





<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
1. <i>Cáncer</i>	3
1.1 <i>Antígenos Asociados a Tumor</i>	4
2. <i>O-glicosilación y Cáncer</i>	7
3. <i>Inmunoterapia Anti-Tumoral</i>	10
4. <i>Antecedentes inmediatos de este trabajo</i>	15
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>17</b>
1. <i>Hipótesis</i>	17
2. <i>Objetivo General</i>	17
3. <i>Objetivos Específicos</i>	17
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>19</b>
1. <i>Ratones</i>	19
2. <i>Péptidos Sintéticos</i>	19
3. <i>Obtención de OSM, aOSM y dOSM</i>	19
4. <i>Enzimas ppGalNAcTs</i>	20
5. <i>Cuantificación de Proteínas</i>	20
6. <i>Ensayos de Glicosilación in vitro</i>	20
7. <i>ELISA para la detección del antígeno Tn o de péptidos</i>	21
8. <i>Digestión de Péptidos</i>	22
9. <i>Purificación de glicopéptidos</i>	22
10. <i>SDS-PAGE e Isoelectroenfoque</i>	23
11. <i>Lectin Blot y Dot Blot</i>	23
12. <i>Evaluación de la Respuesta Inmunológica Celular</i>	24

---

13. <i>Generación de BMDCs</i>	25
14. <i>Internalización de antígenos por BMDC</i>	25
15. <i>Análisis Estadístico</i>	26
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>27</b>
1. <i>Optimización de un ensayo de actividad ppGalNAcTs</i>	28
2. <i>Síntesis de Glicopéptidos</i>	31
2.1 <i>Utilizando los péptidos Fhmuc y Egmuc</i>	31
2.2 <i>Utilizando fragmentos de los péptidos Fhmuc y Egmuc</i>	35
2.3 <i>Caracterización de la glicosilación de Fhmuc y Egmuc2</i>	41
3. <i>Optimización de la síntesis de Tn-Fhmuc</i>	44
4. <i>Producción semi-preparativa de glicopéptidos y su purificación</i>	47
5. <i>Antigenicidad de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2</i>	50
6. <i>Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por Tn-Fhmuc</i>	52
7. <i>Internalización de Tn-Fhmuc por células dendríticas</i>	57
<b>Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>62</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>64</b>

---

El cáncer representa uno de los problemas de salud más importantes en el mundo, lo cual ha motivado la búsqueda de estrategias que permitan eliminar células tumorales sin dañar tejidos normales. En este contexto, durante las últimas décadas se ha puesto especial énfasis en la inmunoterapia contra el cáncer: la activación del sistema inmune del paciente contra estructuras propias de las células tumorales para mediar así su eliminación. Uno de los principales cambios que se producen en células tumorales es la *O*-glicosilación truncada, conduciendo a la expresión de antígenos asociados a tumor como el antígeno Tn ( $\alpha$ -GalNAc-O-Ser/Thr), una estructura asociada específicamente a cáncer. Por lo tanto, el desarrollo de vacunas hemi-sintéticas acoplado Tn a diversas mucinas empleadas como carriers constituye una estrategia de interés en inmunoterapia anti-tumoral.

En el presente trabajo llevamos a cabo la adición enzimática del antígeno Tn a péptidos sintéticos derivados de mucinas de origen parasitario, uno de *Fasciola hepatica* (Fhmuc) y dos de *Echinococcus granulosus* (Egmuc y Egmuc2). Todos ellos poseen un alto contenido de serinas y treoninas, los cuales constituyen sitios potenciales de *O*-glicosilación. Para la glicosilación, utilizamos tres ppGalNAc-transferasas recombinantes (ppGalNAcT2, T3 y T6), enzimas que catalizan la adición de GalNAc a proteínas.

Nuestros resultados muestran que de estos péptidos, sólo Fhmuc y Egmuc2 pueden ser glicosilados por las ppGalNAcT ensayadas, obteniéndose mayores niveles de glicosilación con la ppGalNAcT2. Para dicha enzima, y utilizando Fhmuc como sustrato, ensayamos diferentes condiciones en la glicosilación como relación enzima/sustrato, equivalentes de UDP-GalNAc, tiempo de reacción y combinación con la enzima ppGalNAcT3. Se seleccionaron las mejores condiciones para su utilización en glicosilaciones semi-preparativas de Fhmuc y Egmuc2, a partir de las cuales se purificaron los glicopéptidos por cromatografía de afinidad. Esta estrategia nos permitió obtener ambos glicopéptidos con un rendimiento del 79% para Tn-Fhmuc y 30% para Tn-Egmuc2, cuya pureza se determinó por SDS-PAGE. Estudios de reconocimiento de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2 por anticuerpos anti-Tn y anti-péptidos sugieren que la presencia del antígeno Tn en los glicopéptidos altera significativamente la accesibilidad a los epítopes peptídicos.

Dado que conseguimos un mayor rendimiento en la obtención de Tn-Fhmuc, se realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro*, para determinar algunas de sus propiedades

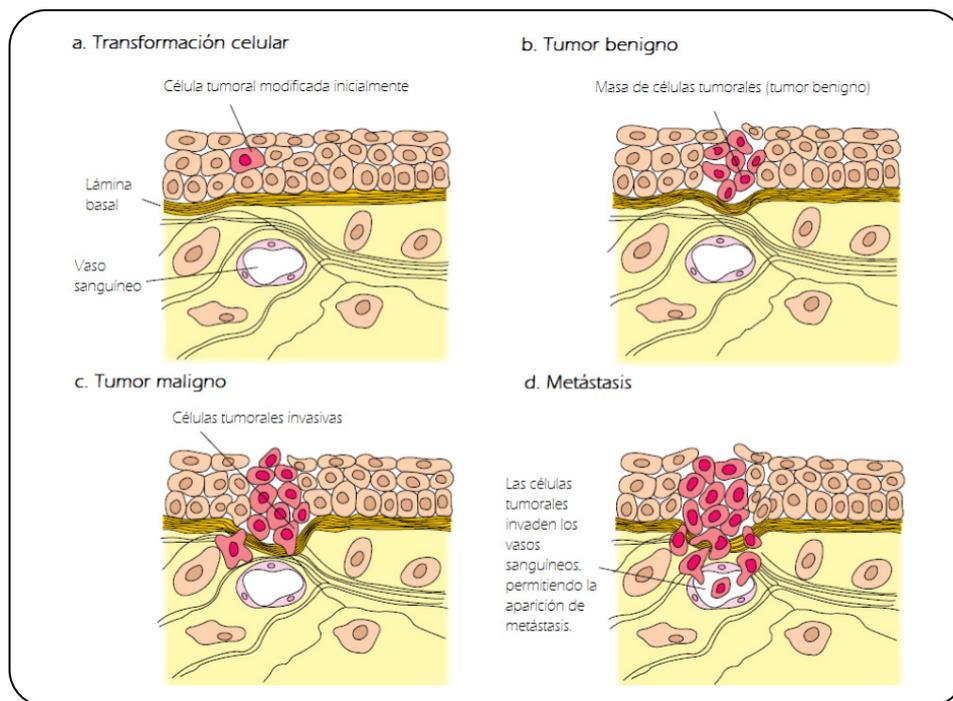
inmunológicas. En este sentido, se llevaron a cabo experimentos que sugieren que la adición del antígeno Tn al péptido potencia la respuesta inmune celular inducida por éste. Se obtuvo un aumento en la inmunogenicidad en ratones C57BL/6, encontrando que el tipo de respuesta celular que produce el glicopéptido promueve un perfil de respuesta Th1, caracterizado por una alta producción de INF $\gamma$  en ausencia de IL-5 e IL-17. Por otro lado, el glicopéptido presentando el antígeno Tn fue internalizado más eficientemente por células dendríticas que el péptido sin glicosilar.

Estos resultados ponen de manifiesto que la presencia del antígeno Tn modifica la antigenicidad de los péptidos, potencia la inmunogenicidad celular y promueve una mejor internalización por células dendríticas, lo que resulta muy prometedor para la utilización de glicopéptidos Tn en inmunoterapia anti-tumoral.

## 1. Cáncer

En la mayoría de los tejidos animales, existe un balance entre proliferación y muerte celular, gracias al cual las células envejecidas o dañadas son renovadas y, en condiciones normales, la cantidad de células de un mismo tipo suele permanecer constante (Baehrecke 2002). Sin embargo, ocasionalmente algunas células pierden la capacidad de responder a mecanismos de control del crecimiento y pueden dar lugar a tumores o neoplasias (término proveniente del latín, que significa “nuevo crecimiento”) (Kumar 2007).

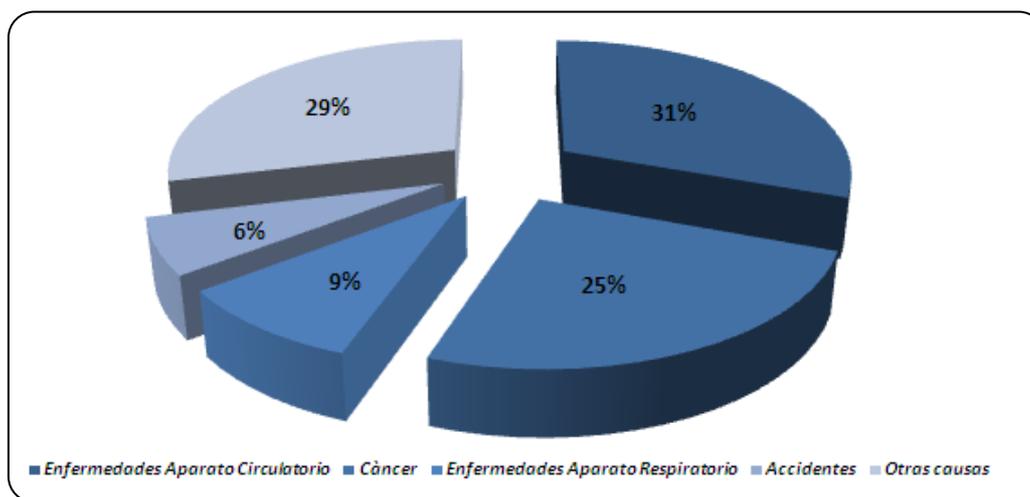
Los tumores así generados pueden ser tumores benignos, los cuales carecen de capacidad invasiva o, por otro lado, malignos (cáncer), los que adquieren características invasivas y son capaces de colonizar otros tejidos. Estos últimos pueden, en este proceso, llegar a la circulación sanguínea y diseminarse en otros tejidos produciéndose, de esta forma, metástasis (Figura 1) (Goldsby 2003).



**Figura 1. Representación de las diferentes etapas que conducen a la formación de metástasis.** a. Una única célula desarrolla cambios que le permiten proliferar indefinidamente. b. La célula transformada prolifera, formando un tumor benigno. c. El tumor puede invadir la lámina basal subyacente, transformándose en maligno. d. La formación de metástasis ocurre mediante el desprendimiento y posterior diseminación por la sangre de células del tumor primario.

*Extraído de Goldsby et al. 2003.*

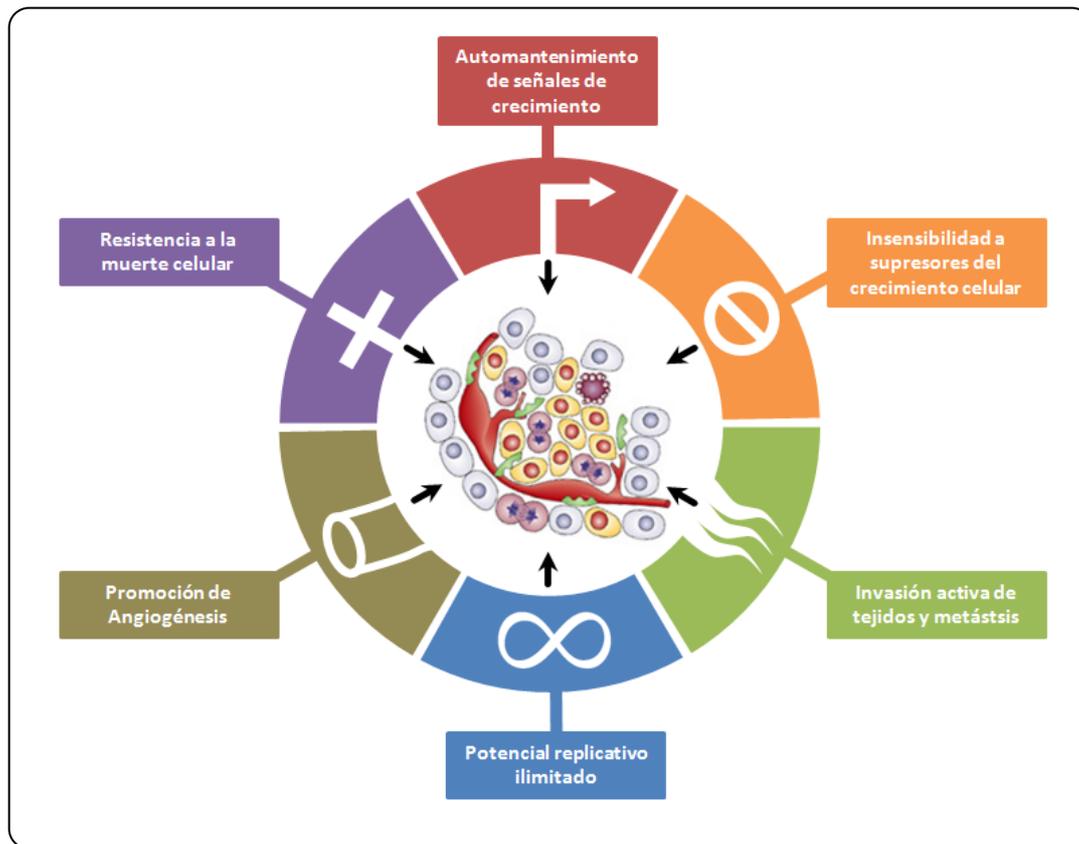
El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud en todo el mundo y es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad (Franco 1997), siendo en nuestro país, la segunda causa de muerte luego de las patologías cardiovasculares (Figura 2) (CHLCC 2010). La elevada incidencia del cáncer en nuestro país coincide con la de los países del primer mundo, donde el aumento en las expectativas de vida debido a una mejora en el control de las enfermedades infecciosas ha llevado a la preponderancia de enfermedades degenerativas tales como el cáncer (DePinho 2000, Weinberg 2007).



**Figura 2. Principales causas de muerte en la población del Uruguay en el año 2008.** Extraído de CHLCC2010.

### 1.1 Antígenos Asociados a Tumor

El proceso de transformación maligna se asocia con cambios fenotípicos que influyen en el comportamiento celular. De hecho, las células transformadas muestran diferencias notables en algunos procesos biológicos, que les permiten proliferar, invadir tejidos y metastatizar (Bogenrieder 2003). En el año 2000, Hanahan y Weinberg postularon que las características distintivas del cáncer eran: la *evasión de la apoptosis*, la *autosuficiencia de señales de crecimiento*, la *insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento celular*, la *capacidad de proliferar indefinidamente*, la *adquisición de modificaciones que permitan la invasión de otros tejidos* y la *vascularización del tumor*. Todas ellas permiten tanto la supervivencia de las células tumorales como su proliferación y contribuyen a su capacidad de generar metástasis (Figura 3) (Kumar 2007, Hanahan 2011).



**Figura 3. Características distintivas que son adquiridas por las células cancerosas.** Las células cancerosas adquieren determinadas capacidades funcionales durante la carcinogénesis. En particular, las células adquieren seis características distintivas: angiogénesis sostenida, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales supresoras del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado e invasión de tejidos y metástasis. Las mismas otorgan a las células cancerosas el fenotipo destructor.

*Modificado de Hanahan et al, 2011.*

Investigaciones recientes sugieren dos características distintivas adicionales que son desarrolladas durante la patogénesis de algunos, o quizás todos, los tipos de cáncer. Una involucra la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular, en pos de un soporte más efectivo de la proliferación neoplásica. La segunda, permite a las células cancerosas evadir la destrucción por el sistema inmune, en particular la mediada por linfocitos T y B, macrófagos y células natural killers (Hanahan 2011).

El mecanismo de cada uno de estos eventos es funcionalmente mantenido por una combinación de moléculas definidas involucradas en la transformación y en los procesos de metástasis. Algunas de estas moléculas, expresadas en la superficie de las células cancerosas o secretadas por éstas, pueden ser detectadas por el sistema inmune, por lo cual generalmente se denominan Antígenos Asociados a Tumores (TAA, por su sigla en inglés *Tumor Associated*

*Antigens*) (Freire 2006a). Ejemplos de estos antígenos incluyen el antígeno HER-2 y la mucina MUC-1 en carcinoma de mama y el antígeno Wilm's Tumor-1 (WT-1) en varios tipos de transformaciones malignas como ser cáncer de pulmón, de ovario, gástrico y hematológicos incluyendo leucemias y linfomas (Peoples 1995, Linley 2011 ).

Los TAA han sido extensamente estudiados, profundizando en la naturaleza y origen de los mismos. De esta forma, actualmente se pueden clasificar en distintos subgrupos: *antígenos sobre-expresados*, *antígenos específicos de linaje o diferenciación*, *antígenos virales*, *autoantígenos mutados ó alterados* y *antígenos cancerosos y testiculares* (Linley 2011). Algunos de los antígenos pertenecientes a estos subgrupos se muestran en la Tabla I.

**Tabla I. Clasificación de los Antígenos Asociados a Tumor.**

<b>Tipo de Antígeno</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Cáncer</b>
<b>Sobre-expresados</b>	HER-2	Mama
	MUC-1	Mama, Ovario, Linfoma
	WT-1	Leucemias
<b>Específicos de Linaje</b>	gp100	Melanoma
	Melan-A/MART-1	Melanoma
	Tirosinasa	Melanoma
	PAS	Próstata
<b>Virales</b>	E6/E7	Cervical, Cabeza, Cuello
	EBNA	Linfomas
	Tax	Leucemias de Células T
	HCV core	Hepatocelular
<b>Mutados o Alterados</b>	BCR-ABL	Leucemias
	PML-RAR $\alpha$	
<b>Testiculares Cancerosos</b>	MAGE	Melanoma
	HAGE	Leucemias, Mieloma, Linfoma
	PRAME	Leucemias, Mieloma

*Extraído de Linley 2011.*

Es de destacar que los antígenos tumorales pueden clasificarse utilizando otros criterios, como ser la naturaleza de las moléculas (lípidos, proteínas, etc). Un tipo muy estudiado de TAA está constituido por carbohidratos y se denominan Antígenos Carbohidratos Asociados a Tumores (TACA, por su sigla en inglés *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*). Son la consecuencia de la desregulación en las vías de glicosilación de las células cancerosas, lo que lleva a una acumulación de glicanos diferentes a los encontrados en células normales, como ser sialil-Le<sup>a</sup>, sialil-Le<sup>x</sup>, Tn, TF, sialil-Tn, el Grupo sanguíneo H y los gangliósidos GM2, GD2 y GD3 (Freire 2006a). Varios estudios han establecido la importancia funcional de la glicosilación aberrante en la progresión tumoral y en la metástasis (Ono 2004). En la Tabla II se muestran algunas de las características de algunos de estos TACA.

**Tabla II. Expresión y efecto biológico de algunos Antígenos Carbohidratos Asociados a Tumor.**

<b>TACA</b>	<b>Expresión en Cáncer</b>	<b>Mecanismo de expresión</b>	<b>Prognosis y correlaciones clínicas</b>
<b>Tn</b> <b>TF</b> <b>sTn</b>	Vejiga Gástrico Colon	<b>Tn</b> Ausencia de actividad de la enzima core1 $\beta$ 3GalT en cáncer de colon. Expresión aberrante de sustratos aceptores polipeptídicos, como en línea celular MCF7, de cáncer de mama	<b>Tn</b> Decrece sobrevida de pacientes con cáncer de colon. Indicador de malignidad en cáncer hepático. <b>sTn</b> Prognosis desfavorable en pacientes con cáncer gástrico y de colon. Se correlaciona con el grado de malignidad y metástasis.
	Próstata Ovario Pulmón Mama Próstata Páncreas	<b>TF</b> Baja actividad de la enzima core3 $\beta$ 3GalT en cáncer de colon. <b>sTn</b> Ausencia de actividad core1 $\beta$ 3GalT en cáncer de colon. Incremento de la actividad ST6GalNAc/core2 $\beta$ 6GalNAcT en la línea celular LMCR de cáncer de colon.	
<b>Grupo Sanguíneo H</b>	Gástrico Pulmón Cervical Epitelio Oral Urotelial Colon	Reducción de la actividad A/B glicosiltransferasas.	Asociado con el grado de malignidad y metástasis. Decrece sobrevida de pacientes
<b>sLe<sup>a</sup></b> <b>sLe<sup>x</sup></b> <b>Le<sup>y</sup></b>	Pulmón Colon Estómago Páncreas Mama Gástrico Ovario	<b>sLe<sup>a</sup></b> Incremento de la actividad $\alpha$ 3Sial-T en cáncer de colon. <b>sLe<sup>x</sup></b> Incremento de la actividad $\alpha$ 4Fuc-T en cáncer de colon. <b>Le<sup>y</sup></b> <b>sLe<sup>x</sup></b> Incremento de la síntesis de sialil-6-sulfo-sLe <sup>x</sup>	Asociado con progresión de la enfermedad y pobre prognosis.
<b>GD2</b> <b>GD3</b> <b>GM2</b>	Melanoma Neuroblastoma	<b>GD2</b> Sobreexpresión del gen GD2 sintasa en cáncer de pulmón. <b>GD3</b> Incremento de la expresión de $\alpha$ 8Sial-T en líneas celulares de melanoma.	

Adaptado de Freire 2006a.

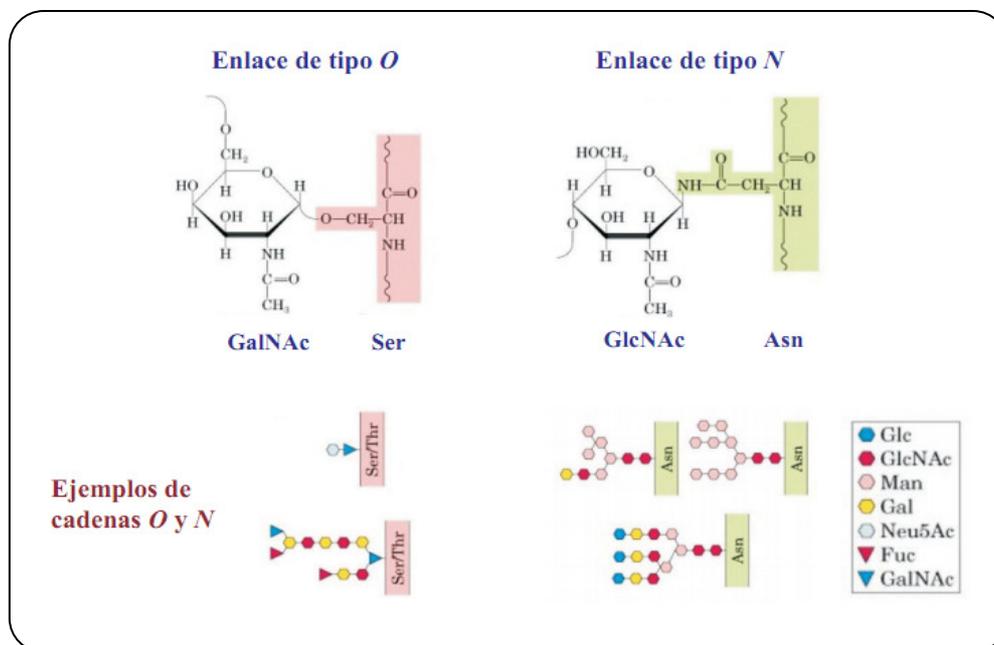
## 2. O-glicosilación y Cáncer

La glicosilación es la modificación post-traduccional covalente más frecuente y compleja en proteínas presentes en células eucariotas, involucrando aproximadamente el 50% de las mismas (Hang 2005; Wopereis 2006). Consiste en la adición de uno o más residuos glucídicos a los aminoácidos que las conforman, en una compleja red de reacciones que involucran a diversas enzimas (Varki 2009).

