenotipo CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Figura 29B). Finalmente, el fenotipo de activación tardía CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> es expresado por el 16.5 %, 11.3 % y 11.4 % de las células estimuladas con anti-CD3/CD28, con anti-CD3/ALL y con anti-CD3/moesina respectivamente (Figura 29B).

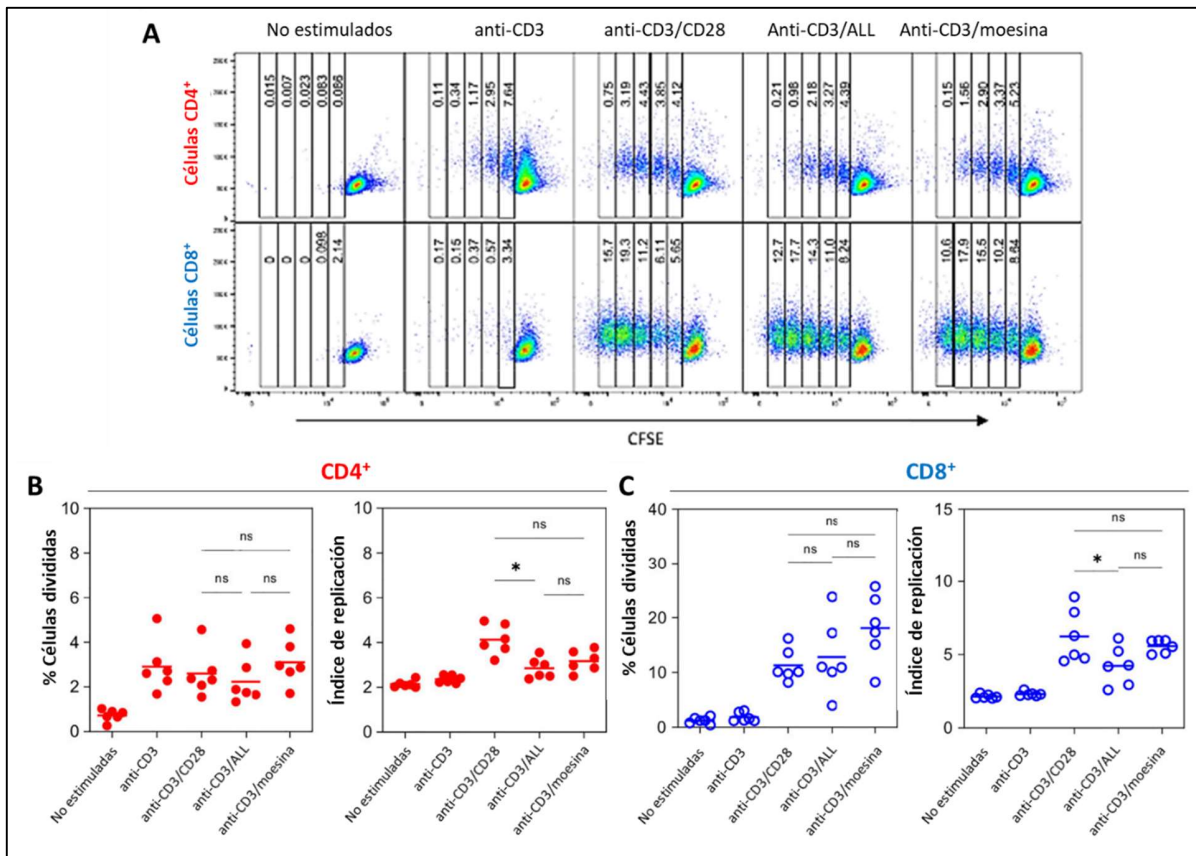
En las células CD8<sup>+</sup> tras 72 h de activación los fenotipos CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> son expresados por el 24.6 %, 42.0 % y 3.30 % de las células activadas con anti-CD3/moesina, lo que contrasta con el 14.1%, 46.7% y con el 6.37 % (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) de las células CD8<sup>+</sup> estimuladas con anti-CD3/CD28 (Figura 29C). En el caso de las células CD8<sup>+</sup> estimuladas con anti-CD3/ALL encontramos que el 18.5 % son células CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, el 23.3 % son CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y el 3.86 % son CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (Figura 29C). Estos resultados nos sugieren que la coestimulación mediada por anti-moesina tiene la capacidad de iniciar, mantener y prolongar la activación de manera comparable con la coestimulación a través de CD28.



**Figura 29. Moesina induce la coestimulación celular y la expresión de marcadores de activación en los linfocitos T de manera prolongada.** Esplenocitos fueron sometidos a separación por selección negativa para la obtención de células T. Las células purificadas fueron estimuladas con anti-CD3 solo o en presencia de anti-CD28 (anti-CD3/CD28) o anti-moesina (antiCD3/moesina) o ALL (anti-CD3/ALL) y colectadas después de 72 h, seguidamente las células fueron marcadas con anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-CD25, Ghos Dye Red 780 y analizadas por citometría de flujo. La estrategia de análisis se desarrolló como se describe en la figura 1. **(A)** Análisis representativo de la expresión de los patrones de expresión de CD69 y CD25 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los gates indican 4 estados de activación CD69<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (no activadas), CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (activación temprana), CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (activación media), CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (activación tardía). Datos representativos de 2 experimentos independientes con tres animales por grupo; **(B)** Porcentaje de células en cada estado de activación bajo diferentes condiciones; los datos fueron analizados usando one-way ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparison test entre las condiciones indicadas. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021.

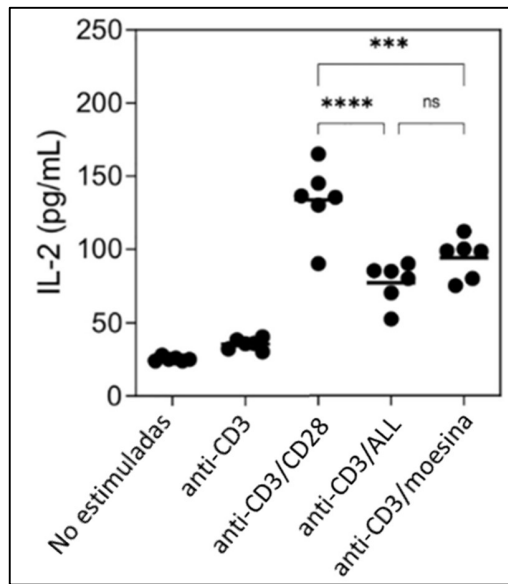
Un segundo parámetro que ayuda a determinar la eficacia del estímulo es la proliferación celular, el cual es un evento que se produce en respuesta a una señal de estimulación constante y prolongada que conduce a la división celular [167]. Con el objetivo de evaluar la capacidad del estímulo anti-CD3/moesina para inducir la proliferación celular, hemos analizado la dilución de la fluorescencia del CFSE en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras 72 h de activación, como un indicador la división celular [168]. Los resultados muestran que 3.1 % de las células CD4<sup>+</sup> y el 18 % de las células CD8<sup>+</sup> se dividen al menos una sola vez, alcanzando 4 y 5 divisiones respectivamente; estos resultados son similares al estimular las células con anti-CD3/CD28 o con anti-CD3/ALL (Figura 30). Al analizar el índice de replicación observamos que en ambas subpoblaciones el estímulo con anti-CD3/CD28 es ligeramente más eficiente en comparación con las células estimuladas con anti-CD3/moesina y anti-CD3/ALL (Figura 30 B-C). Cuando las células son estimulas solo con anti-CD3, la proliferación en ambas subpoblaciones celulares disminuye. Estos resultados nos sugieren que la coseñalización a través de O-moesina se mantiene en el tiempo induciendo la proliferación celular de los linfocitos T, pero ligeramente menos intensa en comparación con la respuesta al estímulo anti-CD3/CD28.





**Figura 30. Moesina induce la proliferación celular en los linfocitos T.** La proliferación celular fue analizada en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> después de la estimulación con cada condición. **(A)** Patrones de proliferación en las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, datos representativos de 2 experimentos independientes con tres animales por grupo; **(B-C)** Según se indica porcentaje de células divididas e índice de replicación (número total de células divididas/ número de células que entraron en división) en células CD4<sup>+</sup> (B) y células CD8<sup>+</sup> (C). Los datos fueron analizados usando one-way ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparison test entre las condiciones indicadas. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021

La IL-2 ha sido descrita como una molécula clave en el desarrollo de la activación y homeostasis de las células T, siendo este el tercer parámetro para evaluar la eficiencia en la señalización a través de CD3/moesina [169]. Células T purificadas fueron cultivadas en presencia de los diferentes estímulos, tras 48 h el sobrenadante fue colectado para cuantificar la concentración de IL-2 soluble por ELISA. Los resultados obtenidos muestran que, la concentración de IL-2 en las células T estimuladas con anti-CD3/moesina fue de 91.33 pg/mL, 3.7 veces más que las células no estimuladas y 1.4 veces menos que las células estimuladas con anti-CD3/CD28 donde la concentración de IL-2 soluble fue de 133.9 pg/mL. También encontramos una concentración 77.26 pg/mL de IL-2 en el sobrenadante de las células estimulas con anti-CD3/ALL (Figura 31).



**Figura 31. La coestimulación a través de moesina induce la producción de IL-2 en linfocitos T.** Células T obtenidas por separación negativa fueron estimuladas con anti-CD3 solo o en presencia de anti-CD28 (anti-CD3/CD28) o anti-moesina (antiCD3/moesina) o ALL (anti-CD3/ALL) por 48h, después los sobrenadantes fueron colectados y la concentración de IL-2 soluble fue determinada por ELISA. Los datos fueron analizados usando one-way ANOVA seguido de Bonferroni's multiple comparison test entre las condiciones indicadas. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001. Datos publicados en Gómez-Henao W, 2021

En general, estos resultados sugieren que la coestimulación a través de la O-moesina conduce a la activación y a la proliferación de células T, de manera similar a lo observado con el coestímulo clásico CD28, lo que perfila a O-moesina y a la señal inducida a través de ella como factores importantes dentro de los procesos de activación de las células T, que podrían ser un potencial blanco terapéutico para la manipulación de la activación de la respuesta inmune.

## 4.2 Tema dos: *Mecanismo de internalización de HS-3S en células HEK y su papel durante la formación de oligo-tau*

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta la calidad de vida de millones de personas cada año. Se ha observado que los síntomas característicos de la enfermedad pueden aparecer a edades muy tempranas, pero los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo de la enfermedad aun no son del todo claros. Se ha evidenciado la acumulación anormal de los HS al interior de las neuronas como una característica fisiopatológica de la enfermedad. En este capítulo utilizamos células HEK que expresan HS3ST2 y tau como un modelo para comprender la participación de HS-3S en el desarrollo de la EA. Nuestros resultados sugieren que los HS-3S son internalizados mediante endocitosis dependiente de caveolina, además nosotros mostramos como la acumulación intracelular de HS-3S induce la formación de oligo-tau, como uno de los procesos que preceden el desarrollo de la enfermedad.

➤ **Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar los niveles de expresión de HS-3S y de tau en las células HEK transfectadas con *HS3ST2* y con *MAPT*.
- ✓ Determinar si la presencia de HS-3S induce la formación de oligo-tau
- ✓ Determinar si la endocitosis es el mecanismo de internalización de HS-3S
- ✓ Determinar la expresión de HS-3S y de HS totales en un modelo murino *KO HS3ST2*<sup>-/-</sup>

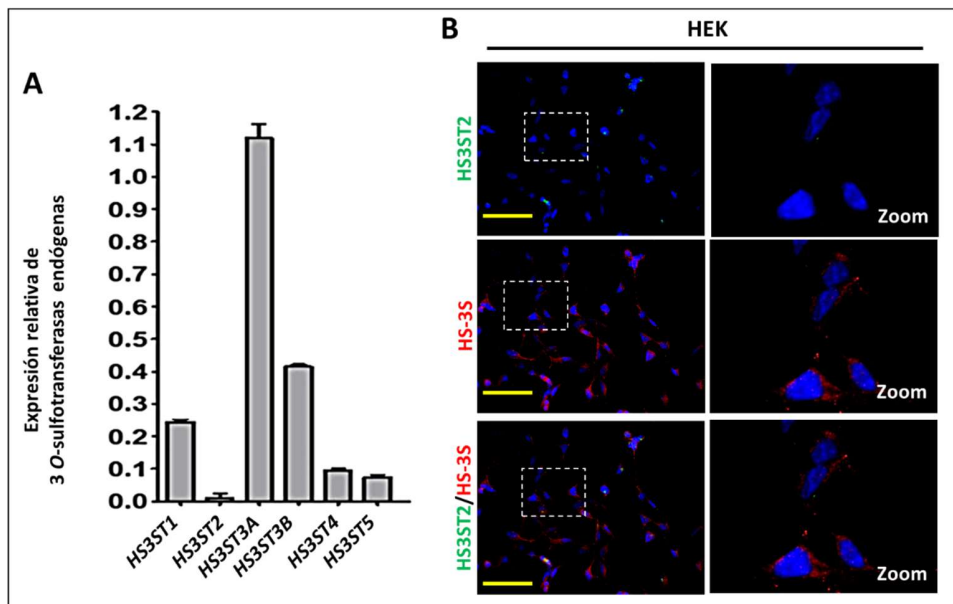
Parte de los resultados presentados fueron publicados en: M. B. Huynh, N. Rebergue, H. Merrick, **W. Gomez-Henao**, E. Jospin, D. S. F. Biard & D. Papy-Garcia. **HS3ST2 expression induces the cell autonomous aggregation of tau**. *Sci Rep* 12, 10850 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13486-6>. (ver artículos publicados).

#### 4.2.1 Caracterización de HS3ST2 y HS-3S en las células HEK

Durante la neurodegeneración causada por algunas taupatías [39], los HS-3S se expresan y se acumulan al interior de las células neuronales [135]. Esta acumulación ha sido incluso propuesta como un marcador postmortem para el diagnóstico molecular de la EA [170]. Previos trabajos han evidenciado la participación de HS3ST2 dentro de los procesos moleculares y celulares que conducen a la fosforilación anormal de la proteína tau [46]. Sin embargo, aún se desconoce el rol de los HS-3S y los mecanismos que gobiernan su participación en el desarrollo de la enfermedad. Para el estudiar el papel de HS-3S en EA, nosotros hemos usamos células HEK293 (HEK), una línea celular utilizada como modelo neuronal que se caracteriza porque no expresa tau [158, 171].

Nuestro primer objetivo fue evaluar los niveles de expresión génica de sulfotransferasas en células HEK mediante RT-qPCR. Los resultados mostraron que, *HS3ST1*, *HS3ST3A* y *HS3ST3B* se expresan mayoritariamente con un nivel de expresión relativo de 0.25, 1.15 y 0.42 respectivamente, y en menor proporción las *HS3ST4* y *HS3ST5* con un nivel relativo de 0.1, 0.8 respectivamente. Nos llama la atención que la enzima *HS3ST2* presentan un nivel de expresión casi nulo con un valor relativo <0.05 (Figura 32A).

Para corroborar los resultados anteriores, nosotros desarrollamos un ensayo de microscopia de fluorescencia donde evaluamos la expresión de HS3ST2 (rojo) y de HS-3S (verde). Los resultados corroboran la ausencia en la expresión HS3ST2 en las células HEK, pero se observa la presencia de HS-3S alrededor de la membrana celular (Figura 32B); esto concuerda con reportes donde se ha descrito bajos niveles de HS-3S en la membrana celular y en la matriz extracelular bajo condiciones fisiológicas normales [172]. Estos resultados sugieren que las células HEK no expresan HS3ST2 de manera basal y que la expresión de HS-3S observada es producto de las demás HS3STs.



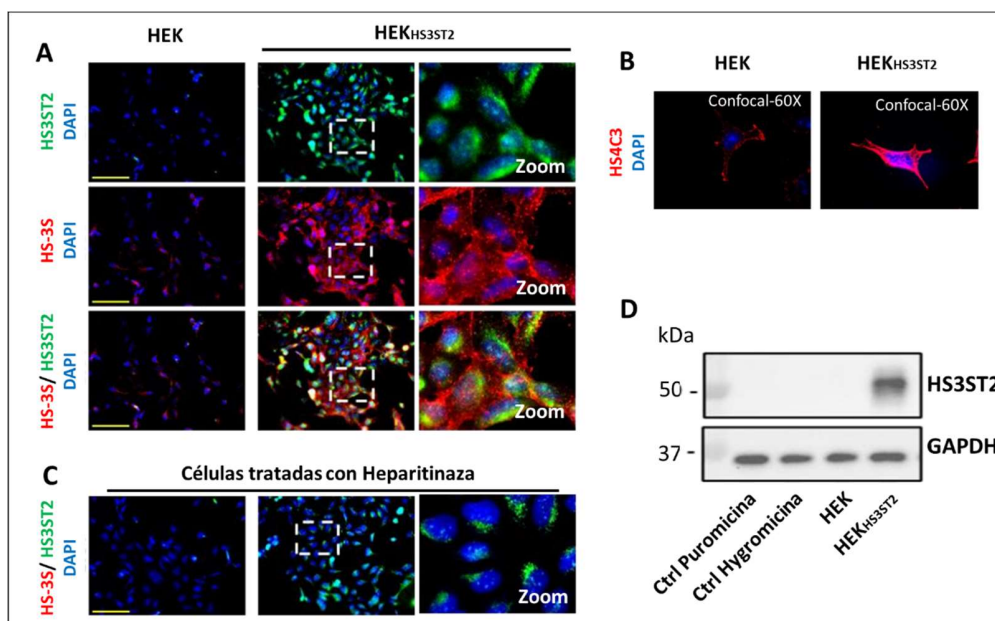
**Figura 32. Determinación de los niveles de expresión de HS3ST2 y de HS-3S en células HEK.** (A) Análisis de la expresión génica de diferentes HS3STs en células HEK. La expresión génica relativa se normalizó con B2M y RPL37A, se representan los valores medios  $\pm$  SD (n = 3); (B) Células HEK cultivadas por 40 día fueron marcadas con ab HS4C3 (rojo) y con anti-HS3ST2 (verde), las células se contrastaron con DAPI para visualizar los núcleos (azul), para cada imagen realizó un zoom de las regiones señaladas donde se observa el contraste con HS-3S y/o con HS3ST2. Las imágenes fueron adquiridas por un microscopio Olympus IX81 (ampliación 20x), la barra de escala es de 100  $\mu$ m. Datos publicados en Huynh MB, 2022.

#### 4.2.2 Células HEK<sub>HS3ST2</sub> incrementan la expresión y acumulación intracelular de HS-3S

Con el fin de estudiar el rol de los HS-3S en el desarrollo de la taupatia, nosotros desarrollamos líneas celulares a partir de HEK que expresaran HS3ST2 y tau solo o en conjunto. Primero, transfectamos células HEK con el plásmido pEBV replicativo que lleva la secuencia que codifica el HS3ST2 humano completo (HEK<sub>HS3ST2</sub>). Luego, las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 75% en presencia de puromicina y/o hygromicina para selección de células HEK<sub>HS3ST2</sub>. Finalmente, analizamos la expresión de HS3ST2 y HS-3S por Western-Blot y por microscopía de fluorescencia (anti-HS3ST2, verde y ab HS4C3, rojo; Figura 33).

Los análisis de microscopía y de Western-Blot, evidencian un incremento en la expresión de HS3ST2 en las células HEK<sub>HS3ST2</sub> en comparación con las células HEK (Figura 33 A, D). Por microscopía de fluorescencia, también observamos un incremento en los niveles

de HS-3S en las células HEK<sub>HS3ST2</sub> en comparación con las células HEK, tanto en la membrana celular como al interior de las células HEK<sub>HS3ST2</sub>, donde los HS-3S se acumulan de manera similar a la fisiopatología de la EA (Figura 33B). Como control de especificidad del ab HS4C3 en los ensayos de microscopia, nosotros tomamos células HEK<sub>HS3ST2</sub> y las pretratamos con una mezcla enzimática de heparitinasa I, II y III para remover los HS presentes antes del inmunomarcaje, los resultados muestran que la señal de ab HS4C3 se pierde totalmente, pero el reconocimiento de HS3ST2 no se ve afectado (Figura 33C).

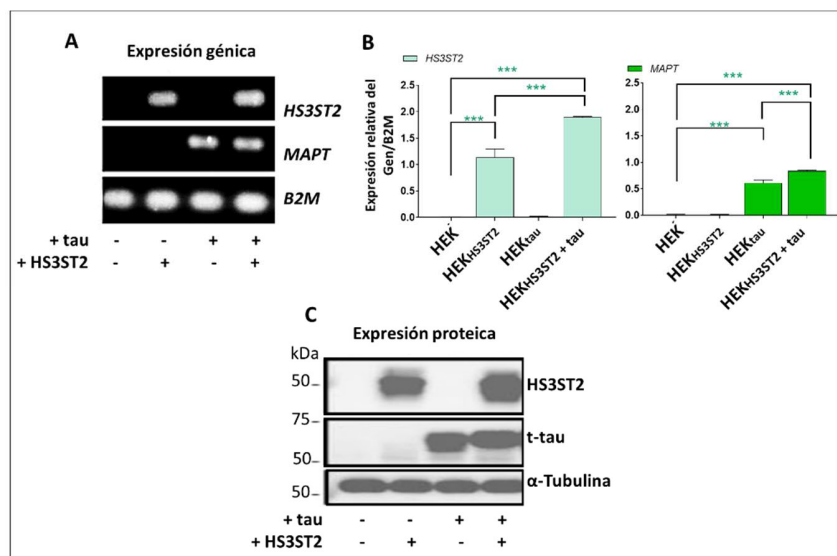


**Figura 33. Las células HEK<sub>HS3ST2</sub> expresan y acumulan HS-3S intracelular.** Células HEK fueron transfectadas como se indicó. Las células fueron cosechadas y marcadas con ab HS3C3 (rojo), anti-HS3ST2 (verde) y con DAPI (Azul) para visualizar los núcleos. **(A)** ICC de HS3ST2 y HS-3S en células HEK (columna 1) y en células HEK<sub>HS3ST2</sub> (columna 2), la columna 3 corresponde a un zoom de la región demarcada en las células HEK<sub>HS3ST2</sub>; **(B)** Imágenes de microscopia confocal de ICC con el ab HS4C3; **(C)** Control de especificidad de ab HS4C3 en células tratadas con heparitinasa; **(D)** Inmunotransferencia de la proteína HS3ST2 utilizando GAPDH como control de carga (lisados de células RIPA). En A Las imágenes fueron adquiridas por un microscopio Olympus IX81, en A la barra de escala es de 100  $\mu$ m con ampliación 20x, en B aumento de 60x. Datos publicados en Huynh MB, 2022.

### 4.2.3 Tau y HS3ST2 no inducen recíprocamente su expresión

Con el objetivo de comprender la relación entre tau y HS3ST2 durante el desarrollo de EA, nosotros desarrollamos dos nuevas líneas celulares. Primero células HEK fueron transfectadas con *MAPT* (tau humana) de longitud completa para generar HEK<sub>tau</sub>, luego se desarrolló una segunda línea doblemente transfectada que expresara de manera simultánea tau y HS3ST2 (HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>). En ambos casos se procedió como se describe en materiales y métodos.

Análisis por RT-qPCR muestran que, la expresión de HS3ST2 incrementa tanto en HEK<sub>HS3ST2</sub> como en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, pero no en las células HEK<sub>tau</sub>; similarmente, tau se expresa en células HEK<sub>tau</sub> y en células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> pero no en las células HEK<sub>HS3ST2</sub> (Figura 34A). Al comparar los niveles de expresión encontramos que, los niveles de expresión de tau y de HS3ST2 son superiores en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> en comparación con las células HEK<sub>tau</sub> y con células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> respectivamente (Figura 34B).



**Figura 34. HS3ST2 y tau no inducen su expresión de manera recíproca.** Células HEK fueron transfectadas para expresar de forma independiente o simultánea HS3ST2 y/o tau. **(A)** PCR de punto final de transcritos de *HS3ST2* y *MAPT* (tau) en las células HEK transfectadas, se utilizó *B2M* como control de carga; **(B)** Cuantificación de los transcritos de *HS3ST2* y *MAPT* (tau) en las células HEK transfectadas con HS3ST2 y/o tau, la expresión génica relativa se normalizó con *B2M*. Se representan los valores medios  $\pm$  SD ( $n = 3$ ); Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Tukey, según se indica (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; ns = no significativo); **(C)** Inmunotransferencia de lisados de celulares con buffer RIPA, la detección de las proteínas se realizó utilizando anti-HS3ST2 y ab K9JA (anti-t-tau). Se usó anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -tub) como control de carga. Datos publicados en Huynh MB, 2022.



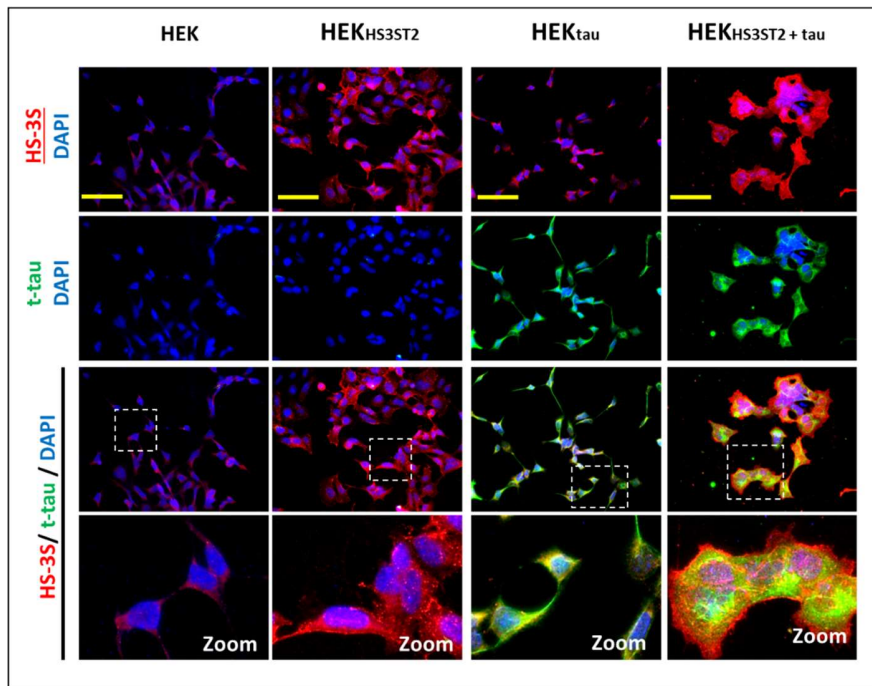
Resultados similares se observan en experimentos de Western-Blot donde se induce la expresión de HS3ST2 en HEK<sub>HS3ST2</sub> y en HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> y de tau en células HEK<sub>tau</sub> y en células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>. Estos resultados sugieren que, la expresión de cada una de las proteínas no tiene un efecto inductor en la expresión sobre la otra proteína, pero la presencia de ambas en la misma línea celular tiene un efecto sinérgico que favorece un incremento de la expresión génica de ambos.

#### 4.2.4 Las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> expresan oligo-tau que colocalizan con HS-3S

Algunos reportes han sugerido que los HS-3S pueden interaccionar con tau a través de su dominio R2 [147]. Para evidenciar esta interacción en nuestro modelo, nosotros evaluamos la colocalización de HS-3S y de tau total (t-tau) en las células transfectadas. Primero las células fueron cosechas y marcadas ab HS4C3 (rojo) y K9JA (t-tau, verde) e inmediatamente fueron analizadas por microscopia de fluorescencia. Los resultados muestran que, tanto las células HEK como las células HEK<sub>2tau</sub> expresan niveles basales de HS-3S en la membrana celular, pero las células HEK<sub>HS3ST2</sub> y las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> presentan un incremento de HS-3S en la membrana y al interior de la célula (Figura 35). Por otra parte, en HEK<sub>tau</sub> y en HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> se observa un aumento en la expresión de tau al interior de la célula incluida la periferia del citosol; en las células HEK<sub>HS3ST2</sub> la expresión de tau no se aprecia, lo cual concuerda con resultados previos donde se observó que HS3ST2 no induce tau (Figura 34). Finalmente Observamos que en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> los HS-3S intracelulares colocalizan fuertemente (amarillo) con tau, sugiriendo una cercanía molecular entre HS-3S y t-tau; además, se observa que en las células doblemente transfectadas se presenta un incremento en el tamaño celular en comparación con las demás líneas. Estos resultados sugieren una posible interacción entra HS-3S y tau.

Se ha descrito que las formas oligo-tau preceden a la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs) durante el desarrollo de la enfermedad y han sido usadas como un biomarcador neuropatológico de diagnóstico [173, 174]. De acuerdo a los resultados anteriores, procedimos a evaluar si los altos niveles de expresión de tau y la presencia

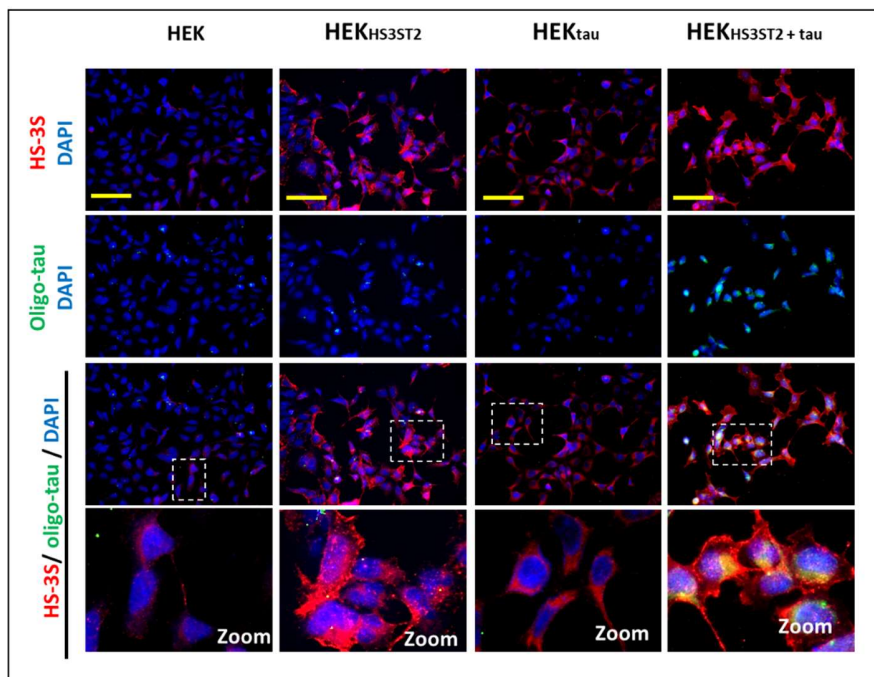
de HS-3S, inducen la formación de oligo-tau. Para ello, células transfectadas fueron marcadas con ab HS4C3 (rojo) y con ab T22 (verde); este anticuerpo reconoce formas oligo-tau en etapas tempranas de agregación y no muestra ninguna reactividad hacia tau monomérico.



**Figura 35. HS-3S colocaliza fuertemente con tau.** Células transfectadas fueron marcadas con ab HS3C3 (rojo), K9JA (verde) y con DAPI (Azul), luego, las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. La imagen muestra tinciones individuales de HS-3S (rojo) o de t-tau (verde) y la colocalización entre ambos marcadores (amarillo); se muestra un zoom de las regiones definidas para cada una de las líneas celulares. Imagen representativa de tres experimentos diferentes. Las imágenes fueron adquiridas por un microscopio Olympus IX81 (ampliación 20x), la barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$ .

Los resultados muestran ausencia de marcaje de ab T22 en las células HEK<sub>tau</sub>, aun cuando la célula expresa altos niveles de t-tau. Lo contrario ocurre en HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, donde se observa la expresión de oligo-tau de manera localizada al interior de la célula (acumulaciones). Interesantemente, observamos que el marcaje de ab HS4C3 colocaliza con el marcaje de ab T22 en las células doblemente transfectadas, lo que nos sugiere una cercanía entre oligo-tau y los HS-3S en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>. Como esperábamos, no se observa la presencia de oligo-tau en las células HEK ni las células HEK<sub>HS3ST2</sub>.

Estos resultados sugieren que la expresión oligo-tau no se da de manera autónoma y que su formación requiere la expresión de HS3ST2 y de su producto HS-3S, posiblemente, como un mecanismo de nucleación en la formación de los oligómeros tautomericos, resultados que fueron corroborados por experimentos de inmunotrasferencias (datos no mostrados, publicados en Huynh MB, 2022 [46]).



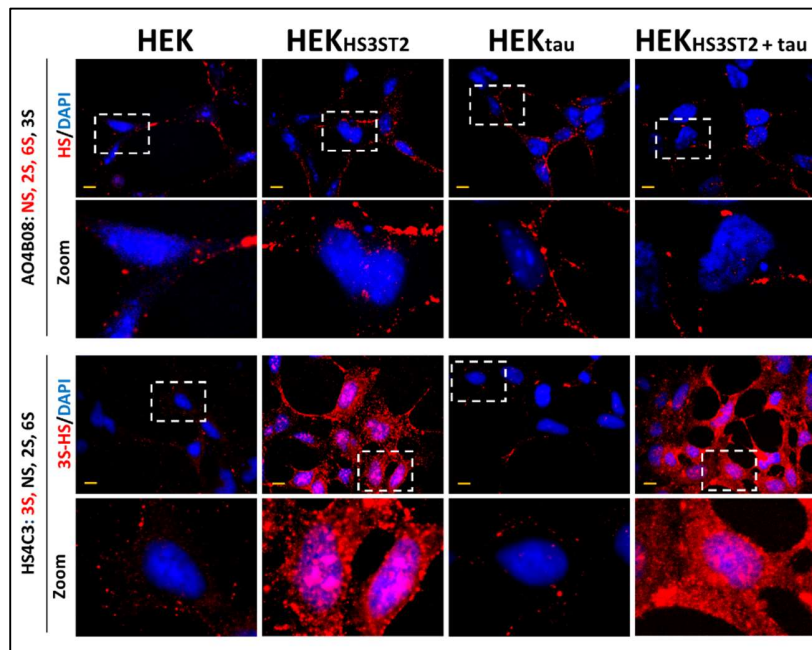
**Figura 36. Solo las células HEK<sup>HS3ST2 + tau</sup> expresan oligo-tau.** Células transfectadas fueron marcadas con ab HS3C3 (rojo), ab T22 (verde) y con DAPI (Azul) y fueron analizadas por microscopia de fluorescencia. La imagen muestra tinciones individuales de HS-3S (rojo) o de oligo-tau (verde). Se muestra un zoom de las regiones definidas para cada una de las líneas celulares. imagen representativa de tres experimentos diferentes. Las imágenes fueron adquiridas por un microscopio Olympus IX81 (ampliación 20x), la barra de escala es de 100  $\mu$ m.

#### 4.2.5 La endocitosis dependiente de caveolina media la Internalización de HS-3S

Fisiológicamente, los HS se encuentran anclados a la membrana celular donde llevan a cabo funciones protectoras, de comunicación, entre otros. Durante el desarrollo de EA, los HS se localizan y acumulan al interior de la neurona, pero los mecanismos que favorecen su internalización y acumulación son desconocidos. En algunos modelos celulares, donde también se ha observado acumulación intracelular de HS, se ha descrito que la internalización es un proceso de endocitosis mediado por caveolinas dependientes

de clatrina o de caveolina (llamadas también independientes de clatrina) [175-177]. De acuerdo a lo anterior, nosotros quisimos evaluar si la internalización de HS-3S en nuestro modelo celular esta mediado por endocitosis.

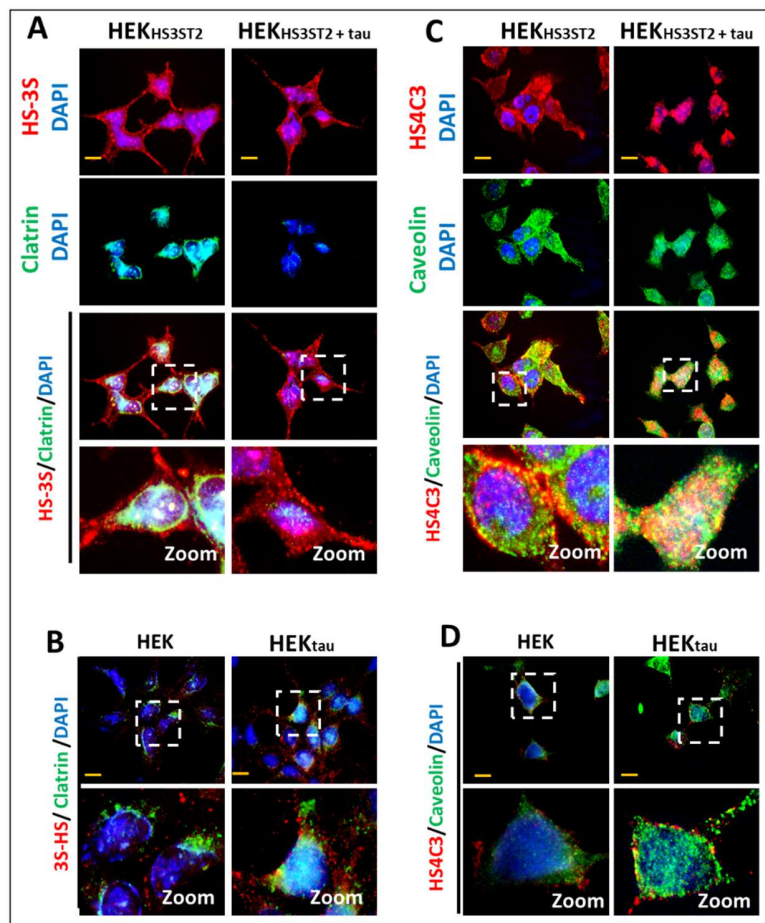
Primero, nosotros quisimos corroborar que los HS acumulados intracelularmente corresponden a HS-3S, para ello, células transfectadas fueron marcadas utilizando ab A04B08 específico para HS-2S, HS-NS y HS-6S, o con ab HS4C3 que reconoce HS-3S, después las células fueron analizadas por microscopia de flujo. Los resultados mostraron que, tanto las células HEK como las células HEK transfectadas expresan HS del tipo HS-2S, HS-NS y HS-6S en la membrana celular, con pequeñas acumulaciones sobre algunas regiones membranales, pero el marcaje intracelular en todas las células es casi nulo célula (Figura 37). Por otro lado, como ya presentamos en previas figuras, el ab HS4C3 reconoce de manera intensa HS-3S en la membra y al interior de las células transfectadas con *HS3ST2*. Estos resultados sugieren que la internalización y acumulación es un fenómeno exclusivo de los HS-3S en nuestro modelo.



**Figura 37. Solo los HS-3S son internalizados y acumulados intracelularmente.** Células HEK transfectadas fueron marcadas con ab A0B4B08 (rojo, HS-2S, HS-6S y para HS-NS) o con ab HS4C3 (rojo, HS-3S); en ambos casos las células fueron teñidas con DAPI (Azul) para visualizar los núcleos. Luego las células fueron analizadas por microscopia de fluorescencia. La imagen muestra tinciones individuales seguido de un zoom de las regiones definidas para cada una de las líneas celulares. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio IX81 Olympus con opción confocal. El aumento fue 60× (aceite de inmersión).

Teniendo en cuenta que solo los HS-3S se acumulan intracelularmente en nuestro modelo celular, nosotros quisimos evaluar el rol de los procesos de endocitosis como mecanismo de internalización de los HS-3S. Para ello, células transfectadas con *HS3ST2* fueron marcadas con ab HS4C3 (rojo) y con anti-clatrina o con anti-caveolina (verde), como medidores de la endocitosis dependiente de clatrina o caveolina respectivamente, y analizadas por microscopia de fluorescencia confocal 60x (Figura 38).

Los resultados muestran que en las células HEK<sub>HS3ST2</sub> y en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, los HS-3S no colocalizan con clatrina al interior de la célula, además se observa que las células transfectadas con *HS3ST2* mantienen un nivel de expresión de clatrina similar en comparación con las células HEK y con las células HEK<sub>tau</sub> (Figura 38A-B). Contrariamente, al realizar el comarcaje con ab HS4C3 y con anti-caveolina observamos que los HS-3S colocalizan de manera intensa tanto al interior de la célula como en la membrana celular, además, se observa un incremento en la intensidad de la señal de anti-caveolina en las células transfectadas con *HS3ST2* en comparación con las células HEK y con las HEK<sub>tau</sub> (Figura 38C-D).

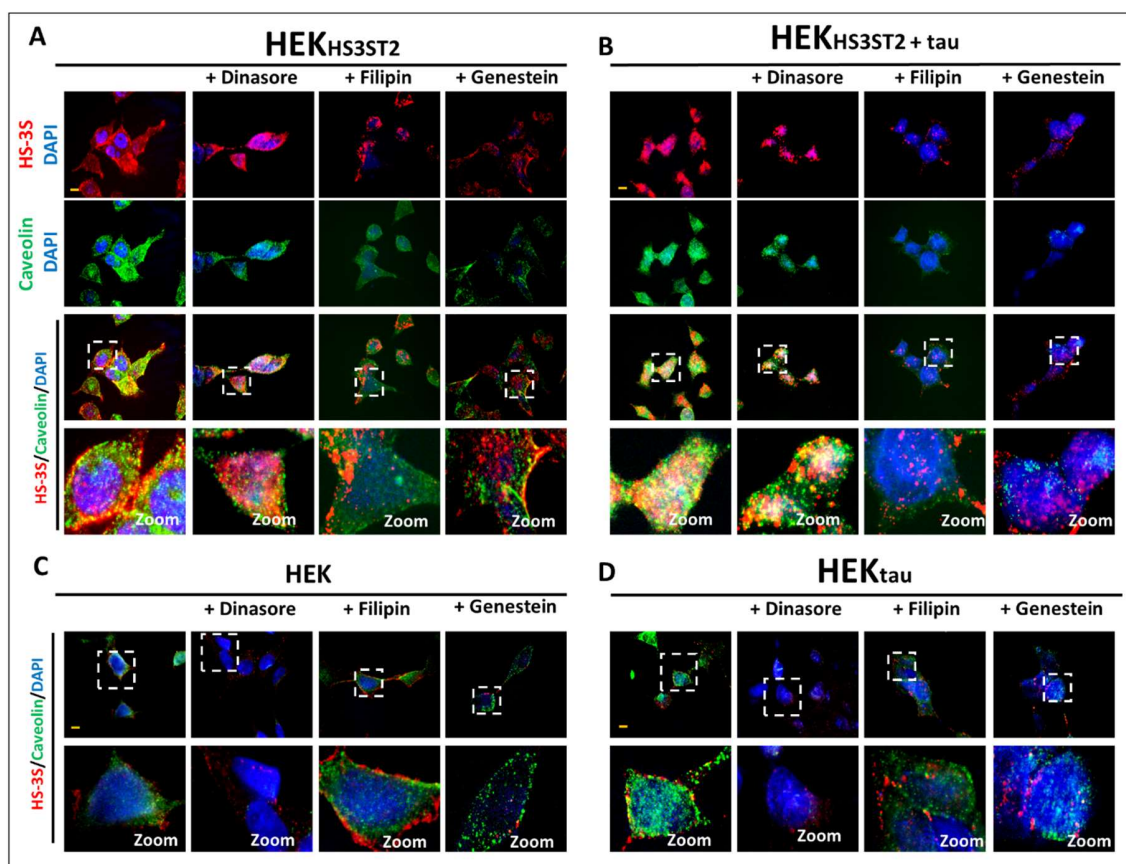


**Figura 38. Los HS-3S son internalizados mediante tráfico endocítico mediado por caveolina.** Células HEK transfectadas solo con HS3ST2 o en conjunto con tau fueron cosechas y marcadas con ab HS3C3 (rojo), anti-clatrina o -caveolina (verde) y con DAPI (Azul) para visualizar los núcleos, luego las células fueron analizadas por microscopia confocal 60X. **(A-B)** Comarcaje de HS-3S (rojo) con anti-clatrina (verde); **(C-D)** Comarcaje de HS-3S (rojo) con anti-caveolin (verde); Se muestra un zoom para cada una de las regiones señaladas. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio IX81 Olympus con opción confocal. El aumento fue 60x (aceite de inmersión).

Paralelamente, nosotros quisimos evidenciar si mediante la inhibición de la endocitosis utilizando inhibidores específicos, la internalización y acumulación de HS-3S se ve afectada. Para ello, nosotros cultivamos células transfectadas en presencia de Dinastore, una molécula que inhibe la endocitosis dependiente de clatrina [178, 179], o en presencia de Filipin o de Genestein, dos inhibidores clásicos de la endocitosis mediada por caveolina [180, 181].

Los resultados muestran que, la inhibición con Dinastore, no induce la disminución en la expresión y en la acumulación intracelular de los HS-3S en las células HEK transfectadas

con *HS3ST2* (Figura 39A-B), también se observa que se mantiene la colocalización intracelular entre los HS-3S y los endosomas dependientes de caveolina. Por otra parte, al inhibir de manera específica la endocitosis dependiente de caveolina con Filipin o con Genestein, se observa en ambos casos, una disminución de la acumulación de los HS-3S al interior de las células transfectadas y la pérdida de la colocalización entre HS-3S y las endosomas dependientes de caveolina (Figura 39A-B). Estos resultados sugieren que existe un proceso dinámico de traslocación y tráfico celular de los HS-3S al interior de las células, mediado por endocitosis dependiente de caveolina.



**Figura 39. La inhibición de los endosomas mediados por caveolina disminuyen la acumulación intracelular de HS-3S.** Células HEK transfectadas solo con *HS3ST2* o en conjunto con tau fueron incubadas por 1 h a 37°C en presencia de Dinastore, Filipin o Genestein a una concentración de 100 mM, 0.1 µg/mL o 200 mM respectivamente. Luego las células fueron fijadas y teñidas con ab HS3C3 (rojo), anti-caveolina (verde) y con DAPI (Azul) para visualizar los núcleos. Las células fueron analizadas por microscopia confocal 60X. **(A)** Comarcaje de HS-3S (rojo) con caveolina (verde) en células HEK<sub>HS3ST2</sub>; **(B)** Comarcaje de HS-3S (rojo) con caveolina (verde) en células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>; Se muestra un zoom para cada una de las regiones señaladas; **(C-D)** Células HEK y células HEK<sub>tau</sub> fueron usadas como control. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio IX81 Olympus con opción confocal. El aumento fue 60x (aceite de inmersión).

#### 4.2.6 Determinación de la expresión de HS-3S en ratones *HS3ST2*<sup>-/-</sup>

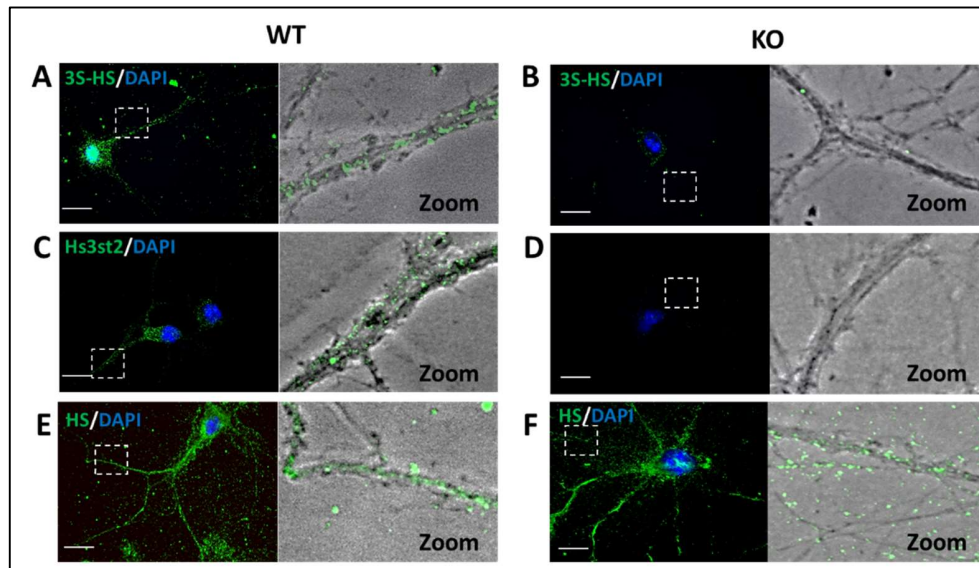
Otra estrategia para investigar la importancia de HS3ST2 en el desarrollo de la enfermedad es mediante el uso de modelos animales. Nuestro laboratorio ha desarrollado un modelo murino *knockout* para *HS3ST2*<sup>-/-</sup> el cual presenta un fenotipo no letal, donde su desarrollo, reproducción y viabilidad no se ven afectados en ausencia de la expresión de HS3ST2, en comparación con el control WT B6. La caracterización de este modelo permitirá extrapolar hacia un modelo animal los resultados obtenidos en las células HEK y validar nuestros hallazgos, además permitirá seguir evidenciando la importancia de HS3ST2/HS-3S en la oligomerización de tau.

Primero, nosotros determinamos si los niveles de HS-3S disminuyen en ausencia de HS3ST2, o si se mantienen en respuesta a un efecto de compensación mediado por las demás HS3STs. Para esto, cultivos primarios de células neuronales de hipocampo, fueron cultivadas y posteriormente analizadas por microscopia de fluorescencia utilizando ab HS4C3. Hablar de la importancia de HS3ST2 a nivel biológico

Los resultados muestran que, la expresión de HS4C3 en las células WT se presenta principalmente en el núcleo y a lo largo de las dendritas neuronales, pero en las células neuronales de ratones *KO HS3ST2*<sup>-/-</sup> los niveles de expresión de HS4C3 disminuye notoriamente en comparación con los ratones WT (Figura 40A-B). Teniendo en cuenta que en las células *KO HS3ST2*<sup>-/-</sup> no hay ausencia total en la expresión de HS-3S, nosotros confirmamos el fenotipo KO por microscopia de fluorescencia utilizando anti-HS3ST2; los resultados confirmaron la ausencia de HS3ST2, sugiriendo que los niveles basales de HS-3S pueden ser un producto de la actividad enzimática de otras HS3STs presentes (Figura 40C-D). Finalmente nosotros quisimos evaluar si la ausencia de HS3ST2 afecta la expresión de los HS totales, para ello realizamos un marcaje con ab 10E4 que reconoce HS pero no reacciona contra otros proteoglicanos, los resultados mostraron que tanto los ratones WT como los ratones KO expresan de HS alrededor del núcleo y a lo largo de las extensiones neuríticas de manera homogénea (Figura 40E-F). Estos resultados nos permiten verificar que la expresión de HS-3S en ratones *KO HS3ST2*<sup>-/-</sup> disminuye en



ausencia de la enzima HS3ST2, pero la expresión de los HS-2S, HS-6S y para HS-NS no se ve afectada.



**Figura 40.** La expresión de HS-3S disminuye en ratones *KO HS3ST2<sup>-/-</sup>*, pero la expresión de otros HS no se ven afectada. Neuronas hipocámpales de ratones *KO HS3ST2<sup>-/-</sup>* fueron obtenidas a partir de embriones de 16 días de gestación, las células se cultivaron durante 20 días, luego se marcaron y analizaron mediante microscopía confocal 60X. **(A-B)** Células WT y *KO HS3ST2<sup>-/-</sup>* fueron marcadas con ab HS3C3 para la detección de HS-3S (verde); **(C-D)** Células WT y *KO HS3ST2<sup>-/-</sup>* fueron marcadas con anti-HS3ST2 para la detección de HS3ST2 (verde); **(E-F)** Células WT y *HS3ST2<sup>-/-</sup>* fueron marcadas con ab 10E4 para la detección de HS totales (verde). Para cada imagen se observa un zoom de las regiones señaladas donde se muestra el contraste entre la molécula de interés y las dendritas neuronales. Las imágenes representan observaciones en células de tres experimentos independientes, las imágenes fueron adquiridas por un microscopio Olympus IX81 (magnificación 60x), la barra de escala es de 20  $\mu$ m.

## 5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

## 5.1 Discusión Tema uno

La glicosilación es clave en el desarrollo de los eventos biológicos que ayuda a la regulación de las funciones y la homeostasis celular [182]. La participación de la glicosilación en las células T ha sido descrita en procesos como la maduración celular, la migración, la apoptosis celular y activación inmunológica [183, 184, 18]. Por ejemplo, CD28 es una *N*-glicoproteína en donde porción glicosídica estabiliza la estructura de la proteína y media la afinidad de CD28 con su ligando CD80/86, regulando así, el mantenimiento, prolongación y arresto de la coestimulación a través de CD28 [76, 67]. . El uso de lectinas, es uno de los métodos para estudiar la estimulación celular *in vitro* [88, 185, 186]. Como en el caso de ALL, que induce una señal coestimuladora comparable con la señalización clásica a través de CD28 [187-190], sin embargo, a la fecha no se tiene certeza de la identidad de la gpALL que lleva a cabo esta señalización.

Nuestro primer objetivo fue evaluar si ALL reconoce linfocitos T de manera diferencial tras la activación celular y si la dinámica de expresión de gpALL presenta un comportamiento diferencial entre células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> [191, 90, 89, 160]. Los resultados mostraron que el fenotipo gpALL<sup>+</sup> se expresa en la mayoría de las células CD8<sup>+</sup> antes y durante la activación celular, pero en las células CD4<sup>+</sup>, el fenotipo CD4<sup>+</sup>gpALL<sup>+</sup> alcanza su máximo a las 48 h de activación. Se ha documentado que la dinámica de los mecanismos efectoras en las células CD8<sup>+</sup> responden de manera más veloz en comparación con las células CD4<sup>+</sup>, pues estas últimas requieren múltiples etapas para polarizar su respuesta Th1, Th2, Th<sub>reg</sub>, etc. Esta diferencia en las dinámicas efectoras nos lleva a proponer que existe una posible correlación entre la expresión de gpALL y el desarrollo de mecanismos efectoras de las células T, explicando la disponibilidad de gpALL en CD8<sup>+</sup> desde el tiempo cero.

Interesantemente, se observa que tanto en los experimentos de citometría de flujo, como en los ensayos de Lectin-Blot hay un aumento de la IMF de gpALL y del número de bandas reconocidas por ALL respectivamente tras 48 h de activación; esta observación permite perfilar la IMF de gpALL como un posible marcador de activación celular, que en conjunto con otras moléculas clásicas como CD69, CD25 y Ca<sup>2+</sup>, pueden dar cuenta de

los estados de activación tempranos y tardíos de los linfocitos T. En conclusión, gpALL se expresa de manera dinámica en las células T tras la activación celular, concordando con reportes previos donde se ha demostrado plasticidad de las glicosilaciones en respuesta a procesos celulares como la activación [192, 193].

Por su naturaleza, las lectinas pueden reconocer diferentes glicoproteínas que tienen en común una secuencia glicosídica específica [194]. En nuestros experimentos, ALL reconoce diferentes O-glicoproteínas asociadas a la secuencia Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O- $\alpha$ -Ser/Thr; sin embargo, nos hemos interesado por la señal de 70-kDa que se observa en ambas subpoblaciones celulares e incrementa su intensidad después de la activación. Esta señal en 70-kDa ha sido reportada previamente por nuestro laboratorio en ensayos donde se usaron lisados celulares obtenidos de células T (timocitos, células T de nódulos linfoides, linfocitos T CD4<sup>+</sup> no activados) [90, 92]; no obstante, en linfocitos T CD8<sup>+</sup> no se han desarrollado experimentos para evidenciar la presencia de la banda de 70-kDa. *Arenas et al.* sugirieron que la gpALL de 70k-Da tiene una homología del 41 % con moesina, una proteína principalmente citosólica y a cuya estructura no se le han descrito MPTs del tipo glicosilación.

Nuestro siguiente objetivo fue aislar la proteína de 70-kDa, determinar su relación con moesina y evidenciar si ALL interactúa con ella en ensayos de Western- y Lectin-Blot. Los resultados mostraron que al inmunoprecipitar con anti-moesina se detecta una señal en 70-kDa en el Lectin-Blot con ALL que concuerda con la moesina detectada por anti-moesina en el ensayo control, sugiriendo que ambas proteínas corresponden a la misma molécula. Resultados similares se obtuvieron al precipitar O-glicoproteínas con ALL donde se identificó la proteína de 70-kDa tanto en el Western- como en el Lectin-Blot. Estos resultados nos llevan a proponer la existencia de una forma O-glicosilada de moesina aun no descrita (O-moesina), sin embargo, se requieren otros experimentos biológicos, bioquímicos e instrumentales que refuercen la existencia de O-moesina. Interesantemente, al inmunoprecipitar con anti-moesina, en el Lectin-Blot se observan otras señales diferentes a 70-kDa detectadas con ALL. Esto sugiere que durante el aislamiento de moesina, otras gpALL son co-inmunoprecipitadas, pues la precipitación de moesina se realizó sobre extractos proteicos en condiciones no desnaturizantes. Lo

anterior concuerda con reportes donde han descrito que las proteínas ERM juegan un rol importante en la morfogénesis mediante la interacción con complejos proteicos transmembranales [195].

Interesantemente, observamos que la banda de 70-kDa es la única señal que se conserva en ambos Lectin-Blots, pues el número de bandas reconocidas por ALL en ambos experimentos son diferentes y solo la banda de 70-kDa está siempre presente. Esto nos lleva a hipotetizar que, en comparación con otras gpALL, la afinidad de ALL por moesina es mayor, esto debido a que la estructura proteica de moesina podría tener un efecto en la estabilización de la interacción O-moesina-ALL [196]; esta hipótesis es reforzada por los trabajos de *Ortiz et al.* donde después de un tratamiento agresivo para la obtención de gpALL mediante cromatografía de afinidad solo se identificó la señal de 70-kDa [90].

Luego, con el objetivo de determinar si O-moesina tiene una expresión dinámica en la membrana de los linfocitos T, nosotros hemos evaluado su cinética de expresión por citometría de flujo. Los resultados mostraron que, a diferencia de las gpALL, moesina se expresa de manera inducida en ambas subpoblaciones celulares, pero la IMF de moesina alcanzan su máximo a las 24 h en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y a las 48 h en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. De acuerdo a lo anterior, nos lleva a pensar nuevamente en una relación entre la expresión de O-moesina y la dinámica de las funciones efectoras de las células T. Moesina ha sido clásicamente asociada a citosol, pero existen reportes donde se ha evidenciado la presencia de moesina en la membrana celular donde es reconocida por patógenos como el sarampión y la rabia para llevar a cabo su infección [197-199].

En el citosol, la moesina es regulada por un proceso de fosforilación/desfosforilación en Thr<sup>558</sup>, lo cual favorece su participación en la polimerización de actina e induce la reorganización de moléculas de superficie en la formación sinapsis inmunológica [200, 201]. Estos mecanismos de regulación por fosforilación han sido ampliamente descritos, inclusive, se ha reportado que en algunos casos existe un balance entre la fosforilación y la O-glcnaclación como un *switch* molecular que regula las funciones de las proteínas y su localización [34, 16, 202]. Nuestros datos bioinformáticos indican que Thr<sup>558</sup> en moesina es un sitio potencialmente O-glicosilable, por lo cual nos es tentador proponer que sobre este aminoácido existe un

posible equilibrio dinámico entre la fosforilación/glicosilación que gobierna la función y la localización de la moesina/O-moesina. Sin embargo, bajo esta posibilidad se desconoce si O-moesina es sintetizada *de Novo* en el retículo endoplásmico de manera canónica o si la síntesis del enlace glicopeptídico se produce en la moesina citosólica, este último sería un raro ejemplo donde la O-glicosilación del tipo antígeno T es sintetizado en un lugar diferente al retículo endoplásmico [203]. Explorar los mecanismos de síntesis de O-moesina está fuera del alcance de este trabajo y se plantea como una perspectiva a futuro.

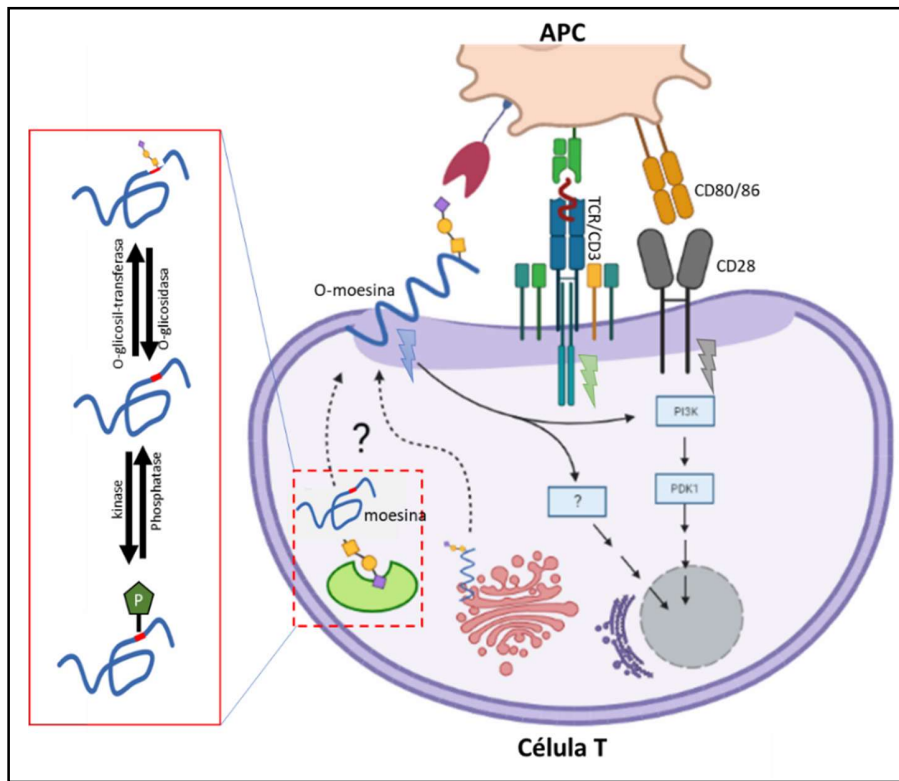
En linfocitos T, se ha reportado la expresión de ezrina y moesina, y se ha descrito que ambas proteínas tienen funciones citosólicas redundantes [93, 97]. Sin embargo, se ha evidenciado que en ratones *Moe<sup>+/-</sup>* el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en sangre periférica disminuye a la vez que incrementa en los órganos linfoides, sugiriendo una relación entre la ausencia de moesina y el egreso de los linfocitos T desde los órganos linfoides a la periferia [95]. Esto concuerda con experimentos donde se evidenció que durante la maduración de los linfocitos T, estos adquieren el fenotipo gpALL<sup>+</sup> antes de su egreso [89]. También, se ha demostrado que la producción de IL-2 se ve disminuida al suprimir la expresión de moesina con siRNA [97]. Otros reportes, describen una rara inmunodeficiencia primaria asociada a moesina y ligada al cromosoma X, los pacientes con esta mutación se caracterizan por presentar infecciones recurrentes, disminución de linfocitos T en circulación, alteración de la proliferación celular, entre otros [204]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nosotros quisimos determinar si es O-moesina, la gpALL que induce la coactivación celular de los linfocitos T en presencia de anti-CD3.

Nuestros resultados mostraron que al coestimular linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con anti-moesina en presencia de anti-CD3, las células expresan los marcadores de activación CD69/CD25, producen IL-2 e inician procesos de proliferación. Estos resultados son comparables con los resultados obtenidos cuando las células son activadas con el estímulo clásico anti-CD3/CD28 o con anti-CD3/ALL. Estos hallazgos son reforzados por los trabajos de *Amiram Ariel et al.* donde se reportan la existencia de un receptor similar a moesina, expresado en la superficie de los linfocitos T y cuya participación está implicada en procesos de activación adhesión celular [205].

A la fecha se han descrito otras moléculas coestimuladoras como CD2 e ICOS, sin embargo, sus funciones y la intensidad de su señal no son comparables con las funciones de CD28 [70]. Por lo tanto, nuestros resultados con O-moesina rompen el paradigma de que CD28 es la única molécula coestimuladora con la suficiente intensidad para iniciar, propagar y mantener la activación de la célula T, pues la señalización inducida utilizando anti-moesina puede ser comparable con la señalización mediada por la molécula clásica CD28. En conclusión, nuestro trabajo demuestra la existencia de una forma O-glicosilada de moesina aún no descrita en linfocitos T, que se expresa de manera dinámica tras la activación celular y cuya función está relacionada con mecanismos de activación no canónicos en linfocitos T.

Como perspectiva, varias preguntas quedan abiertas para ser abordadas en futuros trabajos (Figura 41). En un contexto estructural, es necesario plantear una estrategia experimental que permita explorar los mecanismos de síntesis y regulación de la O-moesina en la membrana de las células T. También, proponemos estudiar la conformación molecular de la O-moesina, su grado de O-glicosilación y los cambios conformacionales que la glicosilación inducen en la proteína.

A nivel funcional, planteamos estudiar la relación de O-moesina con el desarrollo de las funciones efectoras de las células T, sus vías de señalización y los contextos inmunológicos donde tiene un rol fundamental. Finalmente proponemos un estudio paralelo que ayude a identificar el ligando natural de O-moesina y de esta manera dar una elucidación de la participación de O-moesina en la activación *in vivo* de los linfocitos T. Todas las respuestas que arrojen estos hallazgos permitirán, potenciar a O-moesina como un blanco terapéutico que posiblemente ayude a modular la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T.



**Figura 41. Perspectivas en el estudio de la *O*-moesina en la activación de la célula T.** De acuerdo a nuestros resultados se plantean perspectivas desde el punto de vista sintético, estructural y funcional para la *O*-moesina y su participación en la activación de la célula T. Imagen diseñada con BioRender.Com



## 5.2 Discusión Tema Dos

En la actualidad, la investigación a nivel celular y molecular de algunas taupatías como la EA presenta algunos retos. Por ejemplo, la comprensión de los mecanismos que subyacen el desarrollo de la enfermedad o la búsqueda de marcadores moleculares que permitan un diagnóstico clínico temprano de la patología. En los últimos años, se han desarrollado modelos celulares y animales que permitan la comprensión de las características moleculares de la EA. Nosotros hemos usado células HEK, una línea celular que ha sido ampliamente usada en el estudio de la EA y caracterizada por la ausencia en la expresión tau, eliminando el ruido de fondo experimental durante la investigación de taupatías [206, 207].

Nuestro primer objetivo fue evaluar los niveles de expresión de las HS3STs en las células HEK. Los resultados mostraron diferentes niveles de expresión génica de las HS3STs a excepción de la HS3ST2, cuya expresión fue casi nula. Lo anterior nos llamó la atención, al tener en cuenta la relación de la HS3ST2 con el desarrollo de la fosforilación anormal de tau [46]; Los análisis de microscopia nos permitieron evidenciar niveles basales en la expresión de HS-3S sobre las membranas de las células HEK; esta expresión podría ser producto de la acción enzimática de las otras HS3STs en respuesta al estrés durante el cultivo celular, lo cual estaría respaldado por diferentes estudios donde se ha demostrado que las HS3STs responden frente a contextos estimulantes como la inflamación, el estrés y otros [208, 209]. De manera específica durante la EA, se conoce que bajo ciertos contextos estimulantes (genéticos, sociales, calidad de vida, enfermedades preexistentes), también denominados factores de riesgo, se puede inducir la expresión de HS3ST2 y de su producto HS-3S en el desarrollo de la EA.

Nuestro siguiente objetivo fue inducir la expresión de HS-3S y de tau en células HEK mediante la transfección con *HS3ST2* y/o con *MAPT*. En las células HEK<sub>HS3ST2</sub>, los resultados mostraron un incremento en la expresión de los HS-3S en la membrana celular y al interior de la célula de manera similar a lo observado en pacientes Alzheimer [145]. Teniendo en cuenta que HEK carece de la expresión de tau, realizamos igualmente una transfección para obtener células HEK<sub>tau</sub> (*MAPT*) y células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub> (*HS3ST2* y

*MAPT*) . En ambos tipos de células, se observó la expresión de tau e y una colocalización de tau con HS-3S en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, sugiriendo una interacción entre t-tau y HS-3S. También podemos inferir que el aumento en la expresión de tau no induce la síntesis de HS-3S en las HEK<sub>tau</sub>, por lo cual nos lleva a hipotetizar que el aumento en la expresión de HS-3S no se ve influenciada por el incremento en la producción de tau.

Luego, nosotros quisimos determinar si la expresión de HS3ST2 induce la formación de oligo-tau [145] utilizando ab T22 que reconoce oligo-tau, pero no tau monomérica ni los estados avanzados de su agregación. Los resultados mostraron que las formas oligoméricas de tau solo están presentes en las células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, pero no en HEK<sub>tau</sub>, aun cuando expresión de tau en estas últimas se ve incrementada. También pudimos observar que HS-3S colocalizan con oligo-tau en las células doblemente transfectadas. Resultados similares se observaron en experimentos de Western-Blot donde se observa la presencia de oligo-tau solo en células HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, esto nos lleva a proponer que los HS-3S pueden tener un rol de nucleación en la formación de oligo-tau, es decir, las formas oligoméricas de tau no se generan de manera autónoma, sino que requieren la presencia de HS-3S [46, 210]. Estos hallazgos en HEK<sub>HS3ST2 + tau</sub>, nos permite perfilar nuestro modelo celular como una herramienta en el estudio de la participación de HS-3S dentro del desarrollo de la taupatia [46, 211, 150].

Una de las incógnitas centrales que se tiene con respecto a la acumulación de HS-3S en las neuronas, está relacionada con los mecanismos que favorecen su internalización y acumulación. En las neuronas, la endocitosis es uno de los procesos de tráfico e internalización más eficientes y activos durante procesos como la nutrición, el reciclaje de proteínas o durante la internalización de moléculas relacionadas con el desarrollo de patologías [212, 213].

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si los HS pueden ser internalizados a través de endocitosis mediada por clatrina o por caveolina. Los resultados mostraron que los HS-3S colocalizan con caveolina en las células transfectadas con *HS3ST2*, pero no con clatrina; además encontramos que, al utilizar Filipin y Genestein, hay una disminución en los niveles de expresión de HS-3S y de caveolina intracelular. Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con Dinastore, inhibidor de la vía dependiente de clatrina, los

niveles de expresión de HS-3S no disminuyeron, pero si los de clatrina sin afectar la acumulación intracelular de HS-3S. Estos resultados nos sugieren que la endocitosis mediada por caveolina participa en la internalización de HS-3S, lo cual concuerda con la literatura donde se han reportado resultados similares en un modelo de cáncer [156]. Teniendo en cuenta que los HS son claves en el desarrollo de la EA, es tentador pensar que la vía endocítica mediada por caveolina podría ser un blanco en el desarrollo de estrategias moleculares, que inhiban la internalización de los HS-3S como mecanismo terapéutico para detener el avance de la EA, lo cual ha sido propuesto ya en otros campos de la medicina [214].

Finalmente, nosotros presentamos avances en la caracterización de otros modelos biológicos que permitirán la comprensión de la enfermedad. Los modelos animales son estrategias que permiten extrapolar los hallazgos encontrados en los modelos celulares, pero a su vez, permiten investigar aspectos de la enfermedad cuyas respuestas están limitadas en los modelos celulares [215]. El modelo murino *KO HS3ST2<sup>-/-</sup>*, es un modelo animal viable que se caracteriza por la ausencia en la expresión de HS3ST2. Nosotros hemos caracterizado este fenotipo en cultivos primarios de células de hipocampo, donde encontramos una disminución de HS-3S en comparación con el ratón WT. Estos resultados sugieren que la ausencia de HS3ST2 induce mecanismos de compensación de las demás HS3STs para mantener los niveles basales de HS-3S.

En conclusión, nuestro trabajo aportó evidencia de la participación de HS3ST2 en la formación de oligo-tau. Además, mostramos como la endocitosis mediada por caveolina participa en la internalización de los HS-3S favoreciendo su acumulación intracelular. Desarrollamos un modelo celular HEK<sub>HS3ST2</sub> + tau que se perfila como una herramienta útil en el estudio de la EA y de otras taupatías.

Teniendo en cuenta los resultados y conclusiones, nosotros nos planteamos cuatro líneas de trabajo a futuro:

- i) Elucidar los aspectos estructurales que gobiernan la interacción entre los HS-3S y tau que conllevan al desarrollo de la formación de oligo-tau.
- ii) Determinar cuáles son las vías subsiguientes a la endocitosis de los HS-3S, permitiendo comprender los mecanismos de liberación y acumulación

al interior de las células. Además, evaluar potenciales mecanismos de regulación que permitan inhibir la internalización y acumulación de HS-3S.

- iii) Determinar si la expresión de HS3ST2 y de tau induce la expresión de factores de riesgo genéticos con Bin1, ApoE, entre otros.
- iv) Determinar la participación de los HS-3S dentro de las estructuras sinápticas responsables de la memoria y el aprendizaje.
- v) Evaluar la presencia de biomarcadores relacionados con la expresión de HS3ST2 como potencial método en el diagnóstico molecular de la enfermedad.

## 6. CONCLUSION GENERAL

La investigación científica en torno a las funciones de las glicosilaciones ha venido aumentando en los últimos años. Se ha descrito que las glicosilaciones están implicadas en el mantenimiento de estructural de algunas proteínas, en la regulación de procesos biológicos o como componente de la señalización y la comunicación celular. En este sentido, aquí mostramos como ALL reconoce una forma O-glicosilada de moesina, denominada O-moesina, cuya participación está implicada en la activación celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como un mecanismo de activación independiente de CD28. Estos resultados son un claro ejemplo de cómo la glicosilación participa en procesos de señalización que promueven la activación celular de los linfocitos T.

Contrastando, también se ha descrito la participación de la glicosilación durante el desarrollo de algunas enfermedades. Aquí mostramos, a través de un modelo celular de taupatia, como la expresión desregulada de HS3ST2/HS-3S induce agregación autónoma de tau; además hemos determinado como la endocitosis dependiente de caveolina participa en la internalización de los HS-3S. Estos resultados nos ejemplifican como la desregulación de la glicosilación es un factor importante en la enfermedad, para nuestro caso en la EA, donde la acumulación intracelular de HS-3S es una característica fisiopatológica de la enfermedad.






Nuestro trabajo demuestra la importancia de la glicosilación en la activación de las células T y en el desarrollo de la EA, y aporta información que permite avanzar en la comprensión de la biología de las glicosilaciones en ambos contextos. Nuestros resultados perfilan tanto a la O-moesina como a los HS-3S en moléculas blanco para el desarrollo nuevas estrategias biotecnológicas o farmacológicas, enfocadas al uso de los glicanos como un factor modulador en el mantenimiento de la salud y en la prevención o eliminación de la enfermedad.

## 7. ARTÍCULOS PUBLICADOS

REVIEW



## Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell

Wilton Gómez-Henao<sup>a,b</sup> , Eda Patricia Tenorio<sup>a</sup> , Francisco Raúl Chávez Sanchez<sup>a</sup>, Miguel Cuéllar Mendoza<sup>a</sup> , Ricardo Lascurain Ledezma<sup>a</sup> , and Edgar Zenteno<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacan; Mexico; <sup>b</sup>Cell Growth, Tissue Repair and Regeneration (CRRET), CNRS ERL 9215, Université Paris Est Créteil (UPEC), Créteil, France

### ABSTRACT

The immunological synapse promotes receptors and ligands interaction in the contact interface between the T lymphocyte and the antigen presenting cell; glycosylation of the proteins involved in this biological process favors regulation of molecular interactions and development of the T lymphocyte effector response. Glycans in the immunological synapse influence cellular and molecular processes such as folding, expression, and structural stability of proteins, they also mediate ligand-receptor interaction and propagation of the intracellular signaling or inhibition of uncontrolled cellular activation that could lead to the development of autoimmunity, among others. It has been suggested that altered glycosylation of proteins that participate in the immunological synapse affects the signaling processes and cell proliferation, as well as exacerbation of the effector mechanisms of T cells that trigger systemic damage and autoimmunity. Understanding the role of glycans in the immune response has allowed for advances in the development of immunotherapies in different fields through the controlled and specific activation of the immune response. This review describes the structural and biological aspects of glycans associated with some molecules present in the immunological synapse, providing information that allows understanding the function of glycosylation in the interaction between the T lymphocyte and the antigen-presenting cell, as well as its impact on signaling and development regulation of T lymphocytes effector response.

### ARTICLE HISTORY

Received 16 September 2020  
Accepted 29 October 2020

### KEYWORDS

Glycans; immunological synapse; N-glycosylation; O-glycosylation; T cells activation

## Introduction

T cell activation is a critical event in the adaptive immune response. This process begins with the recognition of the T-cell receptor (TCR) and the major histocompatibility complex (MHC) bound to the antigenic peptide (pMHC) of the antigen presenting cells (APC). This interaction induces the formation of the immunological synapse (IS) between the T cell and the APC, conceptualized as receptors and adhesion molecules polarization toward the contact interface between the T cell and the APC, promoting activation of T lymphocytes that trigger the effector immune response [1–3]. The molecular organization observed at the SI is denominated the Supramolecular Cell Activation Complex (SMAC) [3]. The SMAC has a concentric architecture, where the TCR-pMHC is located in the central zone (cSMAC) along with other molecules that favor cell signaling such as CD3, CD28, CD4, or CD8 among others. cSMAC is

surrounded by a peripheral ring (pSMAC) composed of adhesion molecules of the integrin family, like LFA-1 (lymphocyte function antigen 1), more externally, there is a distal ring (dSMAS) composed of adhesion molecules, like CD43. The molecules in the SMAC are mostly glycoproteins, where the glycosidic portion has a fundamental role in the expression or development of the biological functions of the proteins [4]. In this article we review and contextualize the importance of glycosylation in the development of IS and its modulating role in the structural and biological characteristics of SMAC molecules, and how glycans contribute to the homeostasis of cellular activation, possibly regulating the signaling pathways that induce the development of effector mechanisms.

## Glycosylation

It is estimated that more than half of the proteins in mammals have linked glycans and their function is



related to processes of structural stability, adhesion, signaling, biological barrier, among others [5, 6]. Glycosylation has been proposed to participate in protein folding [7, 8], moreover, it has direct implications for the development of biological processes such as cell differentiation [9], apoptosis [10], signal transduction [11], adhesion, and cell migration [12, 13]; defects in glycosylation processes can lead to the development of autoimmune diseases and other pathologies [14].

Glycan synthesis is catalyzed by *glycosyltransferases*, which favor the formation of glycopeptide and glycosidic bonds, using the carbohydrates mannose (Man), galactose (Gal), N-acetyl glucosamine (GlcNAc), sialic acid (SiA), fucose, as substrates (Fuc), and N-acetyl galactosamine (GalNAc) bound to nucleoside donors such as UDP, GDP, or CMP [15]. The size of branching of glycans is highly heterogeneous between different glycoproteins and its structure may vary according to factors such as biological process, age, sex, disease states, or genetic defects; this makes glycosylation a mechanism with a high chemical potential for information transport [16, 17].

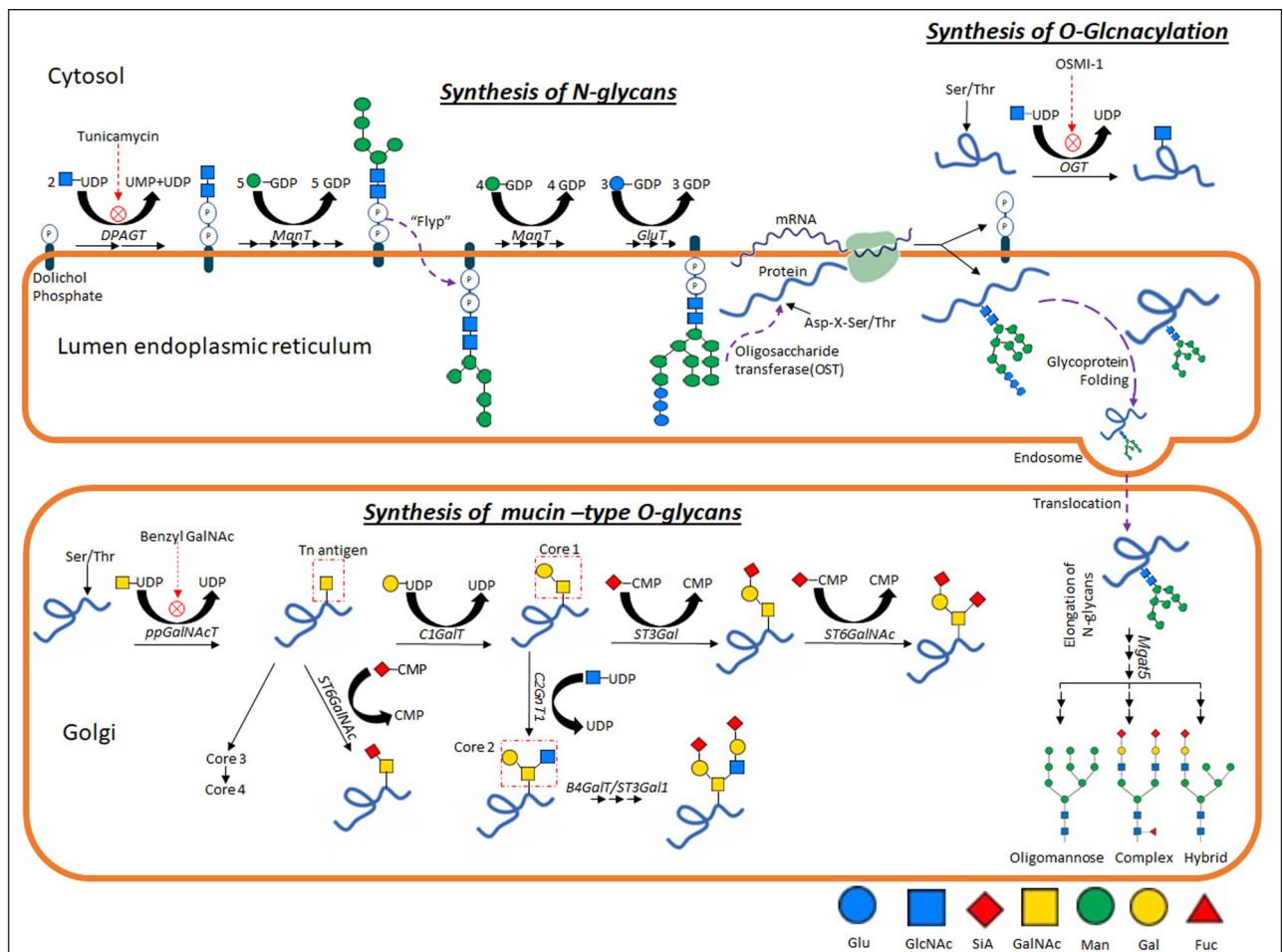
Protein glycosylation is classified into two main types, N-glycans and O-glycans. The N-glycans are characterized by the formation of a glycosidic bond between the GlcNAc to the amide group of asparagine (Asn), in the consensus sequence Asn-X-serine (Ser)/threonine (Thr), where "X" is any amino acid except proline (Pro), synthesis of N-glycans begins in the endoplasmic reticulum in a co-translational manner to the protein synthesis forming the core  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$  and continues with their maturation and elongation into the Golgi apparatus. N-glycans are subdivided into complex-type N-glycans that contain lactosaminic structures ( $\text{Gal}\beta 1,4/1,3\text{GlcNAc}$ ), oligomannose-type N-glycans, and hybrid-type N-glycans, which differ in the type of glycosidic sequence or extension of core, called branch; the synthesis of N-glycans can be inhibited by tunicamycin, which blocks the transfer of N-GlcNAc to DolP. The O-glycans are subdivided into mucin-type and O-GlcNAcylated. The mucin-type O-glycans are synthesized in the Golgi apparatus and are characterized by forming an O-glycosidic bond between GalNAc and the hydroxyl of Ser or Thr called Tn antigen, the synthetic precursor of the core 1 also called T antigen and core 3, the synthesis of Tn antigen can competitively be inhibited by BenzylGalNAc, blocking the transfer of GalNAc to the polypeptide chain [18]. O-GlcNAcylated glycans are formed by a GlcNAc monomer, their synthesis occurs

in cytosolic, mitochondrial, or nuclear space by the transfer of the GlcNAc to the hydroxyl of Ser or Thr in the polypeptide, OSMI-1 is a molecule that can inhibit the formation of O-GlcNAcylation, Figure 1 [19, 20].