El papel de los carbohidratos presentes en glicoproteínas y sus derivados, es particularmente importante en el desarrollo de organismos multicelulares, ya que su presencia

es esencial para establecer interacciones entre las células y la matriz extracelular, la regulación de la actividad enzimática, conferir estabilidad y solubilidad a las proteínas secretadas, modificar la funcionalidad del sistema inmune, entre otros (Hang 2005; Tarp 2008; Varki 2009).

En las glicoproteínas uno o más glicanos están unidos covalentemente al esqueleto polipeptídico, en general a través enlaces *N*- u *O*- glicosídicos. De esta forma, existen dos tipos principales de glicosilación de proteínas: la *N*- y la *O*-glicosilación, dependiendo de si el enlace de unión entre el esqueleto peptídico y el glúcido se produce a través de un residuo de asparragina o una serina o treonina, respectivamente (Figura 4) (Freire 2002; Varki 2009).



**Figura 4. Clasificación de glicoproteínas según el tipo de enlace entre el esqueleto peptídico y los glúcidos.** Hay dos familias: N-glicoproteínas y O-glicoproteínas, dependiendo del tipo de enlace entre el polipéptido y el carbohidrato. En las N-glicoproteínas los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparragina. En O-glicoproteínas el punto de unión es el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina. Los carbohidratos que se unen directamente a estos sitios son normalmente N-acetilglucosamina y O-acetilgalactosamina, respectivamente.

Extraído de Freire et al, 2002.

Dentro de las alteraciones moleculares más notorias de las células cancerosas, se encuentra la expresión de antígenos producidos por O-glicosilación incompleta los cuales han constituido la base de diferentes procedimientos de diagnóstico oncológico y están siendo

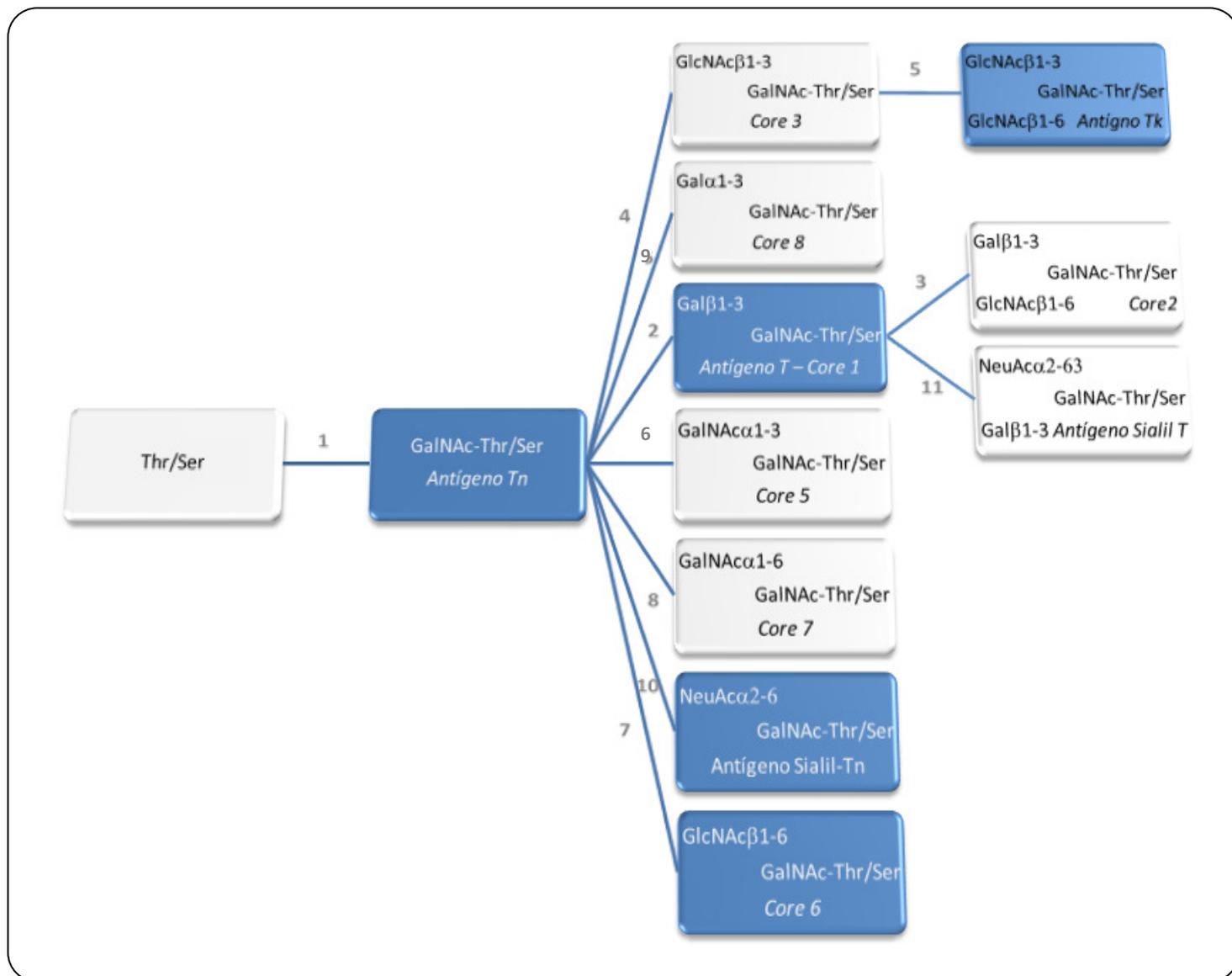
evaluados en protocolos de inmunoterapia activa específica del cáncer (Brockhausen 1999, Freire 2006a, Yu 2007).

Muchos de estos patrones de O-glicosilación incompleta son marcadores tumorales importantes. Entre ellos se encuentran algunos motivos tales como Tn, Tk y sialil-Tn (Figura 5), que constituyen importantes antígenos asociados a tumor (Yu 2007). La expresión de algunas de estas estructuras por los tumores está correlacionada con un peor pronóstico para el paciente (Freire 2002, Brockhausen 2006, Yu 2007).

La presencia de este tipo de alteraciones en las pautas de modificación post-traducciona l de las células tumorales, les confiere propiedades relacionadas con la invasividad, la metástasis (Hakomori 2002), la adhesión tanto a otras células como a la matriz extracelular (Mannori 1995, Tsuiji 2003) y la evasión de las respuestas inmunes (Vollmers 2007, Van Kooyk 2008).

El primer paso en la síntesis de los O-glicanos se encuentra catalizado por una familia de enzimas conocidas como UDP-N-acetilgalactosamina:polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAcTs), las cuales transfieren un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) al grupo hidroxilo presentes en residuos de serina o treonina, dando origen al antígeno Tn. Posteriormente, ocurre un proceso de elongación de la cadena donde se añaden otros glúcidos en reacciones catalizadas por otras glicosiltransferasas específicas (Figura 5) (Wopereis 2006, Alberts 2008, Varki 2009).

Como se podría esperar, teniendo en cuenta las complejas estructuras de O-glicanos que se encuentran en la naturaleza, existe una gran diversidad de glicosiltransferasas. Sin embargo, comparten la capacidad de catalizar una reacción de transferencia, en la que el grupo monosacárido de su sustrato dador, un azúcar nucleótido (como el CMP-Ácido Siálico o UDP-N-Acetil-Galactosamina), se transfiere a un aceptor determinado que, en el caso de las O-glicoproteínas, es el grupo hidroxilo presente en una serina o treonina (Varki 2009). Este tipo de glicosilación se conoce como glicosilación tipo mucina, debido a que determina la unión de las numerosas cadenas oligosacáridicas presentes en las mucinas (glicoproteínas de muy alto peso molecular que recubren la superficie de diferentes tipos celulares) (Hanisch 2001).



**Figura 5. Estructura y biosíntesis del "core" de los O-glicanos.** La primera etapa de la O-glicosilación ocurre por la adición de GalNAc a un residuo de Thr o de Ser de la cadena polipeptídica. Esta reacción es catalizada por una ppGalNAc-T (paso 1). Ocho tipos diferentes de "core" de O-glicanos pueden luego formarse por la actividad de distintas glicosiltransferasas: "core 1" β3Gal-T (paso 2), "core 2" β6GlcNAc-T (paso 3), "core 3" β3GlcNAc-T (paso 4), "core 4" β6GlcNAc-T (paso 5), "core 5" α3GalNAc-T (paso 6), "core 6" β6GlcNAc-T (paso 7), "core 7" α6GalNAc-T (paso 8) y "core 8" α3Gal-T (paso 9). Las estructuras sialil-Tn y sialil-TF se forman mediante sialilación de los antígenos Tn y TF, en reacciones catalizadas por la α6-sialil-T (paso 10) o la α3sialil-T (paso 11), respectivamente. En color azul se indican los antígenos carbohidratos asociados a tumor identificados hasta el presente. T=Transferasa. Modificado de Freire 2002.

### 3. Inmunoterapia Anti-tumoral

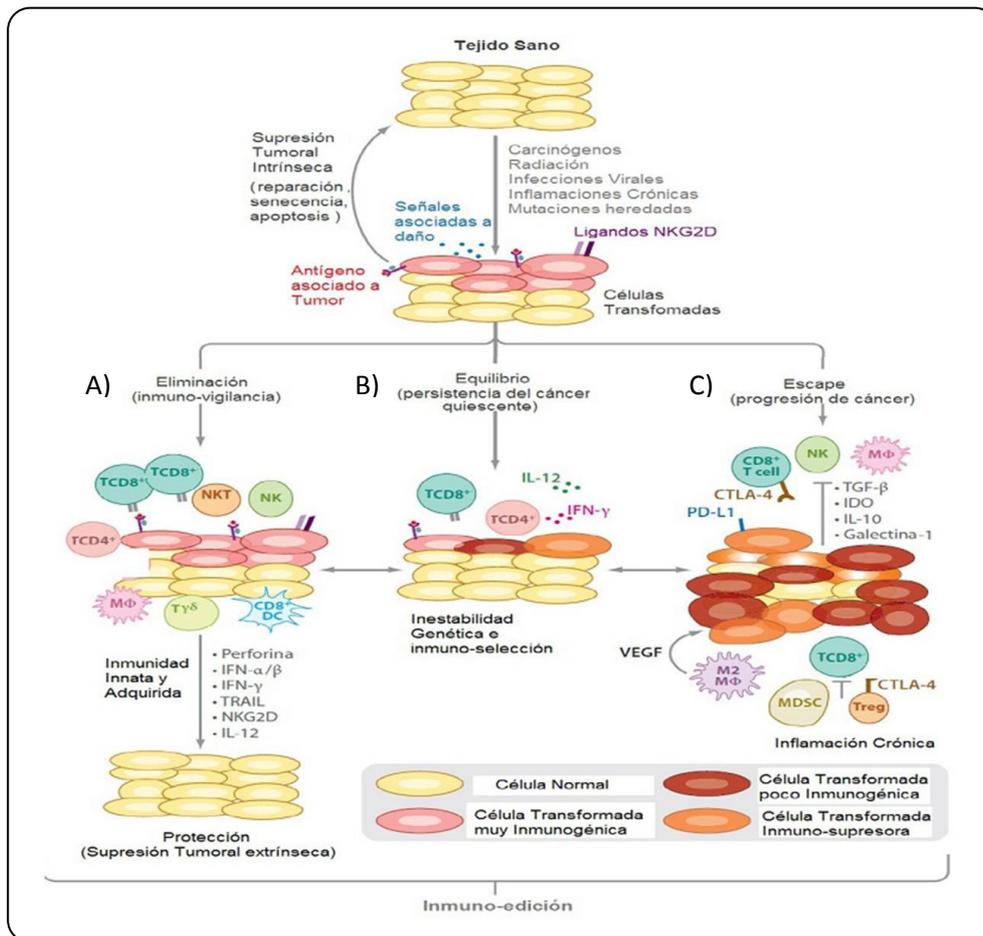
Dada la importancia del cáncer como enfermedad a nivel mundial, es permanente la búsqueda de estrategias terapéuticas que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes. La introducción de terapias dirigidas contra mecanismos propios de las células tumorales, ha

sido fruto de más de tres décadas de notable progreso en la investigación sobre los mecanismos de la patogénesis del cáncer (Hanahan 2011). Dentro de este contexto, una de las estrategias más estudiada en los últimos años es la inmunoterapia anti-tumoral: en la que se busca estimular al sistema inmune del paciente para que medie la eliminación de las células tumorales (Freire 2006a).

Paul Ehrlich, premio Nobel en Fisiología y Medicina (1908), fue quien propuso por primera vez la idea de que el sistema inmunitario podía protegernos frente al cáncer. Al observar algunas regresiones espontáneas de tumores propuso la existencia de antígenos tumorales, es decir, de entidades moleculares específicas de tumor capaces de ser reconocidas como extrañas por el organismo portador del mismo y generar una respuesta inmune contra ellas (Strebhardt 2008).

Desde entonces, se han producido muchos avances en el estudio de la interacción de las células tumorales con el sistema inmune. Actualmente, se sabe que el sistema inmunológico establece lo que se denomina un diálogo dinámico con el tumor, que le permite a éste último modificar sus propiedades fenotípicas y funcionales. Esta nueva concepción permitió que en el año 2002 Dunn et al re-definieran la teoría de la “Inmunovigilancia” en lo que hoy conocemos como “Teoría de la inmuno-edición tumoral” (Dunn 2002). El proceso de inmuno-edición de tumores transcurre en tres fases conocidas como: Eliminación, Equilibrio y Escape tumoral (denominadas las “tres E”, Figura 6) (Dunn 2002, Dunn 2006, Vesely 2011).

El hecho de que las células del sistema inmune sean capaces de reconocer a las células tumorales mediante el reconocimiento de antígenos asociados a tumor, ha motivado el desarrollo de la inmunoterapia anti-tumoral, en la que se busca potenciar dicha respuesta de manera tal de evitar llegar a condiciones de equilibrio, y posterior escape tumoral (Strebhardt 2008). Para lograr esto, pueden utilizarse dos estrategias: *inmunoterapia activa*, donde se estimula al propio sistema inmune del paciente a luchar contra el cáncer; o *inmunoterapia pasiva*, que utiliza componentes del sistema inmune (como los anticuerpos o citoquinas) producidos en el laboratorio, los cuales desencadenan el ataque a las células tumorales.



**Figura 6. Las tres fases de la inmuno-edición en cáncer.** La inmuno-edición en cáncer es el resultado de tres procesos que funcionan de manera independiente o secuencialmente, de manera de controlar y moldear el cáncer. Una vez que las células normales se transforman en tumor, por una combinación de oncogenes adquiridos y fallas intrínsecas de los mecanismos supresores de tumor, el sistema inmune puede actuar como un factor de supresión externo al tumor, eliminando células tumorales y evitando su crecimiento. En la primer fase de la inmuno-edición, la eliminación o inmuno-vigilancia, las células del sistema inmune innato y adaptativo reconocen moléculas en células transformadas y las destruyen, lo que genera un retorno a las condiciones normales fisiológicas del tejido (A). Sin embargo, si la inmunidad anti-tumoral no puede resolver completamente dicha eliminación, las variantes que sobrevivan pueden entrar en la fase de equilibrio, en la cual las células de la inmunidad adaptativa evitan el crecimiento masivo (B). Estas variantes pueden, eventualmente, adquirir un fenotipo más invasivo por la acumulación de mutaciones (C). (Abreviaturas: CTLA-4, Proteína-4 asociada a linfocitos T; IDO, indoleamina 2,3-desoxigenasa; IFN, interferón; IL, interleuquina; MΦ, macrófago; MDSC, células supresoras derivadas del progenitor mielode; NK, natural killer; NKG2D, NK grupo 2, miembro D; PD-L1, ligando de muerte celular programada 1; TGF-β, Factor de crecimiento transformante-β; TRAIL, Ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral; Treg, linfocito T regulador; VEGF, Factor de crecimiento endotelial).

El advenimiento de los anticuerpos monoclonales en la inmunoterapia pasiva sugirió una posibilidad de dirigir la respuesta y destruir tumores utilizando anticuerpos específicos contra antígenos asociados a tumor. Este enfoque depende, en parte, de encontrar antígenos

asociados a tumor que se encuentren en la superficie de la célula tumoral. En particular, han sido muy sorprendentes los resultados obtenidos en el tratamiento de cáncer de mama, utilizando un anticuerpo monoclonal humanizado llamado Trastuzumab (Herceptin) cuyo blanco molecular es la molécula HER-2/Neu, sobre-expresada en un cuarto de pacientes de cáncer de mama (Slamon 1989, Hortobagyi 2005).

Otro tipo de estrategias terapéuticas utilizadas en cáncer involucran el uso de vacunas. Diferentes métodos han sido evaluado para el diseño de vacunas que pueden ser utilizadas para tratar pacientes con cáncer. En este sentido las vacunas ideales son aquellas basadas en antígenos tumorales capaces de establecer una inmunidad anti-tumoral mediada por células T, en particular un perfil Th1 (Clemente 1996, Linley 2011).

Se han desarrollado diversas vacunas anti-tumorales basadas en diferentes TAAs, como por ejemplo mucinas sobre-expresadas en diversos tipos de cáncer. En particular, los ensayos clínicos llevados a cabo para evaluar la capacidad terapéutica de las mucinas en pacientes con cáncer, se basan en la utilización de péptidos de la mucina MUC1, principalmente para cáncer de mama y colon (Byrd 2004, Vlad 2004). Por otro lado, también se han obtenido vacunas contra el cáncer basadas en TACAs, llegando algunas a ser evaluadas en ensayos clínicos. En este sentido, han sido ampliamente estudiadas algunas vacunas que contienen TACAs de O-glicosilación simple (Tabla III).

Las vacunas basadas en TACAs generalmente involucran la obtención de motivos carbohidratos, ya sea de origen natural o sintetizadas químicamente, conjugados a moléculas que actúan como carriers, como péptidos o proteínas. Una de las estrategias más utilizadas en la última década ha sido el desarrollo de vacunas basadas en TAAs proteicos (en particular, mucinas sobre-expresadas en diferentes tipos de cáncer) portando dentro de su estructura determinados TACAs, ya que cada vez más trabajos demuestran la importancia de los carbohidratos en la estructura de los marcadores tumorales en las mucinas, y que su presencia puede ser esencial para obtener un inmunógeno eficaz. Por ejemplo, se ha reportado que pacientes con cáncer de mama son capaces de producir anticuerpos anti-MUC1 que reconocen mejor péptidos derivados de MUC1 glicosilados que péptidos sin glicosilar (von Mensdorff-Pouillym 2000). Por otra parte, determinados estudios estructurales han mostrado que el antígeno Tn participa en el reconocimiento inmune del tumor ya que es reconocido por anticuerpos anti-MUC1 obtenidos luego de inmunización con células de un tumor de ovario

(Byrd 2004). Asimismo, cuando el antígeno Tn es presentado sobre un péptido MUC1 conjugado a la KLH (MUC1:Tn-KLH), induce la producción de niveles más elevados de anticuerpos anti-Tn que cuando se encuentra directamente conjugado a la KLH (Tn-KLH) (Kagan 2005). Además, el glicoconjugado MUC1:Tn-KLH es capaz de producir niveles más elevados de anticuerpos específicos contra el péptido MUC1 que el conjugado no glicosilado MUC1-KLH (Freire 2006a).

**Tabla III. Vacunas conjugadas utilizando TACAs de O-glicosilación simple.**

<b>Vacuna</b>	<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>Respuesta Inmune Provocada/ Efecto Terapéutico</b>	<b>Referencia</b>
<b>Tn-KLH</b>	Próstata	IgM e IgG con poco reconocimiento por células LSC. Disminución de la progresión de cáncer de próstata.	Slovin 2003
<b>Tn-PAM</b>	Próstata	Escasa producción de IgM que no reconocen células LSC.	Slovin 2003
<b>sTn-KLH</b>	Ovario (metastásico)	Producción de IgM que reconocen células tumorales humanas. Citotoxicidad dependiente de Complemento.	MacLean 1996
<b>sTn-KLH</b>	Colorectal (metastásico)	Producción de IgM + IgG que no reconocen los TACA nativos.	Adluri 1995
<b>TF-KLH</b>	Próstata	Producción de IgM que no reconocen células tumorales humanas. Decrece progresión de PSA.	Slovin 2005a
<b>TF-KLH</b>	Ovario (metastásico)	Producción de IgM e IgG que reconocen células tumorales humanas. Citotoxicidad dependiente de Complemento	MacLean 1996
<b>MUC1:Tn-KLH</b>		Alta producción de anticuerpos que reconocen el antígeno Tn y células tumorales. Producción de anticuerpos anti MUC1.	Kagan 2005
<b>(MUC2-Tn)-KLH + GloboH-KLH</b>	Próstata	Producción de IgM + IgG Citotoxicidad dependiente de Complemento	Slovin 2005b

LSC: Células Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD49<sup>high</sup>; PSA: Antígeno Específico de Próstata; PAM: Tripalmitil-S-gliceril-cisteilserina; KLH: Hemocianina del molusco "Lapa Californiana".

La obtención de glicoproteínas o glicopéptidos conteniendo el antígeno Tn a partir de tejidos naturales es una tarea muy compleja y económicamente poco rentable a gran escala dada la baja concentración de las estructuras de interés en la compleja mezcla presente en dichas muestras. La síntesis química ha sido una solución ampliamente utilizada para este fin. Sin embargo, requiere numerosos pasos de protección y de desprotección, debido a la presencia de múltiples hidroxilos de similar reactividad, lo que hace que los rendimientos obtenidos generalmente sean muy bajos y dificulta la producción a gran escala. Además, la

obtención de compuestos estereoespecíficos suele ser dificultosa. Dentro de este contexto, una alternativa interesante a la síntesis química es la utilización de enzimas que participan *in vivo* en el metabolismo de dicho carbohidrato, como las ppGalNAcT (Freire 2006a). Dichas enzimas han sido ampliamente utilizadas para el desarrollo de diferentes glicopéptidos conteniendo el antígeno Tn, algunas de las cuales han sido utilizadas en ensayos clínicos (Freire 2006a, Freire 2006b, Freire 2011).

#### **4. Antecedentes inmediatos de este trabajo**

Como se dijo anteriormente, la obtención de apomucinas glicosiladas constituye un interés particular en el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Sin embargo, la tolerancia por parte de las células T a los antígenos propios, como las mucinas humanas, puede limitar su eficiencia en este tipo de estrategia.

Como una forma de intentar evitar dichas reacciones de tolerancia, resulta de gran interés el estudio de dos péptidos derivados de apomucinas de origen parasitario disponibles en nuestro laboratorio. En el presente trabajo realizamos la síntesis de dos glicopéptidos hemisintéticos conteniendo el antígeno Tn, conjugando mediante transferencia enzimática un grupo GalNAc a dichos péptidos.

Uno de ellos es derivado de *Fasciola hepática* (denominado Fhmuc), el cual ha sido recientemente identificado mediante análisis del transcriptoma del estadio invasivo juvenil del parásito como el cDNA más redundante dentro de un grupo de transcriptos que probablemente se expresen durante la etapa de infección en el hospedero mamífero. Además, dicha secuencia posee un péptido señal, sugiriendo que esta glicoproteína es secretada por el parásito y puede interactuar con las moléculas del hospedero (Cancela, resultados no publicados). Dicho péptido, cuenta con un alto contenido de residuos hidroxilados, 29 en total (15 serinas y 14 treoninas), de las cuales 25 constituyen sitios potenciales de O-glicosilación, según el algoritmo NetOGlyc (Julenius 2005).

El segundo de ellos, al que denominamos Egmuc, es una apomucina derivada de *Echinococcus granulosus*. El mismo fue identificado y clonado durante la caracterización del transcriptoma del estadio larvario del parásito (Fernández 2002) y se compone de 58 aminoácidos que se organizan en tres regiones diferentes: i) un extremo N-terminal con un péptido señal, seguido de una región rica en aminoácidos ácidos, ii) una región central con alto número de sitios potenciales de O-glicosilación y iii) un extremo hidrofóbico C-terminal. En

general, cuenta con 23 residuos hidroxilados (9 serinas y 14 treoninas), de las cuales 16 son sitios potenciales de O-glicosilación de acuerdo con el algoritmo NetOGlyc (Julenius 2005). La secuencia de aminoácidos de Egmuc presenta una muy baja similitud en comparación con las mucinas humanas, como demuestran análisis de homología de secuencia con proteínas existentes en bases de datos.