Classically, glycosylation analysis in biological systems has been performed using lectins within techniques like flow cytometry, microscopy, microarrays, and lectin-blot, while high-performance chromatography and mass spectrometry have made it possible to elucidate with great precision the structure and molecular sequence of these glycans [21–23]. Understanding the functional role of glycosylation in biological contexts has traditionally been approached with specific inhibitors [24, 25]. However, these molecules affect glycosylation on all proteins that are post-translationally modified by each inhibited glycosylation, making this strategy quite unspecific for the study of the role of glycosylation on individual proteins. Recently, the use of antibody-glycosidase conjugates that selectively eliminate glycans present on a target protein without affecting glycosylation on other glycoconjugates has been reported. This will provide a new perspective in the study of glycoproteins and their potential therapeutic use in different diseases like cancer or autoimmune diseases [26]. The effort dedicated to understand the structural and functional role of glycans has led to the creation of databases that allow a thorough study of glycomes, a branch of glycobiology known as glycomics [27].

## TCR, the first signal

The TCR-pMHC interaction has been defined as the promoter of the first signal that induces T lymphocyte activation. The TCR is a member of the immunoglobulin, it has a variable region that recognizes the antigenic peptide and a constant region anchored to the cell membrane. T lymphocytes (95%) express on their surface a  $\alpha\beta$ TCR, a 90-kDa glycosylated heterodimer; with four N-glycosylated sites in the  $\alpha$  chain and one in the  $\beta$  chain in humans, Table 1, in mice, the  $\alpha$  and  $\beta$  chain have two and three N-glycosylated sites, respectively, [28]. TCR glycosylation was determined by mass spectrometry, suggesting the presence of N-glycans with lactosaminic-type sequences [29]. Crystallographic data and bioinformatic analysis showed that the N-glycans of TCR orient the position of the receptor perpendicularly to the cell membrane, promoting the interaction and formation of the TCR-pMHC complex and restricting nonspecific interactions with adjacent proteins in the cell membrane [1, 30].



**Figure 1.** Glycoprotein synthesis. N-type glycosylation is initiated in the endoplasmic reticulum, where they bind to the target protein by transferring the glycosidic moiety present in DoIP to the Asn residue in the Asn-X-Ser/Thr sequence, and later to the Golgi apparatus, where the glycosidic portion elongates and acquires an N-glycan conformation of the oligomannose-type or Hybrid-type or complex-type. O-GlcNAcylated glycoproteins are synthesized in the cytosol, nucleus, or mitochondria by the addition of GlcNAc on Ser/Thr residues. Mucin-type O-glycans are synthesized and elongated in the Golgi apparatus, their synthesis occurs on a Ser/Thr residue forming the Tn antigen, precursor of core 1 or core 3, (only some glycosidic structures are represented).

During IS formation, multiple TCRs converge toward the cSMAC and their accumulation maintains a balance between the proportion of TCR and co-receptors, such as CD28 [31, 32].  $\beta$ 1,6N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) is an important enzyme for the N-glycan biosynthesis pathway, it has been observed that in mice-Mgat5<sup>-/-</sup>, the synthesis and expression of the TCR are not affected, However, changes were observed in the fluidity of the TCR on the cell membrane that promoted an increase in the levels of aggregated TCR molecules in the cSMAC, all of which exacerbate TCR-mediated cell signaling leading to easier development of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, hypersensitivity, and experimental autoimmune encephalomyelitis [33, 34]. Besides, it has been observed that mice, whose TCRs possess fucosylated N-glycans, are prone to the generation of pro-inflammatory cytokines, generating favorable microenvironments

for the progression of diseases like colitis [35]; thus, these changes in expression and structure of TCR glycans have been proposed as markers for the diagnosis and disease progress [36, 37]. Finally, mutations in the TCR N-glycosylated sites resulted in an increased avidity between the pMHC and the TCR, Authors have suggested that manipulation of glycosylation on the TCR is a promising strategy for the development of cell lines that specifically and with high avidity recognize tumor antigens in the immunotherapeutic treatment of some types of cancer such as lung, prostate, among others [28, 38, 39].

### CD3 complex

CD3 is formed by the  $\gamma$  $\epsilon$ CD3 and  $\delta$  $\epsilon$ CD3 heterodimers and by the  $\zeta$  $\zeta$ CD3 homodimer [40]. The  $\zeta$  (CD247) chains are 17-kDa non-glycosylated

**Table 1.** Glycosylation in molecules that participate in the immunological synapse.

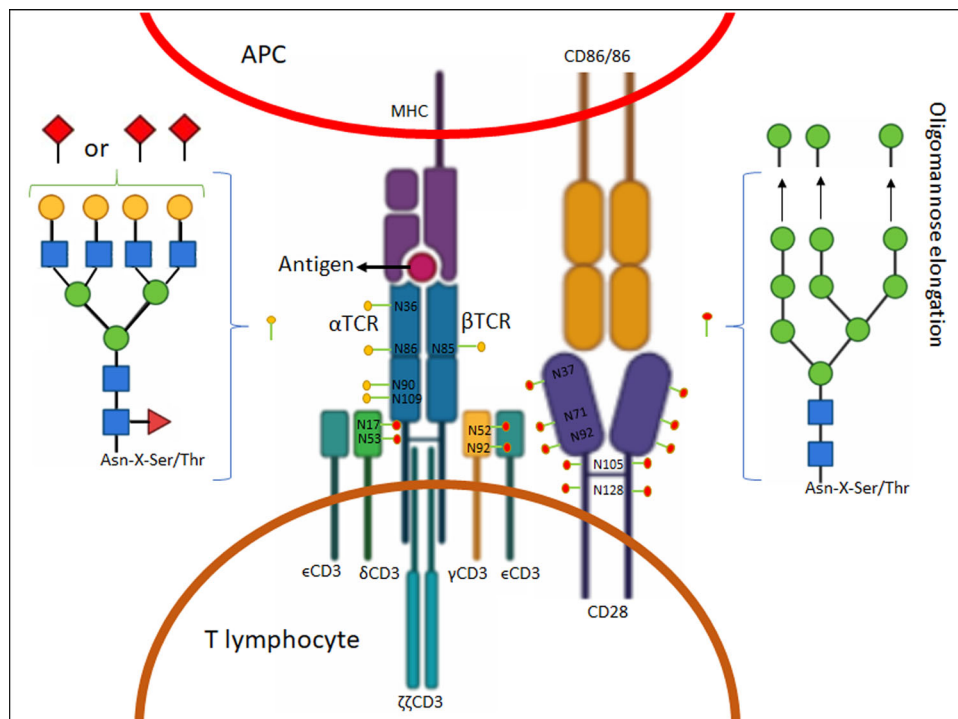
Molecule	Subunit	Type of glycosylation	Position of glycosylation	Most common glycosidic structure
$\alpha\beta$ TCR	$\alpha$ TCR	N-glycan	Asn <sup>36</sup> , Asn <sup>86</sup> , Asn <sup>90</sup> , Asn <sup>109</sup>	Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc Lactosaminic-type
CD3	$\beta$ TCR	N-glycan	Asn <sup>85</sup>	Not characterized
	$\zeta\zeta$ CD3		non-glycosylated	
	$\epsilon$ CD3		non-glycosylated	
	$\gamma$ CD3	N-glycan	Asn <sup>52</sup> , Asn <sup>92</sup>	Man <sub>5-9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Oligomannose-Type
CD28	$\delta$ CD3	N-glycan	Asn <sup>36</sup> , Asn <sup>53</sup>	Not characterized
	Homodimer	N-glycans	Asn <sup>37</sup> , Asn <sup>71</sup> , Asn <sup>92</sup> , Asn <sup>105</sup> , Asn <sup>129</sup>	Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , Oligomannose-Type
CD8	$\alpha$ CD8	O-glycans N-glycans	Thr <sup>122</sup> , Thr <sup>126</sup> , Thr <sup>132</sup> , Thr <sup>135</sup> Asn <sup>137</sup>	O-glycan Mucin-type/sialylated Complex-Type N-glycans
	$\beta$ CD8	N-glycans	NR	Complex-Type N-glycans
CD4	Homodimer	O-glycan	Thr <sup>120</sup> , Thr <sup>124</sup> , Thr <sup>128</sup>	O-glycan Mucin-type/sialylated
		N-glycan	Asn <sup>296</sup>	Hybrid-Type N-glycans
CD43	Monomer	N-glycan	Asn <sup>300</sup>	Complex-Type N-glycans
		O-glycans	>80 potentially O-Glycosylated, example: Thr <sup>21</sup> , Thr <sup>22</sup> , Thr <sup>26</sup> , Thr <sup>28</sup> , Ser <sup>29</sup> , Ser <sup>35</sup> , Thr <sup>36</sup> , Ser <sup>37</sup> , Ser <sup>41</sup> , Ser <sup>42</sup> , Thr <sup>46</sup> , Thr <sup>47</sup> , Ser <sup>48</sup> , Thr <sup>50</sup> , Thr <sup>58</sup> , Thr <sup>69</sup> , Ser <sup>99</sup> , Ser <sup>103</sup> , Thr <sup>109</sup> , Thr <sup>113</sup> , SER <sup>114</sup> , Thr <sup>136</sup> , Thr <sup>137</sup> , Thr <sup>173</sup> , Thr <sup>178</sup>	O-glycan sialylated mucin-type or O-glycan asialylated mucin-type
MHC I (HLA-A y HLA-B)	$\alpha$ MHC I	N-glycans	Asn <sup>239</sup>	Not characterized
		N-glycans	Asn <sup>86</sup>	SiA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man and/or SiA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Man. (biantennary or triantennary)
MHC I (HLA-C)	$\beta$ 2Microglobulin	NR	NR	
	$\alpha$ MHCI	N-glycans	Asn <sup>86</sup> .	SiA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man And/or SiA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Man or GlcNAc $\beta$ 1-4Man and/or GlcNAc $\beta$ 1-6Man (biantennary or triantennary)
MHC II (HLA-DP HLA-DR, HLA-DQ)	$\beta$ 2microglobulin	NR	NR	
	$\alpha$ MHC II	N-glycans	Asn <sup>78</sup> , Asn <sup>118</sup>	Complex-Type N-glycans highly heterogeneous
Transcription factors, Zap70	$\beta$ MHC II	N-glycans	Asn <sup>19</sup> mainly HLA-DQ	Complex-Type N-glycans
		O-glycan	Not characterized	O-GlcNAc

NR: not reported.

polypeptides, with a small extracellular domain and an intracellular portion containing 3 ITAM motifs [41–43]. The  $\epsilon$  chain is a 20-kDa non-glycosylated polypeptide with a large extracellular domain [44, 45]. The  $\gamma$  and  $\delta$  chains are 25-kD and 20-kDa transmembrane glycoproteins, respectively, with ITAM motifs in their cytosolic domain and an extracellular domain with structural features of the immunoglobulin family. Each chain has two oligomannose-type glycans, Figure 2, expressed in a non-conserved way among different mammalian species; for example, in mice,  $\gamma$ CD3 has only one N-glycosylated site and  $\delta$ CD3 has three N-glycosylated sites, Table 1 [46–48].

CD3 and  $\alpha\beta$ TCR are associated through the interaction between the extracellular domains of  $\delta\epsilon$ CD3 with  $\alpha$ TCR and  $\gamma\epsilon$ CD3 with  $\beta$ TCR [49]; by inhibiting N-glycosylation in J76 cells with tunicamycin, it was possible to isolate the  $\alpha\beta$ TCR complex associated to  $\gamma\epsilon$ CD3, but the presence of the  $\delta\epsilon$ CD3 was not

observed, this suggests that N-glycosylation is required for the expression of the  $\delta\epsilon$ CD3, but the N-glycans are not necessary for the expression of the  $\gamma\epsilon$ CD3 and its interaction with the  $\alpha\beta$ TCR, these results also suggest that the glycosylation of the  $\delta$  and  $\gamma$  polypeptides does not influence the expression and maintenance of the  $\alpha\beta$ TCR on the T cell membrane [47]. The stoichiometric relationship between CD3 and  $\alpha\beta$ TCR remains conserved in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, however, each subpopulation has different levels of oligomannose in the backbones of N-glycans linked to  $\delta$ CD3 and  $\gamma$ CD3 [50, 51]. Research has suggested that these differences have direct implications for the modulation of signaling intensity induced by  $\alpha\beta$ TCR-CD3 during T cell activation This has been exploited as a strategy in the development of anti-CD3 monoclonal antibodies with the ability to induce different activation thresholds, depending on the levels of glycosylation of the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex [52].



**Figure 2.** Interaction of human MHC, TCR-CD3 complex, and CD28-CD80/86. The most common complex-type N-glycans present in the TCR and the oligomannose-type N-glycans associated with the  $\gamma$ CD3 and  $\delta$ CD3 chains are represented; The levels of sialylation on N-glycans of the TCR can be mono-sialylated in any branch or bi-sialylated in the branches 1 or 2 and 3 or 4; oligomannose levels in CD3 and CD8 are associated with each T cell subset.

Historically, lectins have been used *in vitro* to evaluate the biological role of glycoproteins. For example, the concanavalin A lectin (ConA) is a mitogen for different cell types and it is used for classic T cell activation assays. Immunoprecipitation assays showed that ConA binds strongly to the TCR-CD3 complex through the oligomannose-type N-glycans present in CD3, a molecular crosslinking strong enough to initiate activation [53–57]. It has been suggested that CD3 glycosylation plays an intermediary role between the initial TCR signaling and the activation of intracellular activation pathways.

### Costimulatory molecules

To reach the required signaling threshold that promotes the development of effector functions and the immune response, T cells are stimulated first through the TCR, and then by a second costimulatory signal through CD28 [58]. CD28 is a 46-kDa glycoprotein member of the immunoglobulin superfamily arranged in homodimers, it is recruited into the cSMAC during the immune synapse to interact with CD80/CD86, expressed in APC [59, 60]. The CD28 amino acid sequence has an approximate weight of 23-kDa, however, each polypeptide has N-glycans oligomannose-type

added at Asn<sup>37</sup>, Asn<sup>71</sup>, Asn<sup>92</sup>, Asn<sup>105</sup>, and Asn<sup>129</sup> positions, table 1, increasing CD28 weight up to 46-kDa, therefore, 50% of CD28 molecular mass corresponds to glycans linked to the polypeptides, so far, the presence of O-glycosylation in CD28 has not been determined, Figure 2 [61–63]. These N-glycosylation provide rigidity to the protein, but it has also been demonstrated that lower glycosylation levels increase CD28 avidity for its ligands, leading to over-stimulation and an increase in IL-2 production, which suggests that CD28 signaling is greatly regulated by its glycan density [64].

Evidence suggests the presence of an O-glycosylated protein homologous to moesin, a protein classically associated with the cytosol, possesses costimulatory influences on T cells seems to be a mucin-type O-glycoprotein containing Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O-Ser/Thr. Experiments have shown that in the presence of anti-CD3 this moesin-like O-glycoprotein can induce non-canonical cell activation processes similar to CD28 [65]. Another molecule with costimulatory functions is CD2, a glycoprotein present in dSMAC with costimulatory functions, that mediates costimulation and adhesion processes during IS formation. CD2 is a 50-kDa polypeptide that is N-glycosylated in Asn<sup>37</sup>, which specifically participates in the interaction with its LFA-3 receptor in APC [66].

## CD4 and CD8 co-receptors

Helper and cytotoxic T lymphocytes are two subpopulations of T cells characterized by the membrane expression of CD4 or CD8 co-receptors, respectively. These molecules execute two biological functions: they provide stability and specificity in the TCR-pMHC interaction during cellular activation and recruit signaling cascade molecules, like Lck, through its intracellular domain toward the TCR-CD3 complex that increases TCR-mediated signal transduction [67].

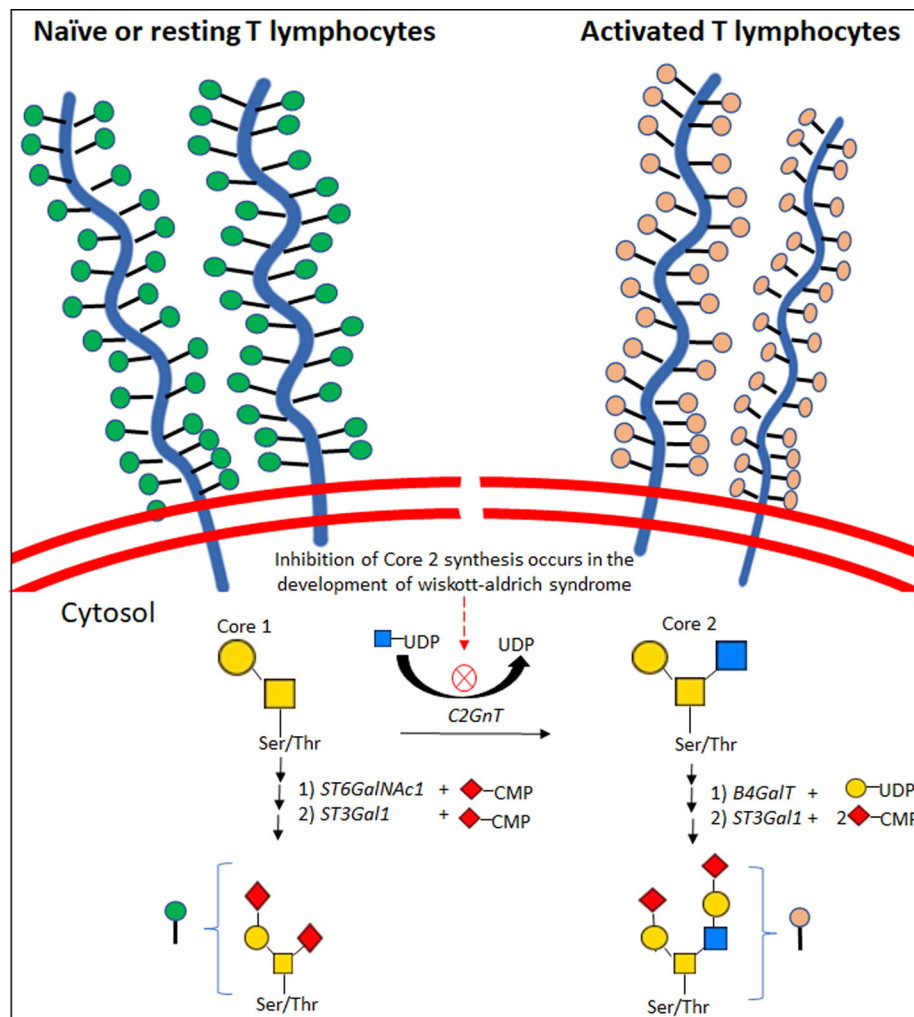
CD8 is a co-receptor that binds strongly to class I MHC molecules (MHC I) during the formation of the TCR-pMHC I complex, it is a highly conserved heterodimeric molecule,  $\alpha$ CD8 and  $\beta$ CD8, it has a topology similar to the one observed in the immunoglobulin superfamily and 20% of its amino acid sequence is made up by Ser and Thr [68]. Experiments have proven that  $\alpha$ CD8 has four conserved O-glycosylated sites at Thr<sup>122</sup>, Thr<sup>126</sup>, Thr<sup>132</sup>, and Thr<sup>135</sup>, and one non-conserved complex-type N-glycan at Asn<sup>137</sup> [28, 69, 70]; whereas  $\beta$ CD8 has only one N-glycosylated position; three conserved O-glycosylated sites have been found between species in Thr<sup>120</sup>, Thr<sup>124</sup>, and Thr<sup>128</sup>. Interestingly, it was further determined that the O-glycans present in CD8 are of the sialylated mucin-type, Table 1 [70].

Structural analysis established the presence of Lys residues in the CD8 polypeptide chains; site-directed mutations and enzymatic assays allowed identifying that the positive charges on the Lys residues are neutralized by the negative charges of the SiA in the O-glycans present in  $\beta$ CD8, stabilizing the structure of the CD8 heterodimer. On the other hand, it has been established that the structure of the CD8 co-receptor has a relative rigidity and an extended conformation in a similar way to mucins, due to the negative charges provided by the SiA bound to the O-glycans of the  $\alpha$ CD8 chain [71]; therefore, the elimination of the SiA present in the O-glycans directly affects the interaction between the CD8 co-receptor and its ligand MHC I, decreasing the avidity in the interaction between both molecules [72]. This is in agreement with experiments where it is observed that during the different stages of maturation and development of the effector functions of T cells, the levels of SiA are modulated by the enzymatic expression of *sialyltransferases* [71, 73–75], suggesting that sialylation levels present in mucin-type O-glycans associated with CD8 can create a molecular “switch” that regulates biological processes of the cytotoxic lymphocyte, like cell activation, where sialic acid levels regulate CD8/MHC I interaction.

On the other hand, CD4 is a 55-kDa glycoprotein expressed as a single polypeptide chain on the helper T lymphocyte cell membrane, its ligand is class II MHC molecules (MHC II) on APC. Its structure possesses N-glycosylation sites: Asp<sup>296</sup> hybrid-type N-glycan and Asp<sup>300</sup> complex-type N-glycan, Table 1 [76, 77]. Experiments that inhibit N-glycosylation showed that the CD4 receptor membrane expression decreases, suggesting that this modification is required for CD4's correct assembly and expression; however, it is still unknown whether the glycosidic portion of CD4 has a role in its interaction with MHC II [78, 79].

## CD43, an adhesion molecule

CD43, also called leukosialin, is a mucin-type O-glycoprotein with an approximate length of ~45 nm, its cytosolic, transmembrane, and extracellular portion are composed of 124, 23, and 234 amino acids, respectively, and it is one of the longest and most abundant proteins on the surface of T cells with approximately  $>10^5$  copies of CD43 molecules per cell. Evidence suggests that CD43 possesses  $>80$  O-glycosylated sites in the extracellular domain and an N-glycan in Asn<sup>239</sup> site, Table 1 [80]. The O-glycans in CD43 have a glycosidic sequence recognized by the E-selectin receptor on epithelial cells and by the intracellular adhesion molecules ICAM-1 present in APCs. Both E-selectin and ICAM-1 are lectin-like molecules that mediate the adhesion to epithelial tissue and favor cell-cell contact during antigen presentation by huddling at the dSMAC [81, 82]. Two CD43 isoforms have been identified with the same 44-kDa polypeptide structure, but differing in the O-glycosylation type [80, 83]. O-glycans in the first isoform have a glycosidic core composed of SiA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr, called sialylated Core 1 or Sialyl-T antigen. The second isoform has a core biantennary glycan composed of GlcNAc $\beta$ 1-6(Gal $\beta$ 1-3) GalNAc $\alpha$ Ser/Thr, called Core 2, extended by the addition of Gal $\beta$ 1-4 on GlcNAc and it could be sialylated on both branches. The isoforms have a molecular weight of 115-kDa and 130-kDa, respectively [81] and Core 2 is synthesized by the *C2GnT* enzyme using the Core 1 as a structural precursor [84]. The 115-kDa isoform is mainly expressed in naïve or resting T lymphocytes whereas the 130-kDa isoform expression increases during activation, suggesting that the level of CD43 glycosylation is involved in the development of effector functions, agreeing with results where an increase in the expression of *C2GnT* is observed in activated T lymphocytes; interestingly, this



**Figure 3.** Synthesis of glycans in CD43 during lymphocyte activation. Changes in CD43 O-glycosylation are depicted, where Core 1 O-glycans are expressed in resting cells and Core 2 O-glycans in activated cells; inhibition in Core 2 synthesis during cell activation may lead to the development of the Wiskott-Aldrich syndrome.

molecular turnover is more evident in CD4<sup>+</sup> than in CD8<sup>+</sup> T cells, Figure 3 [85, 86].

The presence of SiA confers a high negative charge to CD43, which favors leukosialin to adopt an extended conformation that creates a barrier that protects the cell against the action of proteases [81, 82], and provides a steric regulatory mechanism that prevents nonspecific activation of naive or resting T lymphocytes and prevents T lymphocyte hyper-reactivity, which could lead to the development of autoimmune events [87, 88]. During the initiation of T lymphocyte activation, the CD43's 115-kDa isoform is recycled and replaced by the 130-kDa isoform, which converges to the dSMAC region, this relocation of CD43 in the periphery of the SMAC decreases the effects of steric repellants facilitating the interaction between receptors and ligands that participate in IS and promoting cell-cell contact during cell activation through interaction with ICAM 1 receptor of APC [89, 90]. It

has been established that this change in CD43 is influenced also by the presence of IL-2 and IL-4, promoting the expression of *C2GnT1* and, to a lesser extent, of *B4GALT* and *ST3GAL1* [91]. Altered glycosylation of the CD43 molecule is the cause of the Wiskott-Aldrich syndrome, an immunodeficiency characterized by the development of hemolytic anemias, lymphopenia, and recurrent infections, patients with this syndrome have defects in the enzymatic activity of *C2GnT*, which decreases after T cell activation and inhibits CD43 O-glycosidic turnover during cell activation [92, 93].

### MHC, the antigen presenting molecule

MHC molecules are proteins specialized in presenting peptide antigens that will be recognized by the TCR, promoting cellular activation; two MHC types have been characterized, MHC I and MHC II.

In humans, MHC I is encoded by three loci called HLA-A, HLA-B, and HLA-C, making it a highly polymorphic protein; MHC I is expressed in nucleated cells, presents endogenous antigens of 8 to 10 amino acids, and interacts with the TCR in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. MHC I is a heterodimer composed of a 45-kDa glycosylated peptide called  $\alpha$  heavy chain and a non-glycosylated 12-kDa invariant polypeptide called  $\beta$ 2microglobulin. The  $\alpha$  heavy chain comprises three extracellular domains,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\alpha$ 3, with only one N-glycosylated site in Asn<sup>86</sup>, a conserved amino acid in the  $\alpha$ 1 domain. The HLA-A, HLA-B and, HLA-C haplotypes have exclusively N-glycans biantennary or triantennary extended by SiA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man or SiA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Man, and also the HLA-C haplotype can be associated with their asilylated and agalactosidated branches forms (GlcNAc $\beta$ 1-4Man, GlcNAc $\beta$ 1-6Man), Table 1 [94, 95].

N-glycosylation inhibition experiments showed that the absence of N-glycans does not affect the synthesis and expression of MHC I, does not increase its susceptibility to proteolytic degradation and does not modify the alloantigenicity of MHC I, nor its ability to interact with TCR [96–98]. On the other hand, computational analyses of molecular dynamics of MHC I suggest that the spatial arrangement of N-glycans plays a role in targeting MHC I perpendicularly to the cell membrane and stabilizes the protein residues involved in the TCR-pMHC I interaction [99].

On the other hand, MHC II is expressed in APC cells and presents extracellular antigenic peptides to CD4<sup>+</sup> T cells of 13 to 25 amino acids; in humans, the HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR haplotypes are expressed. MHC II is a heterodimer composed of a 33-kDa heavy  $\alpha$  chain and a 28-kDa light  $\beta$  chain joined non-covalently. Each chain has two domains called  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 that are N-glycosylated at Asn<sup>78</sup> and Asn<sup>118</sup> ( $\alpha$  chain) and Asn<sup>19</sup> ( $\beta$  chain) in humans, Table 1;  $\alpha$ Asn<sup>78</sup> and  $\beta$ Asn<sup>118</sup> are highly conserved in different species and glycosylation of  $\beta$ Asn<sup>19</sup> has been found mainly in the HLA-DQ haplotype and more rarely in HLA-DP and HLA-DR [100–102].

Analysis of murine MHC II showed that its  $\alpha$  chain is associated with complex-type N-glycans with high variability and heterogeneity in the branching pattern and the levels of sialylation, but with a homogeneous glycosylation pattern in the  $\beta$  chain, suggesting that the differential glycosylation of the  $\alpha$  chain may influence the binding of the antigen to MHC II and/or the interaction TCR- pMHC II [103, 104].

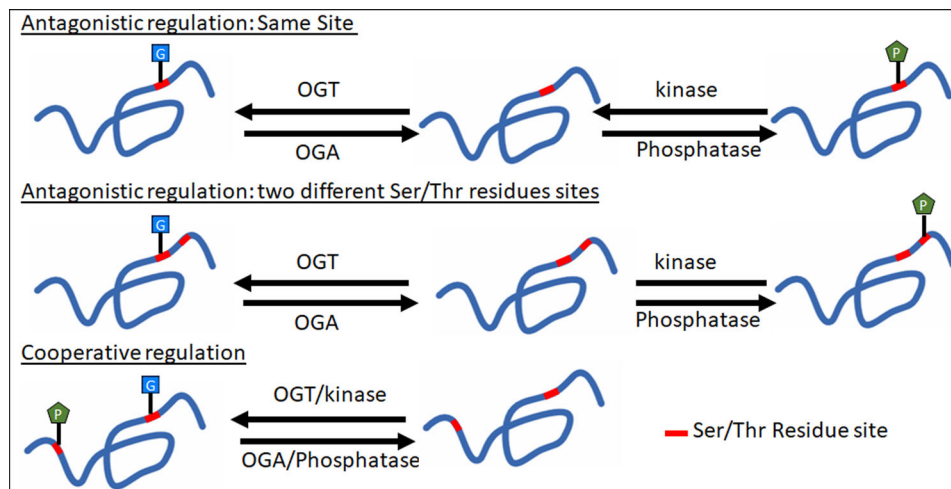
MHC molecules have been widely described as being involved in the development, maturation, and

thymic selection of T cells, in antigenic presentation and the activation of T lymphocytes with superantigens and used as a strategy in immunotherapy. Experimental models showed that mutations on  $\alpha$ Asn<sup>78</sup> or  $\alpha$ Asn<sup>118</sup> in MHC II affect antigenic presentation, but only the absence of  $\alpha$ Asn<sup>118</sup> induces a decrease in T cells during positive selection [100]. This agrees with structural analyses showing that the N-glycans in  $\alpha$ Asn<sup>78</sup> and  $\beta$ Asn<sup>19</sup> are found near the antigen-binding groove in MHC II, but  $\alpha$ Asn<sup>118</sup> is located near the cell surface, suggesting that the N-glycans in  $\alpha$ Asn<sup>78</sup> and  $\beta$ Asn<sup>19</sup> are related to the stability of the interaction of the pMHC II complex whereas  $\alpha$ Asn<sup>118</sup> is related to stabilizing the MHC II structure. Accordingly, experimental evidence showed that mutation of  $\alpha$ Asn<sup>78</sup> and  $\beta$ Asn<sup>19</sup> or N-glycan elimination can positively or negatively affect MHC II's ability to bind and present antigens and also affect the interaction with the TCR [105, 106]. These findings demonstrate how glycosylation influences antigenic presentation, modulating the interaction and formation of the pMHC II complex, however, the absence of N-glycans does not affect the assembly of MHC II [105–107].

### Glycosylated antigenic peptides

Antigen processing and presentation involve four important steps: (i) enzymatic fragmentation of the antigen source protein, (ii) peptides binding to MHC molecules, (iii) export of the pMHC complex to the cell membrane, and (iv) interaction of pMHC with TCR [108, 109].

Traditionally, it has been described that  $\alpha\beta$ TCR only recognizes unmodified peptidic antigens, however, studies performed in the '90s showed glycosylated peptides can be presented by APC and recognized by T cells [110]. pMHC complex formation is prompted by the molecular interaction between a central portion of the peptide, usually, and the amino acids present in the MHC cleft; it has been shown that glycoantigens can be loaded and presented by the MHC to the TCR, which recognizes the glycoantigens and induces the activation of specific clones of T cells. However, the antigen presentation and the activation of the T lymphocyte are affected by eliminating the glycosidic portion linked to the antigen, these findings suggest that glycosylation in the antigen is directly involved in the TCR-pMHC interaction [111, 112]. On the other hand, it has been established that the TCR does not recognize antigenic peptides that possess large and highly complex glycan



**Figure 4.** Dynamic between O-GlcNAcylation and phosphorylation as a regulatory reciprocal relationship that activates or inhibits protein function. In the Antagonistic regulation O-GlcNAc and phosphorylation can compete for the same Ser/Thr site or link to different proximal Ser/Thr residue sites, in cooperative regulation O-GlcNAc and phosphorylation act synergistically; In all three cases, the reciprocal relationship between O-GlcNAc and phosphorylation can promote the activation, inhibition or stability of the protein.

structures, because they generate a steric impediment in the molecular anchorage that allows the formation of the TCR-pMHC complex [113].

Interestingly, it has been observed that proteins processed through the cytosolic pathway are subjected to the action of cytosolic N-glycanases that eliminate their N-glycosidic portions before entering the proteasome, this blocks the generation of N-glycosylated peptides. This enzymatic action generates a new antigen, called neo-antigen, because cleavage of the Asn glycosidic portion turns it into Asp [114]. Contrastingly, O-glycosylated proteins present in the cytosol and processed through the proteasome can still generate O-glycosylated antigens, this can be explained by the fact that most of these are mucin-type O-glycoproteins with a high concentration of O-glycans that evade the action of cytosolic O-glycosidases [115]. On the contrary, processing of glycoproteins through the MHC II pathway enables the generation of O-glycosylated or N-glycosylated antigens that are correctly presented by MHC II and recognized by the TCR [116, 117]. On the other hand, proteolysis of glycoproteins can be affected by the type, length, abundance, and position of glycans because these glycosidic structures can sterically block the action of proteolytic enzymes. For example, the HIV-pg120 envelope protein is highly N-glycosylated, which hampers the proteolytic processing and reduces viral recognition from the immune system [118, 119].

The ability to modulate antigenic presentation and interaction with MHC through glycosylation has been used in recent years as a strategy in vaccine design for the treatment of diseases such as cancer, viral infections, and autoimmune diseases [120, 121].

### Glycosylation in intracellular signaling

O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) is a type of dynamic glycosylation found in cytosolic, nuclear, and mitochondrial proteins, involved in biological processes such as cell metabolism, cell differentiation, development of neurodegenerative diseases, among others [20, 122, 123]. O-GlcNAc consists of the addition of a GlcNAc molecule to a Ser/Thr residue, its synthesis is regulated by the substrate donor UDP-GlcNAc and by the *O-GlcNAc transferase* (OGT) and the *O-GlcNAcase* (OGA) enzymes that, respectively, add and remove glycans from the target protein [115]. O-GlcNAc along with phosphorylation regulates protein functions acting as a “switch” to activate and inhibit signals in cascades that lead to the development of cellular responses, maintaining the homeostasis of the communication systems of the cell with its environment [19, 124].

It has been observed that the activity of proteins can be regulated by dynamic interactions between the phosphorylation and O-GlcNAc, some regulatory mechanisms between both modifications may be of the type: antagonistic regulation or cooperative regulation. The antagonistic regulation is a reciprocal relationship in which one of the modifications stimulates the activity of the protein and the other modification induces its inhibition, in the antagonist regulation GlcNAc and phosphorylation can compete for the same Ser/Thr residue or link to different proximal Ser/Thr residue sites; in the cooperative regulation, the presence of both modifications on the target protein is required to activate or inhibit the biological functions of the protein, Figure 4 [125, 126].



During cell activation, the expression levels of O-GlcNAcylated proteins increased and 31% and 41% correspond to proteins located in the cytosol or the cell nucleus, respectively [127, 128], the high levels of O-GlcNAc require an increase in the availability of substrate UDP-GlcNAc, this requirement is supplied by the expression of the glucose transporter (GLUT 1) in the cell membrane of the T lymphocyte after the formation of the TCR-pMHC complex, GLUT 1 facilitates the entry of high levels of glucose into the cell where its metabolism leads to the synthesis of donor UDP-GlcNAc and subsequent formation of O-GlcNAc on the target protein [129–131].

O-GlcNAc regulates protein phosphorylation/dephosphorylation processes the signaling cascades, an example is Zap 70, an O-GlcNAcylated protein found upstream in the TCR activation signaling pathway. The presence of O-GlcNAc on Zap 70 inhibits the action of kinases preventing unspecific activation by acting as a protein seal at the phosphorylation site [132–134]. O-GlcNAc also positively regulates signaling at the nucleus level, where the transcription factors Jun, NFκB, NAFT, and c-Rel are O-GlcNAcylated during the propagation of cell activation signaling. It has been suggested that the inhibition of the OGT enzyme in activated cells decreases the production of IL-2 and affects the processes of cell proliferation, these reports suggest that the addition of O-GlcNAc to transcription factors facilitates their translocation from the cytosol into the nucleus, where they finally promote the production of cytokines and other molecules of the effector response [132, 133, 135].

## Conclusions

Protein glycosylation has been explored since the mid-twentieth century; the scientific interest in glycans includes the structural analysis of glycoproteins, their contribution to the biological function of proteins, and their potential use as markers in clinical diagnosis or cell phenotyping. As summarized in Table 1, Glycosylation actively participates in the cellular and molecular processes that promote the formation of the immunological synapse and the activation of the T lymphocyte. Glycans have a wide variety of functions like influencing protein structural stability, signaling propagation, amplification, and regulation and they also work as a biological barrier that mediates cell-cell contact. As a key feature of the molecules that integrate the immunological synapse, glycans tune T cell activation intensity, it is thus, tempting to point them as targets for the development of novel

modulatory therapeutic strategies for the treatment of infections, oncological and autoimmune diseases. However, to reach this possibility, several questions should be first answered, including how the cell decides timing, identity and, the proportion of proteins that get glycosylated; to decode the instructions depicted by each glycan pattern and how can we artificially modulate glycosidic residues from individual proteins in vivo. Responses to these inquiries will open for us a new perspective for biological interpretations.

## Disclosure statement

The authors have declared no financial or commercial conflict of interest.

## Funding

This work was supported by grants IN-213818, IN-218719 and IN-218919 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico). W. GÓMEZ-HENAO is recipient of a PhD fellowship from CONACYT (Registry 742472). W. GÓMEZ-HENAO is part of Biochemical Sciences PhD Program of the Universidad Nacional Autónoma de México and of the Université Paris-Est Créteil. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Dirección general de asuntos del personal académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México.

## ORCID

Wilton Gómez-Henao  <http://orcid.org/0000-0002-4637-0053>

Eda Patricia Tenorio  <http://orcid.org/0000-0002-4725-2286>

Miguel Cuéllar Mendoza  <http://orcid.org/0000-0002-5236-4653>

Ricardo Lascurain Ledezma  <http://orcid.org/0000-0001-5665-2911>

Edgar Zenteno  <http://orcid.org/0000-0001-5603-4072>

## References

1. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221–227. Juldoi:10.1126/science.285.5425.221.
2. Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(11):1023–1033. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0161.
3. Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells (Reprinted from). *Nature*. 1998;395(6697):82–86. doi:10.1038/25764.
4. Freiberg BA, Kupfer H, Maslanik W, et al. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol*. 2002;3(10):911–917. doi:10.1038/ni836.
5. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from

- analysis of the SWISS-PROT database. Dedicated to Prof. Akira Kobata and Prof. Harry Schachter on the occasion of their 65th birthdays. *Biochim Biophys Acta (BBA)*. 1999;1473(1):4–8.
6. Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep*. 2011;1(90):srep00090.
  7. Roth J, Zuber C, Park S, et al. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells*. 2010;30(6):497–506. doi:10.1007/s10059-010-0159-z.
  8. Xu CC, Ng DTW. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(12):742–752. doi:10.1038/nrm4073.
  9. Giovannone N, Antonopoulos A, Liang J, et al. Human B cell differentiation is characterized by progressive remodeling of O-linked glycans. *Front Immunol*. 2018;9:2857.
  10. Toscano MA, Bianco GA, Ibarregui JM, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*. 2007;8(8):825–834. doi:10.1038/ni1482.
  11. Ferreira IG, Pucci M, Venturi G, Malagolini N, Chiricolo M, Dall’Olio F. Glycosylation as a main regulator of growth and death factor receptors signaling. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):580–08.
  12. Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol*. 1996;132(6):1199–1208. doi:10.1083/jcb.132.6.1199.
  13. Hang Q, Isaji T, Hou S, Wang Y, Fukuda T, Gu J. A key regulator of cell adhesion: identification and characterization of important N-glycosylation sites on integrin  $\alpha 5$  for cell migration. *Mol Cell Biol*. 2017;37(9):16.
  14. Daniels MA, Hogquist KA, Jameson SC. Sweet ’n’ sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol*. 2002;3(10):903–910. doi:10.1038/ni1002-903.
  15. Comelli EM, Head SR, Gilmartin T, et al. A focused microarray approach to functional glycomics: transcriptional regulation of the glycome. *Glycobiology*. 2006;16(2):117–131. doi:10.1093/glycob/cwj048.
  16. Raman R, Raguram S, Venkataraman G, Paulson JC, Sasisekharan R. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat Methods*. 2005;2(11):817–824. doi:10.1038/nmeth807.
  17. Turnbull JE, Field RA. Emerging glycomics technologies. *Nat Chem Biol*. 2007;3(2):74–77. doi:10.1038/nchembio0207-74.
  18. Patsos G, Hebbe-Viton V, San Martin R, Paraskeva C, Gallagher T, Corfield A. Action of a library of O-glycosylation inhibitors on the growth of human colorectal cancer cells in culture. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 4):721–723. doi:10.1042/BST0330721.
  19. Ong QX, Han WP, Yang XY. O-GlcNAc as an integrator of signaling pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:599.
  20. Issad T, Lefebvre T. Editorial: O-GlcNAcylation: expanding the frontiers. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:867. doi:10.3389/fendo.2019.00867.
  21. Rakus JF, Mahal LK. New technologies for glycomic analysis: toward a systematic understanding of the glycome. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2011;4:367–392. doi:10.1146/annurev-anchem-061010-113951.
  22. Oswald DM, Cobb BA. Emerging glycobiology tools: a renaissance in accessibility. *Cell Immunol*. 2018; 333:2–8. doi:10.1016/j.cellimm.2018.04.010.
  23. Riley NM, Bertozzi CR, Pitteri SJ. A pragmatic guide to enrichment strategies for mass spectrometry-based glyco-proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2020;mcp.R120.002277. doi:10.1074/mcp.R120.002277.
  24. Prescher JA, Bertozzi CR. Chemical technologies for probing glycans. *Cell*. 2006;126(5):851–854. doi:10.1016/j.cell.2006.08.017.
  25. Agard NJ, Bertozzi CR. Chemical approaches to perturb, profile, and perceive glycans. *Acc Chem Res*. 2009;42(6):788–797. doi:10.1021/ar800267j.
  26. Gray MA, Stanczak MA, Mantuano NR, et al. Targeted glycan degradation potentiates the anticancer immune response in vivo. *Nat Chem Biol*. 2020. doi:10.1038/s41589-020-0622-x.
  27. Cummings RD, Pierce JM. The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol*. 2014;21(1):1–15. doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.010.
  28. Kuball J, Hauptrock B, Malina V, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirectioned T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J Exp Med*. 2009;206(2):463–475. doi:10.1084/jem.20082487.
  29. Zhang K, Demarest SJ, Wu X, Fitchett JR. *Glycosylation Profiling of  $\alpha/\beta$  T Cell Receptor Constant Domains Expressed in Mammalian Cells*. New York: Springer; 2017; p. 197–213.
  30. Rudd PM, Wormald MR, Stanfield RL, et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol*. 1999;293(2): 351–366. doi:10.1006/jmbi.1999.3104.
  31. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*. 1996;273(5271):104–106.
  32. Valitutti S, Lanzavecchia A. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today*. 1997;18(6):299–304.
  33. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001; 409(6821):733–739. doi:10.1038/35055582.
  34. Dias AM, Dourado J, Lago P, et al. Dysregulation of T cell receptor N-glycosylation: a molecular mechanism involved in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*. 2014;23(9):2416–2427. doi:10.1093/hmg/ddt632.
  35. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, et al. Core fucosylation on T Cells, required for activation of T-cell receptor signaling and induction of colitis in mice, is increased in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2016;150(7):1620–1632. doi:10.1053/j.gastro.2016.03.002.

36. Verhelst X, Dias AM, Colombel JF, et al. Protein glycosylation as a diagnostic and prognostic marker of chronic inflammatory gastrointestinal and liver diseases. *Gastroenterology*. 2020;158(1):95–110. doi:10.1053/j.gastro.2019.08.060.
37. Wang Y-N, Lee H-H, Hsu JL, Yu D, Hung M-C. The impact of PD-LIN-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):77. doi:10.1186/s12929-020-00670-x.
38. Schumacher TNM. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(7):512–519. doi:10.1038/nri841.
39. Liddy N, Bossi G, Adams KJ, et al. Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. *Nat Med*. 2012;18(6):980–987. doi:10.1038/nm.2764.
40. Swamy M, Dopfer EP, Molnar E, Alarcón B, Schamel WWA. The 450 kDa TCR Complex has a Stoichiometry of alphabeta gamma epsilon delta epsilon-lon zetazeta. *Scand J Immunol*. 2008;67(4):418–420. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02082.x.
41. Samelson LE, Patel MD, Weissman AM, Harford JB, Klausner RD. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell*. 1986;46(7):1083–1090.
42. Sussman JJ, Bonifacio JS, Lippincott SJ, et al. Failure to synthesize the T Cell CD3- $\zeta$  chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*. 1988;52(1):85–95.
43. Weissman AM, Hou D, Orloff DG, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9709–9713. doi:10.1073/pnas.85.24.9709.
44. Borst J, Prendiville MA, Terhorst C. The T3 complex on human thymus-derived lymphocytes contains two different subunits of 20 kDa. *Eur J Immunol*. 1983;13(7):576–580. doi:10.1002/eji.1830130712.
45. Gold DP, Puck JM, Pettey CL, et al. Isolation of cDNA clones encoding the 20K non-glycosylated polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 complex. *Nature*. 1986;321(6068):431–434. doi:10.1038/321431a0.
46. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6(1):629–662. doi:10.1146/annurev.iv.06.040188.003213.
47. Dietrich J, Neisig A, Hou X, Wegener AM, Gajhede M, Geisler C. Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *J Cell Biol*. 1996;132(3):299–310. doi:10.1083/jcb.132.3.299.
48. Arnett KL, Harrison SC, Wiley DC. Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(46):16268–16273. doi:10.1073/pnas.0407359101.
49. Manolios N, Bonifacio J, Klausner R. Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science*. 1990;249(4966):274–277. doi:10.1126/science.2142801.
50. Zapata DA, Schamel WWA, Torres PS, et al. Biochemical differences in the alpha beta T cell receptor/CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(23):24485–24492. doi:10.1074/jbc.M311455200.
51. Rossi NE, Reine J, Pineda-Lezamis M, et al. Differential antibody binding to the surface alpha beta TCR/CD3 complex of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation. *Int Immunol*. 2008;20(10):1247–1258. doi:10.1093/intimm/dxn081.
52. van de Griend RJ, Borst J, Tax WJ, Bolhuis RL. Functional reactivity of WT31 monoclonal antibody with T cell receptor-gamma expressing CD3 + 4-8- T cells. *J Immunol*. 1988;140(4):1107–1110.
53. C Chilson OP, Kelly-Chilson AE. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1989;19(2):389–396. doi:10.1002/eji.1830190225.
54. Dither-Centerlind M-L, Axelsson B, Hammarstrom S, Hellström U, Perlmann P. Interaction of lectins with human T lymphocytes mitogenic properties, inhibitory effects, binding to the cell membrane and to isolated surface glycopeptides. *Eur J Immunol*. 1980;10(6):434–442.
55. Chilson OP, Boylston AW, Crumpton MJ. *Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *EMBO J*. 1984;3(13):3239–3245.
56. Kay JE. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunol Lett*. 1991;29(1-2):51–54.
57. Pang B, Shin DH, Park KS, et al. Differential pathways for calcium influx activated by concanavalin A and CD3 stimulation in Jurkat T cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2012;463(2):309–318.
58. Riley JL, Mao M, Kobayashi S, et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11790–11795. doi:10.1073/pnas.162359999.
59. Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. 1999;283(5402):680–682. doi:10.1126/science.283.5402.680.
60. Evans EJ, Esnouf RM, Manso-Sancho R, et al. Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat Immunol*. 2005;6(3):271–279. doi:10.1038/ni1170.
61. Aruffo A, Seed B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(23):8573–8577. doi:10.1073/pnas.84.23.8573.
62. Hanawa H, Ma Y, Mikolajczak SA, et al. A novel costimulatory signaling in human T lymphocytes by a splice variant of CD28. *Blood*. 2002;99(6):2138–2145. doi:10.1182/blood.v99.6.2138.
63. Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol*. 2009;27(4):378–386. doi:10.1038/nbt.1532.
64. Ma BY, Mikolajczak SA, Yoshida T, Yoshida R, Kelvin DJ, Ochi A. CD28 T cell costimulatory receptor function is negatively regulated by N-linked carbohydrates. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(1):60–67. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.012.

65. Arenas-Del Ángel M, Legorreta-Herrera M, Mendoza-Hernández G, et al. Amaranthus leucocarpus lectin recognizes a moesin-like O-glycoprotein and costimulates murine CD3-activated CD4(+) T cells. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3(3):182–195. doi:10.1002/iid3.58.
66. Recny MA, Luther MA, Knoppers MH, et al. N-Glycosylation is required for human cd2 immunoadhesion functions. *J Biol Chem*. 1992;267(31):22428–22434.
67. Wang J-h, Reinherz EL. Structural basis of cell–cell interactions in the immune system. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10(6):656–661.
68. Chang H-C, Tan K, Ouyang J, et al. Structural and Mutational Analyses of a CD8 $\alpha\beta$  Heterodimer and Comparison with the CD8 $\alpha\alpha$  Homodimer. *Immunity*. 2005;23(6):661–671.
69. Classon BJ, Brown Mh Fau - Garnett D, Garnett D, Fau - Somoza C, et al. The hinge region of the CD8 alpha chain: structure, antigenicity, and utility in expression of immunoglobulin superfamily domains. *Int Immunol*. 1992;4(2):215–25. doi:10.1093/intimm/4.2.215.
70. Merry AH, Gilbert RJC, Shore DA, et al. O-glycan sialylation and the structure of the stalk-like region of the T cell co-receptor CD8. *J Biol Chem*. 2003;278(29):27119–27128. doi:10.1074/jbc.M213056200.
71. Moody AM, North SJ, Reinhold B, et al. Sialic acid capping of CD8beta core 1-O-glycans controls thymocyte-major histocompatibility complex class I interaction. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7240–7246. doi:10.1074/jbc.M210468200.
72. Daniels MA, Devine L, Miller JD, et al. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity*. 2001;15(6):1051–1061.
73. Galvan M, Murali-Krishna K, Ming LL, Baum L, Ahmed R. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8(+) T cells from naive cells. *J Immunol*. 1998;161(2):641–648.
74. Harrington LE, Galvan M, Baum LG, Altman JD, Ahmed R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med*. 2000;191(7):1241–1246. doi:10.1084/jem.191.7.1241.
75. Shore DA, Wilson IA, Dwek RA, Rudd PM. Glycosylation and the function of the T cell co-receptor CD8. *Glycobiol Med*. 2005;564:71–84.
76. Carr SA, Hemling ME, Folena-Wasserman G, et al. Protein and carbohydrate structural-analysis of a recombinant soluble cd4 receptor by mass-spectrometry. *J Biol Chem*. 1989;264(35):21286–21295.
77. Spellman MW, Leonard CK, Basa LJ, Gelineo I, Vanhalbeek H. Carbohydrate structures of recombinant soluble human CD4 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*. 1991;30(9):2395–2406. doi:10.1021/bi00223a015.
78. König R, Ashwell G, Hanover JA. Glycosylation of cd4 - tunicamycin inhibits surface expression. *J Biol Chem*. 1988;263(19):9502–9507.
79. Tiffit CJ, Proia RL, Camerini-Otero RD. The folding and cell-surface expression of cd4 requires glycosylation. *J Biol Chem*. 1992;267(5):3268–3273.
80. Schmid K, Hediger MA, Brossmer R, et al. Amino-acid-sequence of human plasma galactoglycoprotein - identity with the extracellular region of cd43 (sialophorin). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(2):663–667.
81. Cyster JG, Shotton DM, Williams AF. The dimensions of the lymphocyte-t glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *Embo J*. 1991;10(4):893–902.
82. Matsumoto M, Atarashi K, Umemoto E, et al. CD43 functions as a ligand for E-selectin on activated T cells. *J Immunol*. 2005;175(12):8042–8050. doi:10.4049/jimmunol.175.12.8042.
83. Barran P, Fellingner W, Warren CE, Dennis JW, Ziltener HJ. Modification of CD43 and other lymphocyte O-glycoproteins by core 2 N-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology*. 1997;7(1):129–136. doi:10.1093/glycob/7.1.129.
84. Brockhausen I, Pamela S, O-GalNAc Glycans, et al. In: Varki A CR, Esko JD, editors., editor. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2017.
85. Jones AT, Federspiel B, Ellies LG. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J Immunol*. 1994;153(8):3426–3439.
86. Ellies LG, Jones AT, Williams MJ, Ziltener HJ. Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in graft-versus-host disease. *Glycobiology*. 1994;4(6):885–893. doi:10.1093/glycob/4.6.885.
87. Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. Negative regulation of t-cell adhesion and activation by cd43. *Nature*. 1995;377(6549):535–538. doi:10.1038/377535a0.
88. Thurman EC, Walker J, Jayaraman S, Manjunath N, Ardman B, Green JM. Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43. *Int Immunol*. 1998;10(5):691–701. doi:10.1093/intimm/10.5.691.
89. Ostberg JR, Barth RK, Frelinger JG. The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today*. 1998;19(12):546–550.
90. Delon J, Kaibuchi K, Germain RN. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 2001;15(5):691–701. doi:10.1016/S1074-7613(01)00231-X.
91. Carlow DA, Corbel SY, Williams MJ, Ziltener HJ. IL-2, -4, and -15 differentially regulate O-glycan branching and P-selectin ligand formation in activated CD8 T cells. *J Immunol*. 2001;167(12):6841–6848.
92. Higgins EA, Siminovitch KA, Zhuang DL, Brockhausen I, Dennis JW. Aberrant o-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets from patients with the wiskott-aldrich syndrome. *J Biol Chem*. 1991;266(10):6280–6290.
93. Khan S, Holding S, Dore PC, Sewell WAC. Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for

- some features of Wiskott-Aldrich syndrome. *Med Hypotheses*. 2008;70(2):269–272.
94. Barbosa JA, Santos-Aguado J, Mentzer SJ, Strominger JL, Burakoff SJ, Biro PA. Site-directed mutagenesis of class I HLA genes. Role of glycosylation in surface expression and functional recognition. *J Exp Med*. 1987;166(5):1329–1350. doi:10.1084/jem.166.5.1329.
  95. Barber LD, Patel TP, Percival L, Gumperz JE, Lanier LL, Phillips JH. Unusual uniformity of the N-linked oligosaccharides of HLA-A, -B, and -C glycoproteins. *J Immunol*. 1996;156(9):3275–3284.
  96. Parham P, Alpert BN, Alpert B, Orr HT, Strominger JL. Carbohydrate moiety of HLA antigens. Antigenic properties and amino acid sequences around the site of glycosylation. *J Biol Chem*. 1977;252(21):7555–7567.
  97. Ploegh HL, Orr HT, Strominger JL. Biosynthesis and cell-surface localization of nonglycosylated human histocompatibility antigens. *J Immunol*. 1981;126(1):270–275.
  98. Parham P. Functions for MHC class I carbohydrates inside and outside the cell. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(11):427–433.
  99. Mandal TK, Mukhopadhyay C. Effect of glycosylation on structure and dynamics of MHC class I glycoprotein: A molecular dynamics study. *Biopolymers*. 2001;59(1):11–23.
  100. Ishikawa S, Kowal C, Fau - Cole B, Cole B, Fau - Thomson C, et al. Replacement of N-glycosylation sites on the MHC class II E alpha chain. Effect on thymic selection and peripheral T cell activation. *J Immunol*. 1995;154(10):5023–5029.
  101. Salomonsen J, Marston D, Avila D, et al. The properties of the single chicken MHC classical class II alpha chain (B-LA) gene indicate an ancient origin for the DR/E-like isotype of class II molecules. *Immunogenetics*. 2003;55(9):605–614. doi:10.1007/s00251-003-0620-7.
  102. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 1993;364(6432):33–39. doi:10.1038/364033a0.
  103. Cullen Se Fau - Kindle CS, Kindle Cs Fau - Shreffler DC, Shreffler Dc Fau - Cowing C, Cowing C. Differential glycosylation of murine B cell and spleen adherent cell Ia antigens. *J Immunol*. 1981;127(4):1478–1484.
  104. Barrera C, Espejo R, Reyes VE. Differential glycosylation of MHC class II molecules on gastric epithelial cells: implications in local immune responses. *Hum Immunol*. 2002;63(5):384–393. doi:10.1016/s0198-8859(02)00386-5.
  105. Ryan SO, Bonomo J, Fau - Zhao F, Zhao F, Fau - Cobb BA, Cobb BA. MHC II glycosylation modulates *Bacteroides fragilis* carbohydrate antigen presentation. *J Exp Med*. 2011;208(5):1041–1053.
  106. Wei BY, Buerstedde Jm Fau - Bell M, Bell M, Fau - Chase C, et al. Functional effects of N-linked oligosaccharides located on the external domain of murine class II molecules. *J Immunol*. 1991;146(7):2358–2366.
  107. Nag B, Passmore D, Fau - Kendrick T, Kendrick T, Fau - Bhayani H, et al. N-linked oligosaccharides of murine major histocompatibility complex class II molecule. Role in antigenic peptide binding, T cell recognition, and clonal nonresponsiveness. *J Biol Chem*. 1992;267(31):22624–22629.
  108. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol*. 2016;37(11):724–737. doi:10.1016/j.it.2016.08.010.
  109. Nielsen M, Andreatta M, Peters B, Buus S. Immunoinformatics: predicting peptide–MHC binding. *Annu Rev Biomed Data Sci*. 2020;3(1):191–115. doi:10.1146/annurev-biodatasci-021920-100259.
  110. Carbone FR, Gleeson PA. Carbohydrates and antigen recognition by T cells. *Glycobiology*. 1997;7(6):725–730. doi:10.1093/glycob/7.6.725-d.
  111. Harding CV, Kihlberg J, Fau - Elofsson M, Elofsson M, Fau - Magnusson G, et al. Glycopeptides bind MHC molecules and elicit specific T cell responses. *J Immunol*. 1993;151(5):2419–2425.
  112. Deck MB, Sjolín P, Unanue ER, Kihlberg J. MHC-restricted, glycopeptide-specific T cells show specificity for both carbohydrate and peptide residues. *J Immunol*. 1999;162(8):4740–4744.
  113. GalliStampino L, Meinjohanns E, Frische K, et al. T-cell recognition of tumor-associated carbohydrates: The nature of the glycan moiety plays a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity. *Cancer Research*. 1997;57(15):3214–3222.
  114. Suzuki T, Seko A, Kitajima K, Inoue Y, Inoue S. Identification of peptide:N-glycanase activity in mammalian-derived cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194(3):1124–1130. doi:10.1006/bbrc.1993.1938.
  115. Haurum JS, Høier IB, Arsequell G, et al. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *J Exp Med*. 1999;190(1):145–150. doi:10.1084/jem.190.1.145.
  116. Werdelin O, Meldal M, Jensen T. Processing of glycans on glycoprotein and glycopeptide antigens in antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9611–9613. doi:10.1073/pnas.152345899.
  117. Ninkovic T, Hanisch FG. O-glycosylated human MUC1 repeats are processed in vitro by immunoproteasomes. *J Immunol*. 2007;179(4):2380–2388.
  118. Doe B, Steimer KS, Walker CM. Induction of HIV-1 envelope (gp120)-specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell-derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N-linked glycans. *Eur J Immunol*. 1994;24(10):2369–2376. doi:10.1002/eji.1830241017.
  119. Li HL, Xu CF, Blais S, et al. Proximal glycans outside of the epitopes regulate the presentation of HIV-1 envelope gp120 helper epitopes. *J Immunol*. 2009;182(10):6369–6378. doi:10.4049/jimmunol.0804287.
  120. Dzhambazov B, Nandakumar KS, Kihlberg J, Fugger L, Holmdahl R, Vestberg M. Therapeutic vaccination of active arthritis with a glycosylated collagen type II peptide in complex with MHC class II molecules. *J*

- Immunol.* 2006;176(3):1525–1533. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1525.
121. Palitzsch B, Gaidzik N, Stergiou N, et al. A synthetic glycopeptide vaccine for the induction of a monoclonal antibody that differentiates between normal and tumor mammary cells and enables the diagnosis of human pancreatic cancer. *Angew Chem Int Ed.* 2016; 55(8):2894–2898. doi:10.1002/anie.201509935.
  122. Issad T, Masson E, Fau - Pagesy P, Pagesy PO. GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes Metab.* 2010;36(6 Pt 1): 423–435.
  123. Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med.* 2016;51:1–15. doi:10.1016/j.mam.2016.05.005.
  124. Issad TO. [O-GlcNAc glycosylation and regulation of cell signaling]. *Med Sci (Paris).* 2010;26(8-9): 753–759. doi:10.1051/medsci/2010268-9753.
  125. Whelan SA, Hart GW. Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ Res.* 2003;93(11):1047–1058. doi:10.1161/01.RES.0000103190.20260.37.
  126. Butkinaree C, Park K, Hart GO, LinkedβN. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(2):96–106. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.018.
  127. Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal n-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes - evidence for o-linked glcnac. *J Biol Chem.* 1984;259(5):3308–3317.
  128. Woo CM, Lund PJ, Huang AC, Davis MM, Bertozzi CR, Pitteri SJ. Mapping and Quantification of Over 2000 O-linked Glycopeptides in Activated Human T Cells with Isotope-Targeted Glycoproteomics (Isotag). *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(4):764–775. doi:10.1074/mcp.RA117.000261.
  129. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* 2014;20(1):61–72. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.004.
  130. Swamy M, Pathak S, Grzes KM, et al. Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nat Immunol.* 2016;17(6):712–720. doi:10.1038/ni.3439.
  131. Machacek M, Slawson C, Fields PE. O-GlcNAc: a novel regulator of immunometabolism. *J Bioenerg Biomembr.* 2018;50(3):223–229. doi:10.1007/s10863-018-9744-1.
  132. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):591–619. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
  133. Trinidad JC, Barkan DT, Gulledge BF, et al. Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(8):215–229. doi:10.1074/mcp.O112.018366.
  134. Lund PJ, Elias JE, Davis MM. Global analysis of O-GlcNAc glycoproteins in activated human T cells. *J Immunol.* 2016;197(8):3086–3098. doi:10.4049/jimmunol.1502031.
  135. O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol.* 2004;24(4): 1680–1690. doi:10.1128/mcb.24.4.1680-1690.2004.



OPEN ACCESS

**Edited by:**

Varun Sasidharan Nair,  
Helmholtz Association of German  
Research Centers (HZ), Germany

**Reviewed by:**

Shivashankar Othy,  
University of California, Irvine,  
United States

Dhaneshwar Kumar,  
National Institute of Diabetes and  
Digestive and Kidney Diseases (NIH),  
United States  
Seonghun Kim,  
Korea Research Institute of Bioscience  
and Biotechnology (KRIBB),  
South Korea

**\*Correspondence:**

Eda Patricia Tenorio  
ep.tenorio@unam.mx  
Edgar Zenteno  
ezenteno@unam.mx

†These authors share last authorship

**Specialty section:**

This article was submitted to  
T Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 03 October 2021

**Accepted:** 11 November 2021

**Published:** 30 November 2021

**Citation:**

Gómez-Henao W, Saavedra R,  
Chávez-Sánchez FR, Lascurain R,  
Zenteno E and Tenorio EP (2021)  
Expression Dynamics of the  
O-Glycosylated Proteins Recognized  
by *Amaranthus leucocarpus* Lectin in  
T Lymphocytes and Its Relationship  
With Moesin as an Alternative  
Mechanism of Cell Activation.  
Front. Immunol. 12:788880.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.788880

# Expression Dynamics of the O-Glycosylated Proteins Recognized by *Amaranthus leucocarpus* Lectin in T Lymphocytes and Its Relationship With Moesin as an Alternative Mechanism of Cell Activation

Wilton Gómez-Henao<sup>1</sup>, Rafael Saavedra<sup>2</sup>, Francisco Raúl Chávez-Sánchez<sup>1</sup>,  
Ricardo Lascurain<sup>1</sup>, Edgar Zenteno<sup>1\*†</sup> and Eda Patricia Tenorio<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,

<sup>2</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

T lymphocyte activation begins with antigen/MHC recognition by the TCR/CD3 complex followed by a costimulatory signal provided by CD28. The search for novel costimulatory molecules has been extensive due to their potential use as immunotherapeutic targets. Although some molecules have been identified, they are unable to provide sustainable signaling to allow for proper T cell activation and proliferation. It has been shown that the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) can be used as an *in vitro* costimulator of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the presence of anti-CD3 mAb; this lectin specifically recognizes O-glycans of the Galβ1-3GalNAc-O-Ser/Thr type, including a 70-kDa moesin-like protein that has been suggested as the costimulatory molecule. However, the identity of this molecule has not been confirmed and such costimulation has not been analyzed in CD8<sup>+</sup> lymphocytes. We show herein that the expression kinetics of the glycoproteins recognized by ALL (gpALL) is different in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, unlike moesin expression. Results from IP experiments demonstrate that the previously described 70-kDa moesin-like protein is an O-glycosylated form of moesin (O-moesin) and that *in vitro* stimulation with anti-CD3 and anti-moesin mAb induces expression of the activation molecules CD69 and CD25, proliferation and IL-2 production as efficiently as cells costimulated with ALL or anti-CD28. Overall, our results demonstrate that O-moesin is expressed in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and that moesin provides a new costimulatory activation signal in both T cell subsets.

**Keywords:** O-glycosylation, *Amaranthus leucocarpus* lectin, moesin, T lymphocytes, costimulatory molecules

## INTRODUCTION

T cell activation is a complex process dependent on three sequential signals, the first comprises antigen/MHC recognition by the TCR/CD3 complex; the second involves the generation of a costimulatory signal induced by CD28 after CD80/CD86 recognition in antigen presenting cells (APC); and the third consists of the effect of cytokines that maintain cell survival, expansion, and polarization like IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-4 (1–3). This process begins with the immunological synapse formation, the contact interface between the T cell and the APC, where diverse proteins converge to promote stimulation, adhesion, communication, and signaling, many of which are highly dependent on the glycosidic portion of glycoproteins (4–6). A proper activation is highly dependent on costimulation since this second signal enhances the one induced by antigen recognition (7–9) and CD28 remains as the canonical costimulatory molecule in T cells (10). For example, although LFA-1 and CD2 have been proposed as alternative costimulatory molecules, the stimulus induced through these molecules is not strong enough to endure activation and allow adequate T cell effector functions. Other molecules like ICOS and OX40 appear once cell activation is complete and their costimulation provides survival and maintenance signals (11–14).

Earlier reports from our group showed that mouse and human CD4<sup>+</sup> T cells stimulated *in vitro* with anti-CD3 and the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) activate and proliferate similarly to anti-CD3/CD28 activated cells (15, 16), suggesting that other molecules can generate initial costimulatory signals and, potentially, the existence of an alternate T cell co-activation mechanism. ALL identifies O-glycoproteins with a Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O-Ser/Thr sequence, even in the presence of sialic acid residues in their structure (17). In mouse thymus, it recognizes CD4<sup>+</sup> T cells in the medulla and the cortico-medullary junction, suggesting that the glycoproteins identified by ALL (gpALL) are expressed until T cells mature (18, 19).

Additionally, one of the molecules recognized by ALL in circulating mouse CD4<sup>+</sup> T cells is a 70-kDa membrane O-glycoprotein that belongs to the ERM family (ezrin, radixin, and moesin) with high sequence homology to moesin (20). Moesin is mainly expressed in endothelial cells, platelets, T lymphocytes and to a lesser extent in some types of epithelial cells, where ezrin predominates (21, 22). It has been classically described as a non-glycosylated cytosolic protein involved in cell polarity maintenance and the interaction between membrane proteins with the cytoskeleton (23, 24); however, a few studies report its presence on the cell surface (25, 26). Moesin is a 67.8-kDa protein, composed of 577 amino acids, and its structure is comprised of a FERM or amino-terminal domain, a central or alpha-helical domain, and a moesin or carboxy-terminal domain (27); its cytosolic activity is regulated by phosphorylation of the conserved amino acid Thr<sup>558</sup>, which induces the protein to adopt an active conformation (28, 29). This protein is determinant for T cell homeostasis and function since moesin deficient mice show a reduced number of T cells in the periphery and lymph nodes (30, 31), and other studies have shown that suppressing moesin expression with siRNA hampers IL-2 production by T cells after *in vitro* stimulation (32).

Expanding our knowledge of costimulatory molecules in T cells is of great interest because they have become crucial targets for the treatment of different illnesses like cancer and autoimmune diseases (33, 34), turning any new molecule or mechanism involved in T cell activation into a potential clinical target. Therefore, in this study, we aimed to determine gpALL and moesin expression dynamics in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after *in vitro* activation and if the 70-kDa glycoprotein detected by ALL is an O-glycosylated form of moesin. Finally, we evaluated if *in vitro* stimulation with anti-CD3 and anti-moesin could induce activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Six to eight-week-old male BALB/c mice weighing 28–30 g were used for all experiments. Animals were bred and maintained at our animal house following institutional guidelines and used according to the protocol approved by the institutional ethics and research committees.

### Antibodies, Lectins, and Dyes

The following fluorochrome-conjugated mAbs were used: anti-CD4-APC (RM4-5, Tonbo Biosciences), -CD4-FITC (GK1.5), -CD8-PE (53-6.7) -CD8-PerCP-Vio 700 (53-6.7), -CD25-PE (REA568), -CD69-PE-Vio770 (H1.2F3) from Miltenyi Biotec and -moesin-PE (EP1863Y, Abcam). Gal $\beta$ -1,3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr type O-glycoproteins were detected using ALL, an in-house purified lectin obtained as previously described (35). ALL was biotinylated with the EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin kit (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions using a 1:2 lectin:biotin ratio. Biotinylated ALL was detected with Streptavidin Brilliant Violet 421 (Strp BV 421, BioLegend). CFSE (Thermo Fisher) was used for cell proliferation analysis and Ghost Dye Red 780 (Tonbo Biosciences) or 7-AAD (Thermo Fisher) for dead cell exclusion.

### Cell Staining and Flow Cytometry

Cell surface molecules analysis was performed incubating 10<sup>5</sup> cells with ALL followed by Strp BV 421, washed, and stained with the indicated antibody cocktail. All incubations were conducted in 100  $\mu$ l of wash buffer (DPBS supplemented with 1% FCS) for 30 min (4°C, in the dark). For viability determination, cells were incubated with 0.5  $\mu$ g/ml of Ghost Dye Red 780 (20 min, RT) or 1  $\mu$ g/ml of 7AAD (20 min, 4°C) in DPBS (Thermo Fisher). For moesin detection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in DPBS for 40 min before incubation with anti-moesin as described above. Stained cells were suspended in 200  $\mu$ l of DPBS, 100  $\mu$ l of the cell suspension was acquired using a MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) and analyzed with FlowJo software V.10.6.2 (Beckton Dickinson).

### Proliferation Assay

Splenocytes were obtained by perfusion with DPBS and red cells were removed using hypotonic NH<sub>4</sub>Cl lysing buffer. Cells were



stained with CFSE (Thermo Fisher) as previously reported (36) and T lymphocytes were purified by negative selection using the Pan T cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). Cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/ml) were incubated in complete RPMI medium (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, 50 mM 2- $\beta$  mercaptoethanol, and 50 U/ml penicillin-streptomycin from GIBCO and 10% FCS (ByProducts) in 96-well plates (Sarstedt) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were stimulated with 3  $\mu$ g/ml soluble anti-CD3 (145-2C11, in house purified) and 3  $\mu$ g/ml soluble anti-CD28 (37.51; Tonbo Biosciences), 5  $\mu$ g/ml ALL, and/or 5  $\mu$ g/ml anti-moesin (EP1863Y, Abcam). Seventy-two hours later cells were harvested, washed (DPBS, 1% FCS), and stained with the corresponding mAb combination.

## IL-2 Determination

Purified T cells stimulated as described above ( $2.5 \times 10^5$ ) cells/ml were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI complete medium in 24-well plates, and supernatants were collected at 48 h post-activation. IL-2 was quantified using the Mouse IL-2 ELISA Matched Antibody Pair Kit, following the manufacturer's indications (Tonbo Biosciences); the detection limit was 2 pg/ml.

## Cell Sorting

Freshly obtained splenocytes ( $1 \times 10^8$ ) or stimulated with 3  $\mu$ g/ml anti-CD3 and 0.3  $\mu$ g/ml CD28 for 48h, were labeled with anti-CD4, anti-CD8, and 7-AAD. Viable CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> gates were sorted, collected in FCS, washed several times in DPBS, and lysed immediately to obtain protein extracts; the purity of each population was  $\geq 95\%$ , the gating strategy and post-sort purity are shown in **Supplementary Figure 1**. Cells were sorted using a FACSAria (Beckton Dickinson) at LabNalCit, UNAM, Mexico.

## Protein Extraction

Purified CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes ( $1 \times 10^7$ ) were resuspended in 200  $\mu$ l RIPA buffer supplemented with 2 mM Na<sub>3</sub>O<sub>4</sub>V, a phosphatase inhibitor, and EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail 1x (Merck). The suspension was sonicated (30 s), incubated (30 min), and centrifuged for 20 min at 10,000 rpm. The supernatant was transferred to an Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit 10-kDa tube (Merck) for buffer exchange, centrifuging three times at 10,000 rpm for 15 min with 300  $\mu$ l DPBS supplemented with phosphatase and protease inhibitors. A final volume of 200  $\mu$ l of concentrated protein was obtained and concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher). The T cell protein extract was then used for immunoprecipitation assays, western or lectin blots.

## Immunoprecipitation and Pull Down

For moesin immunoprecipitation experiments, 5  $\mu$ l of unconjugated anti-moesin mAb (EP1863Y, Abcam) was mixed with 200  $\mu$ l of the T cell protein extract (200  $\mu$ g/ml) and incubated overnight at 4°C; then, 50  $\mu$ l of  $\mu$ MACS Protein A Microbeads (Miltenyi Biotec) were added (2 h, 4°C). The immunoprecipitate's washing, elution, and separation were performed according to the manufacturer's recommendations. For gpALL pull-down, 200  $\mu$ l of the T cell protein extract

(200  $\mu$ g/ml) was mixed with 30  $\mu$ l of biotinylated ALL (2.2 mg/ml) and incubated at 4°C overnight; then, 100  $\mu$ l of Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec) were added and further incubated for 2 h, at 4°C; the precipitate's elution, washing, and separation were performed with 500 mM GalNAc following manufacturer's instructions. The precipitates were used in later experiments.

## SDS-PAGE

Twenty  $\mu$ g of protein per well were loaded with 4x Laemmli + buffer 10%  $\beta$ -mercaptoethanol (Bio-Rad) at a 1:4 ratio and, later, the proteins were subjected to 10% SDS-PAGE (Invitrogen™) using Precision Plus Dual Color molecular weight standards (MW, Bio-Rad) as reference. Afterward, the gel was transferred to a polyvinyl difluoride (PVDF) Immobilon-P membrane (Millipore Corp). Ponceau S (Sigma-Aldrich) was used as a loading control in the experiments during the identification experiments of the glycans recognized by ALL.

## Lectin and Western Blot

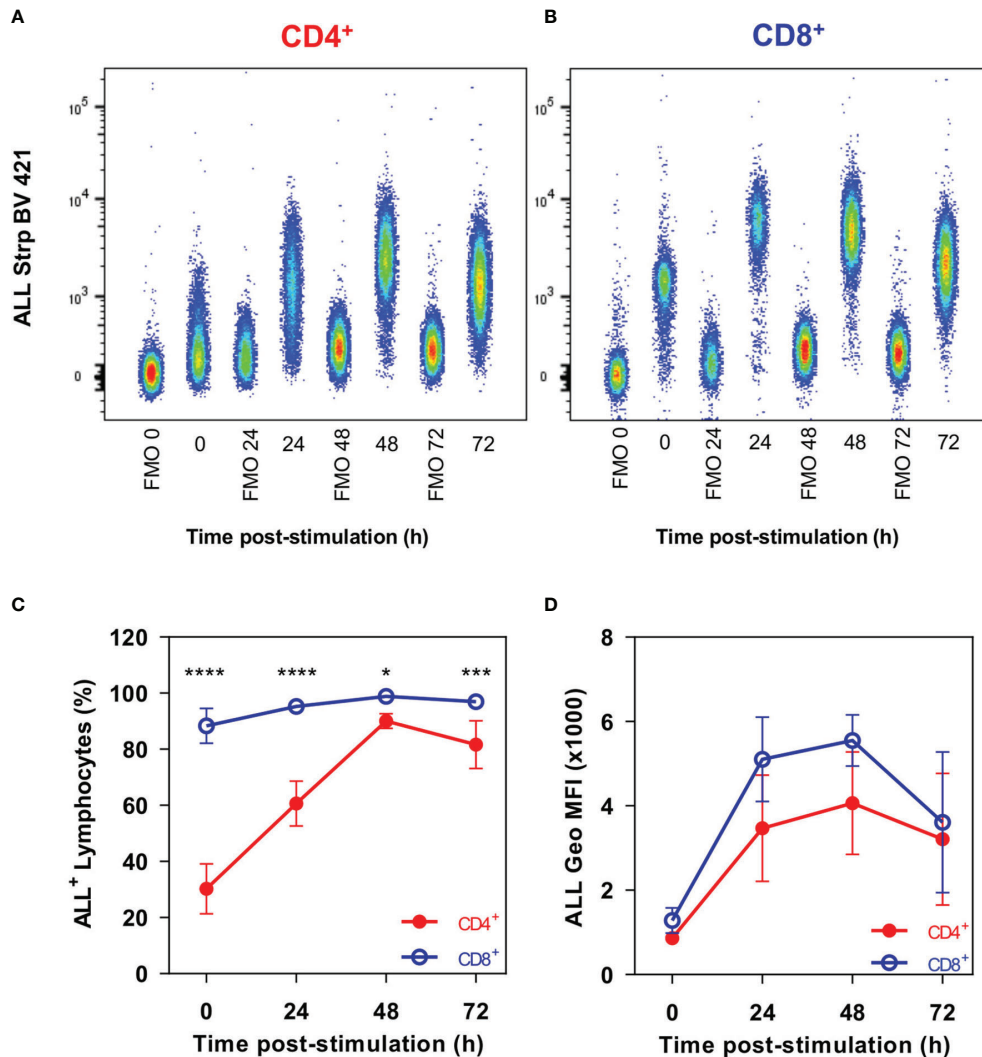
For lectin-blot, the PVDF membrane was blocked with T-PBS (PBS + 0.1% v/v Tween), 3% BSA for 1 h at room temperature, incubated with ALL 1.1  $\mu$ g/ml in PBS overnight (4°C) and washed 3 times with T-PBS followed by incubation with Streptavidin HRP (Strp-HRP, 1:7000; Vector Laboratories) in T-PBS, 5% Blotto-non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature and a final wash with T-PBS, 0.2% Triton X-100. Western-blot membranes were blocked for 1 h at room temperature using T-TBS (Tris-buffered saline + 0.1% Tween), 3% BSA, followed by incubation with anti-moesin HRP (EP1863Y, 1:5000; Abcam) diluted in TBS overnight at 4°C and washed with T-TBS, 0.2% Triton X-100. Both membranes were developed using Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (Merck) on autoradiographic Kodak Biomax films (Sigma-Aldrich), and data were analyzed using Lab 6.0.1 software (Bio-Rad).

## Statistical Analysis

Statistical differences between groups were determined using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison tests using PRISM software V9.2 (GraphPad).

## RESULTS

We first performed a comparative analysis of gpALL expression kinetics by flow cytometry in CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes stimulated for 24 h, 48 h, and 72 h with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs (**Figure 1**). Results show that 30% of unstimulated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are ALL<sup>+</sup>, this percentage doubles 24 h post-activation and reaches its maximum after 48 h, when 90% of CD4<sup>+</sup> cells are recognized by ALL (**Figures 1A, C**). In contrast, 88% of not activated CD8<sup>+</sup> lymphocytes already express gpALL and peak positivity occurs at 48h post-activation where 98.8% of cells are ALL<sup>+</sup> (**Figures 1B, C**); in both cases, a decrease of ALL binding is observed at 72 h (**Figures 1A, B, D**). Despite the



**FIGURE 1** | CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells show different gpALL expression patterns. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs; cells were harvested at the indicated time points and stained with anti-CD4, anti-CD8, ALL, Ghost Dye Red 780, and immediately analyzed in the flow cytometer. Lymphocytes were defined by FCS and SSC characteristics, after singlets selection, dead cells were excluded and gpALL were analyzed within CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sub gates. Representative analysis of gpALL expression kinetics in (A) CD4<sup>+</sup> and (B) CD8<sup>+</sup> T cells; (C) percentages of CD4<sup>+</sup>ALL<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>ALL<sup>+</sup> cells and (D) ALL binding in each cell subset after activation. Mean and SD from 2 independent experiments with 3 mice per group are depicted in C and D; data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test between CD4<sup>+</sup> (Red full circles) and CD8<sup>+</sup> (Blue open circles) at each time point. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001.

difference in cell percentage positivity, gpALL expression was equivalent in both unstimulated T cell subsets, and in both cases, peak expression was reached at 48 h post-activation; gpALL expression increased 4.7 times in CD4<sup>+</sup> cells (Figures 1A, D) and 4.3 times in CD8<sup>+</sup> cells (Figures 1B, D). Although gpALL expression increases in both cell subsets as a consequence of activation, almost 90% of unstimulated CD8<sup>+</sup> cells are ALL<sup>+</sup>; showing that gpALL is constitutively expressed in this cell subset but inducible in CD4<sup>+</sup> cells (Figure 1).