**Tabla IV. Secuencias primarias de las apomucinas de las que derivaron los péptidos utilizados en este trabajo.**

Péptido	Secuencia
Egmuc	<b>M</b> GTLQIFILLLLTAHT <b>FAY</b> SHEYYGEEDL <u>TTSTTTTSTTW</u> TVAKATSQM <u>SLL</u> SP <u>STPLHLFTS</u> LLLLFITSYAL
Fhmuc	<b>M</b> VRTL <b>S</b> VLLL <b>V</b> VVCL <b>R</b> GMNTQ <b>N</b> NE <b>S</b> NA <b>S</b> Q <b>S</b> SP <b>T</b> AS <b>S</b> TAS <b>V</b> NT <b>S</b> SDA <b>S</b> TT <b>S</b> ST <b>M</b> TT <b>E</b> SS <b>T</b> ST <b>A</b> TV <b>S</b> SE <b>S</b> AP <b>S</b> ST <b>V</b> <u>TAQSS</u> <u>PTATVSSDA</u> <u>STSTTMT</u> <u>ARSSASATASSE</u> <u>TRAPSSTMTIQNAS</u> <u>TTSGSVRLPIQT</u> <u>TRCILLFIFGVAFF</u>

En rojo se marca el péptido señal y en azul las serinas o treoninas.

### **1. Hipótesis**

Teniendo en cuenta que las vacunas portando el antígeno Tn evaluadas en ensayos clínicos no han tenido los efectos terapéuticos buscados, probablemente por el desarrollo de tolerancia inmunológica, al utilizar mucinas humanas como carriers de dichos carbohidratos, nos formulamos como **hipótesis que glicopéptidos conteniendo el antígeno Tn derivados de mucinas de origen parasitario, podrían potenciar una respuesta inmune contra dicho antígeno presente en células tumorales, sin que se presenten problemas de tolerancia inmunológica ya que el péptido portador del antígeno Tn no es propio del hospedero.**

### **2. Objetivos**

#### **2.1. Objetivo General**

El objetivo general de este trabajo final de carrera fue obtener glicopéptidos conteniendo el antígeno Tn mediante la transferencia enzimática de grupos GalNAc a péptidos derivados de apomucinas de origen parasitario, y realizar una caracterización primaria de su inmunogenicidad.

#### **2.2. Objetivos Específicos**

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Optimizar un ensayo para medir la actividad ppGalNAcT.
- Optimizar la síntesis de glicopéptidos Tn y purificar los mismos.
- Evaluar la antigenicidad de los glicopéptidos producidos.
- Estudiar la capacidad de los glicopéptidos producidos de estimular linfocitos T.
- Analizar la internalización de los glicopéptidos Tn por células dendríticas.



## 1. Ratones

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos en la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Éstos fueron mantenidos en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE - Facultad de Medicina), en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21° C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro y recibieron agua y ración estéril, administradas en condiciones *ad libitum*. Los diferentes protocolos de experimentación con animales utilizados en este trabajo fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

## 2. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos fueron obtenidos de SBS Bio Beijing SBS Genetech Co. Ltd (China) ó Peptide 2.0 Inc . (USA). La secuencia de los mismos se detalla en la tabla V.

**Tabla V. Secuencias aminoacídicas de los péptidos utilizados.**

Nombre	Secuencia	N° AA*	Hidroxi AA*	Sitios* O-glic.
<b>Egmuc</b>	YSHEYGGEDDLTSTTTTSTLLTTVAKATSQMSLLSPSTPLHAITSLLLIFITSYALL	58	23	16
<b>Egmuc2</b>	GEDDLTSTTTTSTLLTTVAKATSQMSLLSPSTPLHAIT	40	19	19
<b>Fhmuc</b>	VSSDASTTSTMTARSSASATASSETRAPSSMTTQNASTTSGSVRLPIQTTRCILLFIGVAFF	66	29	25

\*Abreviaciones: AA, Aminoácidos; Hidroxi AA, Aminoácidos hidroxilados (Serinas y Treoninas); Sitios O-glic, Sitios potenciales de O-glicosilación según el algoritmo NetOGlyc (Julenius 2005).

## 3. Obtención de OSM, aOSM y dOSM

Como estándar de antígeno Tn se utilizó la mucina submaxilar ovina desialilada (aOSM). La misma se obtuvo mediante el proceso de desialilación química de la OSM, la cual fue aislada de la glándula submaxilar de oveja según el proceso descrito en Horowitz et al, 1964. La eliminación del ácido siálico presente en dicha mucina hace que se exponga un alto contenido de antígeno Tn. Para ello, se incubó la misma con ácido clorhídrico 0,01 N durante 1 hora a 80 °C. Luego, se enfrió en baño de agua hasta temperatura ambiente, se neutralizó utilizando

hidróxido de sodio 1 N y posteriormente, se dializó durante 24 horas contra solución de Buffer Fosfato Salino (PBS) o Buffer Acetato de Sodio 50 mM pH 4.5, de acuerdo a su posterior utilización como estándar de contenido Tn o para la posterior deglicosilación química, respectivamente.

La variante deglicosilada (dOSM) se utilizó como sustrato aceptor modelo en la optimización de un ensayo de actividad ppGalNAcT. Para su obtención se efectuó una deglicosilación química total de la aOSM dializada contra Buffer Acetato de Sodio 50 mM pH 4.5, por incubación con Periodato de Sodio 10 mM durante 1 hora a Temperatura Ambiente, seguido de diálisis durante 24 horas contra PBS.

#### **4. Enzimas ppGalNAcTs**

Se utilizaron las enzimas ppGalNAcT2, T3 y T6 humanas. Las mismas habían sido producidas en un sistema de expresión de baculovirus, como se describe en Freire et al, 2011.

#### **5. Cuantificación de Proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas fue realizada mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith 1985), el que basa en que dicho compuesto es capaz de formar un complejo de color púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino. Este complejo absorbe la luz visible. El reactivo permite monitorear el ión cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) producido en una reacción entre las proteínas y el ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ). El método del ácido bicinconínico, posee la ventaja de presentar escasas interferencias con compuestos presentes en el buffer o que se encuentren en las muestras. La reacción se realizó agregándole a 10  $\mu\text{L}$  de diferentes diluciones de la muestra en PBS y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo, preparado con una solución de BCA (Sigma, EE.UU) y sulfato de cobre, en una relación de partes 50:1. Posteriormente se incubó 1 hora a 37°C, para luego medir a 570 nm la formación del complejo.

#### **6. Ensayos de Glicosilación *in vitro***

Las glicosilaciones *in vitro* fueron realizadas mediante la incubación a 37°C de los péptidos (Fhmuc, Egmuc o Egmuc2) o dOSM con las diferentes ppGalNAcTs (T2, T3, T6), en presencia de UDP-GalNAc (Uridina-5-difosfo-N-acetilgalactosamina, Fluka). La reacción se realizó en Buffer Imidazol 50 mM pH 7.2, conteniendo  $\text{MnCl}_2$  15 mM y Triton X-100 0,1%. Asimismo, se utilizó un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) para evitar la degradación

del sustrato peptídico. Se ensayaron diferentes condiciones de tiempo de reacción (entre 6 horas y 48 horas), relación enzima/sustrato y equivalentes de UDP-GalNAc por equivalentes de Serina y Treonina en el sustrato aceptor. Los ensayos analíticos se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ L (25  $\mu$ g de péptido), mientras que los semi-preparativos en 500  $\mu$ L (250  $\mu$ g de péptido).

### **7. ELISA para la detección del antígeno Tn o de los péptidos**

La detección del antígeno Tn y los péptidos fue realizada mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para ello se sensibilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) durante toda la noche a temperatura ambiente con diluciones de las mezclas de reacción de glicosilación (1-2  $\mu$ g de péptido por pocillo). Asimismo, se sensibilizaron por duplicado con al menos 5 concentraciones diferentes de aOSM comprendidas entre 10 ng/mL y 1  $\mu$ g/mL. Posteriormente, se efectuaron 3 lavados con PBS con Tween 0.1% (PBS-T), y se bloqueó con gelatina 1% en PBS durante una hora a 37°C. Luego de 3 lavados, se incubó con el anticuerpo primario en PBS conteniendo 0.05% de gelatina y 0.05% de Tween (PTG) por una hora a 37°C. A continuación se lavó 3 veces con PBS-T, para luego incubar durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario en PTG. Luego, se llevaron a cabo nuevamente 3 lavados con PBS-T para posteriormente incubar con la solución de revelado. El revelado consistió en o-Fenilendiamina 0,5 mg/mL (OPD) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno 0,12% en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH5, y el desarrollo de color fue cuantificado con un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS) midiendo absorbancia a 492 nm.

Para la detección del antígeno Tn se utilizó el anticuerpo monoclonal 83D4, capaz de reconocer el antígeno Tn formando clusters de al menos dos residuos de GalNAc (Osinaga 2000). El anticuerpo secundario utilizado en este ensayo el anti-IgM de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Para la determinación de los péptidos se utilizaron sueros anti Egmuc o Fhmuc, producidos previamente en el laboratorio en ratón o conejo, respectivamente. Asimismo, se utilizaron anticuerpos anti-inmunoglobulinas totales de ratón o de conejo conjugados a peroxidasa, según el caso.

## **8. Digestión de péptidos**

Dada la baja solubilidad que presentaban los péptidos Egmuc y Fhmuc, se realizó un análisis de hidrofobicidad de los mismos utilizando el software disponible on line ProtScale que utiliza el algoritmo de Kyte-Doolittle (<http://web.expasy.org/protscale>). A partir de este análisis se diseñaron estrategias para eliminar zonas altamente hidrofóbicas de los mismos. Para ello se utilizaron dos protocolos de clivaje: químico, utilizando el ácido 2-nitro 5-tiocianobenzoico (NTCB, por su sigla en inglés *Nitro-ThioCyanoBenzoic Acid*); o enzimático, utilizando la proteasa tripsina.

El clivaje de Fhmuc se realizó utilizando como agente de corte el NTCB, el cual puede clivar un polipéptido en el extremo carboxilo de una cisteína. Se utilizó un protocolo previamente reportado (Jacobson 1973), con modificaciones. Brevemente, 35 µg de péptido se incubó a 37°C durante 30 minutos junto a NTCB 5 mM en PBS, en presencia o ausencia de Urea 0,5 M o Ditiotreitól (DTT) 1 mM. Luego de este tiempo, se ajustó el pH a 9 utilizando NaOH 1 N, y se incubó nuevamente durante una hora a 50°C, lapso después del cual se realizó una diálisis de 24 horas contra PBS.

La proteasa Tripsina, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos de los extremos carboxílicos de los aminoácidos Arginina o una Lisina, fue utilizada para el clivaje enzimático de Egmuc. Para ello 10 µg de péptido se incubaron en Buffer Tris-HCl 88 mM pH 8 junto a Tripsina en una relación masa:masa de 1:50 y 1:20 en presencia o en ausencia de Urea 0,7 M durante 24 horas a 37°C, para lo que se utilizó un termociclador T Gradient Thermocycler, Biometria.

El análisis de las digestiones se siguió mediante SDS-PAGE, Western Blot o por Isoelectroenfoque, según se indica oportunamente.

## **9. Purificación de glicopéptidos**

La purificación de los glicopéptidos se realizó por cromatografía de afinidad, una técnica basada en una interacción reversible entre una molécula de interés y un ligando unido a un soporte sólido, como por ejemplo la Agarosa. En el presente trabajo se utilizó la lectina de *Helix Pomatia*, que reconoce residuos de GalNAc terminales, unida covalentemente un gel de agarosa (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Para ello, en primer lugar se equilibró en Buffer PBS mediante un lavado de al menos 5 volúmenes de columna, y luego, la adsorción de los glicopéptidos se realizó incubando, junto al gel, en batch 500  $\mu$ L de las mezclas obtenidas luego de las reacciones de glicosilación. Posteriormente se lavó con 5 a 10 volúmenes de matriz de PBS. Subsiguientemente, se empaquetó el gel en forma de columna en un soporte de 10 mm de diámetro interno, obteniendo una altura de 10 mm. Luego, se procedió a eluir el glicopéptido por competencia con dos volúmenes de GalNAc 50 mM en PBS y luego por cambio de pH mediante la circulación de 2 volúmenes de matriz de Glicina 0.1 M con NaCl 0,15 M pH 2.4. Las fracciones de elución se colectaron en volúmenes de aproximadamente 0,5 mL. Las correspondientes a la elución ácida fueron neutralizadas con Buffer Tris 1 M pH 9.

#### **10. SDS-PAGE e Isoelectroenfoque**

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y reductoras se utilizaron geles homogéneos de 20% de acrilamida (PhastGel Homogeneous – 20, GE Healthcare, Estados Unidos). Las corridas se realizaron en equipo PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia) según las especificaciones del fabricante. Las muestras a analizar fueron pre-tratadas de la siguiente forma: 25  $\mu$ L de la muestra se mezclaron con 25  $\mu$ L de buffer de muestra (Buffer Tris/HCl 10 mM pH 8,0, suplementado con EDTA 1 mM, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y azul de bromofenol 0,05%). La mezcla se calentó durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar y se utilizó para el análisis. En la corrida electroforética se incluyeron estándares de peso molecular (14,4 – 97,0 KDa, Pharmacia, Suecia). Los geles se revelaron mediante tinción con plata, siguiendo una secuencia de pasos indicados por el fabricante.

El Isoelectroenfoque también se realizó utilizando el equipo PhastSystem, pero en este caso con geles con gradiente de pH (PhastGel IEF – 3-9, GE Healthcare, Estados Unidos). Las muestras se dializaron contra agua antes de la realización del ensayo. El revelado se realizó también por tinción con plata.

#### **11. Western Blot, Lectin Blot y Dot Blot**

Para la realización del Lectin Blot se sembró un volumen de los productos de las reacciones de glicosilación o los controles correspondiente a 15  $\mu$ g de (glico)péptido en un gel de poliacrilamida al 15%. La corrida electroforética se realizó a 200 V y fue seguida de electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa. Alternativamente, se realizaron análisis

por Dot Blot, en los que 2,5 µg de las muestras fueron sembrados sobre una membrana de nitrocelulosa, utilizando protocolos convencionales. Asimismo, se realizó Western Blot de las digestiones del péptido Egmuc con tripsina, para lo cual 10 µg del péptido o de los productos de digestión se corrieron en un gel de poliacrilamida al 20% y se transfirieron a nitrocelulosa.

Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con seroalbúmina bovina BSA 3% en PBS. Luego se hicieron 3 lavados con Buffer PBS con Tween 0.1% (PBS-T) durante 10 minutos. Para determinar la presencia del antígeno Tn, se incubó con la lectina de *Vicia Villosa*, que reconoce específicamente grupos de GalNAc, la cual tiene conjugada Biotina (Sigma, Estados Unidos), en BSA 1% en PBS. Posteriormente, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS-T y luego se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Para detectar la presencia de los péptidos Egmuc y Fhmuc se incubó con sueros policlonales específicos para los mismos de ratón o conejo, respectivamente, en BSA 1% en PBS. Luego de los correspondientes lavados, se realizó una incubación con anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados a peroxidasa, según correspondiera.

En ambos casos, el revelado se realizó por detección de quimioluminiscencia luego de incubar durante un minuto con el reactivo ELC Western Blotting System (Amersham, Estados Unidos) y se reveló sobre una placa fotográfica.

## **12. Evaluación de la Respuesta Inmunológica Celular**

Grupos de 3 ratones C57BL/6 fueron inmunizados de forma sub-cutánea en la base de la cola con Fhmuc o Tn-Fhmuc (15 µg) en Adyuvante Completo de Freund (CFA). Transcurridos 8 días se extrajeron los ganglios drenantes, los cuales fueron disgregados. Las células obtenidas fueron re-estimuladas con distintas concentraciones de los antígenos (entre 1 µg/mL y 30 µg/mL) por 3 días a 37°C en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), conteniendo L-glutamina (2.05 mM), y suplementado con suero fetal bovino (SBF) 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomina 0,1 mg/mL y β-mercaptoetanol 0,05 mM (RPMI completo). Los sobrenadantes fueron colectados para la determinación de citoquinas (IL5, IL17 e INFγ) por ELISA. Para ello, placas Nunc de 96 pocillos fueron sensibilizadas con anticuerpos primarios específicos de cada citoquina (BD Bioscience) toda la noche a 4°C. Se bloqueó con BSA 1% en PBS-T por 1 hora a 37°C. Diferentes diluciones de los sobrenadantes, así como los estándares de cada citoquina utilizados para las curvas de calibración, se incubaron por 1 hora a 37°C. Luego se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados a biotina utilizados se incubaron

durante 45 minutos a 37°C y posteriormente con estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos a 37°C. El sistema de revelado consistió en OPD 0,5 mg/mL y peróxido de hidrógeno 0,12 % en Buffer citrato-fosfato pH 5, como indicado anteriormente.

### **13. Generación de BMDCs**

Se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC, por su sigla en inglés *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) a partir de precursores de la médula ósea de femures y tibias de ratones C57BL/6. Se cortaron las extremidades de los huesos y haciendo uso de una jeringa de 1 mL se extrajeron las células progenitoras en medio RPMI completo. Las mismas se contaron y se llevaron a una dilución de  $2,0 \times 10^5$  células/mL en medio RPMI completo suplementado con 0,5% del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF, por su sigla en inglés *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). Una vez llevadas a la concentración deseada, las células precursoras de células dendríticas se depositaron en placas de petri a razón de 10 mL por placa. Al tercer día se observaron las células y en caso de presentar islotes se adicionaron 5 mL de medio RPMI completo con 0,5% GM-CSF. Del día 7 a 9 las células en suspensión se colectaron y se contaron para llevarlas a la concentración requerida para cada experimento.

### **14. Internalización de antígenos por BMDC**

La internalización de antígenos por BMDC se evaluó por citometría de flujo y por microscopía confocal. Para ello, primeramente se marcaron los antígenos con una sonda fluorescente ATTO-647 (Fluka, Estados Unidos). Fhmuc y Tn-Fhmuc fueron incubados con ATTO-647 (10 µg/µl) en Buffer Bicarbonato 0,3 M pH 9,5 por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los péptidos fueron dializados utilizando una membrana de diálisis (Peso molecular de corte 1500 Da; Pierce) por 24 hrs a 4° C. Para la evaluación de la internalización por citometría de flujo, se incubaron BMDC ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) con los péptidos-ATTO-647 (2,5 µM) por 1 hora a 37° C ó a 4° C (control). Transcurrida la incubación se efectuaron dos lavados en PBS conteniendo azida de sodio 0,1% y SBF 2%, en adelante Buffer FACS. A continuación las BMDC fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD11c conjugado a Ficoeritrina (PE, por sus sigla en inglés *PhycoErythrin*) lo que permitió evaluar la intensidad de fluorescencia correspondiente a la internalización de los péptidos-ATTO-647 por células CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo. Alternativamente, las BMDCs previamente incubadas con los antígenos marcados, fueron depositadas en láminas de vidrio previamente lavadas y tratadas

con alcohol 95%. Una vez secas, las células fueron incubadas por 30 minutos a 4 °C con el anticuerpo específico anti-CD11c conjugado a PE y posteriormente fijadas con formaldehído al 0,37% en buffer FACS. Los preparados fueron montados con glicerol 80% estéril y analizados en un microscopio confocal (Nikon).

### **15. Análisis Estadístico**

Las variables cuantitativas se analizaron mediante el test de la t de Student. Valores de  $p$  menores a 0,05 o 0,01 (señalizados en las gráficas con un \*) se consideraron estadísticamente significativos.

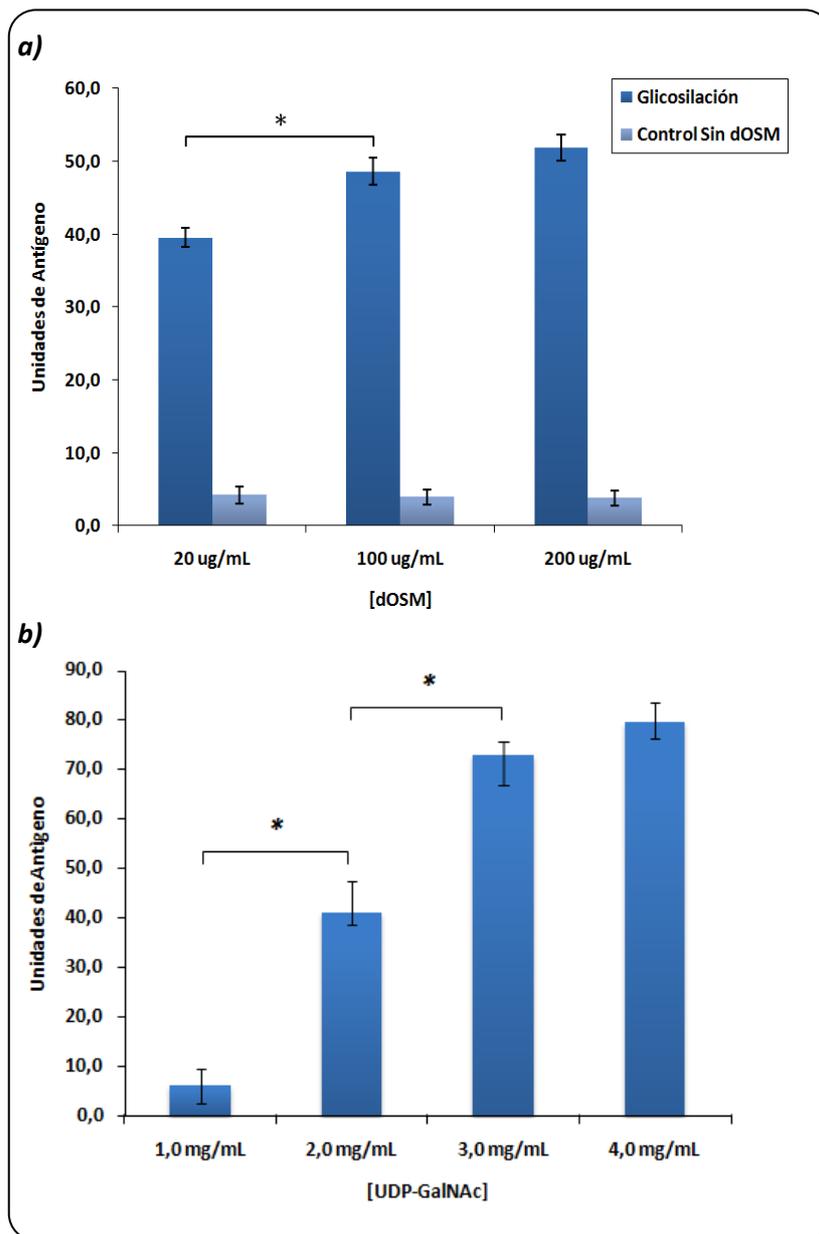
### **1. Optimización de un ensayo de actividad ppGalNAcT**

En el presente trabajo, para la obtención glicopéptidos conteniendo el antígeno Tn, se disponía de diversos lotes de las enzimas recombinantes ppGalNAcT2, T3 y T6 de origen humano, obtenidas como el sobrenadante del cultivo de células de insecto infectadas mediante el sistema de baculovirus (Freire 2011). En primera instancia nos propusimos ajustar las condiciones óptimas de transferencia de GalNAc a nuestros péptidos en escala analítica, para luego llevarlas a escalas semi-preparativas o preparativas. Para ello fue necesario poder determinar la actividad ppGalNAcT de las diferentes enzimas y de sus diversos lotes.

Por esto, se procedió a la optimización de un ensayo capaz de determinar la transferencia de GalNAc por parte de las ppGalNAcT, a través de la detección y cuantificación del antígeno Tn, utilizando como base un ensayo tipo ELISA. Para ello, se utilizó un anticuerpo monoclonal murino, denominado 83D4, específico para el antígeno Tn (Osinaga 2000). Asimismo, se utilizó como sustrato aceptor modelo la mucina submaxilar ovina deglicosilada químicamente con meta-periodato de sodio (dOSM). El contenido de antígeno Tn se expresó en Unidades Arbitrarias que se denominaron Unidades de Antígeno (UA) comparando la reactividad en ELISA de las muestras con una curva de diferentes concentraciones de asialo-OSM (aOSM), que se utilizó como estándar de Tn. Una UA se definió como la reactividad anti-Tn, correspondiente al valor de absorbancia a 492 nm, de una solución de 10 ng/mL de aOSM.

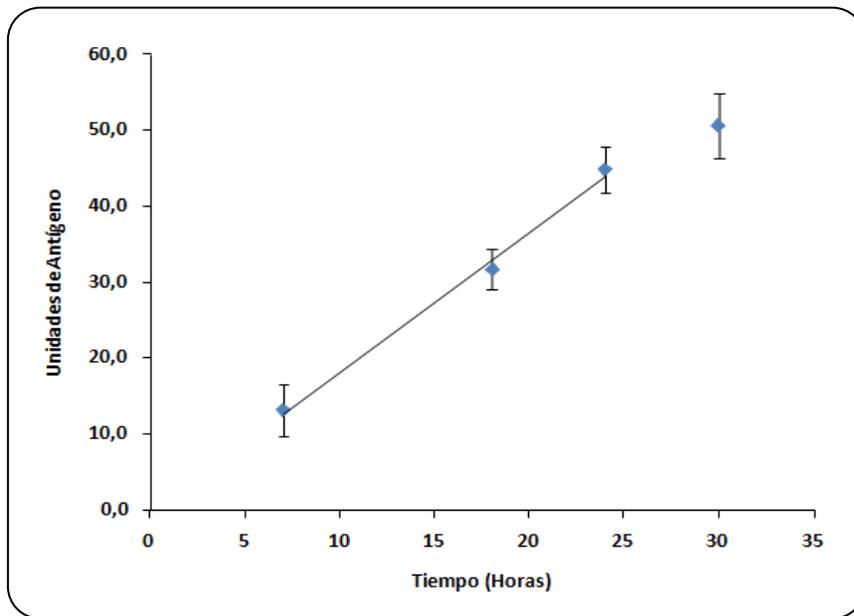
Se realizaron varios controles de la reacción de glicosilación de dOSM. Por un lado, se incubó una mezcla de reacción en las mismas condiciones pero en ausencia UDP-GalNAc, en la que no se dará la transglicosilación por ausencia del dador de GalNAc, razón por la que se utilizó como blanco para el cálculo de las UA. No se utilizó un control sin ppGalNAcT dado que el sobrenadante de cultivo en el que se encontraban las enzimas presentaba cierta reactividad en el ensayo de ELISA (Resultados no mostrados). Sin embargo, con el primer control descrito, se está controlando la reactividad de los sobrenadantes. Por otro lado, se llevó a cabo el ensayo sin del sustrato aceptor de GalNAc, en este caso dOSM, por lo que la reactividad con el anticuerpo anti-Tn de esta mezcla podría corresponder a la glicosilación propia de la enzima o de otros componentes proteicos presentes en el medio de cultivo en el que se encuentra la misma.

En una primera instancia se evaluó la transferencia de GalNAc variando la concentración de los sustratos dadores y aceptores de la enzima (UDP-GalNAc y dOSM). Para ello, diferentes concentraciones de cada uno se incubaron a 37°C con el mayor volumen de enzima posible (30 µL) durante 24 horas y en presencia de concentraciones fijas del otro sustrato, en un volumen final de 50 µL.



**Figura 7. Estudio de la influencia de la concentración de dOSM (a) y de UDP-GalNAc (b) en la transferencia de GalNAc a la dOSM.** Para realizar dichos estudios, se incubó ppGalNAcT2 con dOSM (20, 100 y 200 µg/mL) y UDP-GalNAc (1,0 – 4,0 mg/mL) en buffer de reacción durante 24 horas a 37°C. En a) se utilizó una concentración fija de UDP-GalNAc de 4 mg/mL, mientras que en b) la concentración de dOSM fue de 100 µg. \*Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre las condiciones indicadas.  $n=3$ .

En la Figura 7 se muestra que a partir de los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dOSM o de 3  $\text{mg}/\text{mL}$  de UDP-GalNAc, no se obtiene diferencias significativas en el grado de transferencia de GalNAc con respecto a las concentraciones mayores, por lo que podemos afirmar que a partir de esas concentraciones nos encontramos en condiciones de saturación. Por lo tanto, estas condiciones fueron las que se eligieron para realizar a continuación un estudio cinético, donde se midió la transferencia de GalNAc a diferentes tiempos. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 8, donde se puede ver que existe una relación lineal entre las Unidades de Antígeno y el tiempo entre las 6 y las 24 horas.



**Figura 8. Estudio cinético para la determinación del tiempo óptimo del ensayo de actividad.** 30  $\mu\text{L}$  de ppGalNAcT2 se incubaron con dOSM (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y UDP-GalNAc (3,0  $\text{mg}/\text{mL}$ ) en buffer de reacción a 37°C durante 6 a 32 horas. Se obtuvo linealidad entre el tiempo y las Unidades de antígeno entre las 6 y las 24 horas de reacción, con un  $R^2 = 0,9953$ .

Luego de estos ensayos se seleccionaron como condiciones óptimas para la determinación de la actividad ppGalNAcT:

- [dOSM] = 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- [UDP-GalNAc] = 3  $\text{mg}/\text{mL}$ .
- Tiempo de incubación: 24 horas.
- Se definió la *Unidad de Enzima* como la cantidad de enzima necesaria para obtener un cambio de 1 UA en 24 horas, en las condiciones del ensayo.

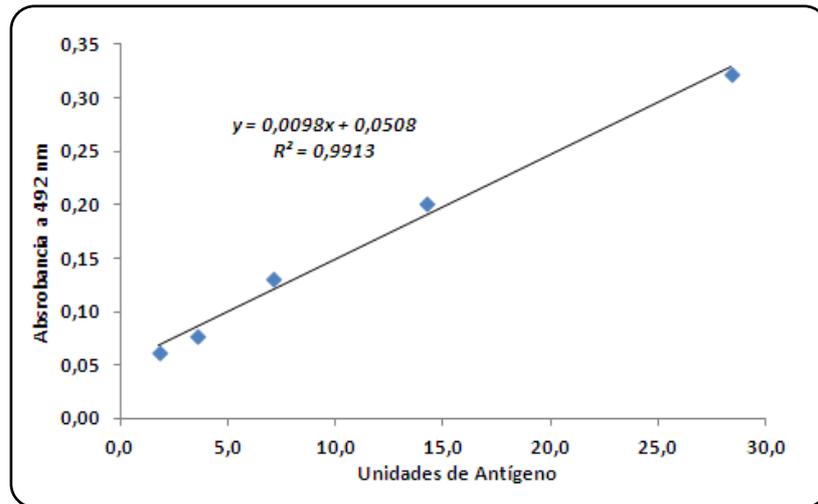
Si bien este método utiliza tiempos prolongados comparando con los utilizados en ensayos clásicos de actividad ppGalNAcT (Freire 2004), nos permitió contar en el laboratorio con un ensayo para estimar la actividad de los diversos lotes de las diferentes enzimas ppGalNAcT para luego poder optimizar la síntesis de glicopéptidos.

En la Tabla VI se muestra un ejemplo de determinación de la actividad ppGalNAcT, de diferentes lotes de enzimas disponibles en el laboratorio. La curva de calibración utilizada para calcular las unidades de antígeno de dicha determinación de actividad se muestra en la Figura 9. Como se observa en la Tabla VI los diversos lotes contenían diferente actividad ppGalNAcT y que, gracias a la puesta a punto del ensayo de actividad enzimática, fue posible tratarlos homogéneamente.

**Tabla VI. Determinación de la actividad ppGalNAcT de diferentes lotes de enzima.**

ppGalNAcT2 Lote I			ppGalNAcT2 Lote II			
	<i>Aprom</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>Aprom</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>
<b>Glicosilación</b>	0,574	0,598	0,550	0,395	0,402	0,388
<b>Control sin UDP GalNAc</b>	0,187	0,205	0,168	0,122	0,149	0,095
<b>Actividad</b>	<b>1141,3</b>	<b>UE/mL</b>	<b>Actividad</b>	<b>754,2</b>	<b>UE/mL</b>	
ppGalNAcT3 Lote I			ppGalNAcT3 Lote II			
	<i>Aprom</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>Aprom</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>
<b>Glicosilación</b>	0,370	0,384	0,356	0,408	0,48	0,336
<b>Control sin UDP GalNAc</b>	0,145	0,122	0,168	0,139	0,102	0,176
<b>Actividad</b>	<b>592,0</b>	<b>UE/mL</b>	<b>Actividad</b>	<b>740,7</b>	<b>UE/mL</b>	
ppGalNAcT6 Lote I			ppGalNAcT6 Lote II			
	<i>Aprom</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>Aprom</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>
<b>Glicosilación</b>	0,328	0,337	0,319	0,334	0,369	0,298
<b>Control sin UDP GalNAc</b>	0,134	0,140	0,127	0,144	0,106	0,181
<b>Actividad</b>	<b>488,9</b>	<b>UE/mL</b>	<b>Actividad</b>	<b>473,7</b>	<b>UE/mL</b>	

30 µL de cada enzima se incubaron durante 24 horas a 37°C con dOSM (100 µg/mL) y UDP-GalNAc (3 mg/mL) en Buffer de reacción, en un volumen final de 50 µL. Se muestran los datos de las enzimas sin diluir. Resultados similares de actividad se obtuvieron con diluciones de las mismas.



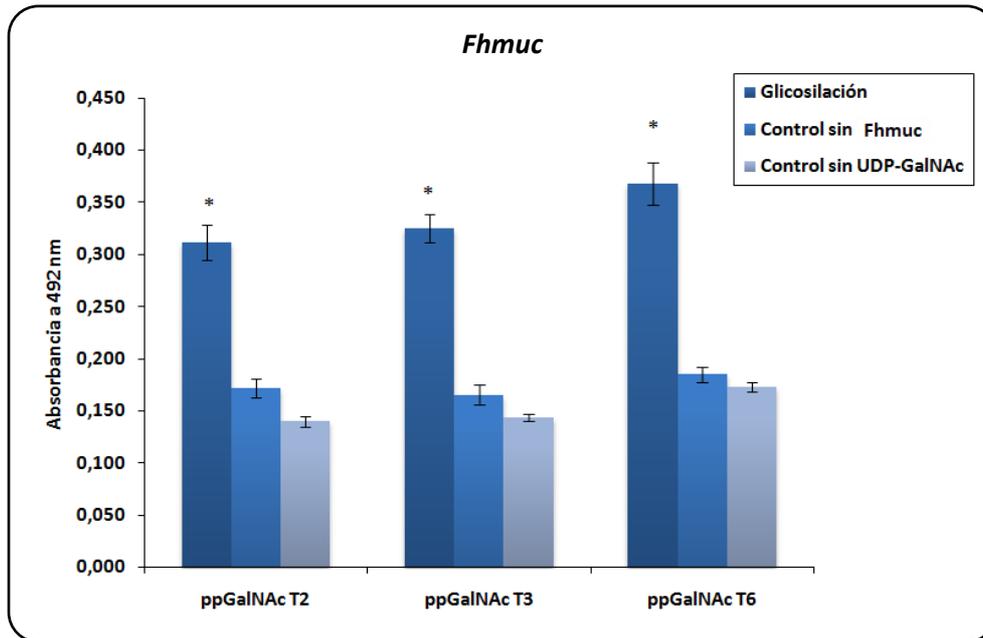
**Figura 9. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de Unidades de Antígeno.** Placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas durante toda la noche con 1  $\mu\text{g}$  de dOSM a temperatura ambiente. La detección del antígeno Tn se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4 específico anti-Tn, como se detalla en Materiales y Métodos. Se observó linealidad entre Absorbancia a 492 nm y las Unidades de antígeno hasta al menos 100 UA.

## 2. Síntesis de Glicopéptidos

### 2.1 Utilizando los péptidos Fhmuc y Egmuc

Para la producción de glicopéptidos se utilizaron como sustratos aceptores de GalNac dos péptidos sintéticos derivados de proteínas tipo mucina de origen parasitario: Fhmuc (*F. hepatica*) y Egmuc (*E. granulosus*), los que contienen 25 y 16 sitios potenciales de O-glicosilación, respectivamente, de acuerdo al algoritmo NetOGlyc (Julenius 2005). En ambos casos, se trabajó con suspensiones de ambos péptidos, dada su baja solubilidad en solución acuosa. De todas formas, se pudo observar que Fhmuc era más soluble que Egmuc.

En una primera instancia, se realizaron pruebas preliminares para verificar que dichos péptidos utilizados podían ser glicosilados por las enzimas ppGalNAcT que disponíamos en el laboratorio. Para ello, realizamos ensayos de glicosilación en condiciones analíticas, para posteriormente verificar la presencia del antígeno Tn mediante la técnica de ELISA, descrita previamente, observándose los resultados que se muestran en la Figura 10 y 13.

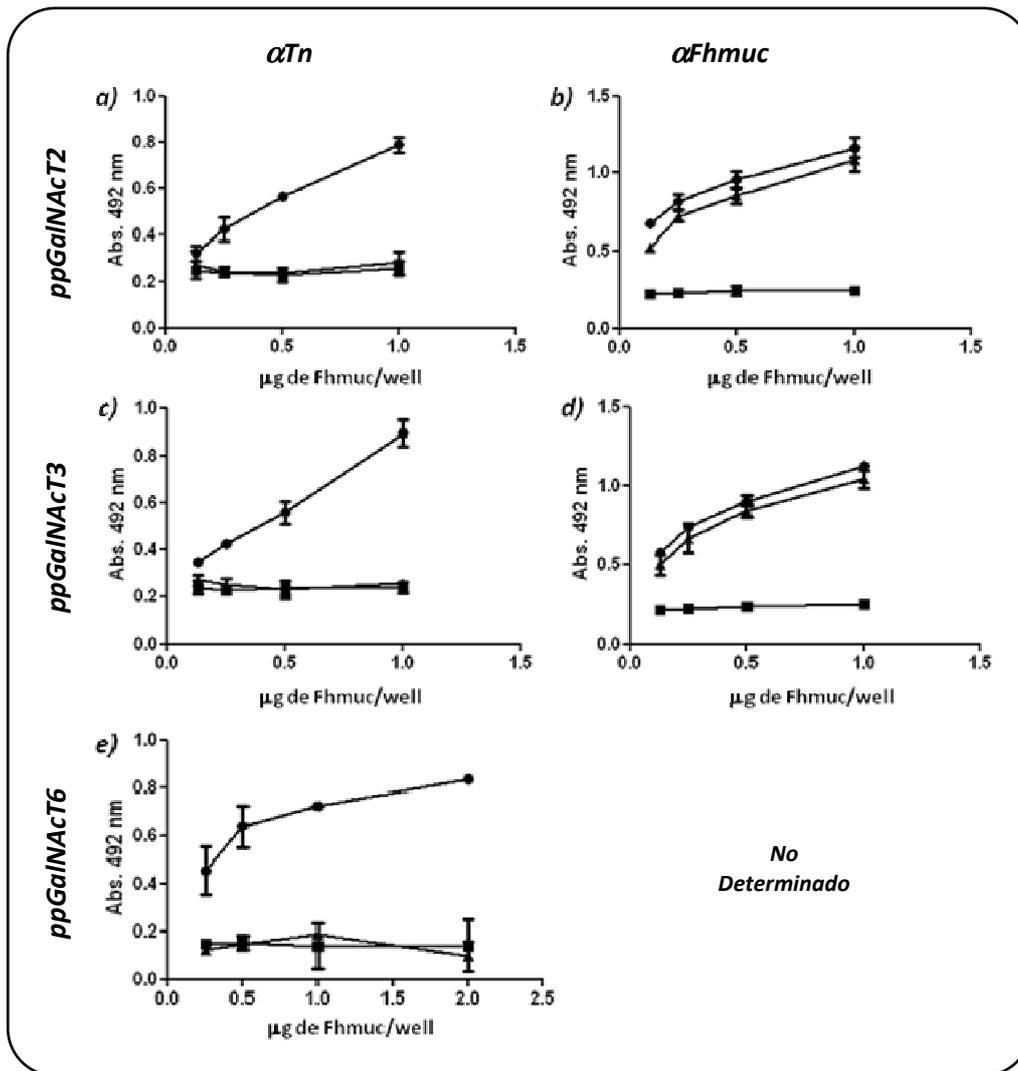


**Figura 10. Glicosilación de Fhmuc por diversas ppGalNAcT.** Para la glicosilación, 25 µg de Fhmuc se incubaron durante 24 horas a 37°C con 30 µL de enzima (ppGalNAcT2, T3 o T6) y un equivalente de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina en Buffer de reacción, con un volumen total de 50 µL. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 1 µg del (glico)péptido por pocillo e incubadas posteriormente con el anticuerpo monoclonal 83D4, como se describe en Materiales y Métodos.

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a los dos controles correspondientes;  $n=3$ .

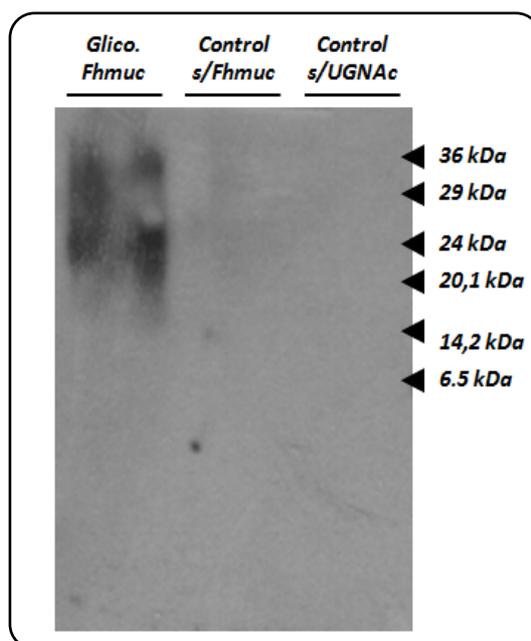
Se puede observar que el péptido Fhmuc fue glicosilado por las tres enzimas evaluadas. Dicha glicosilación se confirmó mediante ensayos utilizando distintas concentraciones de péptido (Figura 11) y Lectin Blot (Figura 12).

Se ve en la Figura 11 que cuando medimos la reactividad con el anticuerpo anti-Tn, ésta aumenta con cantidades crecientes de Fhmuc por pocillo en la reacción de glicosilación mientras que la reactividad de ambos controles (tanto sin péptido como sin donador de GalNAc) se mantienen constante, confirmando que se obtuvo transferencia de GalNAc. Asimismo, vemos que al determinar la presencia de Fhmuc, utilizando un suero policlonal específico contra el mismo, no se obtienen diferencias entre el péptido glicosilado y el control sin UDP-GalNAc, confirmando que en ambos se tiene la misma cantidad de péptido.



**Figura 11. Determinación del antígeno Tn en glicopéptidos Tn-Fhmuc obtenidos a partir de ensayos de glicosilación como los mostrados en la Figura 10 utilizando diferentes cantidades de péptido.** Se realizó la determinación de antígeno Tn (gráficos a, c y e) o Fhmuc (b y d) sensibilizando la placa de ELISA con cantidades crecientes de (glico)péptido. Se muestran los resultados obtenidos para las glicosilaciones con las diferentes enzimas (ppGalNAcT2, a y b; ppGalNAcT3, c y d; ppGalNAcT6, e). ● Glicosilación; ■ Control sin Fhmuc; ▲ Control sin UDP-GalNAc.

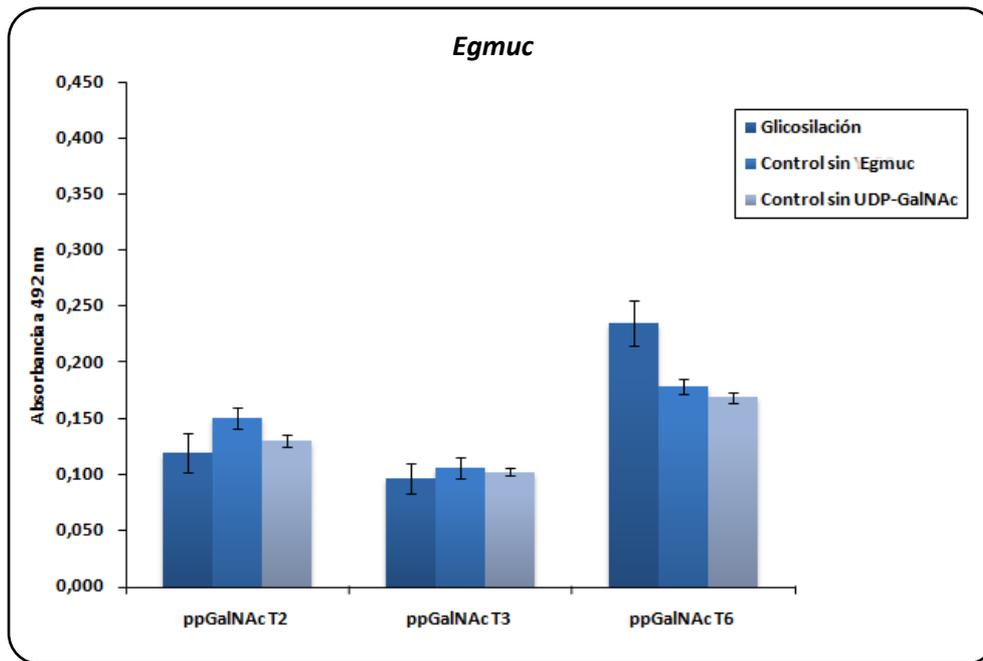
En el lectin blot se puede ver el “smear” característico de proteínas glicosiladas, dado la existencia de diferentes especies conteniendo el antígeno Tn. Resultados similares se obtuvieron para las restantes enzimas.



**Figura 12. Detección del antígeno Tn por Lectin Blot en glicopéptidos de Fhmuc utilizando la ppGalNACT2.** 10 µg de Fhmuc en la mezcla de reacción de las glicosilaciones mostradas e la Figura 10, fueron sembrados en un gel de acrilamida de 20%. Luego de la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, el revelado se realizó utilizando la lectina proveniente de *Vicia Villosa*, que reconoce específicamente el residuo GalNAc, como se describe en Materiales y Métodos.

En lo que respecta a la glicosilación del péptido Egmuc (Figura 13), podemos observar que el mismo no pudo ser glicosilado en las condiciones ensayadas, observándose que los niveles de glicosilación fueron similares a los obtenidos con los controles para las tres ppGalNACTs utilizadas (Figura 13). Esto podría deberse por un lado a la baja solubilidad del péptido en soluciones acuosa o, por otra parte, a que las enzimas no reconozcan como sustratos los sitios donde se encuentran los aminoácidos *O*-glicosilables (Serinas o Treoninas).

Como se observa en la Figura 14, ambos péptidos presentan una cola altamente hidrofóbica en un extremo. Esto nos hace pensar que la disposición espacial de los péptidos en solución favorecerá la unión de dichas zonas hidrofóbicas, dejando libre el resto del péptido hacia el exterior. Casualmente, sería esa parte del péptido que se expone a la solución donde se encontrarían los residuos *O*-glicosilables, por lo que, si la enzima es capaz de reconocerlos, en éstos se podrá agregar el antígeno Tn.