To further analyze these differences, we evaluated the O-glycoprotein profile recognized by ALL in unstimulated and 48 h stimulated cells with anti-CD3/CD28 by lectin blot. These results

(Figures 2A, C) revealed that in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells the number of glycoproteins and the intensity of the bands recognized by ALL increased after 48 h of activation compared to the gpALL expressed in unstimulated cells (Figures 2A–C). ALL recognized O-glycoproteins with molecular weights that vary between 20 and 150-kDa in both stimulated and unstimulated cells; after stimulation, over twice the bands were detected in CD4<sup>+</sup> cells (Unstimulated 7 vs Stimulated 15), while 5 additional bands were detected in CD8<sup>+</sup> cells (unstimulated 11 vs Stimulated 16) (Figure 2A). Quantitative analysis of the glycoproteins recognized by ALL (Figure 2C), showed that the mean gpALL expression level increased 1.1 times after activation

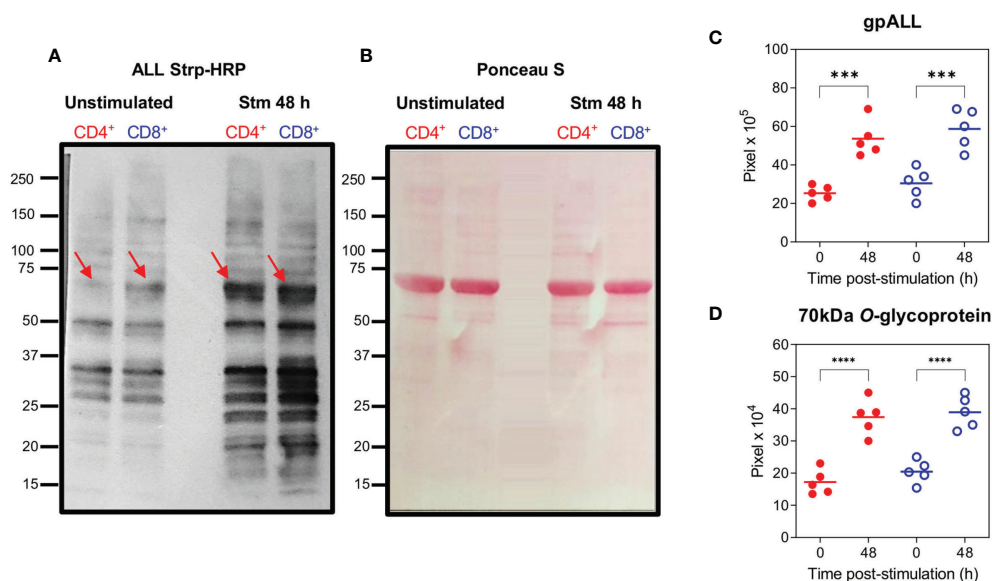
in CD4<sup>+</sup> T cells and 0.8 times in CD8<sup>+</sup> T cells compared to unstimulated samples. Within these, the 70-kDa protein (**Figure 2A**, arrow) is of particular interest for us because its expression has been previously reported in T cells from the thymus, peripheral blood, lymph nodes, and spleen (18). Herein we found an increased expression of the 70-kDa protein in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after 48 h stimulation (1.2 and 0.9 times, respectively. **Figure 2A**, arrows, and **2D**).

This 70-kDa protein has been identified as an ERM family member with high sequence homology to moesin (20), thus, we evaluated the membrane surface expression kinetics of moesin by flow cytometry. As can be seen in **Figures 3A–C**, some unstimulated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were moesin<sup>+</sup> (19.2 and 10.25%, respectively), these percentages increased up to 54.8% in CD4<sup>+</sup> cells and 50.2% in CD8<sup>+</sup> cells 48 h after stimulation. Consequently, membrane moesin expression increased slightly in both cell subsets after stimulation, up to 1.8 times in CD4<sup>+</sup> T cells at 72 h and 1.4 times in CD8<sup>+</sup> T at 24 h (**Figures 3A, B, D**). These results demonstrate that moesin is expressed in the cell membrane and the expression kinetics is equivalent in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells after activation.

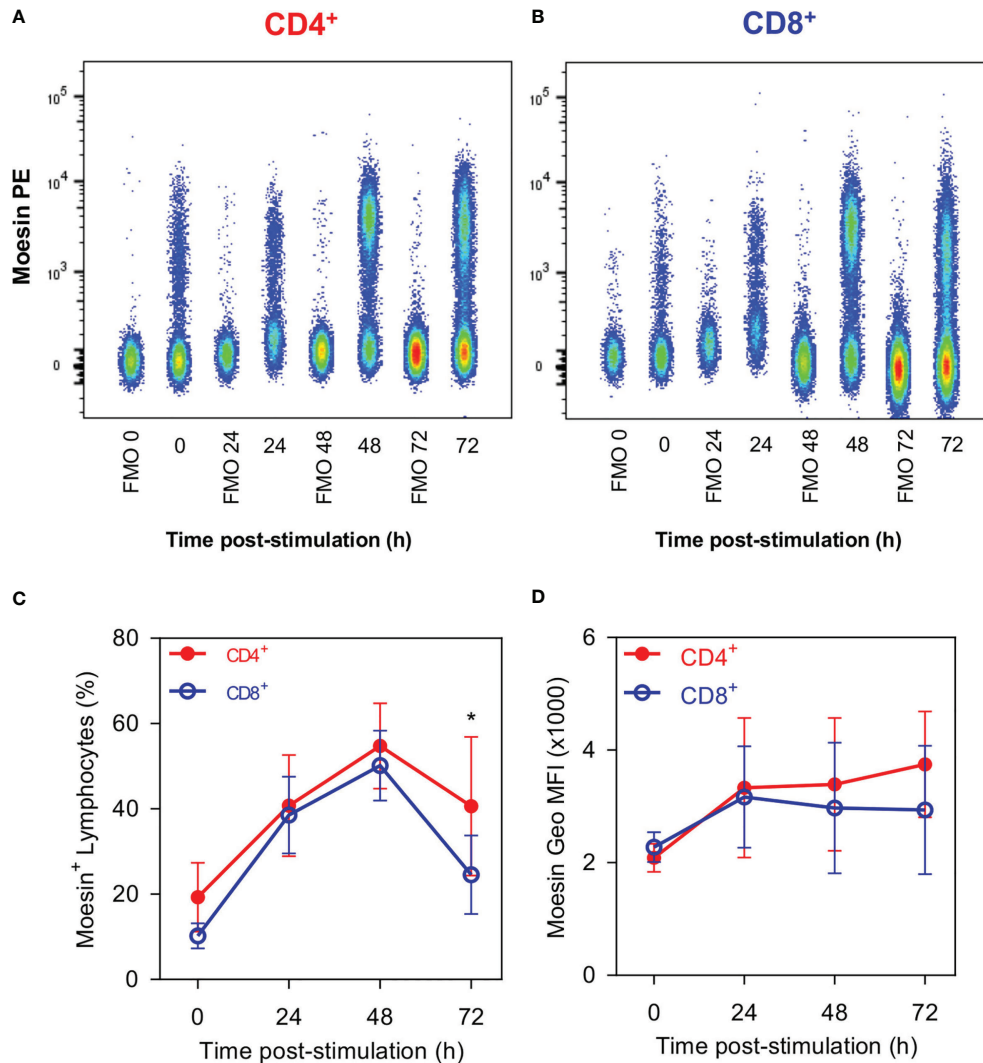
Arenas et al. also showed that this moesin-like protein co-localized with gpALL on the cell surface of CD4<sup>+</sup> lymphocytes after activation (20). Thus, to demonstrate that an *O*-glycosylated form of moesin (*O*-moesin) is expressed in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell subsets, we performed precipitation and cross-recognition assays using an anti-moesin mAb and ALL in protein extracts

from 48 h activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. First, we immunoprecipitated the proteins with anti-moesin, and performed a lectin-blot using ALL and a western-blot developing with anti-moesin (**Figure 4A**), results showed that ALL recognizes 5 proteins with equivalent molecular weights in both cell subsets (150, 100, 80, 70 and 60-kDa) and an additional 45-kDa protein in CD4<sup>+</sup> cells only. The 70-kDa band was the most prominent in both cell subsets and corresponds to the only band observed in the anti-moesin western blot. In parallel, ALL precipitated proteins were analyzed in a western blot developed with anti-moesin, where a single 70-kDa band is revealed in both cell subsets and a lectin blot with ALL (**Figure 4B**). The latter showed the presence of 5 bands in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and 4 bands in CD8<sup>+</sup> T, including the 70-kDa *O*-glycoprotein. These results show that ALL recognizes an *O*-moesin expressed in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, the detection of additional molecules in the lectin blots, suggests that these molecules could have been isolated as part of a larger molecular complex.

Up to date, no reports describe the presence of a glycosylated moesin form. Prediction of possible *O*-glycosylation sites using NetOGlyc 4.0 server (**Supplementary Figure 2**) showed that among the 577 amino acids that integrate moesin, only 3.8% of them have > 50% probability to be Ser/Thr *O*-glycosylated: 1 at the FERM domain, 13 at the alpha-helical domain, and 8 at the moesin domain. Only 6 sites have > 80% probability of being *O*-glycosylated, within this group Thr<sup>469</sup> has the higher probability of modification (95%) but Thr<sup>558</sup> (84%), located at the moesin



**FIGURE 2** | *O*-glycoproteins detected by ALL are increased on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after activation. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs for 48 h, after harvesting, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were separated by cell sorting and protein extracts were obtained. Samples were analyzed by lectin blot using ALL Strp-HRP (**A**), *O*-glycoproteins from unstimulated (Lanes 1 and 2) and stimulated (Lanes 3 and 4) from CD4<sup>+</sup> (Lanes 1 and 3) and CD8<sup>+</sup> (Lanes 2 and 4) cells are shown; the red arrow indicates the previously reported 70-kDa *O*-glycoprotein recognized by ALL; the protein profile transferred to a PVDF membrane and stained with Ponceau S is included as a loading control (**B**). Quantification of the accumulative intensity from the total number of bands per lane (**C**) and the 70-kDa band recognized by ALL (**D**) from 5 independent experiments pooling the cells from 2 animals per group. Data were analyzed using ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test between unstimulated and stimulated (CD4<sup>+</sup> (Red full circles) and CD8<sup>+</sup> (Blue open circles); \*\*\**p* < 0.001, \*\*\*\**p* < 0.0001).

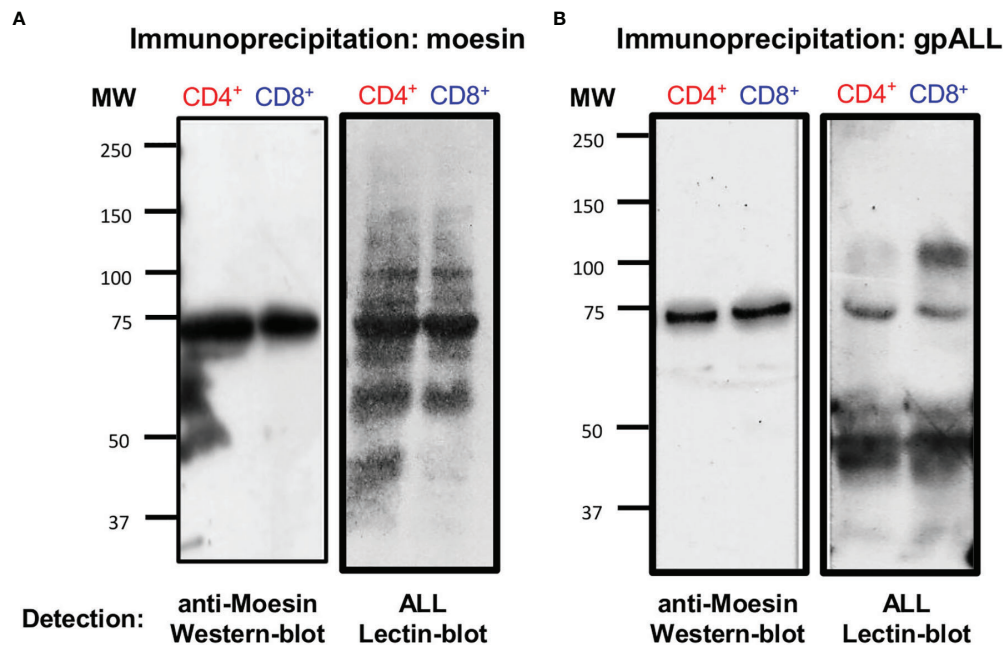


**FIGURE 3** | CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Lymphocytes show similar moesin expression. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs; cells were harvested at the indicated time points and stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-moesin, Ghost Dye Red 780, and immediately analyzed by flow cytometry. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> gates were defined as described in **Figure 1**. Representative analysis of moesin expression kinetics in **(A)** CD4<sup>+</sup> and **(B)** CD8<sup>+</sup> T cells; **(C)** percentages of CD4<sup>+</sup> moesin<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> moesin<sup>+</sup> cells and **(D)** moesin expression in each cell subset after activation. Mean and SD from 2 independent experiments with 3 mice per group are shown in C and D; data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test between CD4<sup>+</sup> (Red full circles) and CD8<sup>+</sup> (Blue open circles) at each time point. \*p < 0.05.

domain, is particularly interesting because it has been reported as a fundamental site for the activation and inhibition of intracellular moesin (23).

Given that ALL can provide a costimulatory signal for T cells similar to the one provided by anti-CD28 in the presence of anti-CD3 *in vitro* and that we have demonstrated herein that O-moesin is recognized by this lectin, we aimed to determine if we could accomplish a similar activation profile after moesin costimulation. To this end, purified T lymphocytes were cultured in the presence of anti-CD3 and anti-moesin for 72 h, and different activation parameters were evaluated: CD69 and CD25 expression, cell proliferation, and IL-2 production.

**Figure 5A** shows a representative CD69 and CD25 expression analysis in both T cell subsets 72 h after activation. Analysis of CD4<sup>+</sup> cells stimulated with CD3/moesin showed that 3.87% had a very early activated phenotype (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), 10.5% had a mid-activation phenotype (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) and 11.4% showed a late activation phenotype (CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>). Among CD3/Moesin activated CD8<sup>+</sup> T cells 24.6% were at the earliest activation point (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), 42% were mid-activated (CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) and 3.3% were at the latest activation stage (CD69<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>). In both cases, the comparison with control cells activated with CD3/ALL and CD3/CD28 showed a similar pattern to those observed in cells activated with CD3/moesin (**Figures 5A, B**); no differences were found when



**FIGURE 4** | Moesin is the 70-kDa O-glycoprotein recognized by ALL in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes. T cell protein extracts from 48 h stimulated cells were obtained as described in **Figure 2** and precipitated with **(A)** anti-moesin mAb or **(B)** ALL using the  $\mu$ MACS separation system. Proteins were separated by SDS-PAGE, then, western and lectin blots were developed with anti-moesin **(A and B, left)** and ALL **(A and B, right)**, respectively. The experiment was performed twice with comparable results.

CD69 and CD25 expression was analyzed 6 h post activation (**Supplementary Figure 3**). These experiments demonstrate that moesin is a costimulator as effective as CD28.

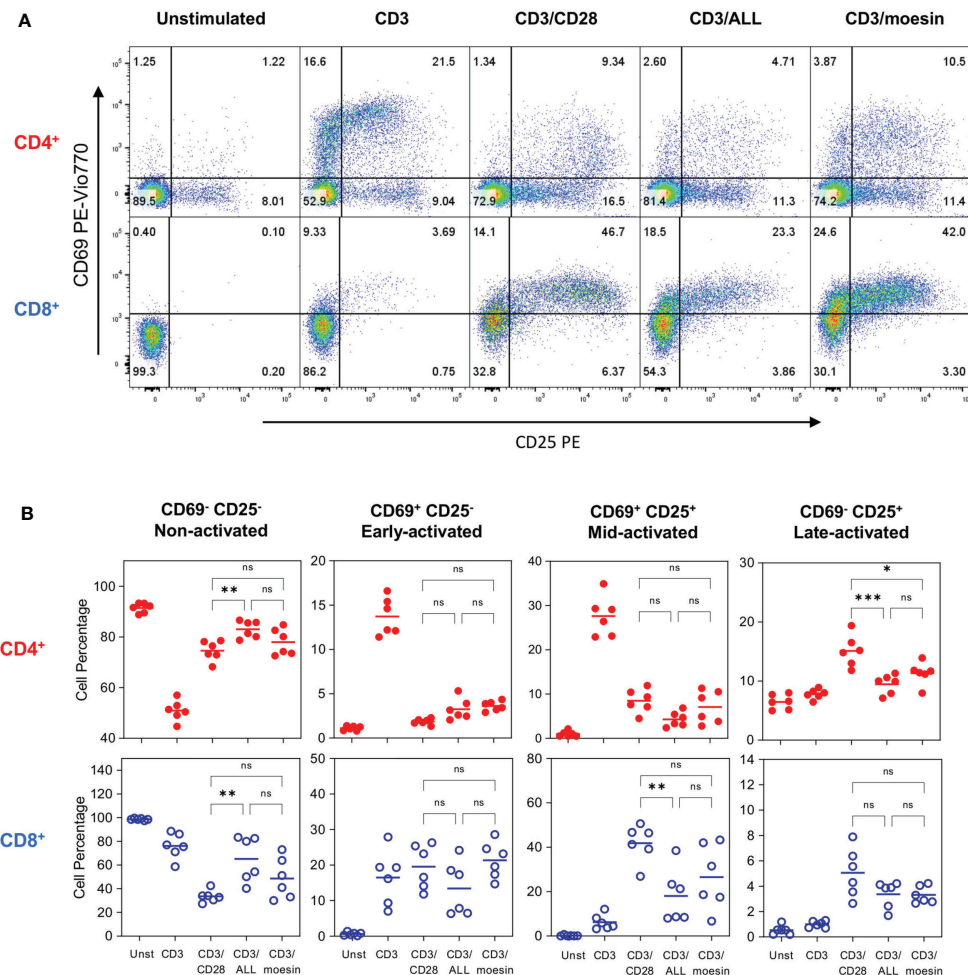
Cell proliferation analysis (**Figure 6**) revealed that after CD3/moesin stimulation CD4<sup>+</sup> cells divided 4 times and CD8<sup>+</sup> cells divided 5 times. Statistical analysis of the percentage of divided cells (**Figure 6B**) showed that 3.1% of CD4<sup>+</sup> and 18.13% of CD8<sup>+</sup> cells from the original population were able to divide at least once (37). A similar proliferation pattern was observed in control cells stimulated with CD3/ALL and CD3/CD28, although proliferation was slightly more efficient in the latter condition. This data demonstrates that CD3/moesin activated T cells show a classic mitogen-induced cell proliferation pattern, including the faster division rate observed in CD8<sup>+</sup> cells. Finally, we evaluated IL-2 production (**Figure 6C**) in CD3/moesin stimulated T cells, where 91.33 pg/ml were detected, 3.7 times more than unstimulated cells (25.33 pg/ml), slightly but not significantly more than CD3/ALL stimulated cells (77.26 pg/ml) and less than CD3/CD28 cells (133.9 pg/ml).

These results demonstrate that costimulation through moesin is strong enough to initiate, maintain, and propagate the necessary signaling that leads to T cell activation and proliferation, outlining CD3/moesin as an alternate cell activation path. Moreover, given the similar activation and proliferation patterns observed between cells stimulated with anti-CD3 and anti-moesin or anti-CD3 and ALL, along with the results from IP experiments, it is tempting to speculate that the costimulatory signal is provided by the O-glycosylated form of moesin.

## DISCUSSION

This work aimed to determine if the 70-kDa protein recognized by the *Amaranthus Leucocarpus* Lectin (ALL) in the T cell membrane is an O-glycosylated form of moesin and its potential ability to work as a CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> costimulatory molecule. Previous studies had described the presence of gpALL in mouse peripheral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (18) however, the expression dynamics of these molecules after activation was unknown. Our results show that *in vitro* stimulation with anti-CD3/CD28 leads to an increase in ALL<sup>+</sup> cells within the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets along with an increased expression of gpALL that peaks 48 h post-activation. This is consistent with the glycoprotein profile recognized through lectin blot by ALL and agrees with previous reports describing the remodeling of different glycosylation profiles after T cell activation (5, 38). Although gpALL expression increases similarly in both cell subsets after activation, it must be noted that the proportion of ALL<sup>+</sup> cells is very different in freshly obtained CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes, which is approximately 30% and 90% respectively. This observation leads to wonder if the proportion of gpALL expressing non-activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells is related to different activation or regulatory processes in each subset.

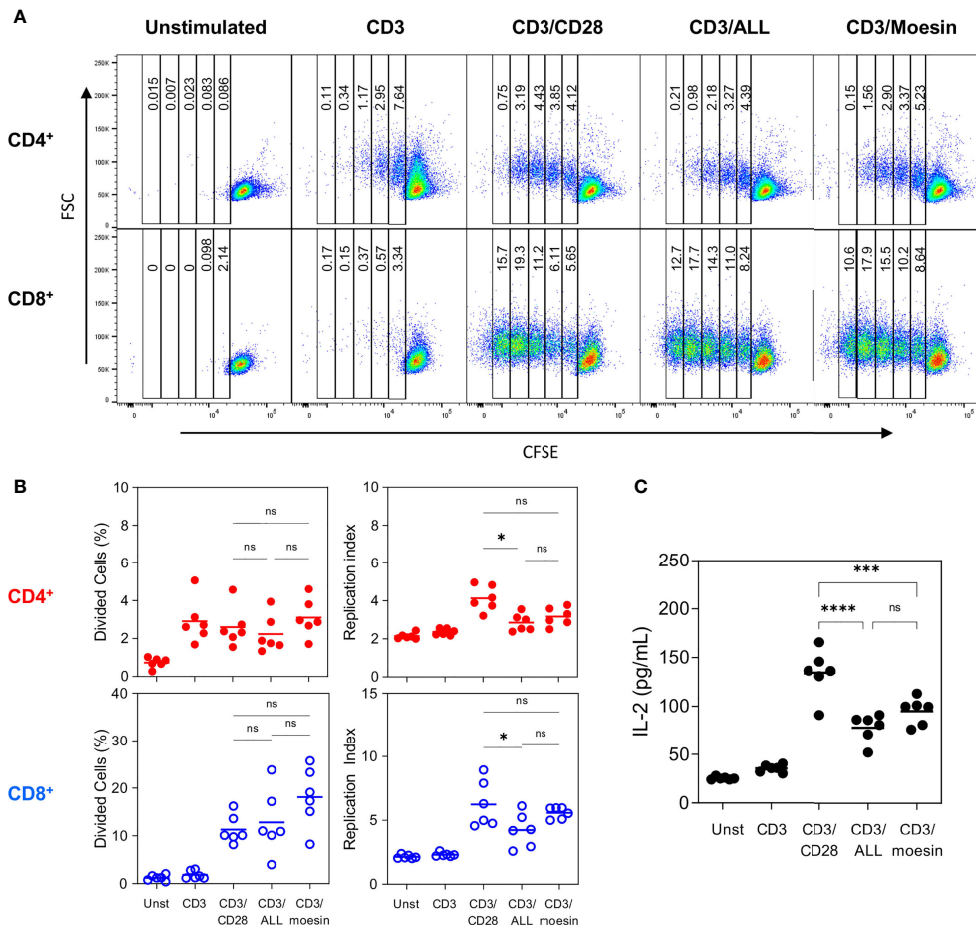
Among the bands recognized by ALL, the 70-kDa protein has been of particular interest. This molecule doubles its expression in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after 48 h post-activation, which concurs with previous findings in mouse splenocytes (18), thymus (39), and macrophages (40). Further analysis of this protein showed that it is a member of the ERM family with 41% homology to an unnamed



**FIGURE 5** | Moesin costimulation induces the expression of activation markers in T lymphocytes. Splenocytes were stained with CFSE, then, T cells were isolated by negative selection and activated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs (CD3/CD28), anti-CD3 and ALL (CD3/ALL), or anti-CD3 and anti-moesin mAb (CD3/moesin) and collected after 72h. Samples were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-CD25, Ghost Dye Red 780, and analyzed by flow cytometry. Lymphocytes were defined by FCS and SSC characteristics, after singlets selection, dead cells were excluded, and the activation markers were analyzed within the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> subsets. Representative analysis of CD69 and CD25 expression pattern in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (**A**), the gates indicate 4 activation stages: CD69<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (Non-activated), CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Early activated), CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Mid-activated) and CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Late activated). (**B**) Percentages of the cell proportions at each activation stage after stimulation with anti-CD3 and each costimulatory molecule from 2 independent experiments with 3 mice per group. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test between the indicated conditions. ns, not significant, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Additional controls performed in this experiment included cells stimulated with anti-CD28, ALL or anti-moesin only, anti-CD28/ALL, or anti-CD28/anti-moesin areshown in **Supplementary Figure 1**.

protein related to moesin (20), thus, given that its identity had not been confirmed we performed several experiments to address this issue. Although the moesin sequence contains no apparent transmembrane domain (41), it has been detected in the membrane of different cell lines (26) and the periphery of several hematopoietic cells (42). Kinetic expression analysis of cell surface moesin in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after activation with anti-CD3/CD28 revealed that a similar percentage of moesin<sup>+</sup> cells is observed within both unstimulated T cell subsets and that a similar expression dynamic is observed after activation. These observations contrast with the flow cytometric gpALL analysis, where a differential expression is observed between T cell subsets,

however, we must consider that ALL recognizes several other molecules besides the 70-kDa protein and moesin expression experiments were limited by the analysis of the single protein, all of which accounts for the observed differences. While performing these experiments it caught our attention that we were only able to detect moesin by flow cytometry after cells had been fixed, it has been described that PFA alters cell surface mechanical properties due to the induction of covalent crosslinking between molecules (43), reduces cell mass density and destructs membrane integrity by dissolving some membrane lipids (44). We think that the membrane remodeling caused by PFA fixation allows the anti-moesin mAb to bind its otherwise hidden target, it is tempting to



**FIGURE 6** | Moesin costimulation induces proliferation in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Samples described in **Figure 6** were further and identically analyzed within the CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> subsets to evaluate CFSE dilution. **(A)** Representative proliferation pattern analysis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells after activation with anti-CD3 and each costimulatory molecule. **(B)** Statistical analysis from 2 independent experiments with 3 mice per group expressed as the percentage of divided cells or as the replication index (Total Number of divided cells/The number of cells that went into division). **(C)** Negatively separated T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28, ALL, or anti-moesin. After 48 h, culture supernatants were collected and IL-2 concentration was determined by ELISA. Data correspond to 2 independent experiments with 3 mice per group and were analyzed using ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. ns, not significant, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. Additional controls performed in this experiment included cells stimulated with anti-CD28, ALL or anti-moesin only, anti-CD28/ALL, or anti-CD28/anti-moesin are shown in **Supplementary Figure 4**.

speculate that moesin is embedded in the cell membrane and that the *O*-GalNAcylation detected by ALL projects outwards. Further analysis on this structural subject will be determinant to understand moesin's function.

The existence of the *O*-glycosylated moesin (*O*-moesin) was confirmed with IP experiments given that we were able to detect moesin after precipitation with ALL and vice versa. Interestingly, the lectin blot from the anti-moesin precipitated sample shows that besides the presence of the 70-kDa band, other proteins are detected by ALL, suggesting that moesin could have been precipitated as part of a molecular complex where other molecules share the same *O*-glycosylation. Moreover, in the lectin blot from the ALL-precipitated sample a dense 45-kDa band in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets and a 100-kDa band in CD8<sup>+</sup> cells were also detected, suggesting that besides *O*-moesin, other *O*-glycosylated proteins are heavily expressed on T cells after

activation. This agrees with the flow cytometry experiments where we can see a higher cell percentage positivity to ALL than moesin, particularly in the CD8<sup>+</sup> subset.

Since moesin has a molecular weight of 67.8-kDa (27) and the *O*-moesin detected herein has a molecular weight of 70-kDa, we hypothesize that this difference corresponds to the glycosidic proportions of the *O*-glycoprotein, but this remains to be demonstrated by instrumental techniques in future works. Nevertheless, the bioinformatics analysis indicated that Thr<sup>558</sup> is a site with a very high probability of *O*-glycosylation. This position has been described as fundamental for moesin function regulation since phosphorylation at this amino acid induces the protein to adopt an active/extended conformation where it can interact with other proteins (28, 29). Phosphorylation/*O*-glycosylation interplay has been described as a molecular switch that can regulate protein function and location (45); in fact, after T cell activation moesin is

phosphorylated, and once activated it removes CD43 from the immunological synapse allowing proper activation (46). We consider that moesin Thr<sup>588</sup> could be a target site for regulation through an *O*-glycosylation/phosphorylation interplay which could mediate the function and location of the protein in the cytosol or the cell membrane. Under this hypothesis, other interesting questions arise, like if *O*-moesin is synthesized *de novo* and directed to the cell membrane, or if the glycan addition to the protein occurs at the cytosol redirecting its translocation towards the cell membrane. The latter would be a rare example where the *O*-glycosylation of the T antigen type is synthesized in a place other than the endoplasmic reticulum (47); the answers to these questions are beyond the scope of this work but are proposed as thought-provoking perspectives.

Finally, we demonstrate that moesin can induce a costimulatory signal equivalent to the one provided by CD28 during *in vitro* activation with anti-CD3, considering that anti-CD3/moesin stimulated T cells were able to express activation molecules, produce IL-2 and proliferate. Although these responses were slightly lower than the ones observed after CD28 costimulation, the proliferation and activation patterns were the same between cells costimulated with ALL and anti-moesin. These results are in agreement with previous experiments reporting ALL costimulatory capacity in mouse and human T cells (15, 16) and that *O*-moesin is located in lipid rafts, cell membrane structures fundamental for the formation of the immunological synapse (20). Our observations reinforce other works describing moesin as a fundamental molecule for T cell homeostasis, maturation, and function: moesin<sup>-/-</sup> mice exhibit T cells with reduced activation capacity and IL-2 production; lymphopenia as a consequence of a diminished incapacity to egress from the thymus, CD8<sup>+</sup> Treg cells from these animals show decreased proliferation (30–32) and an X-linked moesin-associated immunodeficiency where diminished T cell proliferation is observed has been described in humans (48). Moesin also promotes actin polymerization during blast formation and is essential for the formation of the immunological synapse and T cell activation (32, 46, 49).

Altogether, our results demonstrate that moesin provides a, previously undescribed, costimulatory signal in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that along with CD3 crosslinking can induce activation and proliferation; whether the signal is provided by the *O*-glycosylated form of moesin, if the activated cells can be polarized, perform cytolysis or become memory cells, and which is the natural ligand for this receptor, remain to be determined. However, our results show that T cells can be activated through a CD28 independent costimulatory pathway, which opens the door to increase our understanding of T cell biology and to investigate new potential immunomodulatory therapeutic targets.

## REFERENCES

1. Bretscher PA. A Two-Step, Two-Signal Model for the Primary Activation of Precursor Helper T Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96(1):185–90. doi: 10.1073/pnas.96.1.185
2. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, et al. Signals Required for Programming Effector and Memory

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), División de Investigación. Facultad de Medicina, UNAM.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

WG-H, EZ, and ET designed the research study. WG-H performed the experiments. WG-H, FC-S, and ET analyzed the data. ET, RS, WG-H, and EZ wrote the article. All the authors discussed the results, reviewed the manuscript, and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by grants IN218719, IN204717, IN213818, IN218919, and IN200321 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico) and by grant 251116 from CONACYT (Mexico). WGH is the recipient of a Ph.D. fellowship from CONACYT (Registry 742472). WG-H is part of Biochemical Sciences PhD Program of the Universidad Nacional Autónoma de México and of the Université Paris-Est Créteil, France.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Biol. Olivia Reynoso Ducoing, Dr. Elia Torres Gutiérrez, and Dr. Guadalupe Maldonado for their technical advice in protein separation and blotting experiments, to Dr. Francisco Torres for his advice in protein precipitation assays and analysis, and María Caelín for her technical help with reagents organization and titration.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.788880/full#supplementary-material>

Development by CD8<sup>+</sup> T Cells. *Immunol Rev* (2006) 211:81–92. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x

3. Goral S. The Three-Signal Hypothesis of Lymphocyte Activation/Targets for Immunosuppression. *Dialysis Transplant* (2011) 40(1):14–6. doi: 10.1002/dat.20527
4. Dustin ML. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol Res* (2014) 2(11):1023–33. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0161



5. Comelli EM, Sutton-Smith M, Yan Q, Amado M, Panico M, Gilmartin T, et al. Activation of Murine CD4+ and CD8+ T Lymphocytes Leads to Dramatic Remodeling of N-Linked Glycans. *J Immunol* (2006) 177(4):2431–40. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2431
6. Gomez-Henao W, Tenorio EP, Sanchez FRC, Mendoza MC, Ledezma RL, Zenteno E. Relevance of Glycans in the Interaction Between T Lymphocyte and the Antigen Presenting Cell. *Int Rev Immunol* (2021) 40(4):274–88. doi: 10.1080/08830185.2020.1845331
7. Schwartz RH. Costimulation of T Lymphocytes: The Role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in Interleukin-2 Production and Immunotherapy. *Cell* (1992) 71(7):1065–8. doi: 10.1016/s0092-8674(05)80055-8
8. Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, et al. Modulation of TCR-Induced Transcriptional Profiles by Ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 Receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99(18):11790–5. doi: 10.1073/pnas.162359999
9. Appleman LJ, Boussiotis VA. T Cell Anergy and Costimulation. *Immunol Rev* (2003) 192:161–80. doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00009.x
10. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* (2016) 44(5):973–88. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.020
11. Watts TH, DeBenedette MA. T Cell Co-Stimulatory Molecules Other Than CD28. *Curr Opin Immunol* (1999) 11(3):286–93. doi: 10.1016/s0952-7915(99)80046-6
12. Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Boucharde D, Beach J, Speiser DE, et al. Distinct Roles for LFA-1 and CD28 During Activation of Naive T Cells: Adhesion Versus Costimulation. *Immunity* (1997) 7(4):549–57. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80376-3
13. Graf B, Bushnell T, Miller J. LFA-1-Mediated T Cell Costimulation Through Increased Localization of TCR/class II Complexes to the Central Supramolecular Activation Cluster and Exclusion of CD45 From the Immunological Synapse. *J Immunol* (2007) 179(3):1616–24. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1616
14. Leitner J, Herndlner-Brandstetter D, Zlabinger GJ, Grubeck-Loebenstein B, Steinberger P. CD58/CD2 Is the Primary Costimulatory Pathway in Human CD28-CD8+ T Cells. *J Immunol* (2015) 195(2):477–87. doi: 10.4049/jimmunol.1401917
15. Urrea F, Ortiz-Quintero B, Sanchez-Garcia FJ, Blanco-Favela F, Garfias Y, Lascurain R, et al. The Amaranthus Leucocarpus Lectin Enhances the Anti-CD3 Antibody-Mediated Activation of Human Peripheral Blood CD4+ T Cells. *Tohoku J Exp Med* (2010) 221(4):271–9. doi: 10.1620/tjem.221.271
16. Urrea F, Zenteno E, Avila-Moreno F, Sanchez-Garcia FJ, Zuniga J, Lascurain R, et al. Amaranthus Leucocarpus Lectin (ALL) Enhances Anti-CD3-Dependent Activation of Murine T Cells and Promotes Cell Survival. *Immunol Invest* (2011) 40(2):113–29. doi: 10.3109/08820139.2010.503767
17. Hernandez P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, del Carmen Jimenez M, Fernandez G, et al. Specificity of Amaranthus Leucocarpus Syn. Hypocondriacus Lectin for O-Glycopeptides. *Biochim Biophys Acta* (2004) 1674(3):282–90. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.07.008
18. Ortiz B, Porras F, Jimenez-Martinez MC, Montano LF, Martinez-Cairo S, Lascurain R, et al. Differential Expression of a 70 kDa O-Glycoprotein on T Cells: A Possible Marker for Naive and Early Activated Murine T Cells. *Cell Immunol* (2002) 218(1-2):34–45. doi: 10.1016/s0008-8749(02)00518-x
19. Alvarez G, Lascurain R, Hernandez-Cruz P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, et al. Differential O-Glycosylation in Cortical and Medullary Thymocytes. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1760(8):1235–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.024
20. Arenas-Del Angel M, Legorreta-Herrera M, Mendoza-Hernandez G, Garfias Y, Chavez R, Zenteno E, et al. Amaranthus Leucocarpus Lectin Recognizes a Moesin-Like O-Glycoprotein and Costimulates Murine CD3-Activated CD4 (+) T Cells. *Immun Inflammation Dis* (2015) 3(3):182–95. doi: 10.1002/iid3.58
21. Shcherbina A, Bretscher A, Kenney DM, Remold-O'Donnell E. Moesin, the Major ERM Protein of Lymphocytes and Platelets, Differs From Ezrin in Its Insensitivity to Calpain. *FEBS Lett* (1999) 443(1):31–6. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01674-3
22. Berryman M FZ, Bretscher A. Ezrin Is Concentrated in the Apical Microvilli of a Wide Variety of Epithelial Cells Whereas Moesin Is Found Primarily in Endothelial Cells. *J Cell Sci* (1993) 105:18. doi: 10.1242/jcs.105.4.1025
23. Wei Z, Li Y, Ye F, Zhang M. Structural Basis for the Phosphorylation-Regulated Interaction Between the Cytoplasmic Tail of Cell Polarity Protein Crumbs and the Actin-Binding Protein Moesin. *J Biol Chem* (2015) 290(18):11384–92. doi: 10.1074/jbc.M115.643791
24. Kawaguchi K, Yoshida S, Hatano R, Asano S. Pathophysiological Roles of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins. *Biol Pharm Bull* (2017) 40(4):381–90. doi: 10.1248/bpb.b16-01011
25. Dunster LM, Schneider-Schaulies J, Löffler S, Lankes W, Schwartz-Albiez R, Lottspeich F, et al. Moesin: A Cell Membrane Protein Linked With Susceptibility to Measles Virus Infection. *Virology* (1994) 198(1):265–74. doi: 10.1006/viro.1994.1029
26. Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schwartz-Albiez R, Krohne G, ter Meulen V. Physical Association of Moesin and CD46 as a Receptor Complex for Measles Virus. *J Virol* (1995) 69(4):2248–56. doi: 10.1128/JVI.69.4.2248-2256.1995
27. *Moesin. Mus Musculus*. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/P26041> (Accessed Accession date: November 12th 2020).
28. Nakamura F, Amieva MR, Furthmayr H. Phosphorylation of Threonine 558 in the Carboxyl-Terminal Actin-Binding Domain of Moesin by Thrombin Activation of Human Platelets. *J Biol Chem* (1995) 270(52):31377–85. doi: 10.1074/jbc.270.52.31377
29. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM Protein Moesin Reveals the FERM Domain Fold Masked by an Extended Actin Binding Tail Domain. *Cell* (2000) 101(3):259–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80836-3
30. Hirata T, Nomachi A, Tohya K, Miyasaka M, Tsukita S, Watanabe T, et al. Moesin-Deficient Mice Reveal a Non-Redundant Role for Moesin in Lymphocyte Homeostasis. *Int Immunol* (2012) 24(11):705–17. doi: 10.1093/intimm/dxs077
31. Satooka H, Nagakubo D, Sato T, Hirata T. The ERM Protein Moesin Regulates CD8(+) Regulatory T Cell Homeostasis and Self-Tolerance. *J Immunol* (2017) 199(10):3418–26. doi: 10.4049/jimmunol.1700074
32. Shaffer MH, Dupree RS, Zhu P, Saotome I, Schmidt RF, McClatchey AI, et al. Ezrin and Moesin Function Together to Promote T Cell Activation. *J Immunol* (2009) 182(2):1021–32. doi: 10.4049/jimmunol.182.2.1021
33. Edner NM, Wang CJ, Petersone L, Walker LSK. Predicting Clinical Response to Costimulation Blockade in Autoimmunity. *Immunother Advances* (2021) 1(1):1–6. doi: 10.1093/immadv/ltaa003
34. Jeong S, Park S-H. Co-Stimulatory Receptors in Cancers and Their Implications for Cancer Immunotherapy. *Immune Netw* (2020) 20(1):1–20. doi: 10.4110/in.2020.20.e3
35. Zenteno E, Ochoa JL. Purification of a Lectin From Amaranthus Leucocarpus by Affinity Chromatography. *Phytochemistry* (1988) 27(2):5. doi: 10.1016/0031-9422(88)83088-7
36. Tenorio EP, Fernandez J, Castellanos C, Olguin JE, Saavedra R. CD4+ Foxp3+ Regulatory T Cells Mediate Toxoplasma Gondii-Induced T-Cell Suppression Through an IL-2-Related Mechanism But Independently of IL-10. *Eur J Immunol* (2011) 41(12):3529–41. doi: 10.1002/eji.201141507
37. Lyons AB. Analysing Cell Division *In Vivo* and *In Vitro* Using Flow Cytometric Measurement of CFSE Dye Dilution. *J Immunol Methods* (2000) 243(1-2):147–54. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00231-3
38. Toscano MA, Bianco GA, Illarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential Glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 Effector Cells Selectively Regulates Susceptibility to Cell Death. *Nat Immunol* (2007) 8(8):825–34. doi: 10.1038/ni1482
39. Porras F, Lascurain R, Chavez R, Ortiz B, Hernandez P, Debray H, et al. Isolation of the Receptor for Amaranthus Leucocarpus Lectin From Murine Naive Thymocytes. *Glycobiology* (2000) 10(5):459–65. doi: 10.1093/glycob/10.5.459
40. Gorocica P, Lascurain R, Hernandez P, Porras F, Bouquet S, Vazquez L, et al. Isolation of the Receptor for Amaranthus Leucocarpus Lectin From Murine Peritoneal Macrophages. *Glycoconj J* (1998) 15(8):809–14. doi: 10.1023/a:1006916100414
41. Lankes WT, Furthmayr H. Moesin: A Member of the Protein 4.1-Talin-Ezrin Family of Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88(19):8297–301. doi: 10.1073/pnas.88.19.8297
42. Masumoto J, Sagara J, Hayama M, Hidaka E, Katsuyama T, Taniguchi S. Differential Expression of Moesin in Cells of Hematopoietic Lineage and Lymphatic Systems. *Histochem Cell Biol* (1998) 110(1):33–41. doi: 10.1007/s004180050262
43. Kim SO, Kim J, Okajima T, Cho NJ. Mechanical Properties of Paraformaldehyde-Treated Individual Cells Investigated by Atomic Force

- Microscopy and Scanning Ion Conductance Microscopy. *Nano Converge* (2017) 4(1):5. doi: 10.1186/s40580-017-0099-9
44. Cheng R, Zhang F, Li M, Wo X, Su YW, Wang W. Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Front Chem* (2019) 7:588. doi: 10.3389/fchem.2019.00588
45. Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive Crosstalk With Phosphorylation to Regulate Signaling and Transcription in Response to Nutrients and Stress. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1800(2):96–106. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.018
46. Delon J, Kaibuchi K, Germain RN. Exclusion of CD43 From the Immunological Synapse Is Mediated by Phosphorylation-Regulated Relocation of the Cytoskeletal Adaptor Moesin. *Immunity* (2001) 15(5):691–701. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00231-x
47. Cejas RB, Lorenz V, Garay YC, Irazoqui FJ. Biosynthesis of O-N-Acetylgalactosamine Glycans in the Human Cell Nucleus. *J Biol Chem* (2019) 294(9):2997–3011. doi: 10.1074/jbc.RA118.005524
48. Lagresle-Peyrou C, Luce S, Ouchani F, Soheili TS, Sadek H, Chouteau M, et al. X-Linked Primary Immunodeficiency Associated With Hemizygous Mutations in the Moesin (MSN) Gene. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 138(6):1681–9 e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.04.032
49. Ilani T, Khanna C, Zhou M, Veenstra TD, Bretscher A. Immune Synapse Formation Requires ZAP-70 Recruitment by Ezrin and CD43 Removal by Moesin. *J Cell Biol* (2007) 179(4):733–46. doi: 10.1083/jcb.200707199

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gómez-Henao, Saavedra, Chávez-Sánchez, Lascurain, Zenteno and Tenorio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



OPEN

## HS3ST2 expression induces the cell autonomous aggregation of tau

M. B. Huynh<sup>1,4</sup>, N. Rebergue<sup>1,4</sup>, H. Merrick<sup>1</sup>, W. Gomez-Henao<sup>1,2</sup>, E. Jospin<sup>1</sup>,  
D. S. F. Biard<sup>1,3,5</sup> & D. Papy-Garcia<sup>1,5</sup>✉

Heparan sulfates have long been known to intracellularly accumulate in Alzheimer's disease neurons, where they colocalize with neurofibrillary tangles made of abnormally phosphorylated and aggregated tau protein. However, the reasons and consequences of the heparan sulfates accumulation in the Alzheimer's cells are not yet well understood. Previously, we showed that the neural heparan sulfate 3-O-sulfotransferase HS3ST2 is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tauopathy. Using cell models of tauopathy we showed that intracellular 3-O-sulfated heparan sulfates interact with tau inducing its abnormal phosphorylation. However, it is unknown whether HS3ST2 expression induces the intracellular aggregation of tau in cells. Here, by using replicative pEBV plasmids, we engineered HEK293 cells to stably express HS3ST2 together with human tau carrying or not the P301S mutation. We show that HS3ST2 gain of function induces the cell autonomous aggregation of tau not only in cells expressing tau<sub>P301S</sub>, but also in cells expressing the wild type tau. Our engineered cells mimicked both the HS intracellular accumulation observed in neurons of Alzheimer's disease and the tau aggregation characteristic of tauopathy development and evolution. These results give evidence that the neural HS3ST2 plays a critical role in the cell autonomous self-aggregation of tau.