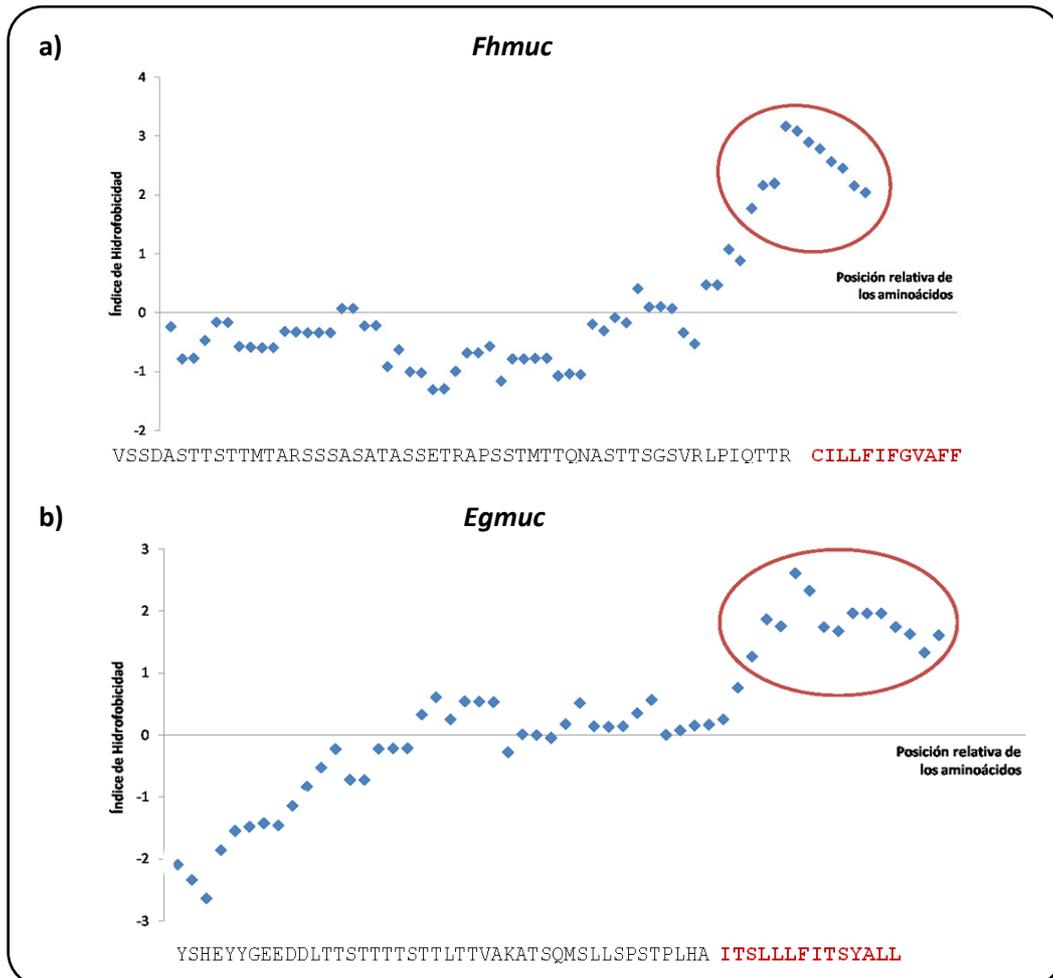
**Figura 13. Glicosilación de Egmuc por diversas ppGalNAcT.** Para la glicosilación 25 µg de Egmuc se incubaron durante 24 horas a 37°C con 30µL de enzima (ppGalNAcT2, T3 o T6) y un equivalente de UDP-GalNAc cada Serina+Treonina en Buffer de reacción, con un volumen total de 50 µL. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 1µg del (glico) péptido por pocillo e incubadas posteriormente con el anticuerpo monoclonal 83D4, como se describe en Materiales y Métodos. n=3.

## 2.2 Utilizando fragmentos de los péptidos Fhmuc y Egmuc.

Tanto Egmuc como Fhmuc presentan regiones hidrofóbicas que pueden afectar los niveles de glicosilación, en parte debido a la dificultad en el acceso de las ppGalNAcTs a los sitios de *O*-glicosilación, que estarían ocultos en el caso de que la proteína precipite en solución, como es el caso de ambos péptidos. Egmuc presenta muy baja solubilidad en solución acuosa, incluso a bajas concentraciones del mismo. Fhmuc, sin embargo, es parcialmente soluble en las condiciones de trabajo, lo que puede explicar que este péptido puede ser glicosilado.

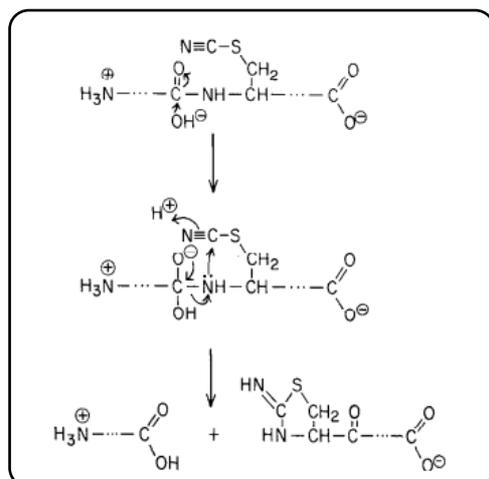
Resulta interesante entonces buscar condiciones que mejoren la solubilidad de ambos péptidos (como utilización de sistemas bifásicos con solventes orgánicos), con lo que mejoraría la accesibilidad de las ppGalNAcTs a los sitios potenciales de glicosilación y, de esta manera, se lograría glicosilar al péptido Egmuc y/o mejorar los niveles de glicosilación de Fhmuc. Para ello se intentó solubilizar ambos en diferentes solventes orgánicos como Cloroformo, Acetonitrilo o

Etanol, sin tener éxito. Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a realizar un análisis de la hidrofobicidad de ambos péptidos para poder diseñar estrategias que permitieran aumentar la solubilidad de los mismos. Esto nos permitió confirmar la presencia de zonas altamente hidrofóbicas en el extremo C-terminal de ambos péptidos (Figura 14). Dichas zonas se intentaron clivar de los péptidos respectivos mediante diferentes técnicas.



**Figura 14. Análisis de la hidrofobicidad de Fhmuc y Egmuc.** El mismo se realizó utilizando el software disponible on line ProtScale que utiliza el algoritmo de Kyte-Doolittle (<http://web.expasy.org/protscale>). En a) se muestra el correspondiente a Fhmuc, mientras que en b) el de Egmuc. Los círculos señalan zonas altamente hidrofóbicas.

Para el caso del péptido Fhmuc, la zona altamente hidrofóbica comienza con un residuo de cisteína, por lo que se seleccionó el método del Ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCB) que permite clivar péptidos en dicho aminoácido utilizando el mecanismo que se muestra en la Figura 15.



**Figura 15. Mecanismo de clivaje por el método del NTCB.** En primer lugar la reacción con el NTCB transforma el grupo tiol de la cisteína en un grupo tiocianato, el que en condiciones alcalinas propicia el clivaje. *Extraído de Jacobson 1973.*

Dicha digestión produciría los siguientes productos:

#### ***Fhmuc***

VSSDASTTSTMTARSSASATASSETRAPSSMTTQNASTTSGSVRLPIQTTRCILLFIFGVAFF

N° Aminoácidos: 66

Peso Molecular: 6786.5

pI teórico: 10.20

#### **Después del clivaje con NTCB**

##### *Cadena no modificada*

VSSDASTTSTMTARSSASATASSETRAPSSMTTQNASTTSGSVRLPIQTTR

N° Aminoácidos: 54

Peso Molecular: 5430.7 Da

pI teórico: 11.52

##### *Cadena modificada*

CILLFIFGVAFF

N° Aminoácidos: 12

Peso Molecular: 1415.7 Da

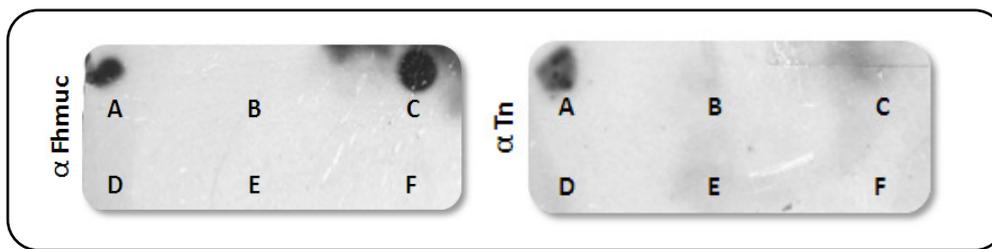
pI teórico: 5.52

*(del péptido sin la modificación)*

Así, se ensayaron diferentes condiciones para intentar escindir de Fhmuc la zona altamente hidrofóbica, combinando el NTCB con Urea y/o Ditiotreitól. Se intentó confirmar que había ocurrido la reacción mediante espectrometría de masa e isoelectroenfoque, sin que haya sido posible identificar los péptidos producidos por la digestión. Por MALDI-TOF, nos fue muy dificultoso poder identificar el péptido Fhmuc sin digerir, por lo que tampoco se pudo sacar conclusiones de los espectros de las diferentes digestiones. Por esto, intentamos recurrir a otra técnica aprovechando las diferencias de pI entre Fhmuc y sus productos de digestión, en particular la zona hidrofóbica, ya que el otro péptido generado presenta un pI cercano al de

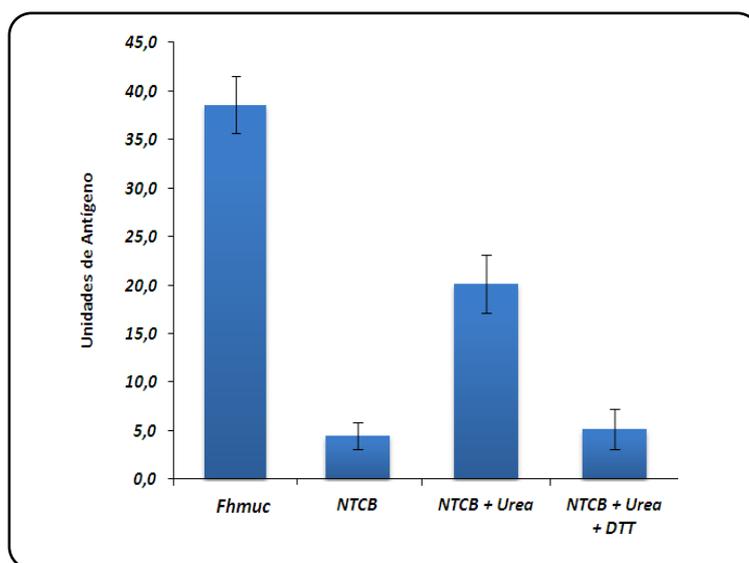
Fhmuc. Sin embargo, sólo se observó una banda a pl similar al de Fhmuc (Resultados no mostrados), lo que podría deberse al pequeño tamaño del péptido correspondiente a la zona hidrofóbica de Fhmuc, que podría dificultar la detección mediante tinción con plata, o a que la modificación que se agrega a dicho fragmento haya modificado su movilidad electroforética.

A pesar de no haber podido confirmar el clivaje de Fhmuc, se procedió a realizar glicosilaciones con los productos de los diferentes ensayos dializados contra PBS, y se las analizó mediante Dot Blot (Figura 16) y ELISA (Figura 17). En el Dot Blot se puede ver que únicamente aparece reactividad con el suero anti-Fhmuc en las reacciones que tienen Fhmuc no tratado con NTCB. Esto podría deberse a que la liberación de la zona hidrofóbica del péptido haya eliminado epítopes altamente inmunogénicos y que en el suero hayan pocos anticuerpos que reconozcan otras zonas de Fhmuc. Asimismo, en el Dot plot anti-Tn, utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4, vemos que únicamente aparece un spot en la glicosilación de Fhmuc pero no en ninguna de las otras condiciones ensayadas.



**Figura 16. Análisis mediante Dot Blot de la transferencia de GalNAc sobre los productos del tratamiento de Fhmuc con NTCB.** Luego de realizada la digestión con NTCB y posterior diálisis, según lo descrito en Materiales y Métodos, los productos de la reacción se trataron con ppGalNAcT2 y UDP-GalNAc. Para ello, diluciones equivalentes para cada una de las condiciones se incubaron con 30  $\mu$ L de ppGalNAcT2 y un equivalente de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina durante 24 horas a 37°C en buffer de glicosilación. Para el Dot Blot, 5  $\mu$ L de los productos de reacción se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa. La detección de Fhmuc se realizó utilizando un suero policlonal anti-Fhmuc, mientras que la presencia del antígeno Tn se analizó utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4. Se muestran Dot Blots de las glicosilaciones de Fhmuc (A), junto con el control sin Fhmuc (B) y el control sin UDP-GalNAc (C), al igual que las correspondientes a los productos de tratamientos con NTCB (D), NTCB + Urea (E) y NTCB + Urea + DTT (F).

Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante ELISA (Figura 17), donde se observó que la glicosilación de Fhmuc es la que da mayores unidades de antígeno Tn, mientras que glicosilaciones con los productos de reacción con NTCB dan un contenido de Tn mucho menor. En conclusión no obtenemos una mejoría en la glicosilación con el tratamiento con NTCB.



**Figura 17. ELISA para la detección del antígeno Tn en la reacción de glicosilación realizada con Fhmuc tratado con NTCB.** Se muestran los resultados obtenidos a partir de los ensayos de glicosilación mostrados en la Figura 16. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 1µg del (glico)péptido por pocillo e incubadas posteriormente con el anticuerpo monoclonal 83D4, como se describe en Materiales y Métodos. La presencia del antígeno se expresa en Unidades de Antígeno, comparando la Abs. a 492 nm de las muestras con una curva con diferentes concentraciones de aOSM, como la de a la Figura 9.

Por otro lado, para Egmuc se procedió a realizar el clivaje utilizando una proteasa específica: la tripsina, la cual hidroliza específicamente los enlaces peptídicos de los extremos carboxílicos de los aminoácidos Arginina y Lisina. Dado que Egmuc posee únicamente un residuo de Lisina y ninguno de Arginina, se obtendrían dos productos de digestión que serían los siguientes:

#### **Egmuc**

YSHEYEGEEDDLTTSTTTTSTLLTTVAKATSQMSLLSPSTPLHAITSLLLITSYALL

Nº Aminoácidos: 58

Peso Molecular: 6289.0

pI teórico: 4.49

#### **Luego de la digestión con Tripsina**

YSHEYEGEEDDLTTSTTTTSTLLTTVAK

Nº Aminoácidos: 28

Peso Molecular: 3116.2

pI teórico: 4.17

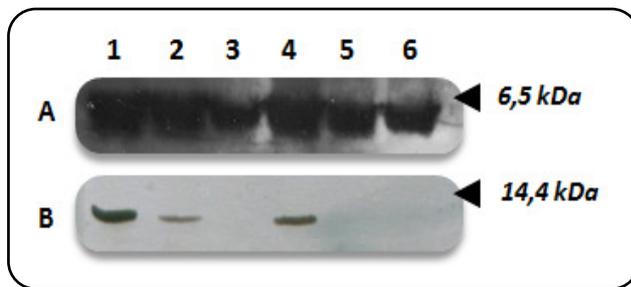
ATSQMSLLSPSTPLHAITSLLLITSYALL

Nº Aminoácidos: 30

Peso Molecular: 3190.7

pI teórico: 6.78

En la Figura 18 se muestran los resultados del análisis por Western Blot y SDS-PAGE para las diferentes condiciones de digestión utilizadas. Se puede ver una disminución de la banda correspondiente al péptido Egmuc, lo que nos sugiere que se estaría produciendo el clivaje. Sin embargo, no se observó una aparición de bandas correspondiente a los productos de digestión, de aproximadamente 3 kDa. Probablemente esto se deba a que los mismos son de muy poco tamaño, lo que produzca que el anticuerpo utilizado en el Western Blot no sea capaz de reconocer dichos productos y que la tinción por plata del SDS-PAGE no sea lo suficientemente sensible como para detectar fragmentos tan cortos a la concentración utilizada.



**Figura 18. Análisis de digestiones de Egmuc con tripsina por Western Blot (A) y SDS-PAGE (B).**

1) Egmuc; 2) Egmuc + Tripsina 30 mg/mL; 3) Egmuc + Tripsina 120 mg/mL; 4) Egmuc + Urea 0,7 M; 5) Egmuc + Tripsina 30 mg/mL + Urea 0,7 M; 6) Egmuc + Tripsina 120 mg/mL + Urea 0,7 M.

Al igual que para Fhmuc, y a pesar de los resultados obtenidos, se realizaron glicosilaciones con los diversos productos de las digestiones pero en ninguno de los casos se detectó glicosilación (resultados no mostrados). Debido a que no se logró glicosilar dicho péptido en ninguna de las condiciones evaluadas, se diseñó un péptido sintético de 40 aminoácidos, derivado de Egmuc pero sin la zona altamente hidrofóbica (representadas con un círculo en la Figura 13). El mismo, denominado Egmuc2, posee la siguiente secuencia:

#### **Egmuc2**

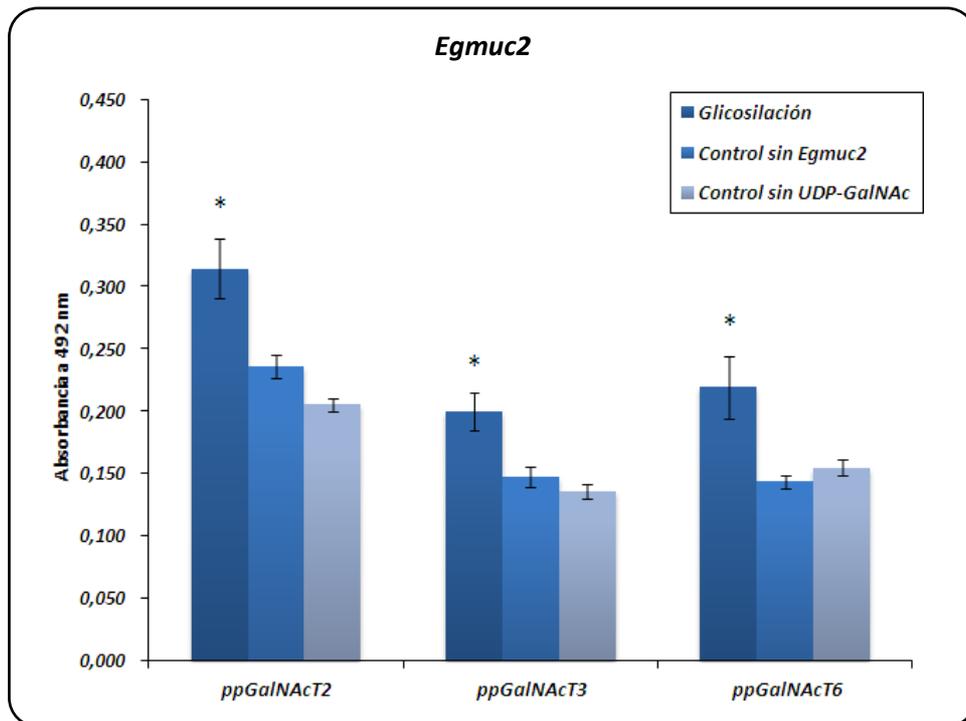
GEEDDLTSTTTTSTLLTVAKATSQMSLLSPSTPLHAIT

N° Aminoácidos: 40

Peso Molecular: 4110.5 Da

pI teórico: 4.31

Este péptido resultó ser soluble en el rango de concentraciones que se utilizaron durante este trabajo (de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), por lo que esperábamos obtener mejores resultados en la glicosilación si es que la solubilidad era el problema que impedía la glicosilación de Egmuc. Por esto, se realizaron ensayos de glicosilación con las diferentes enzimas en las condiciones utilizadas previamente con Egmuc, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 18.



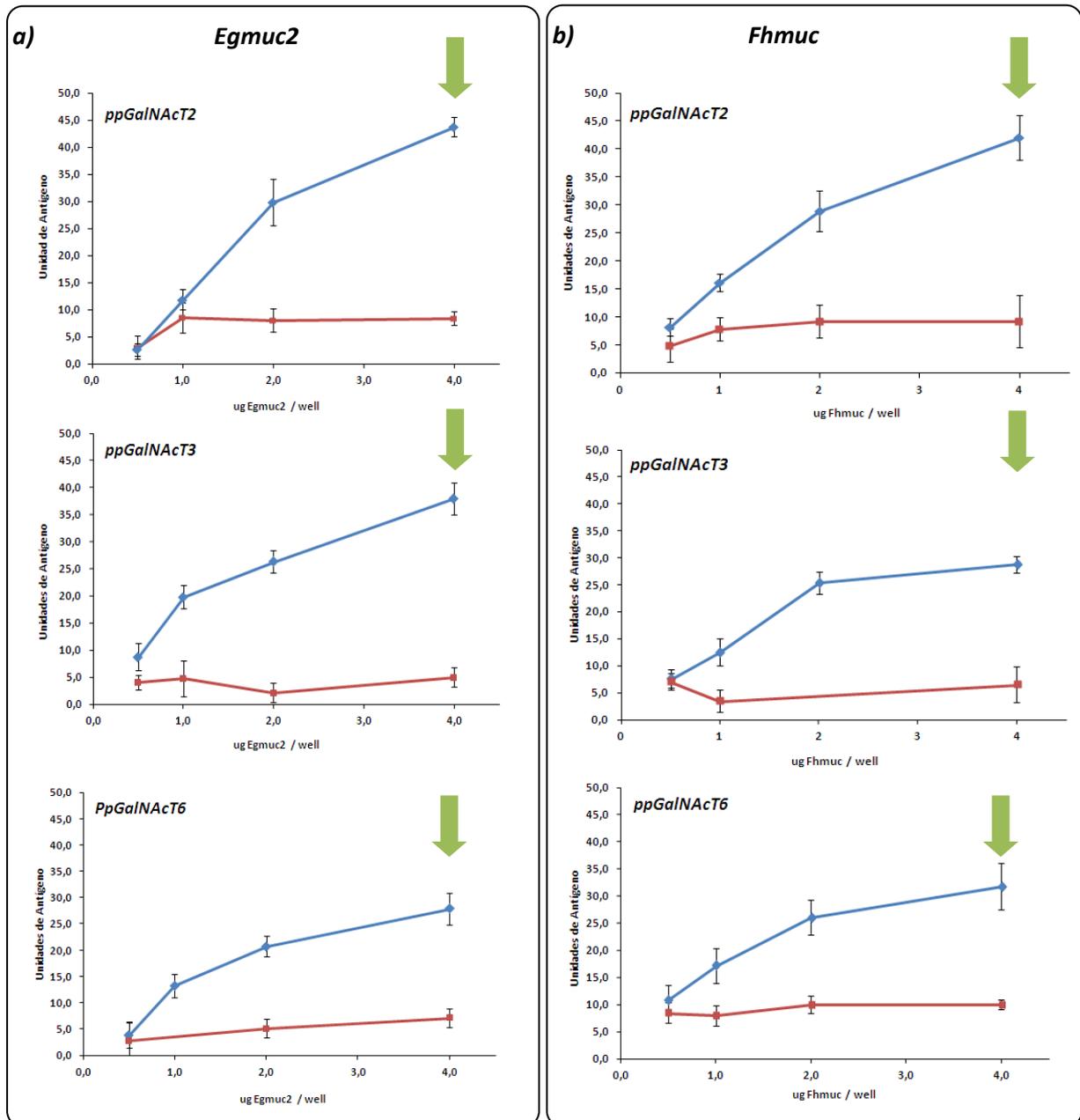
**Figura 19. Glicosilación de Egmuc2 por las diversas ppGalNAcT.** Para la glicosilación, 25 µg de Egmuc2 se incubaron durante 24 horas a 37°C con 30 µL de enzima (ppGalNAcT2, T3 o T6) y un equivalente de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina en Buffer de reacción, con un volumen total de 50 µL. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 1 µg del (glico)péptido por pocillo e incubadas posteriormente con el anticuerpo monoclonal 83D4, como se describe en Materiales y Métodos.

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a los controles;  $n=2$ .

Se obtuvieron mayores niveles de glicosilación que para el caso de Egmuc, encontrándose diferencias significativas con los controles respectivos (Figura 19). Esto nos pone de manifiesto que la baja solubilidad de Egmuc en solución acuosa, producto de la región altamente hidrofóbica, la responsable de impedir que la reacción de transglicosilación ocurra.