Accumulation of the abnormally phosphorylated and aggregated microtubule associated protein tau (MAPT, or tau) is a main hallmark of Alzheimer's disease (AD) and other tauopathies<sup>1–3</sup>, including frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP17), progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal degeneration (CBD), Pick's disease (PiD), and chronic traumatic encephalopathy. In the normal brain, the wild type tau promotes assembly and stability of microtubules<sup>4</sup> and plays crucial roles in axoplasmic transport<sup>5,6</sup>, axonal outgrowth<sup>7</sup>, and synaptic plasticity<sup>8</sup>, centrally participating to the processes involved in learning and memory<sup>9</sup>. In the AD brain, the abnormally phosphorylated wild type tau (P-tau) becomes insoluble, aggregates, and accumulates to form neurofibrillary tangles (NFTs)<sup>10</sup>. A similar process occurs in tauopathies in which tau mutations induce the NFT formation<sup>10,11</sup>. Because NFTs accumulation correlates with neuronal degeneration<sup>11</sup>, halting the aggregation of tau is currently considered among the main therapeutic strategies for AD and related tauopathies<sup>12</sup>. However, the endogenous players involved in the cell autonomous process leading to the primary self-aggregation of tau are not yet fully identified<sup>13</sup>. Interestingly, *in vitro*, tau aggregation can efficiently be promoted by anionic micelles and polyanions, including heparin, suggesting that an anionic micro-environment might play crucial roles in the genesis and maturation of tau aggregates<sup>14–16</sup>. Heparin is a commercially available animal sourced prototype of highly sulfated heparan sulfates (HS)<sup>17</sup>. A structural characteristic of heparin is that it carries a high content of 3-O-sulfation in addition to the classic N-, 2-O-, and 6-O-sulfations carried by common HS<sup>18</sup>. In the brain, 3-O-sulfation is assured by different HS 3-O-sulfotransferases (HS3STs), including the predominantly neural 3-O-sulfotransferase-2 (HS3ST2)<sup>19–21</sup>. However, whether cellular HS, and particularly 3-O-sulfated heparan sulfates (3S-HS), can participate to the processes leading to tau aggregation in cells remains elusive<sup>22</sup>. This is possibly because tau primarily aggregates inside cells whereas HS are generally considered to be located at the extracellular space<sup>23,24</sup>, restricting research commitment in this area. However, HS have been found to colocalize with tau helical filaments inside AD neurons, in where they accumulate before NFT formation<sup>25–27</sup>. By using cell models of tauopathy, we previously showed that 3S-HS accumulate at the intracellular level, interact with tau, and induce the tau abnormal phosphorylation<sup>28</sup>. However, it is unknown whether 3S-HS can promote the spontaneous self-aggregation of tau in cells.

<sup>1</sup>Glycobiology, Cell Growth and Tissue Repair Research Unit (Gly-CRRET), Univ Paris Est Creteil (UPEC), F-94010 Creteil, France. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratorio Internacional Gly-CRRET-UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. <sup>3</sup>CEA, Institut de Biologie François Jacob (IBFJ), SEPIA, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France. <sup>4</sup>These authors contributed equally: M. B. Huynh and N. Rebergue <sup>5</sup>These authors jointly supervised this work: D. Papy-Garcia and D. S. F. Biard ✉email: papy@u-pec.fr

Here, by simultaneously expressing HS3ST2 with human full length wild type tau (tau) or tau carrying the P301S mutation (tau<sub>P301S</sub>) responsible of FTDP17<sup>11</sup>, we demonstrate that 3S-HS produced by HS3ST2 induce the cell autonomous oligomerisation of tau and increase that of tau<sub>P301S</sub>. Immunocytochemistry (ICC) and immunoblotting of tau and P-tau after high salt sarkosyl extraction showed that, in the presence of HS3ST2, the wild type tau self-aggregates at extents near to those observed in the tau<sub>P301S</sub>, indicating that 3S-HS made by HS3ST2 can efficiently promote the aggregation of human tau in the absence of tau mutations. Finally, we confirmed that 3S-HS intracellularly accumulate and colocalize with tau and showed that the 3S-HS co-stain with tau oligomers in cells expressing HS3ST2 and tau, as in cells expressing tau<sub>P301S</sub>. The simultaneous and stable expression of HS3ST2 and tau proteins in cultured HEK293 cells allowed the demonstration that 3S-HS participate to the mechanisms triggering the spontaneous cell autonomous aggregation of tau.

## Materials and methods

**Plasmids.** Plasmids carrying cDNA sequences allowing expression of the full length human tau and tau carrying the mutation P301S (tau<sub>P301S</sub>) in bacteria were kindly provided by Professor M. Goedert (University of Cambridge)<sup>29</sup>. Human full length HS3ST2 (NM\_006043) was synthesized (Eurofins, France) and cloned in pcDNA<sup>TM</sup>3.1 vectors (Invitrogen) for protein expression in bacteria. For simultaneous expressions of HS3ST2 and tau, or tau<sub>P301S</sub>, the corresponding cDNA sequences were included in replicative pEBV plasmids containing single transcription cartridges for expression under hygromycin (HS3ST2) and puromycin (MAPT or MAPT<sub>P301S</sub>) selection<sup>30,31</sup>. Alternatively, a bicistronic vector carrying both the HS3ST2 and MAPT or MAPT<sub>P301S</sub> sequences were constructed (Supplementary Method 1)<sup>32</sup>, but its use was restricted to few confirmatory studies because of risk of HS3ST2-tau fusion protein expression. Human cytomegalovirus (CMV) promoter sequence was included to drive transcription<sup>30,31</sup>. Construct sequences were confirmed by DNA sequencing (Eurofins Genomics, data not shown).

**Stable expression in HEK293 cells.** Human embryonic kidney (HEK293) cells (provided by Dr. A. Delaunay, CEA Saclay, France) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES (Sigma products), under 5% CO<sub>2</sub>. Approximately 100,000 cells were transfected with the agent JetPrime (Ozyme, following manufacturer's instructions) to express HS3ST2 under hygromycin (100 µg/mL) selection. After HS3ST2 expression was confirmed, cells were additionally transfected with tau or tau<sub>P301S</sub> and maintained under both hygromycin and puromycin selection (100 µg/mL and 0.4 µg/mL respectively). The empty pEBV vectors were used to follow effects of transfection and selection on cells. For Sarkosyl experiments, 10<sup>6</sup> cells were transfected. From 24 h after second transfection, cells were permanently maintained under hygromycin/puromycin selection until stabilisation (40 days in culture).

**RNA extraction and RTqPCR.** RNA extraction was performed with RNA-Bee (Bioconnect) following manufacturer's recommendations. RNA concentration was measured with a Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). After a DNase treatment (Ambion), according to manufacturer's procedures, 1 µg RNA was used to synthesize complementary DNA (cDNA) with the Affinity Script Multiple Temperature cDNA kit (Agilent). Samples were incubated at 25 °C for 10 min, at 50 °C for 60 min, and at 70 °C for 15 min. Gene expression was analysed in template cDNA by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) using the Brilliant III Ultra-fast SYBR<sup>®</sup> kit (Agilent Technologies) in an Agilent AriaMx thermocycler. Analysis was performed with the Agilent AriaMx 1.0 software. Primer sequences for HS3ST2 were "GGA ACC CCA CTT CTT TGA CA" and "GTC GAG GAG CCT CTT GAG TG"<sup>33</sup>. Primer sequences for MAPT were "AAG GTC AGC TTG TGG GTT TC" and "TGG CTC ATT AGG CAA CAT CC" (Eurofins). Primer sequences for B2M were "GCT CCG TGG CCT TAG CTG T" and "ACG TGA GTA AAC CTG AAT CTT TGG A". Primer sequences for RPL37A were "ATT GAA ATC AGC CAG CAC GC" and "AGG AAC CAC AGT GCC AGA TCC". Other primers sequences used in this study (other HS3STs) are detailed in Supplementary Table S1. Standard curves were used for calculation of relative RNA quantity B2M and/or RPL37A were used as housekeeping genes for normalization<sup>34</sup>.

**Immunoblotting of RIPA-extracted proteins.** Cells were harvested in 1 mL of RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS; Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1% protease inhibitor mixture (Sigma) and 1% phosphatase inhibitor cocktail I & II (Sigma). Cell lysates were centrifugated at 13,000 rpm for 10 min and protein contents in supernatants were determined using BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Supernatants containing 1–10 µg of protein (as indicated) were suspended in Laemmli buffer (0.125 M Tris HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue; Biorad) supplemented with 10% β-mercaptoethanol and heated for 5 min at 90 °C. Proteins were separated in 8% acrylamide gel and transferred to a PVDF membrane with a Transblot Turbo device (BioRad). Immunoblotting was performed with anti-HS3ST2 (Thermo Fischer Scientific, 1:500), and anti-total tau K9JA (Dako, 1:10,000). Anti-GAPDH (Thermo Fisher Scientific, 1:10,000) or anti-α-tubulin (α-tub, Sigma, 1:10,000) were used as loading control. Blots were incubated for 1 h at room temperature (rt) with the corresponding secondary antibodies diluted in PBS containing 5% milk. Revelation was performed with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Luminata Forte (Millipore) following manufacturer's instructions.

**High salt Sarkosyl tau oligomers extraction and immunoblotting.** To extract tau oligomers<sup>35,36</sup>, cells were harvested in 1 mL of salt rich Sarkosyl buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% sarkosyl) supplemented with 1% protease inhibitor mixture (Sigma) and 1% phosphatase inhibitor cocktail I & II (Sigma). Cell lysates were centrifugated at 180,000 g for 30 min and protein content in

supernatants were determined using BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Cell lysate supernatant containing 1–10 µg of proteins (as indicated) were treated or not (as indicated) in Laemmli buffer (Biorad) supplemented with β-mercaptoethanol. Samples treated with Laemmli buffer were heated for 2–5 min at 90 °C to denature tau oligomers. Proteins were separated by electrophoresis as above. Antibodies used for immunostaining were anti-total tau K9JA (Dako, 1:10,000), T22 (Millipore, 1:500), and PHF1 (from Peter Davis, 1:500), as indicated. Anti-GAPDH (Thermo Fisher Scientific, 1:10,000) or anti-α-tub (α-tub, Sigma, 1:10,000) were used as loading controls, as indicated. Blots were incubated with secondary antibodies and revealed as described above.

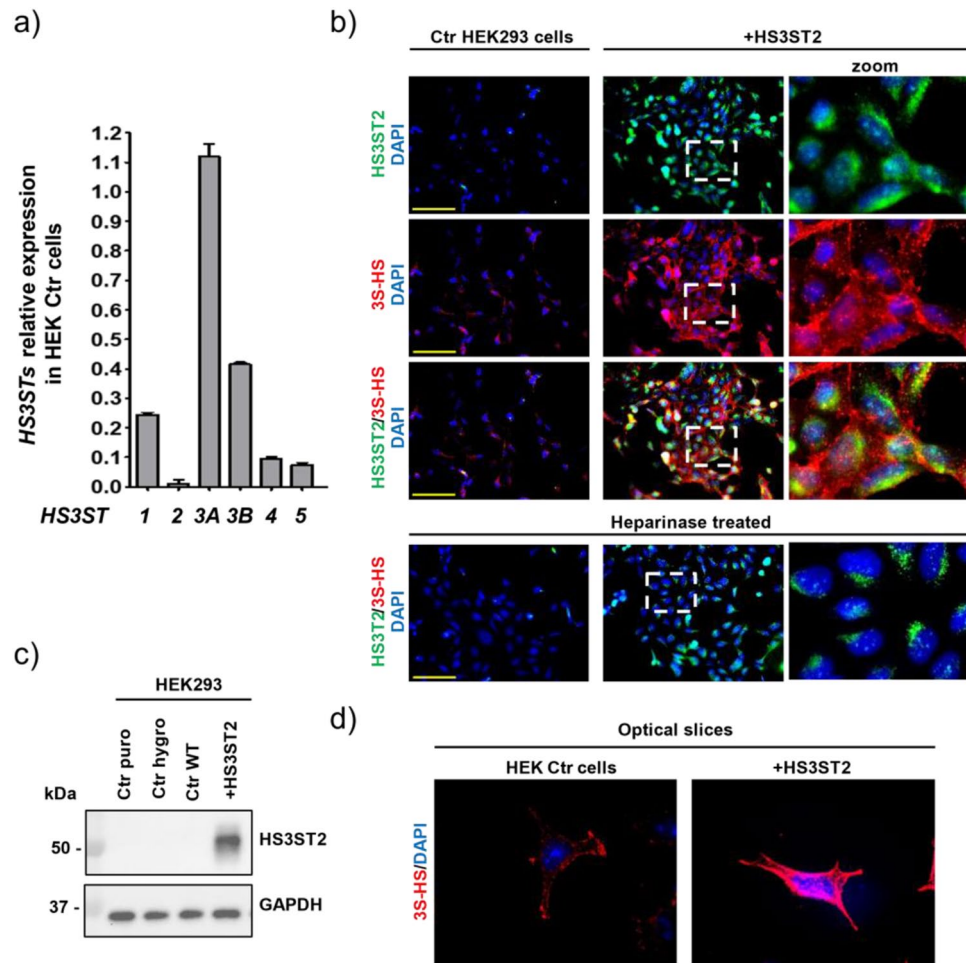
**Immunocytochemistry.** For immunocytochemistry (ICC) experiments, approximately 50,000 cells were cultured on glass cover slips. After transfection and culture as indicated, cells were fixed in 100% methanol at –20 °C for 3 min and incubated for 1 h with the corresponding primary antibody at rt, washed, and then incubated with the appropriate secondary antibody for 1 h at rt. Immunostaining was performed with anti-HS3ST2 (Thermo-Fischer Scientific, 1:500), anti-total tau (K9JA Dako, 1:500), or anti-oligomeric tau (T22 Millipore; 1:700). Fluo488 donkey anti-rabbit (Invitrogen; 1:200) and Fluo488 donkey anti-goat (Invitrogen; 1:200) were used as secondary antibodies. The phage display HS4C3 antibody (1:250; 4 µg/mL), kindly provided by ArrestAD partner Pr. Toin H. van Kuppevelt (Radboud University Medical Center, the Netherlands) was used to detect 3S-HS<sup>37</sup>. To reveal HS4C3 staining, an anti-VSV antibody made in mouse (Sigma; 1:200) was used, followed by a Cy3 anti-mouse made in sheep (Sigma; 1:200). HS identity was confirmed by treating cells with a mix of heparinase I, II and III (Iduron) respectively used at 2, 0.2, and 0.2 U/mL. Stack images were obtained with the software CellSens from a spinning disk inverted confocal microscope (IX81 DSU Olympus, 60×N.A.1.35) coupled to an Orca Hamamatsu RCCD camera. 20× images were obtained with the same microscope in non-confocal configuration. Nuclei was labelled with 1 µg/mL DAPI (Sigma). Images were processed with the ImageJ software (W. Rasband, National Institute of Health).

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.01. Bars represent standard error (SD) or standard error of the mean (SEM) for two or three different experiments each performed in duplicate or triplicate, as indicated. Significance was analysed either by t-test, or one-way ANOVA followed by Tukey's test, as indicated (\*\**P* < 0.001; \*\**P* < 0.01; \**P* < 0.05; *ns* = not significant).

## Results

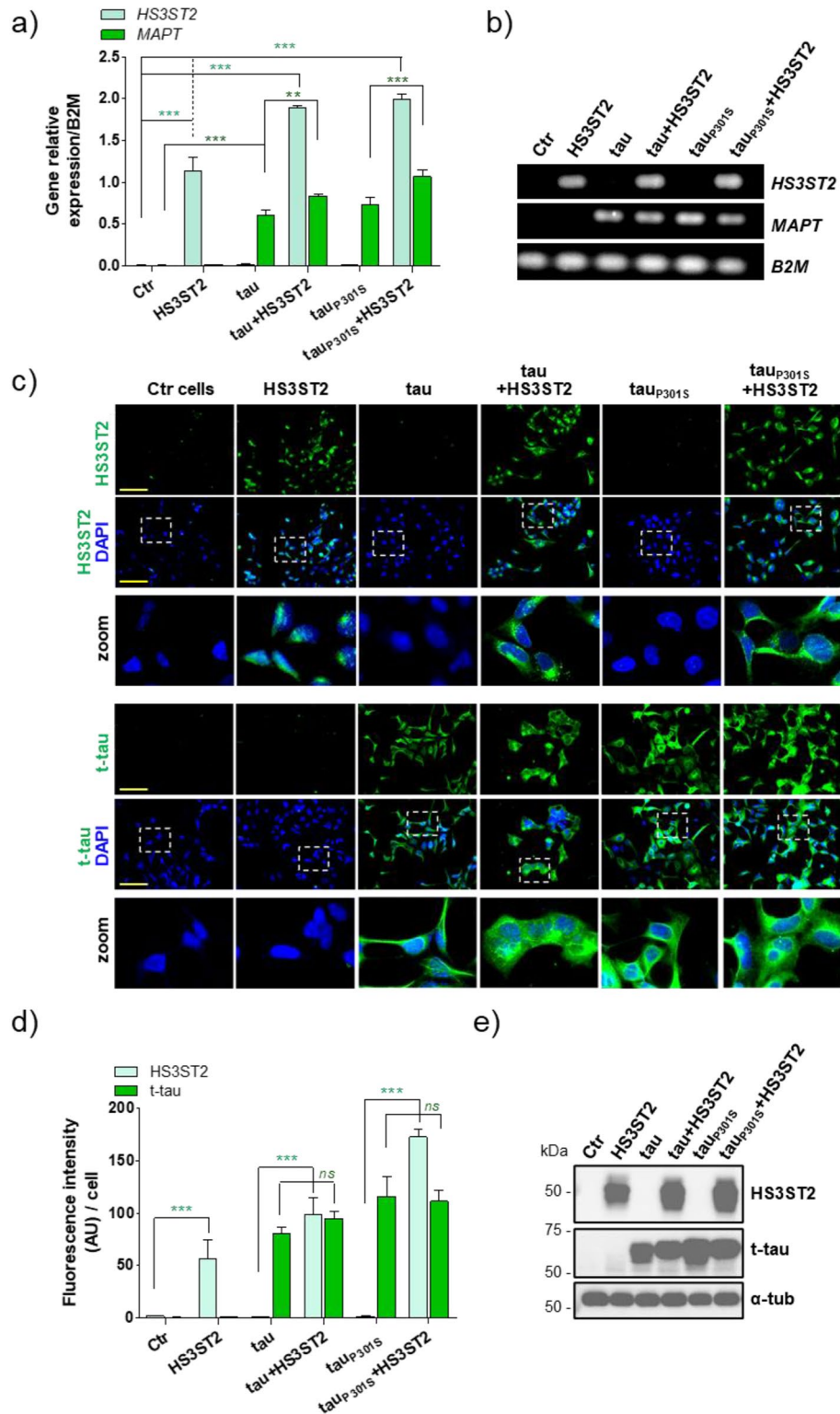
**HS3ST2 expressing cells produce 3S-HS.** Previously, we showed in cell models of tauopathy that HS3ST2 critically participates to the abnormal phosphorylation of tau<sup>28</sup>. However, it is unknown whether HS3ST2 expression can lead to the formation of tau aggregation in cells. To target this question, we chose to simultaneously express HS3ST2 and tau or tau<sub>p301S</sub> in cells lacking these proteins or expressing them in very low extent. We chose to work with HEK293 cells (further referred as HEK Ctr cells) as the two proteins were reported to be absent, or lowly expressed in these cells (<http://www.proteinatlas.org>)<sup>38</sup>. By using RT-qPCR, we first confirmed low HS3ST2 and tau expressions levels in the HEK Ctr cells (Fig. 1a). HS3ST2 transcripts were the lowest compared to other HS3STs expressed in the HEK Ctr cells, suggesting that 3S-HS can be produced at some extent by other HS3STs in these cells. Accordingly, ICC and immunoblotting showed no detectable HS3ST2 protein in the HEK Ctr cells (Fig. 1b, c; full blots in Supplementary Fig. S1) whereas ICC with the anti 3S-HS antibody (HS4C3)<sup>37</sup> showed some 3S-HS staining. As expected, confocal microscopy images confirmed that 3S-HS in the HEK Ctr cells are located at the cell membrane (Fig. 1d). This is in agreement with the well-established membrane location of HS under physiological conditions<sup>23,24</sup>. To validate that HS4C3 can stain 3S-HS produced by HS3ST2, we transfected HEK293 cells with the replicative pEBV plasmid carrying the sequence coding for the full length human HS3ST2 (cells are further referred as HEK+HS3ST2 cells). As expected, HS3ST2 immunostaining and immunoblotting, as well as 3S-HS staining, were stronger in the HEK+HS3ST2 cells compared to the HEK Ctr cells (Fig. 1b, upper and middle panels and Fig. 1c). Again, 3S-HS were observed in the cell membrane of HEK+HS3ST2 cells, although some signal was detected in the intracellular compartment (Fig. 1d). The strong 3S-HS staining in the HEK+HS3ST2 cells indicated that the newly expressed enzyme was active, as confirmed by loss of the HS signal after heparinase treatment of both Ctr and transfected cells (Fig. 1b, lower panel). Together, these results show that enzymatically active HS3ST2 can efficiently be expressed in HEK293 cells and that the produced 3S-HS are predominantly located on the cell membrane.

**HS3ST2 and tau do not induce their reciprocal expression.** To investigate whether HS3ST2 expression induces tau and tau<sub>p301S</sub> expressions, and if tau or tau<sub>p301S</sub> expression induces HS3ST2 expression, cells expressing the full-length human tau carrying or not the P301S mutation (further referred as HEK+tau or HEK+tau<sub>p301S</sub> cells) and cells simultaneously expressing both HS3ST2 and tau carrying or not the tau mutation (further referred as HEK+tau+HS3ST2 or HEK+tau<sub>p301S</sub>+HS3ST2) were generated. RT-qPCR analysis showed that HS3ST2 and tau transcripts were only increased in cells transfected with the corresponding plasmids (Fig. 2a, b). HS3ST2 expression was only increased in the HS3ST2 transfected cells (HEK+HS3ST2, HEK+tau+HS3ST2, and HEK+tau<sub>p301S</sub>+HS3ST2), but not in the tau only expressing cells (HEK+tau or HEK+tau<sub>p301S</sub>). Similarly, tau expression was increased only in the tau transfected cells (HEK+tau, HEK+tau<sub>p301S</sub>, HEK+tau+HS3ST2, and HEK+tau<sub>p301S</sub>+HS3ST2), but not in the HS3ST2 only transfected cells (HEK+HS3ST2) (Fig. 2a, b). After assessing transcript levels, proteins were analysed by ICC and immunoblotting (WB) using anti-HS3ST2 and anti-total tau (K9JA) antibodies. As expected, both proteins were only detected in the corresponding transfected cells (Fig. 2c–e; complete blots are shown in Supplementary Fig. S2), indicating successful protein expression. Together, these results show that, by using pEBV plasmids, cells independently or simultaneously expressing HS3ST2 and/or tau can be generated without inducing their reciprocal expressions.

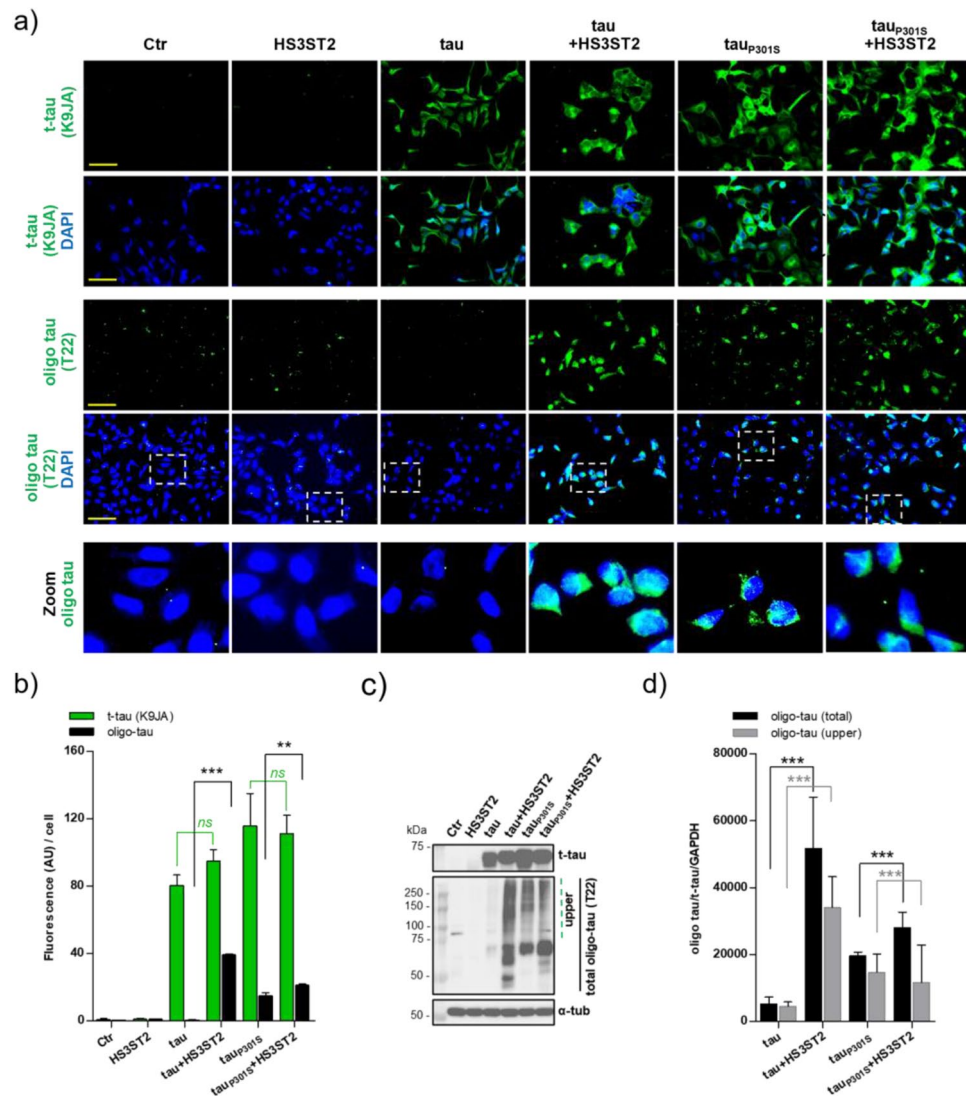


**Figure 1.** HEK293 expressing HS3ST2 cells produce 3S-HS. **(a)** Expression of different HS3STs in wild type (WT) HEK293 cells (HEK Ctr cells). Relative gene expression was normalized with B2M and RPL37A. Mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) are represented. **(b)** HS3ST2 and 3-O-sulfated HS (3S-HS) immunostaining in HEK Ctr cells and in HS3ST2 expressing cells (HEK+HS3ST2). The newly expressed HS3ST2 was enzymatically active, as shown by 3S-HS immunolabelling with the HS4C3 antibody loss of signal after heparitinase treatment (lower panel) in **(b)**. Cells were counterstained with DAPI to visualize nuclei (blue). Images were acquired by a IX81 Olympus microscope (magnification 20 $\times$ ), scale bar is 100  $\mu$ m. **(c)** HS3ST2 protein immunoblotting using GAPDH as loading control (RIPA cell lysates). **(d)** 3S-HS immunocytochemistry using the HS4C3 antibody shows staining predominantly at the cell membrane. Confocal slice images were acquired by a confocal microscope IX81 Olympus (magnification 60 $\times$ , immersion oil).

**HS3ST2 promotes tau and tau<sub>P301S</sub> oligomerisation.** After production of cells independently or simultaneously expressing HS3ST2 and/or tau or tau<sub>P301S</sub>, we investigated whether HS3ST2 expression can lead to the formation of oligomeric tau in these cells. With this aim, we used the T22 antibody, which specifically stains the oligomeric tau (oligo-tau) characteristic of early stages of tau aggregation, although staining decreases when the oligomeric tau reaches higher aggregation stages<sup>39</sup>. In our system, the HS3ST2 capacity to trigger the cell autonomous oligomerisation of non-mutated tau was suggested by T22 staining of tau oligomers, which were only detected when HS3ST2 was expressed with tau (Fig. 3a–d). The HS3ST2 capacity to trigger tau oligomerisation was confirmed with the mutated tau<sub>P301S</sub> expressing cells, as an increased T22 staining was observed in HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 cells compared to the HEK+tau<sub>P301S</sub> cells (Fig. 3a, b). As expected, HEK Ctr cells and HEK+HS3ST2 showed non-significant T22 staining compared to HEK Ctr cells. However, a decreased T22 signal level was observed in HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 cells compared to HEK+tau+HS3ST2 cells (Fig. 3b). This is possibly due to a decreased T22 immunoreactivity characteristic of advanced aggregation stages<sup>39</sup>. Accordingly, an increased propensity of HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 cells to trigger tau oligomerisation compared to HEK+tau+HS3ST2 cells was confirmed in bicistronic vectors transfected cells (Supplementary Method 1), which can be analysed at earlier times after transfection (Supplementary Fig. S3). However, the bicistronic vectors were not used in the continuation of the study because of the detection of fused HS3ST2-tau proteins (results not shown). These results suggest that HS3ST2 triggers the formation of oligomeric tau and boosts the oligomerisation of tau<sub>P301S</sub> in cells.



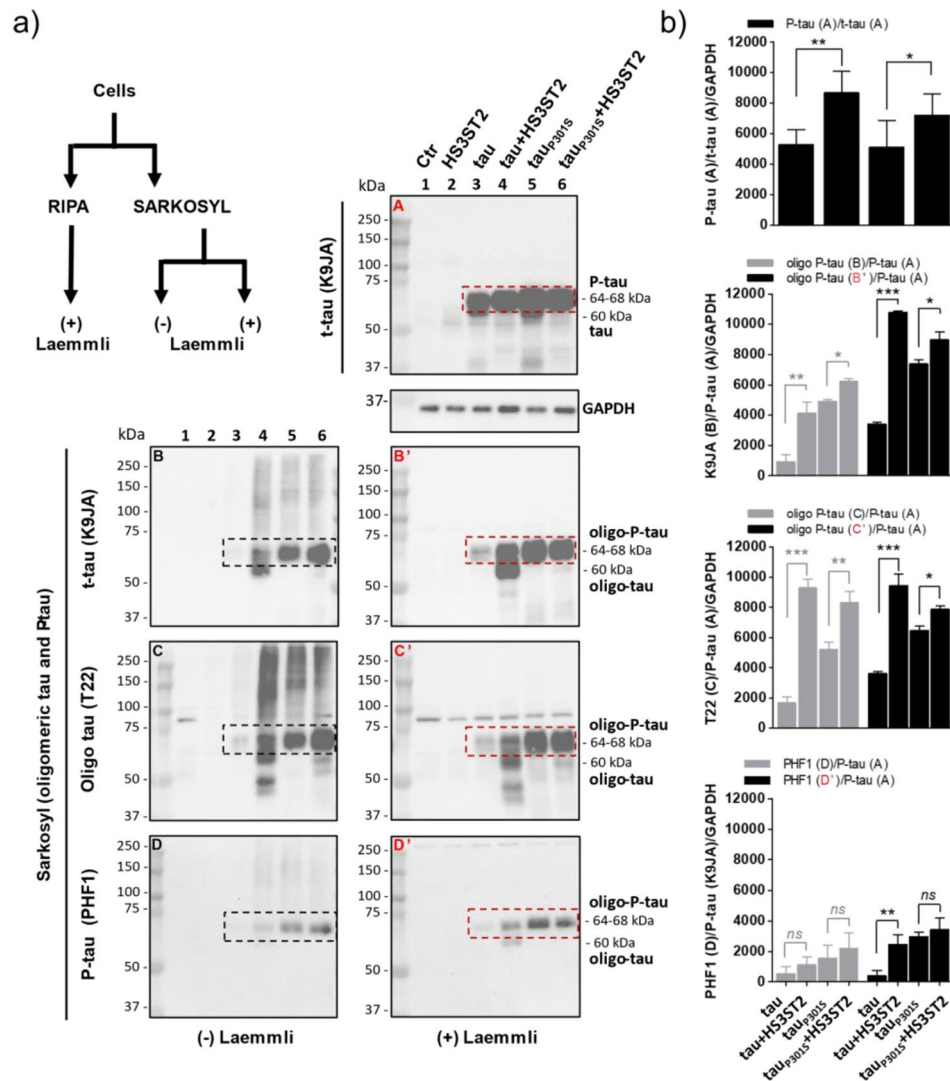
**Figure 2.** HS3ST2 and tau do not induce their reciprocal expression. HEK293 cells were transfected to independently or simultaneously express HS3ST2, tau, and/or tau<sup>p301S</sup>. (a) RTqPCR quantification of HS3ST2 and MAPT (tau) transcripts in the transfected HEK293 cells (Ctr). Relative gene expression was normalized with B2M. Mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) are represented. (b) Final point PCR quantification of HS3ST2 and MAPT (tau) transcripts in the transfected HEK293 cells (Ctr). B2M was used as loading control. (c) Immunostaining of HS3ST2 (anti-HS3ST2) and total tau (t-tau) (K9JA antibody) in HEK293 cells (Ctr) and transfected cells. Cells were counterstained with DAPI to visualize nuclei (blue). Images were acquired by a microscope IX81 Olympus, magnification 20 $\times$ , scale bar 100  $\mu$ m. (d) Relative fluorescence intensity of HS3ST2 and t-tau in engineered cells. (e) Immunoblotting of RIPA cell lysates with anti-HS3ST2 and K9JA (anti-t-tau) antibodies. Anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) antibody was used as loading control. Mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) are represented. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey’s test, as indicated (\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; ns = not significant).



**Figure 3.** HS3ST2 promotes tau oligomerisation in cells expressing tau and tau<sub>p301S</sub>. **(a)** Total tau (t-tau) and oligomeric tau (oligo-tau) were respectively stained with the K9JA and T22 antibodies. Cells were counterstained with DAPI to visualize nuclei (blue). Images were acquired with microscope IX81 Olympus, magnification 20x, scale bar 100  $\mu$ m. **(b)** Fluorescence intensity was quantified in cells by using ImageJ (2 fields, or 3 when cell density was low), t-tau signal (K9JA, green histograms) and oligo-tau signal (T22, black histograms) were compared between cells expressing or not HS3ST2. Mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) are represented. **(c)** T-tau (K9JA) immunoblotting (upper blot) was performed in RIPA cell lysates and proteins were detected in all the MAPT transfected cells. Oligo-tau (T22) immunoblotting (middle blot) was performed on cell lysates extracted with high salt (500 mM) Sarkosyl buffer. Stable tau aggregates are highlighted in the upper part of the blot (green dotted line). An anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) antibody was used as loading control (RIPA). **(d)** Oligo-tau and t-tau signals quantification were performed with ImageJ in the different cells (black histograms: oligo-tau/t-tau/GAPDH, grey histograms: upper oligo-tau/t-tau/GAPDH) and the average signal from two experiments was compared. Mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) are represented. Image or immunoblot analyses were calculated by one-way ANOVA with Tukey's test, as indicated (\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; *ns* = not significant). Experiments were reproduced twice with similar results.

Thus, tau oligomers were isolated using Sarkosyl salt-rich buffer extraction and analysed by immunoblotting<sup>35,36</sup>. The total tau signal detected by the K9JA antibody in RIPA protein extracts (Fig. 3c upper blot; full blots in Supplementary Fig. S4), was compared to oligo-tau signal detected by the T22 antibody in high salt Sarkosyl extracts (Fig. 3c; middle blot, full blots in Supplementary Fig. S4). Oligo-tau levels were significantly higher in cells expressing tau and HS3ST2, compared to cells expressing tau but not the enzyme (Fig. 3d), regardless of similar expression of total tau (Fig. 3c, d). Similarly, higher oligo-tau levels were observed in cells expressing tau<sub>p301S</sub> and HS3ST2 comparing to tau<sub>p301S</sub> only expressing cells (Fig. 3c, d). As in ICC observations, a decreased T22 staining was observed when HEK+tau<sub>p301S</sub>+HS3ST2 cells were compared to HEK+tau+HS3ST2 cells (Fig. 3b–d), suggesting no immunoreactivity of T22 at advanced oligomerisation.





**Figure 4.** HS3ST2 promotes tau aggregation in tau expressing cells. (a) High-salt Sarkosyl and RIPA buffer protein extracts were analysed in cell lysates from control and transfected cells. Immunoblotting of RIPA (blot A) and high salt Sarkosyl buffer (blots B-D and B'-D') extracted proteins were performed before and after protein denaturation by heating in Laemmli buffer (B-D and B'-D', respectively). Total tau (K9JA, blot A), oligomeric total tau (blots B-C and B'-C'), and oligomeric tau hyperphosphorylated at serine 396/404 (PHF1 antibody, blots D and D') were analysed before and after denaturation. (b) Total tau, oligomeric-tau (oligo-tau), and P-tau signal intensities were quantified by ImageJ. Mean values  $\pm$  SD are represented. Immunoblot analyses were calculated by one-way ANOVA with Tukey's test, as indicated (\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ; *ns* = not significant). Experiments were reproduced twice with similar results.

These results opened to the question whether the observed decrease of tau oligomers was accompanied by an increase of tau hyperphosphorylation.

**HS3ST2 promotes tau and tau<sub>P301S</sub> oligomerisation and hyperphosphorylation in cells.** To investigate if in our transfected cells total tau and oligomeric tau and tau<sub>P301S</sub> were hyperphosphorylated, we focused our attention in the immunoblot bands showing increased molecular weight before or after complete denaturation of Sarkosyl or RIPA extracted proteins<sup>40</sup> (Fig. 4a). Sarkosyl is an ionic detergent which under high salt concentration (NaCl 500 mM) allows recovery of tau oligomers that can be separated from soluble tau and tau fibers, if present<sup>35,36</sup>. These tau oligomers can be detectable by the T22 antibody<sup>39</sup>. On the other side, extraction with RIPA allows soluble protein recovery, including soluble tau (but not fibrous tau aggregates)<sup>40,41</sup>, which together represent the total tau detectable with K9JA antibody. Accordingly, K9JA immunoblotting of RIPA cell lysates allowed clear detection of soluble t-tau in both tau and tau<sub>P301S</sub> expressing cells (Fig. 4a, blot A; full blots in Supplementary Fig. S5) whereas in the high salt Sarkosyl extracted proteins, the K9JA tau signal intensity was dramatically reduced only in the HEK+tau cells (Fig. 4a, blots B-C and B'-C'; full blots in Supplementary Figs. S5 and S6). This confirms observation on Fig. 3a-c showing that the non-mutated tau can efficiently form oligomers

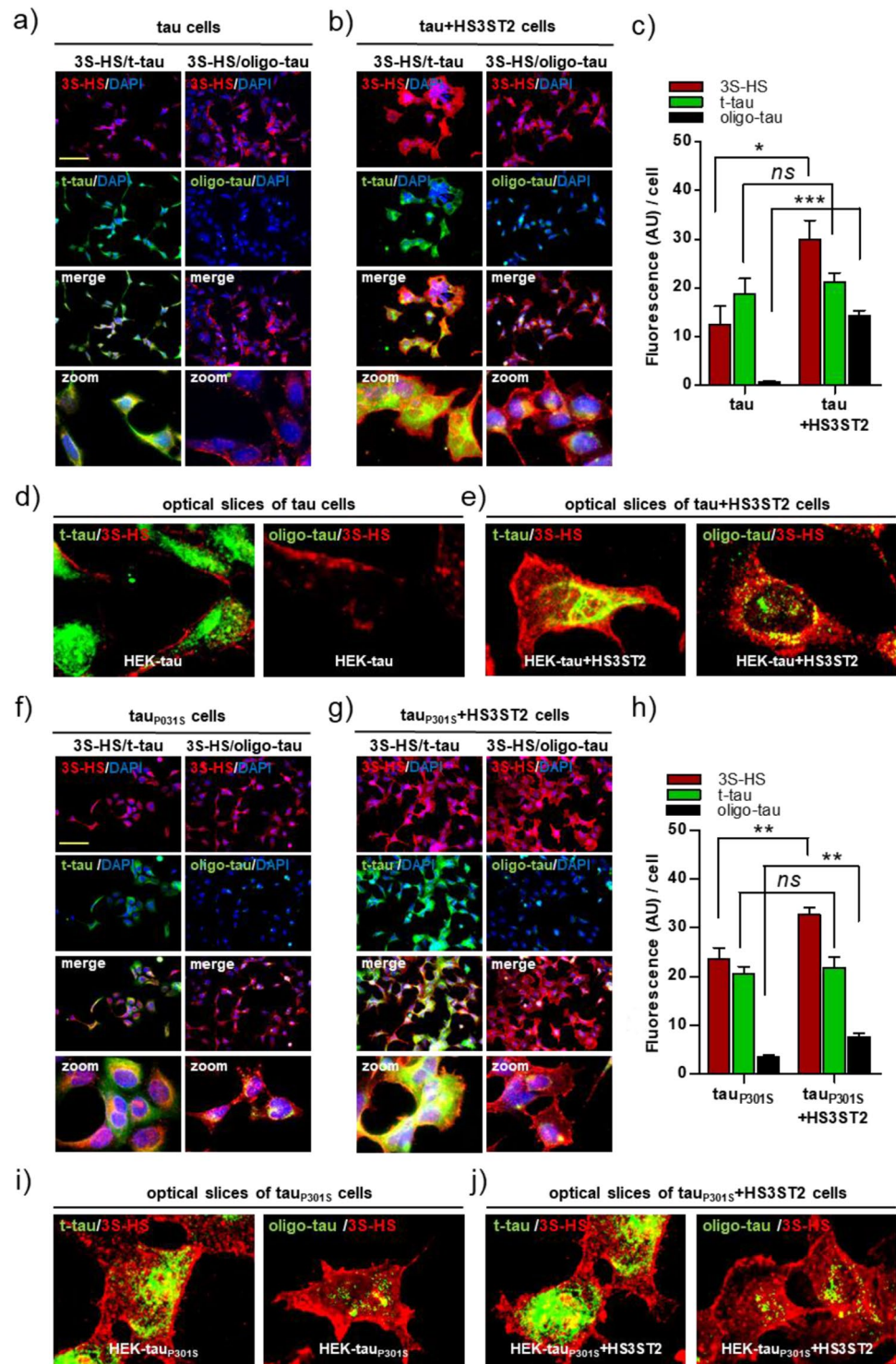
in cells expressing tau and HS3ST2 but not in cells expressing the non-mutated tau only. Interestingly, tau was detected predominantly as two main bands, one around 60 kDa and a second at 64–68 kDa. Indeed, tau purified from the human brain migrates as ~50–60 kDa bands on SDS-gel due to the presence of six isoforms<sup>40,42–45</sup>. Here, only full-length tau (60 kDa) is expressed by the transfected cells. On the other side, PHF-tau isolated from AD brain displays characteristic 60–64 and 68 kDa bands on SDS gels. The 64–68 kDa bands have been shown to be hyperphosphorylated and are considered as a pathological marker of AD<sup>40,42–45</sup>. Here, the 64–68 kDa (P-tau) band was the only band detected in RIPA extracts from cells expressing tau or tau<sub>P301S</sub> together with HS3ST2, whereas the 60 kDa band was also present in cells not expressing HS3ST2 (Fig. 4a, blot A). This suggests that HS3ST2 expression enhances the hyperphosphorylation of both tau and tau<sub>P301S</sub> (Fig. 4a, blot A; full blots are shown in Supplementary Fig. S5). Accordingly, quantification of the hyperphosphorylated tau 64–68 band (Fig. 4b, graph A: P-tau/t-tau/GAPDH) confirms higher P-tau levels in the HS3ST2 expressing cells. Immunoblotting of oligomeric tau extracted by high salt Sarkosyl buffer showed that the 64–68 kDa P-tau is oligomerized in HEK+tau+HS3ST2, HEK+tau<sub>P301S</sub> and HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 cells, but not, or less, in the tau only expressing HEK+tau cells (Fig. 4a, blot A vs blots B–D and B'–D'; full blots in Supplementary Figs. S5–S6). Again, this suggests that P-tau was oligomerized in HEK+tau+HS3ST2, HEK+tau<sub>P301S</sub>, and HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 expressing cells, but not in tau only expressing cells, in agreement with the strong T22 signal observed in Sarkosyl extracts from these cells (Fig. 4a, blots C and C') and with T22 staining in Fig. 3. On the other side, the 60 kDa tau band was not extracted by high salt Sarkosyl either from HEK+tau+HS3ST2 cells nor from HEK+tau<sub>P301S</sub> cells (Fig. 4a, blot A vs blots B–C and B'–C'), suggesting that tau was not oligomerized in these cells. However, the 60 kDa tau band appeared in tau-HS3ST2 expressing cells after Sarkosyl extraction, possibly because the protein was aggregated in the HS3ST2 expressing cells and thus not recovered in the RIPA buffer (Fig. 4a, blot A vs blots C and C'). This is also suggested by the 60 kDa increased band density after oligomers denaturation by heating in Laemmli (Fig. 4a, blot A vs blots B–C and B'–C'). In line with these observations, tau (K9JA) band quantification shows increased P-tau oligomers in the two HS3ST2 expressing cells before and after cell lysate denaturation by Laemmli (Fig. 4b, graph B). Immunoblotting with the more specific anti-oligomeric tau T22 antibody showed similar oligomeric tau extent in the two cell lines expressing HS3ST2 (both before and after Laemmli denaturation; Fig. 4b, graph C). Thus, HS3ST2 can similarly induce tau oligomerisation of tau and tau<sub>P301S</sub>, although the tau oligomers are less hyperphosphorylated in the HEK+tau+HS3ST2 cells compared to the HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 ones. Accordingly, analysis of the extracted oligomers with the anti-P-tau PHF1 antibody<sup>46</sup>, showed a less intense PHF1 signal at 64–68 kDa in tau only expressing cells compared to tau<sub>P301S</sub> expressing cells. In both cases the PHF1 signal increased when HS3ST2 was expressed (Fig. 4a, blot D–D' and Fig. 4b PHF1), confirming that HS3ST2 promoted tau hyperphosphorylation. Together, these results show that HS3ST2 expression triggers a cell autonomous hyperphosphorylation and oligomerisation of both non-mutated tau and tau carrying the pathogenic mutation P301S.

**3S-HS intracellularly accumulate in cells producing tau and tau<sub>P301S</sub> oligomers.** Here, we showed that the cell autonomous hyperphosphorylation and oligomerisation of tau and of tau<sub>P301S</sub> is induced in cells expressing HS3ST2. Previously, we showed in SH-SY5Y cell models of tauopathy that 3S-HS accumulate and colocalize with tau at the intracellular level<sup>28</sup>. To investigate whether 3S-HS intracellularly accumulate and colocalize with tau in our engineered cells producing hyperphosphorylated tau oligomers, we stained cells with total-tau (K9JA), oligo-tau (T22), and 3S-HS (HS4C3) antibodies and analysed cells by ICC with confocal microscopy. As expected, tau was intracellularly located in all tau expressing cells, whereas 3S-HS were intracellularly detected only in cells expressing either HS3ST2 or the tau mutation, or both, regardless of total tau levels (Fig. 5). Similarly, tau oligomers were only detected in cells accumulating intracellular 3S-HS. Interestingly, t-tau (K9JA) and tau oligomers (T22) signals colocalized with intracellular 3S-HS only in cells expressing HS3ST2, but not in cells expressing tau only (Fig. 5a–b), regardless of similar tau protein levels (Fig. 5c). Although the cells that accumulate the higher 3S-HS levels are those accumulating higher levels of tau oligomers, the effect in tau oligomerisation is likely more related to the extent of intracellular 3S-HS rather than the level of the sugar itself, as suggested by the absence of tau oligomers in HEK+tau cells, which accumulate 3S-HS at the cell membrane.

In cells expressing tau<sub>P301S</sub>, 3S-HS were systematically increased and intracellularly detected regardless of HS3ST2 expression although HS3ST2 expression increased tau oligomers levels compared to tau<sub>P301S</sub> only expressing cells (Fig. 5b–h). The intracellular accumulation of 3S-HS in the HEK+tau<sub>P301S</sub> cells supports that tau<sub>P301S</sub> expression triggers the endogenous accumulation of these sugars without requirement of HS3ST2 overexpression (Fig. 5f–e). Together, these results indicate that 3S-HS intracellular location can be induced by simultaneous expression of both HS3ST2 and tau, by tau<sub>P301S</sub> expression in cells (which endogenously produce some 3S-HS), or by over production of 3S-HS.

## Discussion

In a previous report we showed that HS3ST2 is critical for the abnormal phosphorylation of tau in AD-related tauopathy<sup>28</sup>. Here, we show for the first time that HS3ST2 expression promotes tau oligomerisation in cells expressing wild type tau or tau carrying the P301S mutation (tau<sub>P301S</sub>). Tau oligomers detection was assessed in the cultured cells and cell lysates by staining with the T22 antibody, which recognises oligomeric but not monomeric tau nor tau in advanced aggregational stages<sup>39</sup>. This agrees a role of intracellular 3S-HS in tau oligomerisation, T22 positive signal was only detected in cells expressing both HS3ST2 and tau (HEK+tau+HS3ST2 and HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2), or in cells carrying tau<sub>P301S</sub> only (HEK+tau<sub>P301S</sub>). In agreement with the presence of tau oligomers reported to be extractable in high salt (500 mM) Sarkosyl<sup>35,36</sup>, we observed tau multimers in stabilized conformations resistant to SDS<sup>36,47</sup>. However, as previously reported, it cannot be excluded that these multimers may be composed of tau in complex with other protein(s)<sup>47,48</sup>. Interestingly, P-tau oligomers



**Figure 5.** Intracellular 3S-HS and tau oligomers in cells expressing HS3ST2 and tau or tau<sub>P301S</sub>. Cells were immunoassayed with antibodies against 3S-HS (HS4C3, red), total tau (t-tau; K9JA antibody; green), and oligo-tau (T22 antibody; green). Images were recorded with a microscope IX81 Olympus with confocal option. Magnification was 20× or 60× for confocal slices (immersion oil). **(a,b)** Representative image of 3S-HS, tau, and oligo-tau staining in HEK cells expressing tau together or not with HS3ST2. **(c)** Fluorescence intensity quantification of 3S-HS, t-tau, and oligo tau signals in HEK+tau vs HEK+tau+HS3ST2 cells. Mean values ± SD ( $n = 3$ ) are represented. **(d)** Confocal slices showing non-intracellular 3S-HS and no tau oligomers in HEK+tau cells. **(e)** Confocal slices showing intracellular 3S-HS and tau oligomers accumulation in HEK+tau cells. **(f,g)** Representative images of 3S-HS, tau, and oligo-tau staining in HEK cells expressing tau<sub>P301S</sub> together or not with HS3ST2. **(h)** Fluorescence intensity quantification of 3S-HS, t-tau, and oligo tau<sub>P301S</sub> signals in HEK+tau<sub>P301S</sub> vs HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 cells. Mean values ± SD ( $n = 3$ ) are represented. **(i)** Confocal slices showing intracellular 3S-HS and tau oligomers in HEK+tau<sub>P301S</sub> cells. **(j)** Confocal slices showing intracellular 3S-HS and tau oligomers in HEK+tau<sub>P301S</sub>+HS3ST2 cells. Image analyses were calculated by the unpaired and two-tailed Student's t test, as indicated (\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ;  $ns =$  not significant).

were not only detected in the tau<sub>p301S</sub> expressing cells (HEK+tau<sub>p301S</sub>+HS3ST2) but also in cells expressing the non-mutated tau and HS3ST2 (HEK+tau+HS3ST2), thus mimicking the tau aggregation process in both mutational<sup>11,49</sup> and non-mutational tauopathies, which include AD<sup>50</sup>. P-tau signals levels were stronger when HS3ST2 was expressed together with tau and when 3S-HS accumulated inside cells. However, the signal decreased in HEK+tau<sub>p301S</sub>+HS3ST2 compared to HEK+tau+HS3ST2, suggesting lower T22 immunoreactivity in the last due to higher tau aggregation stages<sup>11,51</sup>, as confirmed by analysis of T22 in cells that could be analysed at earlier times of culture (made possible only by using bicistronic vectors). This agrees with a tau<sub>p301S</sub> increased propensity to aggregate compared to native tau<sup>51</sup>. These results agree previous observations showing that suppression of HS3ST2 in a zebrafish model of tauopathy expressing human tau<sub>p301L</sub> leads to tauopathy arrest and animal functional recovery<sup>28</sup> and confirm the hypothesis that HS3ST2 participates to the cell autonomous P-tau oligomerisation and aggregation process in which intracellular 3S-HS might play a central role<sup>22</sup>.

The implication of 3S-HS in tau oligomerisation and aggregation is supported by the extensive use of heparin in the *in vitro* induction of native tau fibrils<sup>14,16</sup>. As heparin is a commercially available prototype of the endogenous 3S-HS<sup>19</sup>, it is not surprising that cells expressing both 3S-HS and tau are able to produce high levels of aggregated tau. Indeed, although heparin is produced predominantly in mast cells by HS3ST1<sup>52</sup>, other 3S-HS can also be produced by other HS3STs expressed in different tissues<sup>19</sup>, as HS3ST2 in brain<sup>21,53,54</sup>. Interestingly, regardless of the reported colocalization of HS with tau in the brain of AD in the 90's<sup>25-27</sup>, the involvement of neural HS sulfotransferases in the development of tauopathy was until recently disregarded. This is possibly because HS are typically described to be located at the cell surface under physiological conditions<sup>23,24</sup>, and thus their intracellular accumulation in AD<sup>25-27,55</sup> breaks the dogma of their extracellular location. Nevertheless, by using cell models of tauopathy, we previously showed that 3S-HS were first located at the cell membrane before internalization, delineating a link with the biology at the cell membrane<sup>28</sup>. Here, we show in the engineered HEK293 cells expressing HS3ST2 and tau, that 3S-HS intracellularly accumulate in cells that produce tau oligomers, whereas 3S-HS are predominantly located at the cell membrane in control wild type cells, in which tau oligomers were not detected (HEK Ctr cells). Indeed, by using FRET experiments, we previously showed that 3S-HS can physically interact with tau in cell models of tauopathy<sup>28</sup>, although aggregation was not assessed in that study. Moreover, the hypothesis of an intracellular 3S-HS induction of aggregation in a cell autonomous manner (without supplementing on tau seeds) is supported by previous proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) studies showing that heparin can induce tau β-sheet conformations, characteristic of fibrillar protein aggregates<sup>16</sup>.

Accumulation of tau aggregates in neurons is an important pathological signature in multiple neurodegenerative disorders including AD, FTDP17, and other tauopathies<sup>1,9</sup>. Although great efforts have been made to understand the tau aggregation processes, there is still an imperative need to identify new key molecular players involved in this process, as well as to develop robust cellular systems to test the pertinence of these players in the research of new therapeutic candidates. Here, we show that tau aggregation can occur in a cell autonomous manner, as it happened without addition of exogenous inducers of aggregation in our engineered cells, which represent a new cell model of tauopathy. Indeed, in most cell models of tauopathy tau aggregation is induced by addition of exogenous tau seeds or tau seeds from reborning cells<sup>56,57</sup>, by addition of exogenous aggregation inducing molecules<sup>58,59</sup>, or by expression of tau carrying pathogenic mutations<sup>28,60,61</sup>. We used HEK293 cells since they are easily transfected and because they exhibit some characteristics of neuronal lineage cells<sup>62</sup>, including expression of more than 60 neuron-specific genes<sup>63</sup>. Moreover, these cells give opportunity to investigate the reciprocal effect of HS3ST2 and tau expression, independently of each other, given that they lack or show very low expression levels of HS3ST2 and tau. Thus, HEK293 cells were permanently transfected to express HS3ST2 alone or in association with tau or tau<sub>p301S</sub>. Interestingly, HS3ST2 protein levels remained undetectable in cells transfected with tau only (tau or tau<sub>p301S</sub>), indicating that tau has no effect in HS3ST2 expression, at least in the HEK293 cells. Accordingly, HS-related genes have not been reported in the panel of genes which expression increases after increasing tau expression<sup>64</sup>. As HS3ST2 and tau could be stably and robustly expressed in the HEK293 cell line, we additionally propose this model, or cells transfected with other HS3STs, as a convenient tool to investigate the involvement of 3S-HS in tau protein abnormal phosphorylation and pathological oligomerisation. Taken together, our results show that 3S-HS produced by HS3ST2 can generate cell autonomous tau aggregation by starting from tau oligomerisation and evolving through tau aggregation in a time dependent manner. However, the mechanism driving the 3S-HS intracellular accumulation remains to be clarified.

## Conclusion

Cell autonomous hyperphosphorylation and oligomerisation of tau were induced through simultaneous expression of the neural HS3ST2 and tau in cultured cells, in which 3S-HS colocalized with tau at the intracellular level. This mimics the intracellular accumulation of HS observed in neurons of the AD<sup>25-27,55</sup>. As HS3ST2 is an enzyme predominantly expressed in brain regions vulnerable to AD, as cortex and hippocampus<sup>33</sup>, our results suggest the involvement of 3S-HS in the mechanisms leading to tau hyperphosphorylation, oligomerisation, and aggregation in the AD brain. Moreover, the cell autonomous production of tau aggregates in the absence of any tau mutation supports that 3S-HS can drive tau aggregation in cells that express tau and in which HS3ST2 is predominantly expressed, as in neural cells. Indeed, these cells are here mimicked by inducing the expression of tau and HS3ST2 in HEK cells, resulting in an original glycan-derived model of cell autonomous tauopathy. This new cell model offers the possibility to bypass tau aggregation inducers used to promote fibrillization of full-length wild-type tau<sup>65</sup>. Moreover, as HS accumulate in brain of AD at early stages of the disease, we propose that inhibiting the interaction of HS with tau will represent a breakthrough for developing new efficient therapeutic drugs for AD and related tauopathies. We are currently working in this area.

Received: 30 May 2021; Accepted: 13 May 2022

Published online: 27 June 2022

## References

- Kovacs, G. G. Invited review: neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**, 3–23 (2015).
- Avila, J. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett.* **580**, 2922–2927 (2006).
- Naseri, N. N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M. & Luo, W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **705**, 183–194 (2019).
- Wang, J.-Z., Gao, X. & Wang, Z.-H. The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays Biochem.* **56**, 111–123 (2014).
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E. & Holzbaur, E. L. F. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* **319**, 1086–1089 (2008).
- Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J. & Gross, S. P. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 87–92 (2007).
- Brandt, R. The tau proteins in neuronal growth and development. *Front Biosci* **1**, d118–130 (1996).
- Regan, P. & Cho, K. The role of tau in the post-synapse. *Tau Biology* **1184**, 113–121 (2019).
- Venkatramani, A. & Panda, D. Regulation of neuronal microtubule dynamics by tau: Implications for tauopathies. *Int. J. Biol. Macromol.* **133**, 473–483 (2019).
- Saha, P. & Sen, N. Tauopathy: a common mechanism for neurodegeneration and brain aging. *Mech. Ageing Dev.* **178**, 72–79 (2019).
- Maeda, S., Sato, Y. & Takashima, A. Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome-17 mutations enhance tau oligomer formation. *Neurobiol. Aging* **69**, 26–32 (2018).
- Silva, M. C. & Haggarty, S. J. Tauopathies: deciphering disease mechanisms to develop effective therapies. *IJMS* **21**, 8948 (2020).
- Stoiljkovic, M., Horvath, T. L. & Hajós, M. Therapy for Alzheimer's disease: missing targets and functional markers?. *Ageing Res. Rev.* **68**, 101318 (2021).
- Konno, T., Oiki, S., Hasegawa, K. & Naiki, H. Anionic contribution for fibrous maturation of protofibrillar assemblies of the human tau repeat domain in a fluoroalcohol solution. *Biochemistry* **43**, 13613–13620 (2004).
- Zhu, H.-L. *et al.* Quantitative characterization of heparin binding to Tau protein: implication for inducer-mediated Tau filament formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 3592–3599 (2010).
- Sibille, N. *et al.* Structural impact of heparin binding to full-length tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **45**, 12560–12572 (2006).
- Meneghetti, M. C. Z. *et al.* Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J. R. Soc. Interface.* **12**, 20150589 (2015).
- Zorél Meneghetti, M. C. *et al.* Insights into the role of 3-O-sulfotransferase in Heparan Sulfate biosynthesis. *Organ. Biomol. Chem.* **14**, 36–39 (2016).
- Thacker, B. E., Xu, D., Lawrence, R. & Esko, J. D. Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol.* **35**, 60–72 (2014).
- Lawrence, R. *et al.* The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues. *Matrix Biol.* **26**, 442–455 (2007).
- Shworak, N. W. *et al.* Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.* **274**, 5170–5184 (1999).
- Maiza, A. *et al.* The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *FEBS Lett* **592**, 3806–3818 (2018).
- Iozzo, R. V. & Schaefer, L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* **42**, 11–55 (2015).
- Li, J.-P. & Kusche-Gullberg, M. Heparan Sulfate: biosynthesis, structure, and function. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 325 215–273 (Elsevier, 2016).
- Su, J. H., Cummings, B. J. & Cotman, C. W. Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **51**, 801–813 (1992).
- Goedert, M. *et al.* Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **383**, 550–553 (1996).
- Snow, A. D. *et al.* Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am J Pathol* **137**, 1253–1270 (1990).
- Sepulveda-Diaz, J. E. *et al.* HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology. *Brain* **138**, 1339–1354 (2015).
- Falcon, B. *et al.* Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J Biol Chem* **290**, 1049–1065 (2015).
- Biard, D. S., Cordier, A. & Sarasin, A. Establishment of a human cell line for the detection of demethylating agents. *Exp. Cell Res.* **200**, 263–271 (1992).
- Biard, D. S. F., Jarray, R., Rebergue, N., Leteurtre, F. & Papy-Garcia, D. APP deficiency and HTRA2 modulates PrPc proteostasis in human cancer cells. *BBA Advances* **2**, 100035 (2022).
- Wang, Y., Wang, F., Wang, R., Zhao, P. & Xia, Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep* **5**, 16273 (2015).
- Huynh, M. B. *et al.* Glycosaminoglycans from Alzheimer's disease hippocampus have altered capacities to bind and regulate growth factors activities and to bind tau. *PLoS ONE* **14**, e0209573 (2019).
- Jacob, F. *et al.* Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS ONE* **8**, e59180 (2013).
- Rai, S. K., Savastano, A., Singh, P., Mukhopadhyay, S. & Zweckstetter, M. Liquid–liquid phase separation of tau: from molecular biophysics to physiology and disease. *Protein Sci.* **30**, 1294–1314 (2021).
- Diner, I., Nguyen, T. & Seyfried, N. T. Enrichment of Detergent-insoluble Protein Aggregates from Human Postmortem Brain. *JoVE* 55835 (2017) doi:<https://doi.org/10.3791/55835>.
- ten Dam, G. B. *et al.* 3-O-sulfated oligosaccharide structures are recognized by anti-heparan sulfate antibody HS4C3. *J. Biol. Chem.* **281**, 4654–4662 (2006).
- Uhlen, M. *et al.* Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nat Biotechnol* **28**, 1248–1250 (2010).
- Lasagna-Reeves, C. A. *et al.* Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB j.* **26**, 1946–1959 (2012).
- Sui, D., Liu, M. & Kuo, M.-H. In Vitro Aggregation assays using hyperphosphorylated tau protein. *JoVE* 51537 (2015) doi:<https://doi.org/10.3791/51537>.
- Petry, F. R. *et al.* Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's Disease: problems and solutions. *PLoS ONE* **9**, e94251 (2014).
- Sahara, N., Maeda, S. & Takashima, A. Tau oligomerisation: a role for tau aggregation intermediates linked to neurodegeneration. *CAR* **5**, 591–598 (2008).

43. Sahara, N. *et al.* Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau: distinct types of tau dimers. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 3020–3029 (2007).
44. Crowther, R. A. & Goedert, M. Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J. Struct. Biol.* **130**, 271–279 (2000).
45. Han, D., Qureshi, H. Y., Lu, Y. & Paudel, H. K. Familial FTDP-17 missense mutations inhibit microtubule assembly-promoting activity of tau by increasing phosphorylation at Ser202 in vitro. *J. Biol. Chem.* **284**, 13422–13433 (2009).
46. Bibow, S. *et al.* Structural impact of proline-directed pseudophosphorylation at AT8, AT100, and PHF1 epitopes on 441-residue tau. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15842–15845 (2011).
47. Berger, Z. *et al.* Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.* **27**, 3650–3662 (2007).
48. Sahara, N. *et al.* Characteristics of TBS-extractable hyperphosphorylated tau species: aggregation intermediates in rTg4510 mouse brain. *JAD* **33**, 249–263 (2012).
49. Zeng, Y. *et al.* The structure and phase of tau: from monomer to amyloid filament. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 1873–1886 (2021).
50. Lo, C. H. & Sachs, J. N. The role of wild-type tau in Alzheimer's disease and related tauopathies. *JoLS* <https://doi.org/10.36069/JoLS/20201201> (2020).
51. Alonso, A. del C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Promotion of Hyperphosphorylation by Frontotemporal Dementia Tau Mutations. *J. Biol. Chem.* **279**, 34873–34881 (2004).
52. Linhardt, R. J. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci* **21**, 1372–1392 (2016).
53. Yabe, T., Hata, T., He, J. & Maeda, N. Developmental and regional expression of heparan sulfate sulfotransferase genes in the mouse brain. *Glycobiology* **15**, 982–993 (2005).
54. Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y. & Kimata, K. Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **283**, 31237–31245 (2008).
55. Hernández, F., Pérez, M., Lucas, J. J. & Avila, J. Sulfo-glycosaminoglycan content affects PHF-tau solubility and allows the identification of different types of PHFs. *Brain Res.* **935**, 65–72 (2002).
56. Dubey, S. K. *et al.* Recent expansions on cellular models to uncover the scientific barriers towards drug development for Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* **39**, 181–209 (2019).
57. Lim, S., Haque, Md. M., Kim, D., Kim, D. J. & Kim, Y. K. Cell-based models to investigate tau aggregation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **12**, 7–13 (2014).
58. Holmes, B. B. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3138–E3147 (2013).
59. Viora, J. R., Li, L., Breen, G. A. M. & Goux, W. J. Novel cell model for tauopathy induced by a cell-permeable tau-related peptide. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 2734–2745 (2017).
60. Matsumoto, G. *et al.* Tau fibril formation in cultured cells compatible with a mouse model of tauopathy. *IJMS* **19**, 1497 (2018).
61. Seidel, D. *et al.* Induced tauopathy in a novel 3D-culture model mediates neurodegenerative processes: a real-time study on biochips. *PLoS ONE* **7**, e49150 (2012).
62. Stepanenko, A. A. & Dmitrenko, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* **569**, 182–190 (2015).
63. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* **16**, 869–871 (2002).
64. Wes, P. D. *et al.* Tau overexpression impacts a neuroinflammation gene expression network perturbed in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **9**, e106050 (2014).
65. Honson, N. S. & Kuret, J. Tau aggregation and toxicity in tauopathic neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis* **14**, 417–422 (2008).

## Acknowledgements

Authors are thankful to the European H2020 FET OPEN RIA program ArrestAD (grant No. 737390), to the Flemish Agency for Innovation and Entrepreneurship (VLAIO; HepSTAD, HBC.2017.0995), and to 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología' (CONACYT, WGH scholarship No. 742472). Authors thank the ArrestAD partner Dr. Toin H. van Kuppevelt (Radboud University Medical Center, Nijmegen, NDL) for kindly affording the HS4C3 antibody, to Prof. Michel Goedert (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) for kindly affording tau constructs, and to late Dr. Peter Davies for supplying PHF1 antibody. Authors thank Mr. Gilles Carpentier for training in the image facility at the Gly-CRRET, to Miss Laura Perez for technical help during her internship. We thank GDR GAGoSciences (No. 3739), Janssen Research and Development (companies of Johnson & Johnson), all the ArrestAD consortium partners, and all members of the Gly-CRRET Research for interesting discussions, comments, and valuable help.

## Author contributions

D.P.-G. conceived and designed experiments. D.S.F.B. designed, created and validated engineered HEK293 cells. M.B.H., N.R., D.S.F.B., H.M., and W.G.-H. performed all experiments, E.J. supported with cells and cell facility management. D.P.-G., D.S.F.B., M.B.H. and N.R. drafted and revised the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript before publication.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13486-6>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to D.P.-G.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

## 8. ANEXOS



Anexo 1. MPTs descritas en proteínas. Tomado y modificado de VN Uversky 2013 [1]

PTM	Aminoácido																			
	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
	A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
Allysine																				
Amidación																				
Aminocarboxipropilación																				
Autocleavages																				
β-metilolación																				
Bromación																				
Carboxilación																				
Colesterol glicine-éster																				
C-Hidroxlación																				
c/s-14-Hidroxi-10,15-dioxo-7-heptadecenoico ácido aspartato																				
Citrulinación/Deiminación																				
Glicosilación ligada a C																				
C-Manosilación																				
Ácido sulfínico cisteína (-SO <sub>2</sub> H)																				
Desamidación																				
Desamidación seguida de metilación																				
Dihidroxlación																				
Hidroxlación																				
Isomerización a isoaspartato																				
Metilación																				
N6-1-carboxietilación																				
N-Acetilación																				
N-Acilaración por grupos acetilo, biotinio, lipoilo, ubiquitil																				
N-ADP-ribosilación																				
N-Decanoilación																				
N-Glicosilación																				
Nitrosilación																				
N-metilación																				
N-Mristoilación																				
N-Palmitoilación																				
O-Acetilación																				
O-Glicosilación																				
O-Octanoilación																				
O-Palmitoilación																				
orto-nitración																				
Oxidación a metionina sulfona																				
Oxidación a sulfóxido de metionina																				
Formación de enlaces disulfuro																				
Fosfopanteteinilación																				
Fosforilación																				
Poli N-ADP-ribosilación																				
Poliglutarilación																				
Poliglicinación																				
Splicing de proteínas																				
S-Acilaración																				
S-Archaol cisteína																				
S-Glutationilación																				
S-Hidroxlación (S-OH)																				
Modificación silenciosa (conversión a ácido aspártico)																				
S-Palmitoilación																				
S-Prenilación																				
Sulfatación																				
TOPA quinina																				
Transglutaminación																				
Trimetilación																				

Se muestran diferentes tipos de MPTs que se adicionan sobre diferentes residuos de aminoácidos.

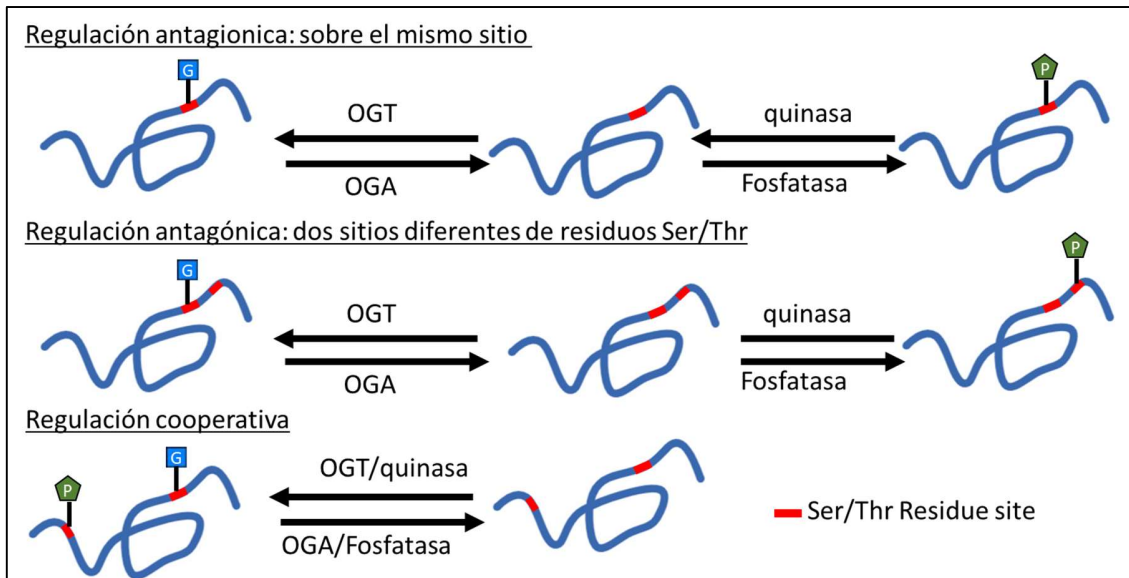
Anexo 2. Monosacáridos, símbolos y nomenclatura.

Tomado y modificado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html), 2022 [216]

Forma	Símbolo Genérico	Azul	Verde	Amarillo	Naranja	Rosado	Violeta	Azul Claro	Marrón	Rojo
Circulo	Hexosa	Glc	Man	Gal	Gul	Alt	All	Tal	Ido	
Cuadrado	HexNAc	GlcNAc	ManNAc	GalNAc	GulNAc	AltNAc	AllNAc	TalNAc	IdoNAc	
Cuadrado cruzado	Hexosamina	GlcN	ManN	GalN	GulN	AltN	AllN	TalN	IdoN	
Diamante Dividido	Hexuronato	GlcA	ManA	GalA	GulA	AltA	AllA	TalA	IdoA	
Triangulo	Desoxihexosa	Qui	Rha		δdGul	δdAlt		δdTal		Fuc
Triangulo dividido	DesoxihexNAc	QuiNAc	RhaNAc			δdAltNAc		δdTalNAc		FucNAc
Rectángulo	Didesoxihexosa	Oli	Tyv		Abe	Par	Dig	Col		
Estrella	Pentosa		Ara	Lyx	Xyl	Rib				
Diamante	Ácido 3-desoxi-nonulosónicos		Kdn				Neu5Ac	Neu5Gc	Neu	Sia
Diamante plano	Ácidos 3,9-didesoxi-nonulosónicos		Pse	Leg		Aci		4eLeg		
Hexágono	Desconocido	Bac	LDmanHep	Kdo	Dha	DDmanHep	MurNAc	MurNGc	Mur	
Pentágono	Asignado	Api	Fru	Tag	Sor	Psi				

Monosacáridos que conforman las glicosilaciones en todos los organismos, en los cuadros rojos se resaltan los carbohidratos más comunes que conforman las glicosilaciones en mamíferos.

**Anexo 3. Mecanismos de la regulación dinámica de las funciones en algunas proteínas mediante la GlcNAcilación/fosforilación. Tomado y modificado de Wilton Gomez, 2019 [217]**



Dinámica entre *O*-GlcNAcilación y fosforilación como una relación recíproca reguladora que activa o inhibe la función de la proteína. En la regulación antagonista, *O*-GlcNAc y la fosforilación pueden competir por el mismo sitio Ser/Thr o unirse a diferentes sitios de residuos proximales de Ser/Thr, en la regulación cooperativa, *O*-GlcNAc y la fosforilación actúan sinérgicamente. En los tres casos, la relación recíproca entre *O*-GlcNAc y la fosforilación puede promover la activación, inhibición o estabilidad de la proteína.

**Anexo 4. Clasificación de algunos proteoglicanos, Tomado y modificado de *Essentials of Glycobiology* , 2017 [36]**

	Proteoglicano	Núcleo proteico (kDa)	Número y tipo GAGs	Distribución tisular	Funciones propuestas
Proteoglicanos secretados	Aggrecano	208–220	~100 CS, ~20 KS	cartílago, cerebro	Con hialuronato forma ECM hidratada para resistir las fuerzas de compresión
	Versicano PG-M	50–450	0–15 CS/DS	ECM peri celular e intersticial; vasos sanguíneos; cerebro, leucocitos	Múltiples interacciones ECM, regulación de la inflamación, adhesión celular y migración
	Neurocano	145	1–2 CS/DS	Cerebro	Regula el crecimiento de neuritas
	Brevicano	96	0–4 CS/DS	cerebro-redes peri neuronales	Regula la plasticidad sináptica
Proteoglicanos secretados (ricos en leucina)	Decorina	36	1 CS/DS	Células del tejido conectivo	regulates interstitial collagen fibrillogenesis, inhibition of TGF- $\beta$ signaling
	Biglicano	38	0–2 CS/DS	Células del tejido conectivo, macrófagos	Ensamblaje de la matriz de colágeno, formas solubles activan el sistema inmune innato
	Lumicano	37	3–4 KS	Ampliamente distribuido	Ensamblaje de la matriz de colágeno
	Keratocano	37	3–4 KS	Ampliamente distribuido pero sulfatado sólo en la córnea	Ensamblaje de la matriz de colágeno, roles en la transparencia corneal
	Fibromodulinano	59	2–4 KS	Ampliamente distribuido	Ensamblaje de la matriz de colágeno
	Mimecano	25	2–3 KS	Ampliamente distribuido pero sulfatado sólo en la córnea	Ensamblaje de la matriz de colágeno, roles en la formación ósea, transparencia corneal
Otros secretados	Perlecano	400	1–3 HS, 0–2 CS	Membranas basales, nicho de células madre, otra ECM, cartílago	ECM assembly, regulated cell migration through integrin interactions, sequestration of growth factors (e.g., FGFs)
	Agrina	200	1–3 HS	Membranas basales, cerebro y uniones neuromusculares	Maduración de la unión neuromuscular, ligando para integrina y $\alpha$ -dístroglicano
Proteoglicanos de membrana	Colageno Tipo IX	68	1 CS/DS	Cartílago, humor vítreo	Estabilización de las fibrillas de colágeno DEL CARTÍLAGO II/XI
	Colágeno tipo XVIII	147	2–3 HS	Membranas basales, la isoforma más larga más extendida	estabilidad de la membrana basal; El dominio carboxi-terminal monomérico (endostatina) es anti angiogénico
	Sindecanos 1–4	31–45	1–3 HS, 0–2 CS	La mayoría de las células nucleadas	Regulador de la adhesión celular, migración y organización citoesquelética
	Betaglicanos	110	0–1 HS, 0–1 CS	Fibroblastos	Correceptor que regula la unión al ligando (por ejemplo, inhibinas) y la señalización a través de los receptores TGF- $\beta$
	Glipicanos 1–6	60	1–3 HS	Células epiteliales y mesenquimales, cerebro	Correceptores que regulan la señalización a través de receptores asociados (por ejemplo, tirosina quinasa)
	Thrombomodulin	58	1 CS/DS	Células endoteliales, pero también una variedad de células no vasculares	Anticoagulante a través de la activación de la proteína C

**Anexo 5. Fenotipos distintivos de subpoblaciones celulares de linfocitos. Tomado y modificado de *Kuby Immunology, 7th Ed, pag. 39* [218]**

Molécula	Función	Linfocito B	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	Célula Nk
CD2	Molécula de adhesión; transducción de señales.	-	+	+	+
CD3	Transducción de señalización acoplado a TCR	-	+	+	-
CD4	Molécula de adhesión que se une a moléculas MHC II, transducción de señal	-	+	-	-
CD5	Desconocido	+	+	+	+
CD8	Molécula de adhesión que se une moléculas MHC I, transducción de señal	-	-	+	-
CD16(FcγRIII)	Receptor de baja afinidad para la región Fc de IgG	-	-	-	+
CD19	Transducción de señales, correceptor de CD21	+	-	-	-
CD21 (CR2)	Receptor de complemento (C3d)	+	-	-	-
CD28	Coseñalización en la activación de la célula T	-	+	+	-
CD32(FcγRII)	Receptor para la región FC de IgG	+	-	-	-
CD35(CR1)	Receptor para complemento (C3b)	+	-	-	-
CD40	Transducción de señal	+	-	-	-
CD45	Transducción de señal	+	+	+	+
CD56	Molécula de adhesión	-	-	-	+

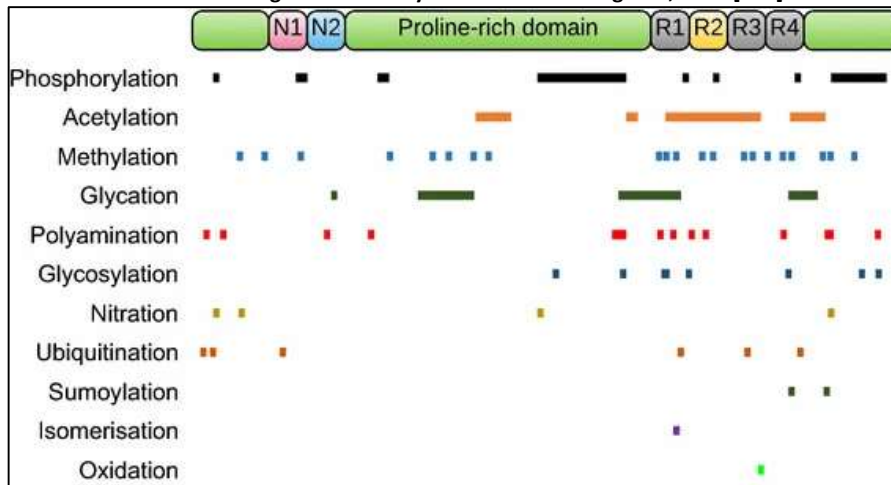
Fenotipo característico de las subpoblaciones celulares, a través de estos marcadores es posible analizar subpoblaciones celulares usando técnicas como citometría de flujo.