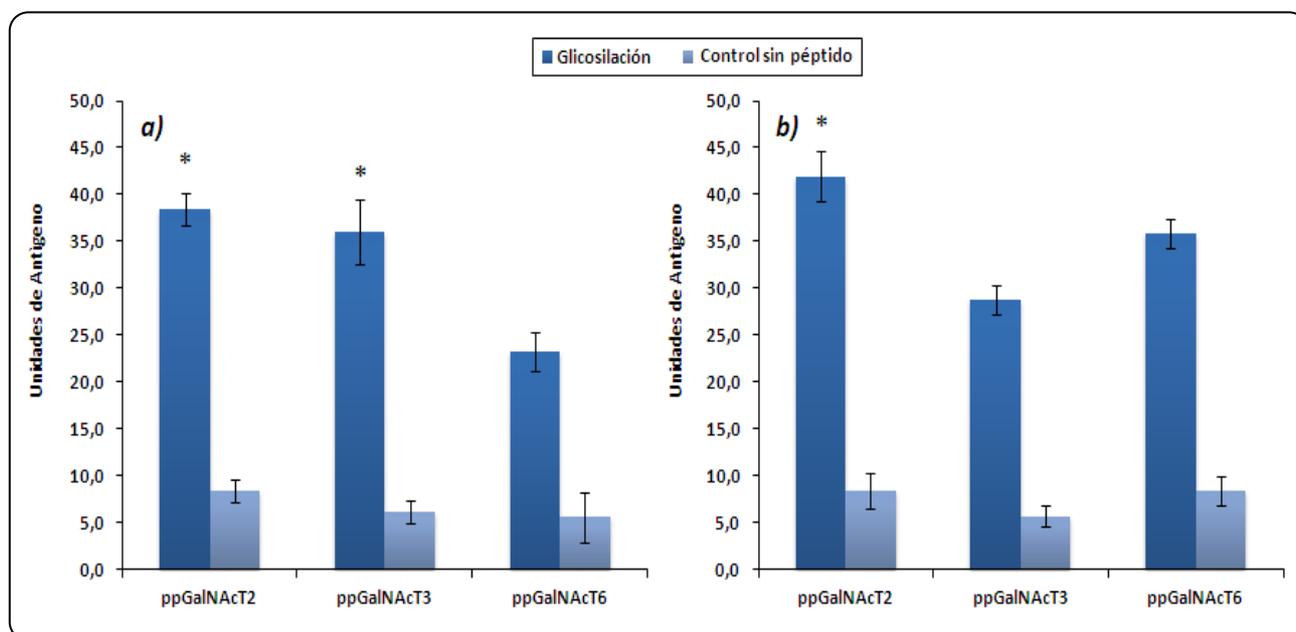
### 2.3 Caracterización de la glicosilación de Fhmuc y Egmuc2.

Una vez comprobado que tanto Egmuc2 como Fhmuc pueden ser glicosilados por las tres enzimas utilizadas, se procedió a realizar una glicosilación calculando la cantidad de Unidades de Antígeno obtenidos utilizando 15 Unidades de Enzima totales en cada uno de los ensayos, determinadas con el método optimizado anteriormente (Figura 20).



**Figura 20. Determinación de la transferencia de GalNAc a los péptidos Egmuc2 y Fhmuc utilizando 15 UE Totales.** Para la glicosilación, 25 µg de Egmuc2 (a) o Fhmuc (b) se incubaron durante 24 horas a 37°C con 15 UE de enzima (según el ensayo optimizado en el punto 1 de Resultados) y un equivalente de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina en Buffer de reacción. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 1 µg del (glico)péptido por pocillo e incubadas posteriormente con el anticuerpo monoclonal 83D4, como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de antígeno Tn se expresa en Unidades de Antígeno, comparando la Abs. a 492 nm de las muestras con una curva de calibración con diferentes concentraciones de aOSM, utilizando como blanco el control sin péptido. ● Glicosilación ● Control sin péptido.

Si tenemos en cuenta los datos correspondientes a la sensibilización de las placas de ELISA con 4  $\mu$ g de Egmuc2 por pocillo (como se muestra en la Figura 20 con una flecha), podemos ver que las enzimas que transfirieron mayores equivalentes de GalNAc, detectados con el anticuerpo monoclonal 83D4, fueron la ppGalNAcT2 y la ppGalNAcT3, no encontrándose diferencias significativas en el contenido del antígeno Tn en ambas reacciones de glicosilación, aunque ambas dieron mejores niveles que la ppGalNAcT6 (Figura 21a). En cambio, para Fhmuc, la ppGalNAcT2 fue la que produjo mayores niveles de glicosilación del péptido, encontrándose diferencias significativas al comparar con las glicosilaciones con las otras enzimas (Figura 21b).



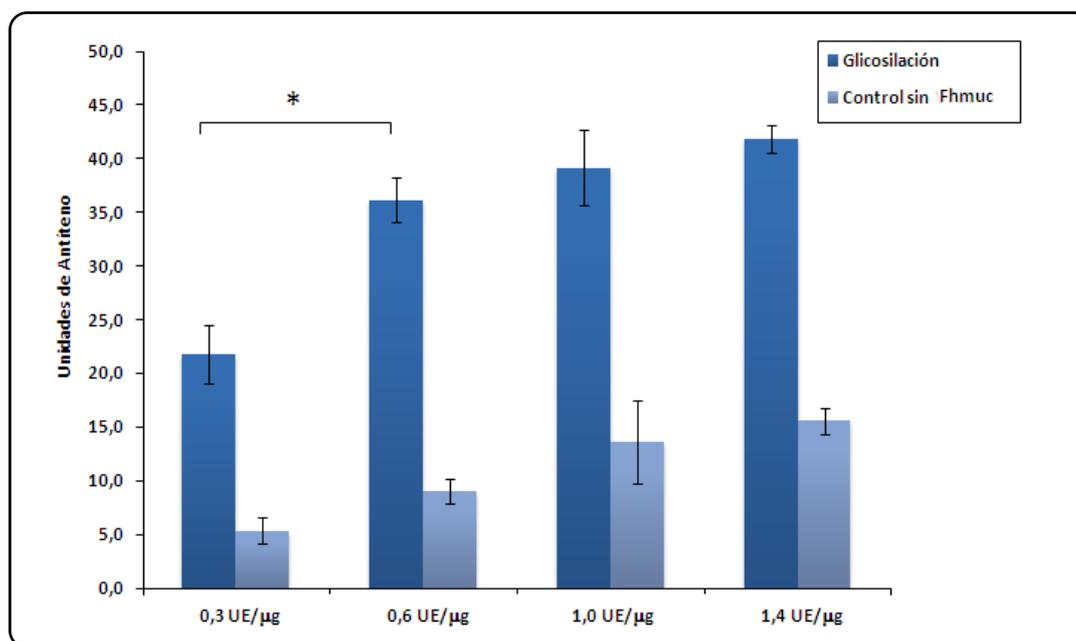
**Figura 21. Unidades de antígeno Tn de las glicosilaciones obtenidas utilizando 15 UE totales de las diferentes enzimas.** Se toman los datos en el punto de 4  $\mu$ g de Egmuc2 (a) o Fhmuc (b) por pocillo, de las glicosilaciones mostradas en la Figura 20. \* Diferencia significativa respecto a las glicosilaciones de las otras enzimas ( $p < 0,05$ );  $n = 3$ .

Además, en la Figura 21 se puede observar que se obtuvo niveles similares de Unidades de antígeno en las glicosilaciones de ambos péptidos. Este hecho que resulta curioso si tenemos en cuenta que Egmuc2 es de menor tamaño que Fhmuc y que se sensibilizaron los pocillos con el volumen correspondiente a la misma masa de ambos péptidos (4  $\mu$ g), por lo que habría presente mayor cantidad de moléculas de Egmuc2. A pesar de su menor cantidad de sitios O-glicosilables que Fhmuc, de existir el mismo reconocimiento de ambos péptidos por las ppGalNAcT y por lo tanto la misma proporción de sitios glicosilados respecto al total, se estaría presentando mayor cantidad de antígeno Tn en el glicopéptido Tn-Egmuc2, respecto al de Tn-

Fhmuc. Sin embargo, ésto no se ve reflejado en nuestros resultados, lo que podría deberse a una adsorción diferencial de ambos péptidos a la placa de ELISA o a mejores niveles de glicosilación de Fhmuc, ya sea por poseer presencia mayor cantidad de sitios potenciales de O-glicosilación (25 para Fhmuc y 19 para Egmuc2) y/o por un mayor reconocimiento por parte de las ppGalNACT.

### 3. Optimización de la síntesis de Tn-Fhmuc

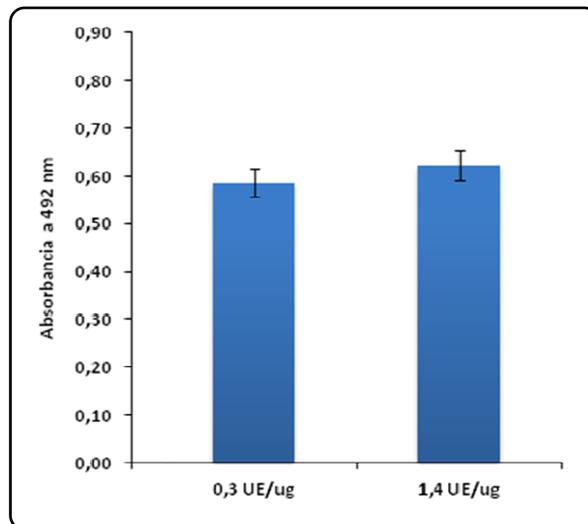
Dado que la ppGalNACT2 fue la enzima más eficiente en glicosilar Fhmuc, y que además los lotes de esta enzima eran los que mayor actividad presentaban, se procedió a buscar las condiciones óptimas para la síntesis de Tn-Fhmuc utilizando dicha enzima. En una primera instancia se estudió la influencia de la relación enzima/sustrato en la glicosilación. Para ello, diferente cantidad de Unidades de Enzima ppGalNACT2 se incubaron con la misma cantidad de péptido durante 24 horas, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, y se procedió a determinar el contenido del antígeno Tn.



**Figura 22. Estudio de la influencia de la relación enzima/sustrato en la síntesis de Tn-Fhmuc.**

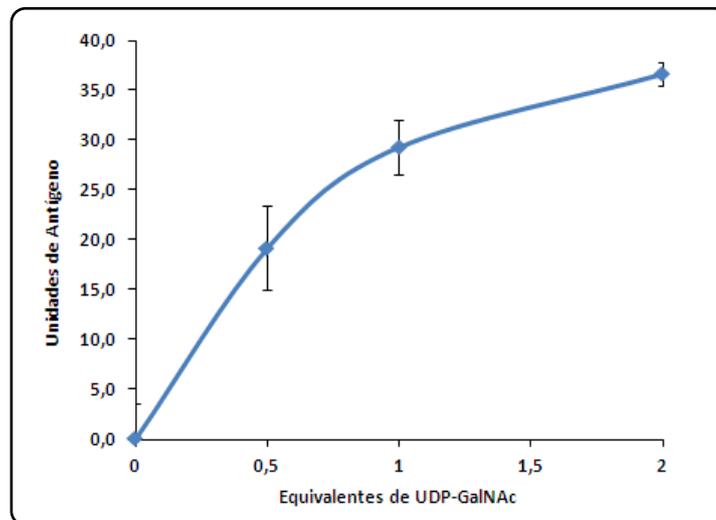
Para la glicosilación, 25 μg de Fhmuc se incubaron durante 24 horas a 37°C con diferentes cantidades de enzima y un equivalente de UDP-GalNac por cada Serina+Treonina en Buffer de reacción. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 2 μg del (glico)péptido por pocillo y utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4. La presencia del antígeno Tn se expresa en Unidades de Antígeno, según se describió anteriormente. \* Diferencia significativa entre las dos relaciones enzima/sustrato señaladas ( $p < 0,05$ );  $n=2$ .

Los resultados se muestran en la Figura 22, donde se puede observar que, dentro de las condiciones ensayadas, no se obtienen diferencias significativas en los niveles de glicosilación a una relación enzima/sustrato mayor a 0,6 UE/ $\mu$ g. Sin embargo, se puede apreciar un aumento significativo en las Unidades de Antígeno del control sin Fhmuc, lo que puede deberse a un aumento de la glicosilación de la propia enzima o de proteínas presentes en el sobrenadante de donde se obtuvo la misma. Dado que este punto puede dificultar la posterior purificación, se optó por seguir trabajando con una cantidad de enzima de 0,6 UE/ $\mu$ g. Teniendo en cuenta que la utilización de mayor cantidad de enzima puede interferir en la capacidad de adsorción del péptido a la placa de ELISA por la presencia de una mayor concentración de otras proteínas en las mezclas de reacción, se midió mediante la misma técnica la presencia de Fhmuc en las diferentes fracciones (Figura 23). Como se puede observar, no existen diferencias significativas en la detección del péptido para dos relaciones enzima/sustrato, por lo que no existirían cambios en los niveles de adsorción del (glico)péptido a la placa entre una relación enzima/sustrato de 0,6 y 1,4 UE/ $\mu$ g de péptido. En consecuencia, los resultados de la Figura 22 podrían deberse a la saturación de la transferencia de GalNAc a Fhmuc y no una adsorción diferencial del (glico)péptido.



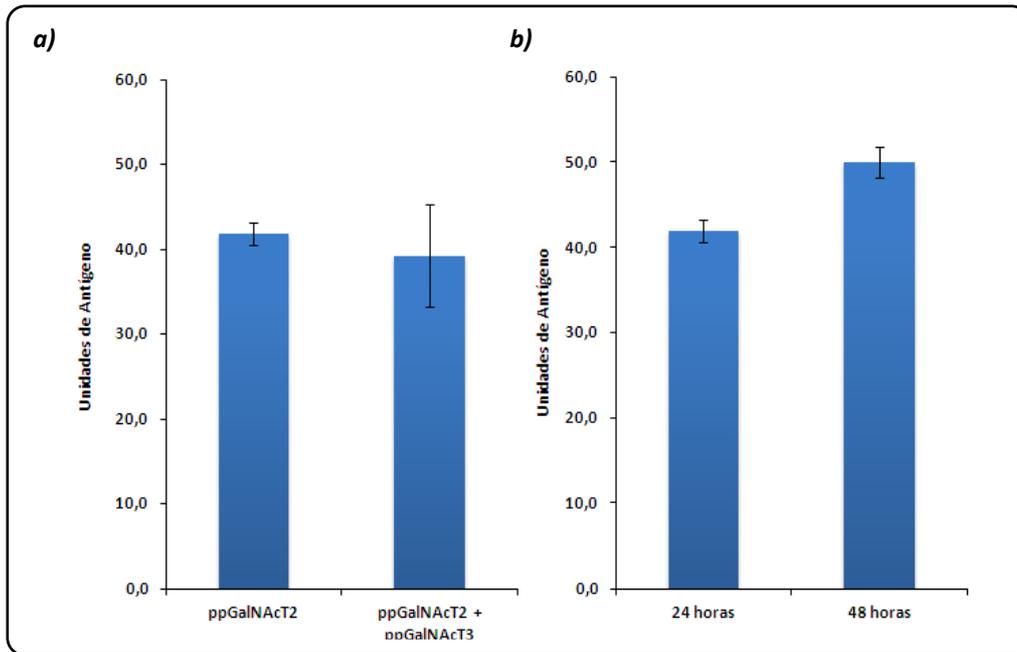
**Figura 23. Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-Fhmuc en los productos de las glicosilaciones utilizando 0,3 y 1,4 UE/ug de péptido.** La detección de Fhmuc se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 1  $\mu$ g del (glico)péptido por pocillo y utilizando un suero policlonal anti-Fhmuc. \*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a las otras condiciones.

Se pasó luego a determinar el número óptimo de equivalentes de UDP-GalNAc por número de Serinas y Treoninas utilizando una relación enzima/sustrato de 0,6 UE/ $\mu$ g de Fhmuc (Figura 24). Se puede ver que la curva sugiere que a partir de 2 equivalentes de UDP-GalNAc se comienza a estabilizar la cantidad de Unidades de Antígeno obtenidas, por lo que dicha condición fue seleccionada como óptima para el ensayo de glicosilación a escala semi-preparativa. Para confirmar este resultado, podríamos repetir el ensayo utilizando mayores concentraciones de UDP-GalNAc.



**Figura 24. Estudio de la síntesis de Tn-Fhmuc a diferentes equivalentes de UDP-GalNAc por Serina+Treonina.** Para la glicosilación, 25  $\mu$ g de Fhmuc se incubaron durante 24 horas a 37°C con 0,6 UE/ $\mu$ g de péptido (15 UE totales) y diferentes equivalentes de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina (entre 0 y 2 eq.) en Buffer de reacción. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 2  $\mu$ g del (glico)péptido por pocillo y utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4. La presencia del antígeno Tn se expresa en Unidades de Antígeno, según se describió anteriormente.

Por último, se realizaron glicosilaciones a dos tiempos diferentes (24 y 48 horas), al igual que se realizaron ensayos combinando 0,6 UE/ $\mu$ g tanto de ppGalNAcT2 como de ppGalNAcT3. En ninguno de los dos casos se obtuvieron mejorías apreciables respecto a las condiciones ensayadas anteriormente (Figura 25).



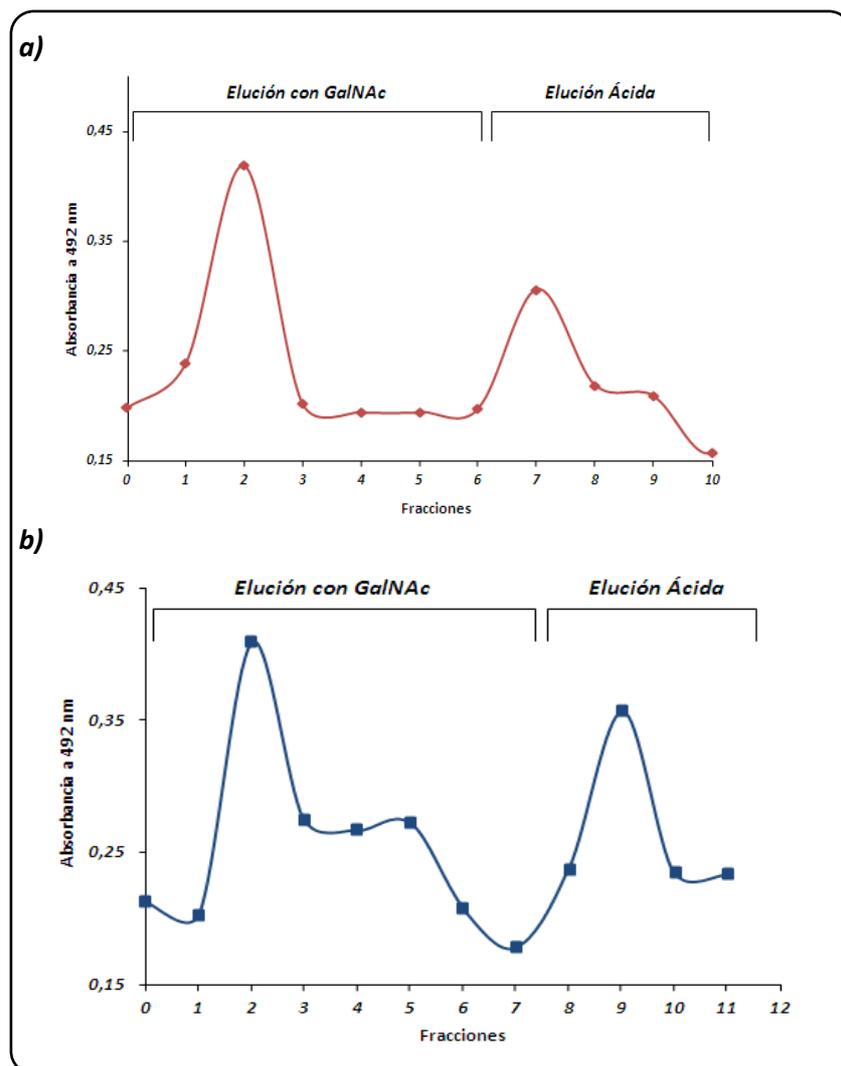
**Figura 25. Glicosilaciones de Fhmuc combinando enzimas (ppGalNAcT2 y T3) o ensayando diferentes tiempos de incubación (24 o 48 horas).** a) Ensayo de glicosilación de Fhmuc (25 µg) utilizando 2eq. de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina y 30 UE Totales, ya sea la ppGalNAcT2 sola o en combinación con ppGalNAcT3 (15 UE de cada enzima), durante 24 horas a 37°C. b) En las mismas condiciones, pero utilizando únicamente ppGalNAcT2, la reacción de glicosilación se incubó durante 24 o 48 horas. La detección del antígeno Tn se realizó por ELISA en placas sensibilizadas con 2 µg del (glico)péptido por pocillo y utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4.

Estos ensayos nos permitieron seleccionar las mejores condiciones dentro de las ensayadas, para la realización de glicosilaciones semi-preparativas, que se realizaron utilizando 2 equivalentes de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina, una relación enzima/sustrato de 0,6 UE/µg de ppGalNAcT2 e incubación durante 24 horas a 37 °C.

#### **4. Producción semi-preparativa y purificación de glicopéptidos**

Una vez seleccionadas las mejores condiciones dentro de las evaluadas, se procedió a realizar una síntesis semi-preparativa de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2, a partir de la cual se purificaron dichos glicopéptidos. Para ello se realizó una cromatografía de afinidad utilizando la lectina de *Helix Pomatia* (HPA), que reconoce específicamente residuos de GalNAc terminal, inmovilizada en soportes de agarosa. La elución se realizó tanto por competencia con GalNAc como por cambio de pH, y se siguió mediante ensayo de ELISA, de la misma forma que los ensayos de glicosilación.

En la Figura 26 se muestran los diagramas de elución correspondientes a la purificación de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2, donde se observa en ambos casos la aparición de esencialmente dos picos, uno durante elución por competencia y otro durante la elución ácida. Esto seguramente se deba a la existencia de glicopéptidos con diferente grado de glicosilación y que, por lo tanto, aquellas con mayor contenido de antígeno Tn se unen con una avidéz mayor a la columna de HPA-Agarosa, necesitando condiciones más drásticas para su elución.



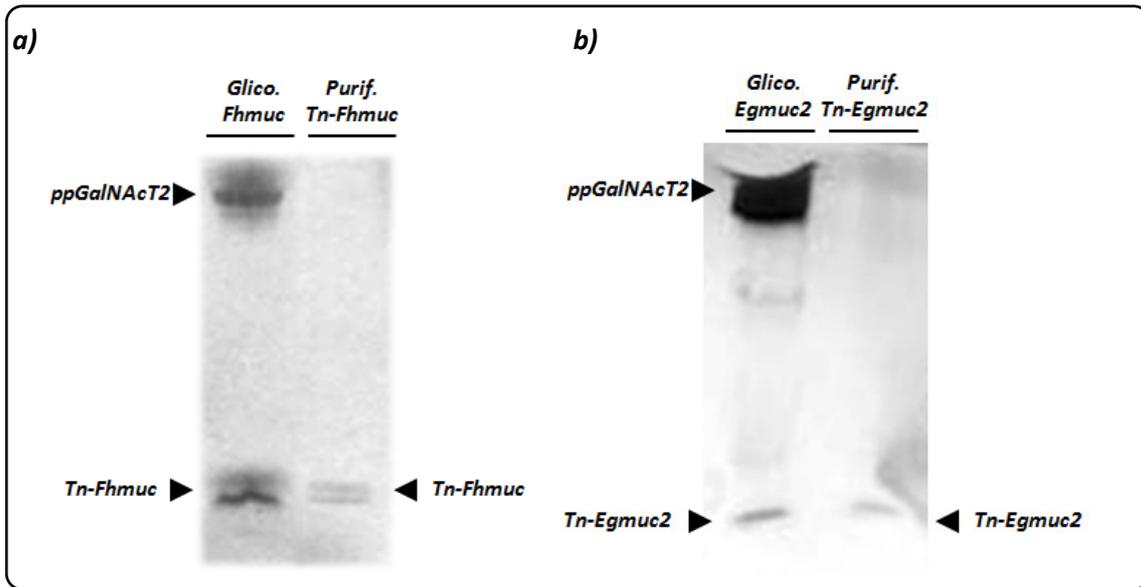
**Figura 26. Diagrama de elución de las purificaciones de Tn-Fhmuc (a) y Tn-Egmuc2 (b).** Se incubó durante 24 horas a 37°C 250 µg de Fhmuc o Egmuc2 con ppGalNACT2 (0,6 UE/µg de péptido) en presencia de dos equivalentes de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina. Para la purificación, se utilizó como adsorbente de afinidad una columna de HPA-Agarosa, y se eluyó con competencia, con 50 mM de GalNAc, seguida de cambio de pH a 2,5.