**Anexo 6. Factores de riesgo genéticos para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Tomado y modificado de Céline Bellenguez, 2022 [116]**

<b>Cromosoma</b>	<b>Gen</b>	<b>valor p</b>
1	<i>CR1</i>	$7,2 \times 10^{-46}$
2	<i>BIN1</i>	$6,1 \times 10^{-118}$
2	<i>INPP5D</i>	$3,6 \times 10^{-18}$
4	<i>CLNK</i>	$2,2 \times 10^{-17}$
6	<i>HLA-DQA1</i>	$7,1 \times 10^{-20}$
6	<i>UNC5CL</i>	$1,1 \times 10^{-9}$
6	<i>TREM2</i>	$2,8 \times 10^{-25}$
6	<i>TREM2</i>	$2,5 \times 10^{-37}$
6	<i>TREML2</i>	$2,1 \times 10^{-8}$
6	<i>CD2AP</i>	$7,9 \times 10^{-22}$
7	<i>EPDR1</i>	$4,6 \times 10^{-10}$
7	<i>SPDYE3</i>	$1,1 \times 10^{-26}$
7	<i>EPHA1</i>	$3,3 \times 10^{-14}$
8	<i>PTK2B</i>	$4,0 \times 10^{-22}$
8	<i>CLU</i>	$1,7 \times 10^{-44}$
10	<i>USP6NL</i>	$9,7 \times 10^{-19}$
11	<i>SPI1</i>	$5,3 \times 10^{-14}$
11	<i>MS4A4A</i>	$3,7 \times 10^{-42}$
11	<i>DEE</i>	$3,0 \times 10^{-48}$
11	<i>SORL1</i>	$2,8 \times 10^{-11}$
11	<i>SORL1</i>	$1,4 \times 10^{-21}$
14	<i>FERMT2</i>	$8,3 \times 10^{-16}$
14	<i>SLC24A4</i>	$4,8 \times 10^{-8}$
14	<i>SLC24A4</i>	$4,2 \times 10^{-21}$
15	<i>SPPL2A</i>	$1,3 \times 10^{-8}$
15	<i>MINDY2</i>	$2,1 \times 10^{-15}$
15	<i>APH1B</i>	$2,2 \times 10^{-25}$
16	<i>BCKDK</i>	$2,0 \times 10^{-11}$
16	<i>IL34</i>	$6,0 \times 10^{-10}$
16	<i>PLCG2</i>	$1,2 \times 10^{-13}$
16	<i>PLCG2</i>	$8,5 \times 10^{-12}$
17	<i>SCIMP</i>	$4,1 \times 10^{-13}$
17	<i>WNT3</i>	$9,3 \times 10^{-13}$
17	<i>ABI3</i>	$2,8 \times 10^{-14}$
17	<i>TSPOAP1</i>	$1,6 \times 10^{-12}$
17	<i>AS</i>	$8,8 \times 10^{-20}$
19	<i>ABCA7</i>	$1,6 \times 10^{-37}$
20	<i>CASS4</i>	$4,1 \times 10^{-21}$
21	<i>ADAMTS1</i>	$1,7 \times 10^{-10}$

En la tabla se indican algunos de los factores de riesgo genéticos en la enfermedad de Alzheimer descritos en la literatura, el valor P indica la correlación con el desarrollo de la enfermedad.

Anexo 7. MPTs de tau en condiciones fisiológicas. Tomado y modificado de Tong Guo, 2017 [219]



La proteína tau ha sido descrita como una proteína que tiene múltiples sitios de fosforilación, sin embargo, se han reportado otras modificaciones postraduccionales en su estructura.

## 9. BIBLIOGRAFÍA



1. Uversky VN. Posttranslational Modification. In: Maloy S, Hughes K, editors. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2013. p. 425-30.
2. Wang Y-C, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Research*; 2014. 24(2):143-60.
3. Flynn RA, Pedram K, Malaker SA, Batista PJ, Smith BAH, Johnson AG, George BM, Majzoub K, Villalta PW, Carette JE, Bertozzi CR. Small RNAs are modified with *N*-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*. 2021 Jun 10;184(12):3109-3124.e22.
4. Kitano M, Kizuka Y, Sobajima T, Nakano M, Nakajima K, Misaki R, et al. Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296: 100354.
5. Laine RA. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*.1994;4(6):759-67.
6. Turnbull JE, Field RA. Emerging glycomics technologies. *Nature Chemical Biology*. 2007;3(2):74-77.
7. Lisacek F, Mariethoz J, Alocci D, Rudd PM, Abrahams JL, Campbell MP, et al. Databases and Associated Tools for Glycomics and Glycoproteomics. In: Lauc G, Wuhrer M, editors. High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 235-64.
8. Murrell MP, Yarema KJ, Levchenko A. The systems biology of glycosylation. *Chembiochem*.2004 Oct 4;5(10):1334-47.
9. Narimatsu Y, Büll C, Chen Y-H, Wandall HH, Yang Z, Clausen H. Genetic glycoengineering in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296:100448.
10. Bernard H, terrapon n, M. C, lombardo V, elodie d, Marie LG, et al. Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) 2022.
11. Varki A. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Jun 1;3(6):a005462.
12. Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW. Regulation of glycan structures in animal tissues - Transcript profiling of glycan-related genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(25):17298-313.
13. Cummings RD. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular Biosystems*. 2009;5(10):1087-104.
14. Werz DB, Ranzinger R, Herget S, Adibekian A, von der Lieth C-W, Seeberger PH. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates ("Glycospace") by Statistical Databank Analysis. *ACS Chemical Biology*. 2007;2(10):685-91.
15. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Jun;319(2):97-105.
16. Lund PJ, Elias JE, Davis MM. Global Analysis of *O*-GlcNAc Glycoproteins in Activated Human T Cells. *Journal of Immunology*. 2016;197(8):3086-98.
17. Irvine KD, Haines N, Lei L, Okajima T, Xu AG. Regulation of notch signaling by glycosylation. *Glycobiology*. 2005;15(11):1190-91.
18. Seyrek K, Richter M, Lavrik IN. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. *Cell Death & Differentiation*. 2019 Jan;26(6):981-93.
19. Tischer A, Machha VR, Moon-Tasson L, Benson LM, Auton M. Glycosylation sterically inhibits platelet adhesion to von Willebrand factor without altering intrinsic conformational dynamics. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Jan;18(1):79-90.
20. Reis CA, Tauber R, Blanchard V. Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*. 2021 Aug;99(8):1023-31.

21. Sim G, Jeong M, Seo H, Kim J, Lee S. The Role of *N*-Glycosylation in the Intracellular Trafficking and Functionality of Neuronal Growth Regulator 1. *Cells*. 2022 Apr;11(7): 1242.
22. Steffen U, Koeleman CA, Sokolova MV, Bang H, Kleyer A, Rech J, et al. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nature Communications*. 2020 Jan;11(1): 120.
23. Shental-Bechor D, Levy Y. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Jun;105(24):8256-61.
24. Xu CC, Ng DTW. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015 Dec;16(12):742-52.
25. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012 Jul;13(7):448-62.
26. de Haan N, Falck D, Wuhrer M. Monitoring of immunoglobulin *N*- and *O*-glycosylation in health and disease. *Glycobiology*. 2020 Apr;30(4):226-40.
27. Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*. 1985;54:631-64.
28. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, et al. *N*-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 9.
29. Ivarsson M, Villiger TK, Morbidelli M, Soos M. Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody *N*-glycosylation. *Journal of Biotechnology*. 2014 Oct;188:88-96.
30. Larsen P, Ahmed M. 1.05 - Common Cellular Glycans: Biosynthesis, Modifications and Functions in Cancer and Inflammation. In: Barchi JJ, editor. *Comprehensive Glycoscience (Second Edition)*. Oxford: Elsevier; 2021. p. 142-62.
31. Brockhausen I Fau - Wandall HH, Wandall Hh Fau - Hagen KGT, Hagen Kgt Fau - Stanley P, Stanley P. *O*-GalNAc Glycans. *BTI - Essentials of Glycobiology*.
32. Hattrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*. 2008;70:431-57.
33. Ong QX, Han WP, Yang XY. *O*-GlcNAc as an Integrator of Signaling Pathways. *Frontiers in Endocrinology*. 2018 Oct; 9:599.
34. Butkinaree C, Park K, Hart GW. *O*-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2010 Jan;1800(2):96-106.
35. Issad T, Lefebvre T. Editorial: *O*-GlcNAcylation: Expanding the Frontiers. *Frontiers in Endocrinology*. 2019 Dec;10.
36. Merry CLR, Lindahl U, Couchman J, et al. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 17.
37. O'Leary T, Critcher M, Stephenson T, Huang ML. Chemical Editing of Proteoglycan Architecture. *Glycobiology*. 2020 Dec;30(12):1024-25.
38. Walimbe T, Panitch A. Proteoglycans in Biomedicine: Resurgence of an Underexploited Class of ECM Molecules. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 Jan;10.
39. Maiza A, Chantepie S, Vera C, Fifre A, Huynh MB, Stettler O, et al. The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *Febs Letters*. 2018 Dec;592(23):3806-18.
40. Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2008 May;13:4309-38.

41. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jul 1;3(7):a004952.
42. Pejler G, David G. Basement-membrane heparan-sulfate with high-affinity for antithrombin synthesized by normal and transformed mouse mammary epithelial-cells. *Biochemical Journal.* 1987 Nov;248(1):69-77.
43. Kojima T, Leone CW, Marchildon GA, Marcum JA, Rosenberg RD. Isolation and characterization of heparan-sulfate proteoglycans produced by cloned rat microvascular endothelial-cells. *Journal of Biological Chemistry.* 1992 Mar;267(7):4859-69.
44. Shworak NW, Liu JA, Petros LM, Zhang LJ, Kobayashi M, Copeland NG, et al. Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase - Isolation, characterization, and expression of human cDNAs and identification of distinct genomic loci. *Journal of Biological Chemistry.* 1999 Feb;274(8):5170-84.
45. de Agostini AI, Dong JC, Arrighi CD, Ramus MA, Dentand-Quadri I, Thalmann S, et al. Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-O-sulfated chains with anticoagulant activity. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Oct;283(42):28115-24.
46. Sepulveda-Diaz JE, Alavi Naini SM, Huynh MB, Ouidja MO, Yanicostas C, Chantepie S, Villares J, Lamari F, Jospin E, van Kuppevelt TH, Mensah-Nyagan AG, Raisman-Vozari R, Soussi- Yanicostas N, Papy-Garcia D. HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology. *Brain.* 2015 May;138(Pt 5):1339-54.
47. Bruinsma IB, te Riet L, Gevers T, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, David G, et al. Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid- $\beta$  plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica.* 2010 Jan;119(2):211-20.
48. Zhang XL, Qu HR. The Role of Glycosylation in Infectious Diseases. *Role of Glycosylation in Health and Disease.* 2021;1325:219-37.
49. Huang HC, Lai YJ, Liao CC, Yang WF, Huang KB, Lee IJ, et al. Targeting conserved N-glycosylation blocks SARS-CoV-2 variant infection in vitro. *Ebiomedicine.* 2021 Dec;74.
50. Petrovic T, Lauc G, Trbojevic-Akmacic I. The Importance of Glycosylation in COVID-19 Infection. *Role of Glycosylation in Health and Disease.* 2021;1325:239-64.
51. Basset C, Devauchelle V, Durand V, Jamin C, Pennec YL, Youinou P, et al. Glycosylation of immunoglobulin A influences its receptor binding. *Scandinavian Journal of Immunology.* 1999 Dec;50(6):572-79.
52. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology.* 2007;25:21-50.
53. Raffler NA, Rivera-Nieves J, Ley K. L-selectin in inflammation, infection and immunity. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies.* 2005 2005/09/01;2(3):213-20.
54. Lefeber DJ, Freeze HH, Steet R, et al. Congenital Disorders of Glycosylation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 45.
55. Wang B. Sialic Acid Is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Annual Review of Nutrition.* 2009;29:177-222.
56. Kristic J, Vuckovic F, Menni C, Klaric L, Keser T, Beceheli I, et al. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences.* 2014 Jul;69(7):779-89.
57. Lee J, Ha S, Kim M, Kim SW, Yun J, Ozcan S, et al. Spatial and temporal diversity of glycome expression in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2020 Nov;117(46):28743-53.
58. Siddiqui TJ, Craig AM. Synaptic organizing complexes. *Curr Opin Neurobiol.* 2011 Feb;21(1):132-43.

59. Leshchyns'ka I, Sytnyk V. Synaptic Cell Adhesion Molecules in Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity*. 2016;2016.
60. Robertson LA, Moya KL, Breen KC. The potential role of tau protein *O*-glycosylation in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*. 2004 Oct;6(5):489-95.
61. Silveyra MX, Cuadrado-Corrales N, Marcos A, Barquero MS, Rabano A, Calero M, et al. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Neurochemistry*. 2006 Jan;96(1):97-104.
62. Hwang H, Zhang JP, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER, et al. Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. *Mass Spectrometry Reviews*. 2010 Jan-Feb;29(1):79-125.
63. Boehm T, Swann JB. Origin and Evolution of Adaptive Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2014;2(1):259-83.
64. Miller JF. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev*. 2002 Jul;185:7-14.
65. Kuball J, Hauptrock B, Malina V, Antunes E, Voss R-H, Wolfl M, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirectioned T cells by removing defined *N*-glycosylation sites in the TCR constant domain. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(2):463-75.
66. Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells (Reprinted from *Nature*, vol 395, pg 82-86, 1998). *Journal of Immunology*. 2015 May;194(9):4061-65.
67. Goral S. The Three-Signal Hypothesis of Lymphocyte Activation/Targets for Immunosuppression. *Dialysis & Transplantation*. 2011 Jan;40(1):14-16.
68. Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Sep;99(18):11790-95.
69. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunological Reviews*. 2003 Jan;192(1):161-80.
70. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013 2013/04/01;13(4):227-42.
71. Beziat V, Rapaport F, Hu JF, Titeux M, des Claustres MB, Bourgey M, et al. Humans with inherited T cell CD28 deficiency are susceptible to skin papillomaviruses but are otherwise healthy. *Cell*. 2021 Jul;184(14):3812-+.
72. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.
73. Prlic M, Williams MA, Bevan MJ. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Current Opinion in Immunology*. 2007 Jun;19(3):315-19.
74. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*. 2007 Jan 26;315(5811):528-31.
75. Beuneu H, Lemaitre F, Deguine J, Moreau HD, Bouvier I, Garcia Z, et al. Visualizing the functional diversification of CD8+ T cell responses in lymph nodes. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):412-23.
76. Gomez-Henao W, Tenorio EP, Sanchez FRC, Mendoza MC, Ledezma RL, Zenteno E. Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell. *International Reviews of Immunology*. 2021, 40:4, 274-288.
77. Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*. 1998 1998/04/01;98(2):637-74.
78. Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 Mar;56(4):425-35.

79. Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, del Carmen Jimenez M, Fernández G, Agundis C, Degand P, Zenteno E. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for *O*-glycopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 1;1674(3):282-90.
80. Zenteno E, Ochoa JL. Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry*. 1988 Jan;27(2):313-17.
81. Rabinovich GA, Toscanol MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007 Oct;17(5):513-20.
82. Madariaga D, Martinez-Saez N, Somovilla VJ, Coelho H, Valero-Gonzalez J, Castro-Lopez J, et al. Detection of Tumor-Associated Glycopeptides by Lectins: The Peptide Context Modulates Carbohydrate Recognition. *Acs Chemical Biology*. 2015 Mar;10(3):747-56.
83. Cabral J, Hanley SA, Gerlach JQ, O'Leary N, Cunningham S, Ritter T, et al. Distinctive surface glycosylation Patterns associated With Mouse and human CD4<sup>+</sup>regulatory T cells and Their suppressive Function. *Frontiers in Immunology*. 2017 Aug;8.
84. Holladay S, Blaylock B, Smith B, Luster M. PNA Lectin-Based Separation of Thymocytes into Mature and Immature Subpopulations: CD4<sup>-</sup> Double Negative Cells Display Characteristics of PNA<sup>lo</sup> Mature Thymocytes. *Immunological Investigations*. 1993, Jan;22(8):517-29.
85. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU International*. 2012;109(2):259-65.
86. Campbell PA, Hartman AL, Abel CA. Stimulation of b-cells, but not t-cells or thymocytes, by a sialic acid-specific lectin. *Immunology*. 1982;45(1):155-62.
87. Ashraf MT. Mitogenic Lectins. 2003;9:265-69.
88. Chilson OP, Kelly-Chilson AE. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1989 Feb;19(2):389-96.
89. Alvarez G, Lascurain R, Hernandez-Cruz P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, et al. Differential *O*-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2006 Aug;1760(8):1235-40.
90. Ortiz B, Porras F, Jimenez-Martinez MC, Montano LF, Martinez-Cairo S, Lascurain R, et al. Differential expression of a 70 kDa *O*-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cellular Immunology*. 2002 Jul-Aug;218(1-2):34-45.
91. Urrea F, Zenteno E, Avila-Moreno F, Sanchez-Garcia FJ, Zuñiga J, Lascurain R, Ortiz-Quintero B. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) enhances anti-CD3-dependent activation of murine T cells and promotes cell survival. *Immunol Invest*. 2011;40(2):113-29.
92. Arenas-Del Ángel M, Legorreta-Herrera M, Mendoza-Hernández G, Garfias Y, Chávez R, Zenteno E, et al. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes a moesin-like *O*-glycoprotein and costimulates murine CD3-activated CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity, inflammation and disease*. 2015;3(3):182-95.
93. Shcherbina A, Bretscher A, Kenney DM, Remold-O'Donnell E. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett*. 1999 Jan 22;443(1):31-6.
94. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*. 2000 Apr 28;101(3):259-70.
95. Hirata T, Nomachi A, Tohya K, Miyasaka M, Tsukita S, Watanabe T, et al. Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. *International Immunology*. 2012 Nov;24(11):705-17.
96. Satooka H, Nagakubo D, Sato T, Hirata T. The ERM Protein Moesin Regulates CD8<sup>+</sup> Regulatory T Cell Homeostasis and Self-Tolerance. *Journal of Immunology*. 2017 Nov;199(10):3418-26.
97. Shaffer MH, Dupree RS, Zhu PM, Saotome I, Schmidt RF, McClatchey AI, et al. Ezrin and Moesin Function Together to Promote T Cell Activation. *Journal of Immunology*. 2009 Jan;182(2):1021-32.

98. Gennery AR. Combined T and B Lymphocyte Deficiencies. In: Rezaei N, editor. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Oxford: Elsevier; 2022. p. 445-64.
99. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019 Oct;179(2):312-39
100. Organization WH. The top 10 causes of death. 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. 31/01/2022.
101. Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2012 Nov;11(11):1006-12. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70191-6.
102. Isik AT. Late onset Alzheimer's disease in older people. *Clin Interv Aging*. 2010 Oct 11;5:307-11.
103. Levitis E, Vogel JW, Funck T, Hachinski V, Gauthier S, Voglein J, et al. Differentiating amyloid beta spread in autosomal dominant and sporadic Alzheimer's disease. *Brain Communications*. 2022 May;4(3).
104. Henderson AS. The risk factors for Alzheimer's disease: a review and a hypothesis. *Acta Psychiatr Scand*. 1988 Sep;78(3):257-75.
105. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 Dec-Jan;366(9503):2112-17.
106. Doruk H, Naharci MI, Bozoglu E, Isik AT, Kilic S. The relationship between body mass index and incidental mild cognitive impairment, alzheimer's disease and vascular dementia in elderly. *Journal of Nutrition Health & Aging*. 2010 Dec;14(10):834-38.
107. Grimm MOW, Mett J, Hartmann T. The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Nov;17(11).
108. Wlodarek D. Food for thought: the emerging role of a ketogenic diet in Alzheimer's disease management. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2021 Jul;21(7):727-30.
109. Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, Hata J, Fujimi K, Matsui Y, et al. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease The Hisayama Study. *Neurology*. 2010 Aug;75(9):764-70.
110. Tolppanen AM, Ngandu T, Kareholt I, Laatikainen T, Rusanen M, Soininen H, et al. Midlife and Late-Life Body Mass Index and Late-Life Dementia: Results from a Prospective Population-Based Cohort. *Journal of Alzheimers Disease*. 2014;38(1):201-09.
111. Mazon JN, de Mello AH, Ferreira GK, Rezin GT. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sciences*. 2017 Aug;182:22-28.
112. Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Feb 15;301(1):41-52.
113. Gessel MM, Bernstein S, Kemper M, Teplow DB, Bowers MT. Familial Alzheimer's Disease Mutations Differentially Alter Amyloid  $\beta$ -Protein Oligomerization. *ACS Chemical Neuroscience*. 2012 2012/11/21;3(11):909-18.
114. Barthet G, Dunys J, Shao ZP, Xuan Z, Ren YM, Xu JD, et al. Presenilin mediates neuroprotective functions of ephrinB and brain-derived neurotrophic factor and regulates ligand-induced internalization and metabolism of EphB2 and TrkB receptors. *Neurobiology of Aging*. 2013 Feb;34(2):499-510.
115. Alzgene. alzgene - field synopsis of genetic association studies in ad. 2022. <http://www.alzgene.org/>
116. Bellenguez C, Kucukali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics*. 2022 Apr;54(4):412-+.
117. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010 Jan-Feb;77(1):32-42.
118. Snow AD, Lara S, Noehlin D, Wight TN. Cationic dyes reveal proteoglycans structurally integrated within the characteristic lesions of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1989;78(2):113-23.

119. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein (Reprinted from *Biochemical and biophysical research communications*, vol 120, pg 885-890, 1984). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 Aug;425(3):534-39.
120. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 May;2(5):a006270.
121. Xia W.  $\gamma$ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond. *Neuroscience Letters*. 2019 May;701:162-69.
122. Glabe CC. Amyloid Accumulation and Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Significance of Monomeric, Oligomeric and Fibrillar A $\beta$ . In: Harris JR, Fahrenholz F, editors. *Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Aspects of Amyloid  $\beta$* . Boston, MA: Springer US; 2005. p. 167-77.
123. Sun X, Chen W-D, Wang Y-D.  $\beta$ -Amyloid: The Key Peptide in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2015 2015-Sep-30;6.
124. Gremer L, Schölzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, et al. Fibril structure of amyloid- $\beta$ (1-42) by cryo-electron microscopy. *Science*. 2017 Oct;358(6359):116-19.
125. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*. 1992 1992/04/10;256(5054):184-85.
126. Atlas THP. MAPT. 2022. <https://www.proteinatlas.org/>
127. Himmeler A. Structure of the bovine tau-gene - alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Molecular and Cellular Biology*. 1989 Apr;9(4):1389-96.
128. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo WJ. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2019 Jul;705:183-94.
129. Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Jan 17;777:96-106.
130. Ikegami S, Harada A, Hirokawa N. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neuroscience Letters*. 2000 Feb;279(3):129-32.
131. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science*. 2008 2008/02/22;319(5866):1086-89.
132. Marcelli S, Corbo M, Iannuzzi F, Negri L, Blandini F, Nistico R, Feligioni M. The Involvement of Post-Translational Modifications in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2018 Feb 22;15(4):313-335.
133. Ryan P, Xu MM, Davey AK, Danon JJ, Mellick GD, Kassiou M, et al. O-GlcNAc Modification Protects against Protein Misfolding and Aggregation in Neurodegenerative Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2019 May;10(5):2209-21.
134. Xia YX, Prokop S, Giasson BI. "Don't Phos Over Tau": recent developments in clinical biomarkers and therapies targeting tau phosphorylation in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Molecular Neurodegeneration*. 2021 Jun;16(1).
135. Snow AD, Mar H, Nochlin D, Sekiguchi RT, Kimata K, Koike Y, Wight TN. Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am J Pathol*. 1990 Nov;137(5):1253-70.
136. Guptabansal R, Frederickson RCA, Brunden KR. Proteoglycan-mediated inhibition of  $\alpha$ -beta proteolysis - a potential cause of senile plaque accumulation. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Aug;270(31):18666-71.
137. Castillo GM, Ngo C, Cummings J, Wight TN, Snow AD. Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A $\beta$ ) of Alzheimer's disease, accelerates A $\beta$  fibril formation, and maintains A $\beta$  fibril stability. *Journal of Neurochemistry*. 1997 Dec;69(6):2452-65.

138. Motamedi-Shad N, Monsellier E, Torrassa S, Relini A, Chiti F. Kinetic Analysis of Amyloid Formation in the Presence of Heparan Sulfate Faster unfolding and change of pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Oct;284(43):29921-34.
139. Iannuzzi C, Irace G, Sirangelo I. The Effect of Glycosaminoglycans (GAGs) on Amyloid Aggregation and Toxicity. *Molecules*. 2015 Feb;20(2):2510-28.
140. O'Callaghan P, Sandwall E, Li J-P, Yu H, Ravid R, Guan Z-Z, et al. Heparan Sulfate Accumulation with A $\beta$  Deposits in Alzheimer's Disease and Tg2576 Mice is Contributed by Glial Cells. *Brain Pathology*. 2008 Oct;18(4):548-61.
141. Jendresen CB, Cui H, Zhang X, Vlodaysky I, Nilsson LNG, Li JP. Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid- $\beta$  precursor protein transgenic mice. *J Biol Chem*. 2015 Feb 20;290(8):5053-5064.
142. Nguyen K, Rabenstein DL. Interaction of the Heparin-Binding Consensus Sequence of  $\beta$ - Amyloid Peptides with Heparin and Heparin-Derived Oligosaccharides. *J Phys Chem B*. 2016 Mar 10;120(9):2187-97.
143. Ancsin JB. Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. *Amyloid*. 2003 Jan;10(2):67-79.
144. Konno T, Oiki S, Hasegawa K, Naiki H. Anionic contribution for fibrous maturation of protofibrillar assemblies of the human tau repeat domain in a fluoroalcohol solution. *Biochemistry*. 2004 Oct 26;43(42):13613-20.
145. Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*. 1996 Oct;383(6600):550-53.
146. Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2009 Mar;15(3):112-19.
147. Mukrasch MD, Biernat J, von Bergen M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. Sites of tau important for aggregation populate beta-structure and bind to microtubules and polyanions. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jul;280(26):24978-86.
148. Sibille N, Sillen A, Leroy A, Wieruszkeski JM, Mulloy B, Landrieu I, et al. Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 2006 Oct;45(41):12560-72.
149. Snow AD, Wight TN, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, Dearmond SJ, et al. Immunolocalization of heparan-sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of gerstmann-straussler syndrome, creutzfeldt-jakob disease and scrapie. *Laboratory Investigation*. 1990 Nov;63(5):601-11.
150. Paudel HK, Li W. Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Mar;274(12):8029-38.
151. Zhao J, Huvent I, Lippens G, Eliezer D, Zhang AQ, Li QH, et al. Glycan Determinants of Heparin-Tau Interaction. *Biophysical Journal*. 2017 Mar;112(5):921-32.
152. Zhao J, Zhu YN, Song XH, Xiao YY, Su GW, Liu XY, et al. 3-O-Sulfation of Heparan Sulfate Enhances Tau Interaction and Cellular Uptake. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2020 Jan;59(5):1818-27.
153. Marcum JA, Conway EM, Youssoufian H, Rosenberg RD. Anticoagulant active heparin-like molecules from cultured fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 1986 Sep;166(1):253-58.
154. Thacker BE, Seamen E, Lawrence R, Parker MW, Xu YM, Liu J, et al. Expanding the 3-O-Sulfate Proteome-Enhanced Binding of Neuropilin-1 to 3-O-Sulfated Heparan Sulfate Modulates Its Activity. *Acs Chemical Biology*. 2016 Apr;11(4):971-80.
155. Ishihara M, Fedarko NS, Conrad HE. Transport of heparan-sulfate into the nuclei of hepatocytes. *Federation Proceedings*. 1986 May;45(6):1845-45.



156. Mandarini E, Tollapi E, Zanchi M, Depau L, Pini A, Brunetti J, et al. Endocytosis and Trafficking of Heparan Sulfate Proteoglycans in Triple-Negative Breast Cancer Cells Unraveled with a Polycationic Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Nov;21(21).
157. Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Garcia-Leon JA, Nunez-Diaz C, Davila JC, et al. Animal and Cellular Models of Alzheimer's Disease: Progress, Promise, and Future Approaches. *Neuroscientist*.
158. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb Journal*. 2002 Apr;16(6):869-+.
159. Edner NM, Wang CJ, Petersone L, Walker LSK. Predicting clinical response to costimulation blockade in autoimmunity. *Immunotherapy Advances*. 2020;1(1): 1-6.
160. A. G-Hw. Análisis de la expresión de la *O*-glicosilación reconocida por la lectina de *Amaranthus Leucocarpus* (ALL) en linfocitos T murinos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Postgrado en Ciencias Bioquímicas. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018. p. 74.
161. Jacob F, Guertler R, Naim S, Nixdorf S, Fedier A, Hacker NF, Heinzelmann-Schwarz V. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS One*. 2013;8(3):e59180.
162. Tenorio EP, Fernandez J, Castellanos C, Olguin JE, Saavedra R. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *European Journal of Immunology*. 2011 Dec;41(12):3529-41.
163. Duk M, Ugorski M, Lisowska E.  $\beta$ -Elimination of *O*-Glycans from Glycoproteins Transferred to Immobilon P Membranes: Method and Some Applications. *Analytical Biochemistry*. 1997 Nov;253(1):98-102.
164. Biard DSF, Jarray R, Rebergue N, Leteurtre F, Papy-Garcia D. APP deficiency and HTRA2 modulates PrPc proteostasis in human cancer cells. *BBA Advances*. 2022 Jan;2:100035.
165. Haslam SM, Julien S, Burchell JM, Monk CR, Ceroni A, Garden OA, et al. Characterizing the glycome of the mammalian immune system. *Immunology & Cell Biology*. 2008;86(7):564-73.
166. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2019 Jan;15(6):346-66.
167. Guy CS, Vignali KM, Temirov J, Bettini ML, Overacre AE, Smeltzer M, Zhang H, Huppa JB, Tsai YH, Lobry C, Xie J, Dempsey PJ, Crawford HC, Aifantis I, Davis MM, Vignali DA. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol*. 2013 Mar;14(3):262-70.
168. Quah BJ, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. LID - 2259 [pii] LID - 10.3791/2259 [doi]. (1940-087X (Electronic)).
169. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:411-433.
170. Fernández-Vega I, Lorente-Gea L, Martín C, Quirós LM. Heparan sulfate proteoglycans as possible diagnostic molecular tools with therapeutic potential in Alzheimer's disease. (1673-5374 (Print)).
171. Yuan J XWW, Jiang S, Yu H, Poon H. F. The Scattered Twelve Tribes of HEK293. *Biomed Pharmacol J*. 2018;11(2).
172. Ajit V, D. CR, Esko JD, Pamela S, W. HG, Aebi M, et al. Essentials of Glycobiology [Internet]. 2022 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/>
173. Sengupta U, Portelius E, Hansson O, Farmer K, Castillo-Carranza D, Woltjer R, et al. Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. (2328-9503 (Print)).
174. Takashima A. Mechanism of neurodegeneration through tau and therapy for Alzheimer's disease. *J Sport Health Sci*. 2016 Dec;5(4):391-392.
175. Payne CK, Jones SA, Chen C, Zhuang X. Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands. *Traffic*. 2007 Apr;8(4):389-401.

176. Sandvig K, Pust S, Skotland T, van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011 Aug;23(4):413-20.
177. Kim MG, Kim CL, Kim YS, Jang JW, Lee GM. Selective endocytosis of recombinant human BMPs through cell surface heparan sulfate proteoglycans in CHO cells: BMP-2 and BMP-7. *Scientific Reports*. 2021 Feb;11(1):3378.
178. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell*. 2006 Jun;10(6):839-50.
179. Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Small Gtpases in Disease, Part A*. 2008;438:77-93.
180. Xu Y, Henning RH, van der Want J, van Buiten A, van Gilst W, Buikema H. Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO-as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life Sciences*. 2007 Apr;80(18):1678-85.
181. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *Bmc Cancer*. 2018 Jan;18.
182. Daniels MA, Hogquist KA, Jameson SC. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nature Immunology*. 2002 Oct;3(10):903-10.
183. Osborn JF, Mooster JL, Hobbs SJ, Munks MW, Barry C, Harty JT, Hill AB, Nolz JC. Enzymatic synthesis of core 2 O-glycans governs the tissue-trafficking potential of memory CD8+ T cells. *Sci Immunol*. 2017 Oct 13;2(16):eaan6049.
184. Pereira MS, Alves I, Vicente M, Campar A, Silva MC, Padrao NA, et al. Glycans as Key Checkpoints of T Cell Activity and Function. *Frontiers in Immunology*. 2018 Nov;9.
185. Chilson OP, Boylston AW, Crumpton MJ. Phaseolus vulgaris phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *The EMBO Journal*. 1984;3(13):3239-45.
186. Lavanya V, Bommanabonia AK, Ahmed N, Jamal S. Immunomodulatory Effects of Jacalin, a Dietary Plant Lectin on the Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022 Jan;194(1):587-99.
187. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 1992 Apr;356(6370):607-09.
188. Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *The Journal of Immunology*. 1996;157(2):636.
189. Pulugulla SH, Packard TA, Galloway NLK, Grimmett ZW, Doitsh G, Adamik J, et al. Distinct mechanisms regulate IL1B gene transcription in lymphoid CD4 T cells and monocytes. *Cytokine*. 2018 Nov;111:373-81.
190. Lawlor N, Nehar-Belaid D, Grassmann JDS, Stoeckius M, Smibert P, Stitzel ML, et al. Single Cell Analysis of Blood Mononuclear Cells Stimulated Through Either LPS or Anti-CD3 and Anti-CD28. *Frontiers in Immunology*. 2021 2021-March-17;12.
191. Maldonado G, Gorocica P, Agundis C, Pérez A, Molina J, Zenteno E. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj J*. 1998 Jun;15(6):615-22.
192. Wu G, Murugesan G, Nagala M, McCraw A, Haslam SM, Dell A, Crocker PR. Activation of regulatory T cells triggers specific changes in glycosylation associated with Siglec-1- dependent inflammatory responses. *Wellcome Open Res*. 2021 Jun 1;6:134.
193. Comelli EM, Sutton-Smith M, Yan Q, Amado M, Panico M, Gilmartin T, et al. Activation of Murine CD4+ and CD8+ T Lymphocytes Leads to Dramatic Remodeling of N-Linked Glycans. *The Journal of Immunology*. 2006;177(4):2431.
194. Hirabayashi J, Arai R. Lectin engineering: the possible and the actual. *Interface Focus*. 2019 Apr;9(2).

195. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002 Aug;3(8):586-99.
196. Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, del Carmen Jimenez M, Fernández G, et al. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for *O*-glycopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2004 Nov;1674(3):282-90.
197. Sagara J, Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S, Kawai A. Cellular actin-binding ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins are incorporated into the rabies virion and closely associated with viral envelope proteins in the cell. *Virology*. 1995 Jan 10;206(1):485-94 .
198. Ariel A, Hershkoviz R, Cahalon L, Williams DE, Akiyama SK, Yamada KM, et al. Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7. *European Journal of Immunology*. 1997 Oct;27(10):2562-70.
199. Kobori T, Tameishi M, Tanaka C, Urashima Y, Obata T. Subcellular distribution of ezrin/radixin/moesin and their roles in the cell surface localization and transport function of P-glycoprotein in human colon adenocarcinoma LS180 cells. *PLOS ONE*. 2021;16(5):e0250889.
200. Delon J, Kaibuchi K, Germain RN. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 2001 Nov;15(5):691-701.
201. Wei Z, Li Y, Ye F, Zhang M. Structural Basis for the Phosphorylation-regulated Interaction between the Cytoplasmic Tail of Cell Polarity Protein Crumbs and the Actin-binding Protein Moesin. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 May 1;290(18):11384-92.
202. Fu YT, Ning LL, Feng JJ, Yu XW, Guan F, Li X. Dynamic regulation of *O*-GlcNAcylation and phosphorylation on STAT3 under hypoxia-induced EMT. *Cellular Signalling*. 2022 May;93.
203. Cejas RB, Lorenz V, Garay YC, Irazoqui FJ. Biosynthesis of *O*-*N*-acetylgalactosamine glycans in the human cell nucleus (vol 294, pg 2997, 2019). *Journal of Biological Chemistry*. 2019 May;294(19):7967-67.
204. Lagresle-Peyrou C, Luce S, Ouchani F, Soheili TS, Sadek H, Chouteau M, et al. X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Dec;138(6):1681-+.
205. Ariel A, Hershkoviz R, Altbaum-Weiss I, Ganor S, Lider O. Cell Surface-Expressed Moesin-Like Receptor Regulates T Cell Interactions with Tissue Components and Binds an Adhesion-Modulating IL-2 Peptide Generated by Elastase. *The Journal of Immunology*. 2001;166(5):3052.
206. Lessard CB, Lussier MP, Cayouette S, Bourque G, Boulay G. The overexpression of presenilin2 and Alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences TRPC6-enhanced Ca<sup>2+</sup> entry into HEK293 cells. *Cellular Signalling*. 2005 Apr;17(4):437-45.
207. Santa-Maria I, Hernandez F, Del Rio J, Moreno FJ, Avila J. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Molecular Neurodegeneration*. 2007;2.
208. Kuberan B, Lech M, Borjigin J, Rosenberg RD. Light-induced 3-*O*-sulfotransferase expression alters pineal heparan sulfate fine structure. A surprising link to circadian rhythm. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5053-4.
209. Sikora AS, Delos M, Martinez P, Carpentier M, Allain F, Denys A. Regulation of the Expression of Heparan Sulfate 3-*O*-Sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by Inflammatory Stimuli in Human Monocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016 Jul;117(7):1529-42.
210. Maïza A, Chantepie S, Vera C, Fifre A, Huynh MB, Stettler O, et al. The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *FEBS Letters*. 2018;592(23):3806-18.

211. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 1992 Dec;51(4):801-13.
212. Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA. Increased Neuronal Endocytosis and Protease Delivery to Early Endosomes in Sporadic Alzheimer's Disease: Neuropathologic Evidence for a Mechanism of Increased  $\beta$ -Amyloidogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(16):6142.
213. He X, Cooley K, Chung CHY, Dashti N, Tang J. Apolipoprotein Receptor 2 and X11 $\alpha/\beta$  Mediate Apolipoprotein E-Induced Endocytosis of Amyloid- $\beta$  Precursor Protein and  $\beta$ -Secretase, Leading to Amyloid- $\beta$  Production. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(15):4052.
214. Ivanov AI. Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? In: Ivanov AI, editor. *Exocytosis and Endocytosis*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 15-33.
215. Falkenburger BH, Schulz JB. Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *Journal of Neural Transmission-Supplement*. 2006 (70):261-68.
216. National Library of Medicine NcfBi. Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG). 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>
217. Gómez-Henao W, Tenorio EP, Sanchez FRC, Mendoza MC, Ledezma RL, Zenteno E. Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell. *International Reviews of Immunology*. 2020:1-15.
218. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J. *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman; 2013.
219. Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*. 2017 May;133(5):665-704.