Dada la poca solubilidad de Fhmuc en solución acuosa, se obtuvo un precipitado en la glicosilación, por lo que para proceder con la purificación se centrifugó para sedimentar al (glico)péptido precipitado y se purificó a partir del sobrenadante. El pellet que se obtuvo, se disolvió nuevamente en PBS para realizar la purificación a partir de él, ya que se observó que tanto el sobrenadante como el pellet contenían similar cantidad de contenido Tn, medido por ELISA.

Se hizo un pool con aquellos eluidos en los que se encontró contenido de Tn, se dializó contra agua destilada para quitar de la solución la GalNAc o las sales del eluyente ácido, y se liofilizó. Se determinó la cantidad de proteína en el liofilizado y se calculó el rendimiento de la reacción de glicosilación, el cual fue del **79%** para **Tn-Fhmuc** y del **30%** para **Tn-Egmuc2**. Es interesante notar que si bien aquí se calcula el rendimiento a través de la proteína presente, la mejor forma de hacerlo sería a través de la cantidad de antígeno Tn determinada por espectrometría de masa (equivalentes de GalNAc/equivalentes de péptido). En nuestro caso, si bien podríamos determinar las UA en el producto de la glicosilación y en el glicopéptido puro, esto no nos serviría para el cálculo del rendimiento, ya que la adsorción del glicopéptido a la placa de ELISA se podría ver afectada por la presencia de la enzima.

Las diferencias de rendimiento en la obtención de Tn-Fhmuc y de Tn-Egmuc2 resultan curiosas, dado que en un planteo inicial considerábamos la baja de solubilidad de Fhmuc como un problema para la obtención de Tn-Fhmuc, por lo que esperábamos obtener mejores resultados con Egmuc2 (soluble en el rango de concentraciones utilizadas, de 0,5 a 25 mg/mL). Éstas diferencias pueden deberse o bien a la síntesis de los glicopéptidos o bien a la purificación de los mismos. Ya se discutió anteriormente los datos de la Figura 20, que nos sugieren que la glicosilación de Fhmuc es mayor que la de Egmuc2, siendo ésta una razón que nos explicaría el mayor rendimiento de obtención de dicho glicopéptido.

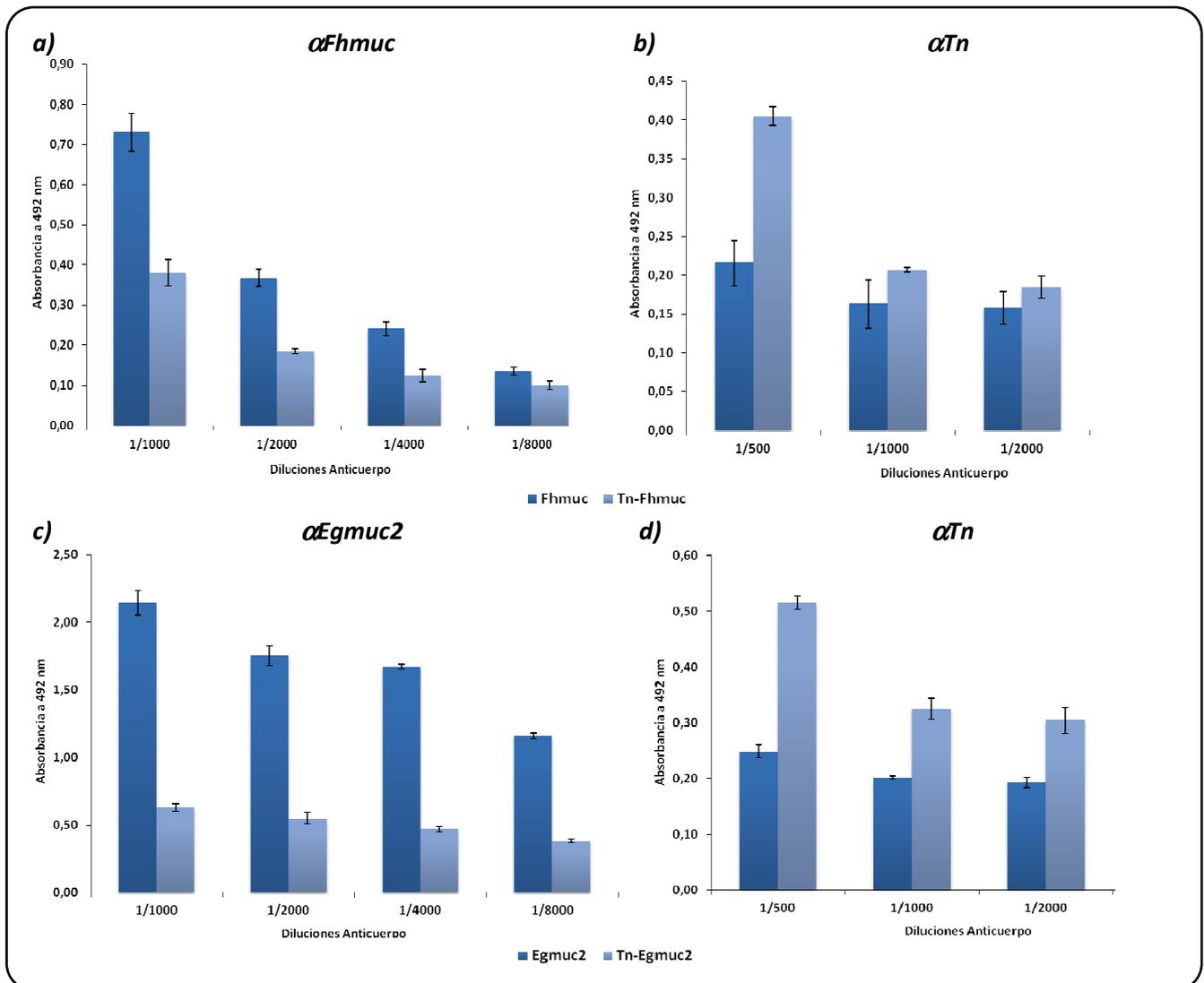
La estrategia utilizada nos permitió obtener ambos glicopéptidos, cuya pureza se verificó mediante SDS-PAGE con tinción de plata (Figura 27). La caracterización tanto de Tn-Fhmuc como de Tn-Egmuc2 se encuentra en proceso y se realizará mediante espectrometría de masa, lo cual nos permitirá determinar la cantidad de residuos de GalNAc presentes en cada uno de ellos.



**Figura 27. SDS-PAGE de los productos de las reacciones de glicosilación y de los glicopéptidos purificados.** La glicosilación semi-preparativa consistió en la incubación durante 24 horas a 37°C de 250 µg de Fhmuc (a) o Egmuc2 (b) con ppGalNAcT2 (0,6 UE/µg de péptido) en presencia de dos equivalentes de UDP-GalNAc por número de Serina+Treonina. La purificación de los glicopéptidos se realizó por cromatografía de afinidad utilizando la lectina de *Helix Pomatia* inmovilizada en geles de agarosa. Los eluidos que eran reconocidos por el anticuerpo monoclonal 83D4 se juntaron, se dializaron contra agua destilada y se liofilizaron. La corrida electroforética se realizó en un equipo PhastSystem, utilizando geles homogéneos del 20% y posteriormente se reveló mediante tinción con plata.

### 5. Antigenicidad de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2

La antigenicidad de ambos glicopéptidos fue analizada por ELISA usando el anticuerpo monoclonal 83D4 para la detección del antígeno Tn y sueros policlonales específicos de los péptidos Fhmuc y Egmuc. En la Figura 28 se puede observar que los péptidos no glicosilados fueron mejor reconocidos por sueros policlonales anti-Fhmuc y anti-Egmuc que los correspondientes glicopéptidos cuando se utilizan sueros anti-péptido.



**Figura 28. Reconocimiento de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2 por anticuerpos anti-Tn y anti-péptidos.** Se realizó un ensayo tipo ELISA en el que los pocillos se sensibilizaron con 2  $\mu$ g de glicopéptidos purificados o con 2  $\mu$ g de los péptidos sin glicosilar. En la detección de los péptidos se utilizó un suero de conejo anti-Fhmuc (a) y un suero policlonal de ratón anti-Egmuc2 (c). Para la detección del contenido de antígeno Tn se utilizó el anticuerpo monoclonal 83D4 (b) para Fhmuc/Tn-Fhmuc; (d) para Egmuc2/Tn-Egmuc2).

Probablemente, este efecto sea producto de una disminución de la accesibilidad al esqueleto peptídico producido por la presencia de los residuos de GalNAc. Este efecto es especialmente importante para el caso de Egmuc2 y Tn-Egmuc2, donde parece perderse casi totalmente el reconocimiento de este último por los anticuerpos anti-péptido. Esto resulta razonable considerando por un lado la diferencia de tamaño entre Egmuc2 y Fhmuc, que podrían permitir al glicopéptido de este último exponer mejor epítopes peptídicos. Por otro lado, si bien ambos presentan la misma proporción de sitios O-glicosilables, en Egmuc2 éstos

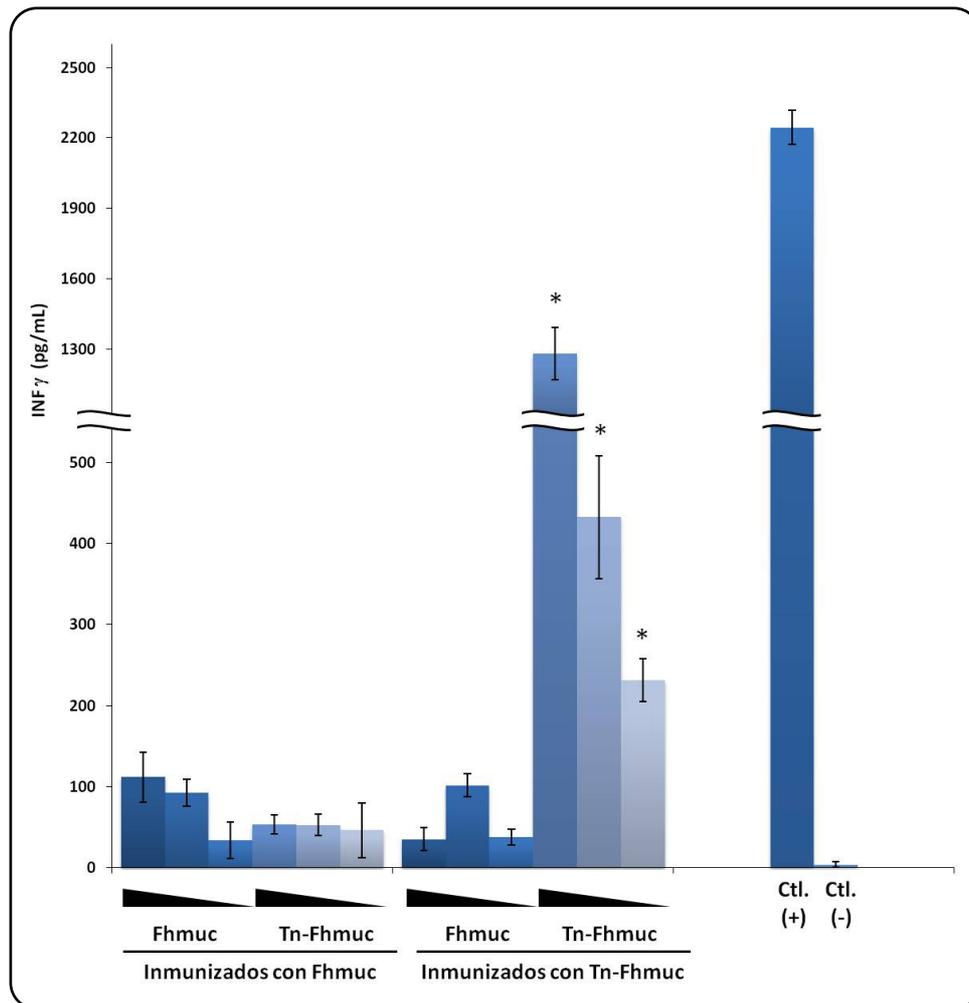
se encuentran distribuidos por todo el péptido, mientras que Fhmuc presenta zonas donde no se encuentran presentes ni serinas y ni treoninas. El hecho de que en glicoproteínas disminuya el enmascaramiento de los epitopes propios del esqueleto polipeptídico conforme aumente el tamaño de éste, se pone de manifiesto si tenemos en cuenta datos reportados recientemente que muestran que existen únicamente leves diferencias entre la reactividad por ELISA encontrada para MUC6, una proteína del doble de tamaño que Fhmuc, y para su glicoproteína conteniendo el antígeno Tn (MUC6:Tn), cuando se utiliza un suero policlonal anti-MUC6 (Freire 2011). Nuestros resultados muestran que ambos glicopéptidos presentan el antígeno Tn alterando significativamente la accesibilidad a los epitopes propios de ambos péptidos, tanto para Tn-Egmuc2 como para Tn-Fhmuc.

La presencia del antígeno Tn fue confirmada utilizando el mismo procedimiento anterior, pero utilizando el anticuerpo monoclonal 83D4. Se puede ver en ambos casos que los péptidos sin glicosilar presentan absorbancias que no varían significativamente con la dilución de anticuerpo utilizada, mientras que si se producen cambios para los glicopéptidos.

#### **6. Evaluación de la respuesta inmunológica celular inducida por Tn-Fhmuc**

Si bien fue posible obtener y purificar ambos glicopéptidos, únicamente los rendimientos correspondientes a Tn-Fhmuc nos permitieron obtener cantidades suficientes para la realización de estudios celulares. Por ello, se utilizó dicho glicopéptido para analizar la respuesta celular que induce en ratones C57BL/6.

Para ello, ratones fueron inmunizados en la base de la cola por vía sub-cutánea con Tn-Fhmuc o Fhmuc en Adyuvante Completo de Freund (CFA). De esta forma, de existir un reconocimiento por parte del sistema inmune, se activarían clones de células T en los ganglios linfáticos drenantes específicas de epitopes de dichos antígenos, las que al ser reestimadas con los mismos, proliferarían y secretarían citoquinas propias del tipo de respuesta que se desencadene. Por ello, los ganglios drenantes se extrajeron, fueron disgregados y reestimados tanto con Fhmuc como con Tn-Fhmuc, y luego de tres días, se evaluó la presencia de citoquinas en el sobrenadante de cultivo.



**Figura 29. Producción de  $INF\gamma$  por células de los ganglios drenantes de ratones inmunizados con Fhmuc o con Tn-Fhmuc.** Las células de ganglios drenantes de ratones C57BL/6 inmunizados con Fhmuc o Tn-Fhmuc (15  $\mu$ g) fueron reestimuladas con 30, 10 y 3,3  $\mu$ g/mL de Fhmuc y 10, 3,3 y 1,1  $\mu$ g/mL de Tn-Fhmuc. El  $INF\gamma$  fue cuantificado en el sobrenadante de cultivo por ELISA sándwich, utilizando anticuerpos específicos para dicha citoquina. Aquí se muestran los datos restando los valores obtenidos para el grupo inmunizado con PBS, los que se tomaron como valores basales. El control positivo correspondió a la reestimulación con ConA (12,5  $\mu$ g/mL), mientras que el control negativo con medio. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a las otras condiciones ensayadas.

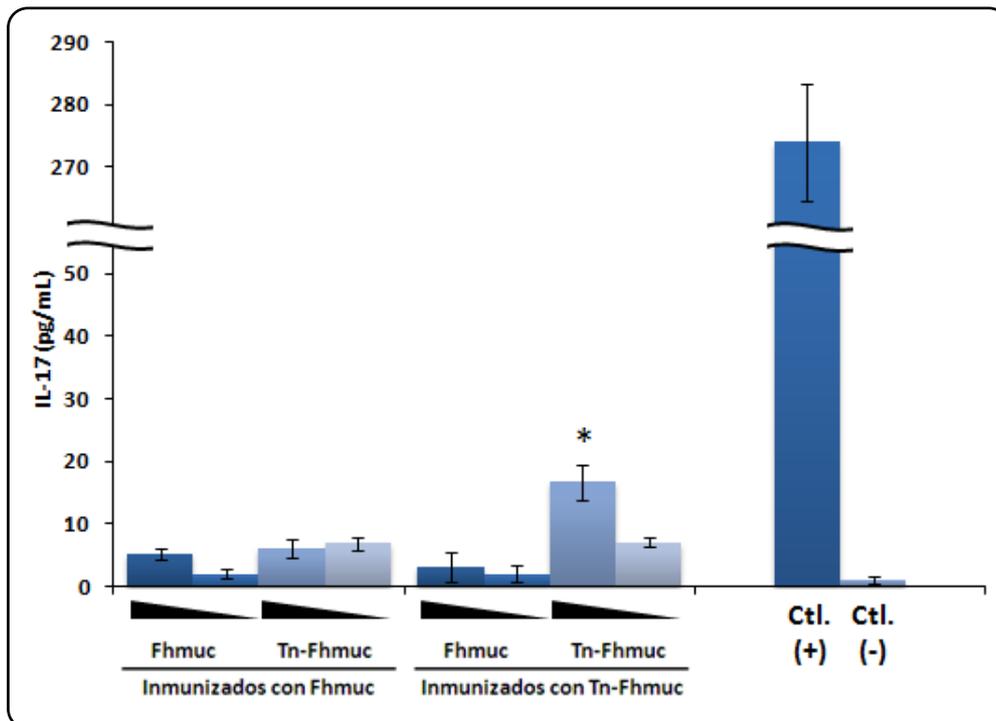
Nuestros resultados ponen de manifiesto que la adición del antígeno Tn potencia altamente la inmunogenicidad celular de Fhmuc, lo cual se evidencia por una alta producción de  $INF\gamma$ . En la Figura 29 se puede observar que las células de los ganglios drenantes de ratones inmunizados con Tn-Fhmuc produjeron altos niveles de interferón  $\gamma$  ( $INF\gamma$ ) cuando fueron estimuladas con el propio glicopéptido, sin presentar reactividad cruzada con el péptido sin

glicosilar; mientras que, por otro lado, ratones inmunizados con Fhmuc produjeron bajos niveles de INF $\gamma$ , sin tampoco encontrar reactividad con el glicopéptido. Estos datos nos mostrarían que la presencia de los residuos de GalNAc en Tn-Fhmuc enmascaran los epítopes T de Fhmuc. En este sentido, se ha reportado previamente que los azúcares unidos a péptidos enmascaran epítopes T, e incluso se ha observado que determinadas modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, glicosilación y metilación, conducen a la generación de neo-epítopes (Quinn 2001; Freire 2006). Esta sería la situación para el caso del glicopéptido Tn-Fhmuc donde la respuesta inmune que es inducida por el mismo parece deberse a la generación de estos nuevos epítopes ausentes en el péptido sin glicosilar.

Dados estos resultados, se procedió a seguir caracterizando la producción de citoquinas por parte de células de ganglios drenantes de los ratones inmunizados con Tn-Fhmuc y Fhmuc, para lo que se procedió a evaluar de la producción de IL-17 (Figura 30) e IL-5 (resultados no mostrados), características de respuestas Th17 y Th2, respectivamente.

En la Figura 30 se puede observar los resultados obtenidos para la determinación de IL-17, únicamente en las células de ganglios de ratones inmunizados con Tn-Fhmuc y reestimulados con el mismo antígeno a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , produjeron niveles de la citoquina con diferencias significativas respecto al resto de las condiciones ensayadas, aunque en cantidades igualmente bajas. Para el caso de IL-5, ninguna de las condiciones ensayadas presentó diferencias significativas con el grupo control.

La alta producción de INF $\gamma$  en ausencia de niveles significativos de IL-5 e IL-17, evidencia que la respuesta producida por Tn-Fhmuc en presencia de CFA presenta un perfil Th1, las que se caracteriza por estimular la inmunidad celular dado que maximiza la eficacia destructora de los macrófagos y la proliferación de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. El desencadenamiento de este tipo de respuesta es especialmente importante en inmunoterapia anti-tumoral, ya que se ha reportado que una respuesta de tipo celular es más eficiente en eliminar las células tumorales que una humoral (Clemente 1996).



**Figura 30. Producción de IL-17 por esplenocitos de ratones inmunizados con Fhmuc o Tn-Fhmuc.** Las células de ganglios drenantes de ratones C57BL/6 inmunizados con Fhmuc o Tn-Fhmuc (15 µg) fueron reestimulados con 30 y 10 µg/mL de Fhmuc y 10 y 3,3 µg/mL de Tn-Fhmuc. La IL-17 fue cuantificada en el sobrenadante de cultivo por ELISA sándwich, utilizando anticuerpos específicos para dicha citoquina. Aquí se muestran los datos restando los valores obtenidos para el grupo inmunizado con PBS, los que se tomaron como valores basales. El control positivo correspondió a la reestimulación con ConA (12,5 µg/mL), mientras que el control negativo con medio. \* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a las otras condiciones ensayadas.

Resulta interesante destacar que nuestros resultados se diferencian de los publicados recientemente, donde se demuestra que la glicosilación de un péptido tipo mucina MUC6 con el antígeno Tn (MUC6:Tn) afecta de manera importante la inmunogenicidad del mismo, y suprime la respuesta Th1 generada por MUC6 y promueve una respuesta de tipo Th17 (Freire 2011).

Este aumento en la inmunogenicidad producto de la presencia del antígeno Tn, en ausencia de reactividad cruzada con el péptido sin glicosilar, pone de manifiesto la importancia del grupo GalNAc en este proceso. Éste podría deberse a su participación en el proceso de presentación antigénica por parte de las células presentadoras de antígeno (APC, por su sigla en inglés *Antigen Presenting Cells*) y en su reconocimiento por parte de linfocitos T específicos.

Hasta principios de los años 90, la gran mayoría de los trabajos con antígenos capaces de estimular linfocitos T habían sido llevados a cabo utilizando proteínas o péptidos, tanto solos como teniendo conjugado un hapteno. Asimismo, se había visto que los carbohidratos puros son incapaces de unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés *Major histocompatibility complex*) y estimular linfocitos T (Harding 1991, Ishioka 1992). Estas evidencias llevaron a pensar que los receptores de los linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés *T Cell Receptor*) únicamente podrían reconocer epítopes peptídicos. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha comprobado que tanto linfocitos T CD4+ como CD8+ pueden reconocer glicopéptidos portadores de monosacáridos y disacáridos en el contexto de una molécula de MHC (Werdelin 2002).

En este sentido, ya ha sido publicado anteriormente que las APC son capaces de procesar glicopéptidos y presentarlos en asociación con el MHC tanto de clase I (Haurum 1994) como de clase II (Corthay 1998). Asimismo, se ha observado que la presencia de carbohidratos unidos a péptidos también puede modificar la unión de éstos a las moléculas MHC y afectar su reconocimiento por linfocitos (Werdelin 2002, Stepensky 2006, Freire 2011). De hecho, estudios recientes han demostrado que el procesamiento de antígeno y presentación de glicopéptidos es altamente dependiente del tamaño, la complejidad y la orientación de las cadenas glicosídicas, al igual que su sitio de unión al esqueleto peptídico (Stepensky 2006, Ninkovic 2007). Por ejemplo, cuando el grupo carbohidrato no se encuentra en la región central de unión al MHC del péptido, el mismo no será reconocido específicamente por linfocitos T, pero puede influir indirectamente en la conformación global del epítipo reconocido. Por otro lado, cuando se encuentra en la región de unión al MHC, el carbohidrato puede afectar de diferentes maneras la presentación del antígeno y el reconocimiento por el linfocito T. De encontrarse en aminoácidos que intervienen en el anclaje al MHC, el glicopéptido se verá imposibilitado de unirse y por lo tanto no será inmunogénico. Sin embargo, si el glicano está unido a un aminoácido lejano al sitio de unión al MHC, dicha interacción no se ve afectada y, de encontrarse en la región central del glicopéptido, el carbohidrato se vuelve la estructura dominante del epítipo, el cual puede ser reconocido con gran especificidad por linfocitos T (Werdelin 2002).

Nuestros resultados sugieren que las APC son capaces de procesar el glicopéptido Tn-Fhmuc y presentarlo en el contexto de una molécula de MHC, de tal forma que expone el antígeno Tn para ser reconocido por linfocitos T específicos.

## 7. Internalización de Tn-Fhmuc por células dendríticas

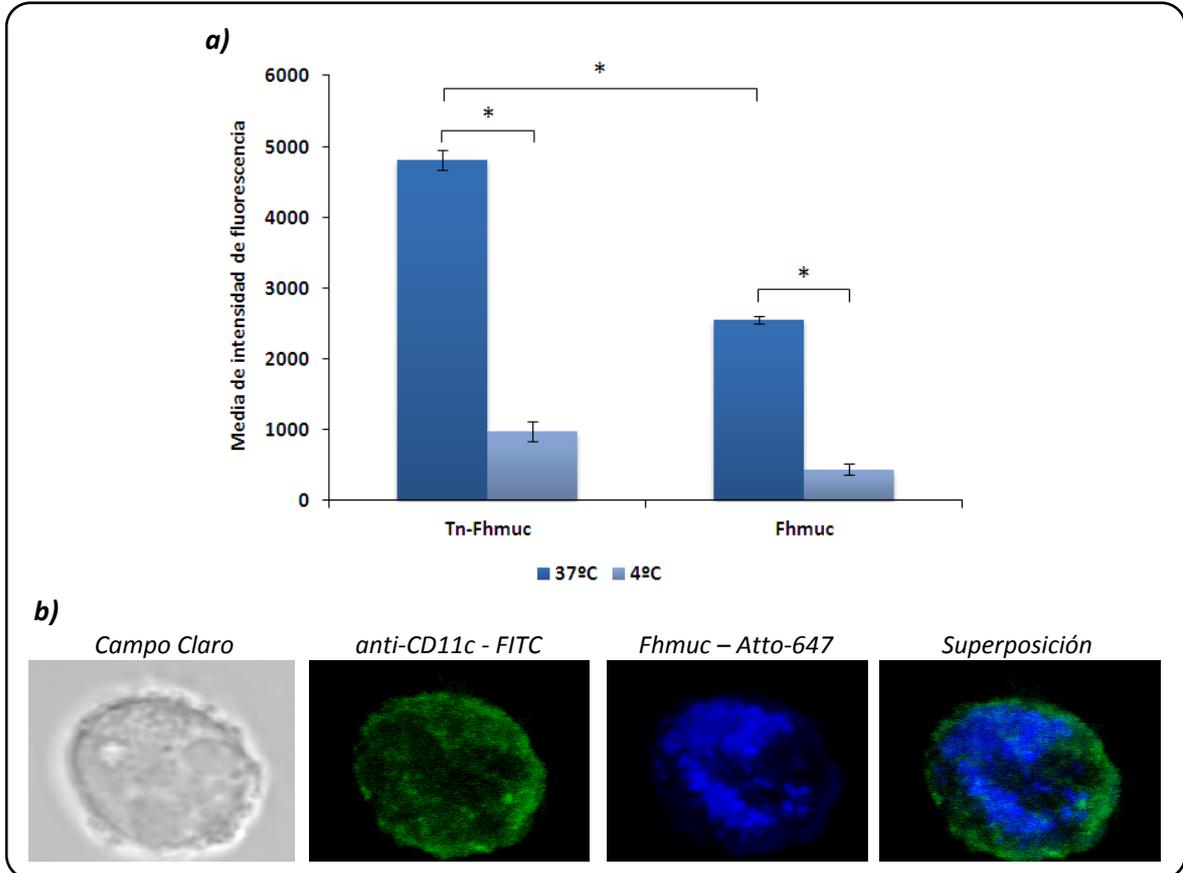
Dada la alta inmunogenicidad de Tn-Fhmuc, el glicopéptido que obtuvimos en mayor cantidad, surgió el interés de estudiar la capacidad de un tipo especial de APC, las células dendríticas, de internalizar el mismo y en particular, si la presencia del antígeno Tn tiene algún efecto en este proceso.

Experiencia previa de nuestro grupo de trabajo en ensayos de internalización de glicoproteínas conteniendo el antígeno Tn por parte de células dendríticas, sugiere que dicho glúcido facilita el proceso de internalización. En particular, se ha visto que la adición de GalNAc a la proteína tipo mucina MUC6 potencia su internalización por células dendríticas, en un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$  (Freire 2011).

Para realizar dichos ensayos, se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC), las cuales fueron incubadas con los péptidos Fhmuc y Tn-Fhmuc, ambos conjugados al fluorocromo ATTO-647, a 4°C para evaluar la unión a BMDC y a 37°C para evaluar la internalización. Posteriormente, las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD11c conjugado a PE, y se detectó por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia correspondiente a los péptidos-ATTO-647 en células CD11c<sup>+</sup> (Figura 31a).

Se puede observar que tanto Fhmuc como Tn-Fhmuc son internalizados por células dendríticas, encontrándose un notorio aumento con la presencia del antígeno Tn. Esto nos estaría indicando que en la internalización de Tn-Fhmuc participan receptores específicos para la porción carbohidrata. Un potencial candidato es la lectina tipo galactosa de macrófagos (MGL, por su sigla en inglés *Macrophage Galactose-Type Lectin*), receptor dependiente de  $Ca^{2+}$  que reconoce residuos GalNAc terminales, en particular el antígeno Tn, y es expresada por las células dendríticas (Singh 2009, Singh 2011). Ya ha sido reportado con anterioridad que la modificación de antígenos con la adición de un grupo GalNAc promueve su interacción con el receptor MGL presente en células dendríticas, estimulando así la internalización de antígenos y su presentación a células T CD4<sup>+</sup>, llevando su diferenciación a células productoras de INF $\gamma$  (Singh 2011). Estos datos son consistentes con nuestros resultados, siendo interesante estudiar al mecanismo involucrado en la internalización por parte de células dendríticas de Tn-Fhmuc. Para ello, podríamos repetir el ensayo incubando con un anticuerpo específico para MGL, lo que bloquearía dicho receptor, o también en presencia de EDTA, un quelante de

cationes divalentes, lo que nos permitiría determinar si cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$ , están involucrados en este proceso.



**Figura 31. Fhmuc y Tn-Fhmuc son internalizados por las células dendríticas.** (a) BMDC obtenidas de ratones C57BL/6 se trataron por una hora a 37°C o una hora a 4°C (control) con Fhmuc o Tn-Fhmuc conjugados a ATTO-647, fluorocromo que se une a los grupos amino libres del péptido o glicopéptido. Posteriormente las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD11c conjugado a PE y fijadas con formaldehído 1 %. La internalización fue evaluada por Citometría de Flujo. \*Diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre las condiciones indicadas. (b) Asimismo, para el caso de Fhmuc también se estudió por Microscopía Confocal, para lo que se utilizó Fhmuc conjugado a ATTO (Azul) y las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD11c conjugado a FITC (Verde).

Complementariamente, se estudió la internalización de Fhmuc por parte de células dendríticas mediante microscopía confocal, con el objetivo de confirmar que efectivamente el péptido se encontraba en el interior celular (Figura 31b). Se puede observar que efectivamente Fhmuc conjugado a ATTO (Azul) es internalizado. Este estudio podía haberse complementado utilizando anticuerpos conjugados a otros fluorocromos específicos contra proteínas marcadoras de compartimientos intracelulares, como LAMP-1 (por sus siglas en inglés

*Lysosomal – Associated Membrane Protein*), marcador de endosomas tardíos. Esto nos permitiría localizar nuestro péptido a nivel intracelular, una vez internalizado.



En este trabajo fuimos capaces de sintetizar dos glicopéptidos (Tn-Egmuc2 y Tn-Fhmuc), y de realizar una caracterización inmunológica parcial de los mismos, obteniendo las siguientes conclusiones:

- Se logró optimizar un ensayo de determinación de la actividad ppGalNAcT en base a la detección del antígeno Tn por ELISA.
- Los péptidos tipo mucina Fhmuc y Egmuc2, que presentan sitios potenciales de O-glicosilación, son sustratos de las tres enzimas utilizadas: ppGalNAcT2, T3 y T6. Para ambos péptidos se detectaron mayores niveles de antígeno Tn cuando se utilizó la ppGalNAcT2, aunque para Egmuc2 se obtuvieron niveles similares al utilizar la ppGalNAcT3. En cambio, el péptido Egmuc no pudo de ser glicosilado en ninguna de las condiciones ensayadas.
- Pudimos determinar las condiciones óptimas de síntesis de Tn-Fhmuc utilizando la ppGalNAcT2, siendo éstas:
  - 2 equivalentes de UDP-GalNAc por cada Serina+Treonina.
  - Una relación enzima/sustrato de 0,6 UE/ $\mu$ g .
  - Incubación durante 24 horas a 37°C.
- Se logró purificar Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2 mediante cromatografía de afinidad utilizando la Lectina de *Helix Pomatia*, que reconoce específicamente grupos GalNAc, inmovilizada sobre geles de agarosa. La pureza de ambos glicopéptidos se verificó mediante SDS-PAGE.
- Se observó que la presencia de grupos GalNAc en Fhmuc y Egmuc2 conduce a una menor detección de los mismos por anticuerpos que reconocen el esqueleto peptídico, sugiriendo un enmascaramiento de epítopes propios de dichos péptidos.
- La adición del antígeno Tn a Fhmuc provoca un aumento de su capacidad de estimular linfocitos T, respecto al péptido sin glicosilar, induciendo una alta producción de INF $\gamma$ , en ausencia de IL-5 e IL-17, sugiriendo un tipo de respuesta Th1. Por otro lado, el glicopéptido presentando el antígeno Tn fue internalizado más eficientemente por células dendríticas que el péptido sin glicosilar.

A partir de este trabajo se desprenden algunas líneas de trabajo para seguir profundizando sobre los resultados obtenidos hasta el momento. Entre ellas se destacan:

- Caracterización estructural de los glicopéptidos obtenidos, fundamentalmente la determinación de la cantidad de antígeno Tn que presenta cada uno de ellos. *Este punto está actualmente en realización por espectrometría de masa gracias a una colaboración con el Instituto Pasteur de Paris.*
- La gran limitante para la realización de ensayos *in vitro* e *in vivo* es la cantidad que se obtiene de Tn-Fhmuc y Tn-Egmuc2, por lo que nos proponemos la síntesis y purificación en escala preparativa para la obtención de mayores cantidades de los mismos.
- Caracterizar el efecto de Tn-Fhmuc en células dendríticas, determinando la producción de citoquinas y la expresión de moléculas co-estimuladoras por células dendríticas incubadas en presencia de glicopéptido.
- Analizar si la internalización del glicopéptido por células dendríticas es mediada por receptor, y en particular por MGL.
- Estudiar la reactividad de esplenocitos de ratones inmunizados con los glicopéptidos contra extractos de células tumorales, en particular líneas celulares que presenten alto contenido del antígeno Tn, como las células TA3-Ha (un adenocarcinoma murino mamario).
- Analizar la capacidad de estimular la producción de anticuerpos en animales inmunizados con los glicopéptidos.
- En caso de que el estudio anterior muestre un reconocimiento de dichas líneas celulares tumorales, pretendemos estudiar si los glicopéptidos pueden mediar protección anti-tumoral mediante ensayos terapéuticos y/o profilácticos.

## AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar a Teresa, mi orientadora durante este trabajo, por abrirme las puertas al laboratorio, por su preocupación constante y por contribuir enormemente a mi formación, como investigador y como persona.
- A Caro, Vero y Enrique, mis compañeros de laboratorio, por su amistad, por su enorme ayuda, y por hacer más divertido y ameno el trabajo, que no es poco.
- A mis padres y mis hermanos, por su apoyo en todo momento.
- A la Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, por su ayuda en este trabajo. En particular de Cecilia Giacomini en la ayuda con el ensayo enzimático y Laura Franco Fraguas y María José Bustamante en la utilización del PhastSystem y liofilizador.
- A todos aquellos que me acompañaron en el día a día, ayudando de una forma u otra a hacer más fácil la tarea

Adluri, S., Helling, F., Ogata, S., Zhang, S., Itzkowitz, S., Lloyd, K., Livingston, P. **(1995)** *“Immunogenicity of synthetic TF-KLH (keyhole limpet hemocyanin) and sTn-KLH conjugates in colorectal carcinoma patients”*. Cancer Immunol. Immunother. 41(3):185-92.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., **(2008)** *Molecular biology of the cell*, (5ta Ed.), Nueva York, Estados Unidos, Editorial Garland Science.

Baehrecke, E. H. **(2002)** *“How death shapes life during development”*. Nature Rev. Molec. Cell Biology. Vol. 3, pp. 779-787.

Bogenrieder, T., Herlyn, M. **(2003)** *“Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis”*. Oncogene 2003; 22: 6524-6536.

Brockhausen, I. **(1999)** *“Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells”*. Bioch. et Bioph. Acta. Vol. 1473, pp. 67-95.

Brockhausen, I. **(2006)** *“Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions”*. EMBO reports. 7 (6), pp. 599-604

Byrd, J., Bresalier, R. **(2004)** *“Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer”*. Cancer Metastasis Rev. 23(1-2): p. 77-99.

Clemente, C.G., Mihm, M.C. Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., Cascinelli, N. **(1996)** *“Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma”*. Cancer. 77(7): p. 1303-10.

CHLCC - Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. **(2010)** *“Informe 2010: Síntesis de datos estadísticos”*. Programa de Vigilancia Epidemiológica, Registro Nacional de Cáncer. Disponible en el sitio web: <http://www.urucan.org.uy>.

Corthay, A., Bäcklund, J., Broddefalk, J., Michaëlsson, E., Goldschmidt, T.J., Kihlberg, J., Holmdahl, R. **(1998)** *“Epitope glycosylation plays a critical role for T cell recognition of type II collagen in collagen-induced arthritis”*. Eur. J. Immunol. 28(8):2580-90.

DePinho, R. A. **(2000)** *“The age of cancer”*. Nature, 408, pp. 248-254.

Dunn, G.P., Bruce, A., Ikeda, H., Old, L., Schreiber, R. **(2002)** "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape". *Nat. Immunol.* 3(11): p. 991-8.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., Schreiber, R.D. **(2006)** "Interferons, immunity and cancer immunoediting". *Nat. Rev. Immunol.* 6(11): p. 836-48.

Fernandez, C., Gregory, W. F., Loke, P., Maizels, R. M. **(2002)** "Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptides equences". *Mol. Biochem. Parasitol.* 122:171–180

Franco, E.L. **(1997)** "Epidemiology in the Study of Cancer" in *Encyclopedia of Cancer*, J.R. Bertino, Editor. Academic Press: New York. p. 621-641.

Freire, T., Robello, C., Casaravilla, C., Alvarez Errico, D., Medeiros, A., Caromona, C., Osinaga E. **(2002)** "Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos". *Actas de Fisiología.* 8, 89-107, 2002.

Freire, T., Fernandez, C., Chalar, C., Maizels, R., Alzari, P., Osinaga, E., Robello, C. **(2004)** "Characterization of a UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase with an unusual lectin domain from the platyhelminth parasite *Echinococcus granulosus*". *Biochem. J.* 382:501–510

Freire, T., Bay, S., Vichier-Guerre, S., Lo-Man, R., Leclerc, C. **(2006a)** "Carbohydrate antigens: synthesis aspects and immunological applications in cancer". *Mini. Rev. Med. Chem.* 6(12): p. 1357-73.

Freire, T., Lo-Man, R., Piller, F., Piller, V., Leclerc, C., Bay, S. **(2006b)** "Enzymatic large-scale synthesis of MUC6-Tn glycoconjugates for antitumor vaccination". *Glycobiology.* 16(5): 390–401

Freire, T., Lo-Man, R., Bay, S., Leclerc, C. **(2011)** "Tn glycosylation of the MUC6 protein modulates its immunogenicity and promotes the induction of Th17-biased T cell responses". *J. Biol. Chem.* 286(10):7797-811.

Goldsby, R.A., Kindt, T. J., Osborne, B., Kubly, J. **(2003)** *Immunology*, (5ta Ed.). Nueva York, Estados Unidos, Editorial W. H. Freeman and Company, Capítulo 22: Cancer and the Immune System, pp. 501-524.

Hakomori, S. **(2002)** *"Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle"*. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 99, n° 16, pp. 10231-10233

Hanahan, D., Weinberg, R. **(2011)** *"Hallmarks of cancer: the next generation"*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.

Hang, H. C., Bertozzi, C. R. **(2005)** *"The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation"*. Bioorg. & Med. Chem. Vol. 13, pp. 5021-5034.

Hanisch, F.G. **(2001)** *"O-glycosylation of the mucin type"*. Biol. Chem. 382(2): p. 143-9.

Harding, C.V., Roof, R.W., Allen, P.M., Unanue, E.R. (1991) *"Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules"*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(7):2740-4.

Haurum, J.S., Arsequell, G., Lellouch, A.C., Wong, S.Y., Dwek, R.A., McMichael, A.J., Elliott, T. **(1994)** *"Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class II-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes"*. J. Exp. Med. 180(2):739-44.

Horowitz, M.I. **(1967)** *"Immunochemistry of ovine and bovine submaxillary mucins"*. Immunochemistry. 4(5).

Hortobagyi, G.N., **(2005)** *"Trastuzumab in the treatment of breast cancer"*. N. Engl. J. Med.. 353(16): p. 1734-6.

Ishioka, G.Y., Lamont, A.G., Thomson, D., Bulbow, N., Gaeta, F.C., Sette, A., Grey, H.M. **(1992)** *"MHC interaction and T cell recognition of carbohydrates and glycopeptides"*. J. Immunol. 148(8):2446-51.

Jacobson, G. R., Schaffer, M. H., Stark, G. R., Vanaman, T. C. **(1973)** *"Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues"*. J. Biol. Chem. 248:6583-6591.

Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., Brunak, S. **(2005)** *"Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites"*. *Glycobiology*, 15:153-64.

Kagan, E., Ragupathi, G., Yi, S.S., Reis, C.A., Gildersleeve, J., Kahne, D., Clausen, H., Danishefsky, S.J., Livingston, P.O. **(2005)** *"Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn"*. *Cancer Immunol. Immunother.* 54(5): p. 424-30.

Kumar, V., Abbas A. K., Fausto, N. & Mitchell, R. **(2007)** *Robbins Basic Pathology* (8va Ed.), Editorial Saunders, Capítulo 6: Neoplasia, pp. 173-224

Linley, A.J., Ahmad, M., Rees, R. **(2011)** *"Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy"*. *Int. J. Hematol.* 93(3): p. 263-73.

MacLean, G., Reddish, M., Koganty, R., Longenecker, B. **(1996)** *"Antibodies against mucin-associated sialyl-Tn epitopes correlate with survival of metastatic adenocarcinoma patients undergoing active specific immunotherapy with synthetic sTn vaccine"*. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19:59.

Mannori, G., Crottet, P., Cecconi, O., Hanasaki, K., Aruffo, A., Nelson, R. M., Varki, A., Bevilacqua, M. P., **(1995)** *"Differential Colon Cancer Cell Adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of Mucin-type Glycoproteins"*. *Canc. Res. Vol. 55*, pp. 4425-4431.

Ninkovic, T., Hanisch, F.G. **(2007)** *"O-glycosylated human MUC1 repeats are processed in vitro by immunoproteasomes"*. *J. Immunol.* 15;179(4):2380-8.

Ono, M., Hakomori, S. **(2004)** *"Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness"*. *Glycoconj. J.* 20(1): 718.

Osinaga, E., Bay, S., Tello, D., Babino, A., Pritsch, O., Assemat, K., Cantacuzene, D., Nakada, H., Alzari, P. **(2000)** *"Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy"*. *FEBS Lett.* 469(1): p. 24-8.

Peoples, G.E., Goedegebuure, P., Smith, R., Linehan, D., Yoshino, I., Eberlein, T. **(1995)** *"Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide"*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(2): p. 432-6.

Quinn, M.T., Swain, S.D., Parkos, C.A., Jutila, K.L., Siemsen, D.W., Kurk, S.L., Jesaitis, A.J., Jutila, M.A. **(2001)** "A carbohydrate neoepitope that is up-regulated on human mononuclear leucocytes by neuraminidase treatment or by cellular activation". *Immunology*, 104(2): p. 185-97.

Singh, S.K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Weelij, D.R., García-Vallejo, J.J., van Vliet, S.J., Saeland, E., van Kooyk, Y. **(2009)** "Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties". *Mol. Immunol.* 46(6):1240-9.

Singh, S.K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Kalay, H., Saeland, E., van Kooyk, Y. **(2011)** "Tumour-associated glycan modifications of antigen enhance MGL2 dependent uptake and MHC class I restricted CD8 T cell responses". *Int. J. Cancer.* 128(6):1371-83.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G. **(1989)** "Studies of the HER-2/neu proto oncogene in human breast and ovarian cancer". *Science.* 244 (4905): 707–712.

Slovin, S.F., Ragupathi, G., Musselli, C., Olkiewicz, K., Verbel, D., Kuduk, S., Schwarz, J.B., Sames, D., Danishefsky, S., Livingston, P., Scher, H. **(2003)** "Fully synthetic carbohydrate based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-Oserine/threonine conjugate vaccine". *J. Clin. Oncol.* 21(23):4292-4298.

Slovin, S.F., Ragupathi, G., Musselli, C., Fernandez, C., Diani, M., Verbel, D., Danishefsky, S., Livingston, P., Scher, H. **(2005a)** "Thomsen Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer". *Cancer Immunol. Immunother.* 54(7):694-702

Slovin, S.F., Ragupathi, G., Fernandez, C., Jefferson, M.P., Diani, M., Wilton, A.S., Powell, S., Spassova, M., Reis, C., Clausen, H., Danishefsky, S., Livingston, P., et al. **(2005b)** "A bivalent conjugate vaccine in the treatment of biochemically relapsed prostate cancer: a study of glycosylated MUC-2-KLH and GloboH-KLH conjugate vaccines given with the new semi-synthetic saponin immunological adjuvant GPI-0100 OR QS-21". *Vaccine.* 23(4):3114-3122

Smith, P.K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. **(1985)** "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal. Biochem.* 163.

Stepensky, D., Tzehoval, E., Vadai, E., Eisenbach, L. **(2006)** *"O-glycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma"*. Clin. Exp. Immunol. 143:139-149

Strebhardt K., Ullrich A. **(2008)** *"Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress"*. Nature Reviews: Cancer. 8:473e80

Tarp, M. A., Clausen, H. **(2008)** *"Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development"*. Bioch. et Bioph. Acta. Vol. 1780, pp 546-563

Tsuiji, H., Takasaki, S., Sakamoto, M., Irimura, T., Hirohashi, S. **(2003)** *"Aberrant O-glycosylation inhibits stable expression of dysadherin, a carcinoma-associated antigen, and facilitates cell-cell adhesion"*. Glycobiology. Vol 13, n° 7, pp. 521-527.

Van Kooyk, Y., Rabinovich, G. A. **(2008)** *"Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses"*. Nature Immunology. Vol. 9, n°6, pp. 593-600

Varki, A.; Sharon, N. **(2009)** *Essentials of Glycobiology, 2nd Edition*, New York, Cold Spring Harbor.

Vesely, M.D., Kershaw, M., Schreiber, R., Smyth, M. **(2011)** *"Natural innate and adaptive immunity to cancer"*. Annu. Rev. Immunol. 29: p. 235-71.

Vlad, A.M., Finn, O. **(2004)** *"Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer"*. Breast Dis. 20: p. 73-9.

Vollmers, H. P., Brändlein, S. **(2007)** *"Tumors: Too sweet to remember?"*. Molec. Can. Vol. 6, n° 78

von Mensdorff-Pouilly, S., Snijder, F., Verstraeten, A., Verheijen, R.H., Kenemans, P. **(2000)** *"Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein"*. Int. J. Biol. Markers. 15(4):343-56.

Weinberg, R. A. **(2007)** *"The biology of cancer"*, (1a Ed.). Nueva York, Estados Unidos, Editorial Garland Science.

Werdelin, O., Meldal, M., Jensen, T. **(2002)** *"Processing of glycans on glycoprotein and glycopeptide antigens in antigen-presenting cells"*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Jul. 23;99(15):9611-3.

Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, E., Wevers, R. A. **(2006)** *“Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review”*. *Clinical Chem.* Vol. 52, n° 4, pp. 574-600.

Yu, L. **(2007)** *“The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression”*. *Glycoconj. J.* Vol 24, pp. 411-420.