

Tesis de Maestría PEDECIBA Biología
Subárea Biología Celular y Molecular

“Estudio de la expresión de GalNAc-T11 en pacientes con Leucemia Linfoide Crónica”

Q.F. María Gabriela Libisch Recalde

Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo

Orientador: Dr. Carlos Robello

Co-Orientador: Dr. Alfonso Cayota

Montevideo, Abril 2012

Agradecimientos

Finalmente se termina esta etapa!!!

No me queda más que agradecer a todos los que directa o indirectamente me ayudaron a realizar esta Tesis.

En primer lugar quiero agradecerle a Malon por darme un lugar en su laboratorio y brindarme siempre mucha libertad para trabajar. Además gracias Malon y Alfonso por el apoyo recibido durante todos estos años.

A mis compañeras y amigas del laboratorio UBM (Ma. Laura, Talia, Moni, Lore, Paula, Andrea, Ceci, Gaby, Dola, Adri, Pili y Gonza), gracias por el tiempo compartido, la ayuda recibida, y por hacer que el día a día de trabajo sea un lindo camino para transitar.

A Pablo, Pilar, Florencia y Cecilia del laboratorio UPR, y a Sergio de UBP por darme las muestras para trabajar.

A Josefina, Valentina e Inés del laboratorio UBC por su ayuda con los experimentos de citometría de flujo.

A mis Amigas, por estar siempre ahí en las buenas y en las no tanto.

A mi querida hermana Ana.

A Gabriel, por su amor, comprensión y apoyo.

Por último a mis padres, para ellos no me alcanzan las palabras de agradecimiento, así que simplemente gracias por TODO!

A todos muchas gracias!

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
CÁNCER	9
Cáncer y metilación	10
LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA	11
Diagnóstico y pronóstico	12
Estados de Rai y Binet	13
Estado mutacional genes IgVH	14
Expresión de marcadores moleculares	15
Análisis citogenético	16
Defectos de apoptosis y proliferación	16
Microambiente en LLC	17
GLICOSILACIÓN	17
Generalidades	17
Funciones	18
N-glicosilación	19
O-glicosilación	19
Mucinas	20
GalNAc-Ts	23
Definición	23
Estructura	25
Especificidad de sustratos	28
Patrones de expresión y distribución	28
Regulación de la expresión de las GalNAc-Ts	29

Localización	30
La familia de los genes GALNT humanos.....	31
GalNAc-Ts y su relación con patologías.....	33
GalNAc-Ts y Cáncer	34
Glicobiología y LLC.....	35
ANTECEDENTES	37
OBJETIVOS	41
GENERAL.....	41
ESPECÍFICOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
RESULTADOS	57
EXPRESIÓN DEL ARNm DE GalNAc-T11.	57
El ARNm de GalNAc-T11 se expresa en linfocitos B-LLC.	57
GALNT11: potencial nuevo marcador de LLC.....	58
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GalNAc-T11.....	62
Producción y caracterización de un Anticuerpo anti GalNAc-T11	62
Purificación del polipéptido de GalNac-T11 recombinante	63
Determinación de la expresión de la proteína GalNAc-T11	65
Western blot.....	65
Inmunofluorescencia Indirecta – IFI.....	66
EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS Tn Y SIALIL-Tn	70
Estudio de expresión del antígeno Tn por citometría de flujo.....	71
Estudio de expresión del antígeno Tn y sialil –Tn por IFI	72
GENERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DAUDI-T11	74
Generación de la línea Daudi-pcDNA6	75

Generación de la línea Daudi-T11	76
Expresión de la proteína GalNAc-T11 en la línea Daudi-T11	79
La sobre-expresión de GalNAc-T11 no se asocia con la expresión de Tn ni sialil-Tn	79
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>GALNT11</i> POR METILACIÓN DEL ADN	80
Búsqueda de islas CpG en la familia de las 20 GalNAc-Ts humanas.	85
DISCUSIÓN.....	88
EXPRESIÓN DEL ARNm de GalNAc-T11	88
Identificación de GalNAc-T11 como un potencial nuevo marcador de Leucemia Linfoide Crónica.....	88
GALNT11 como marcador diferencial de linfocitos B y T.....	91
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GalNAc-T11.....	92
EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS Tn y SIALIL-Tn.....	92
GENERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DAUDI-T11	93
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>GALNT11</i> POR METILACIÓN DEL ADN	94
PERSPECTIVAS	100
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFÍA.....	104

RESUMEN

RESUMEN

Una de las alteraciones de mayor relevancia en células tumorales es la modificación de los patrones de O-glicosilación, encontrándose en la mayoría de los casos expresión de antígenos mucínicos de O-glicosilación incompleta, como los antígenos Tn y sialil-Tn. El primer paso de la O-glicosilación tipo mucina está mediado por una amplia familia de enzimas (20 en humanos) denominadas UDP-GalNAc-polipéptido- α -N-acetilgalactosaminiltransferasas (GalNAc-Ts), muchas de las cuales presentan una expresión alterada en distintos tipos de cáncer. Sin embargo, existe muy poca información respecto a la presencia de alteraciones de la O-glicosilación en leucemias, y particularmente en la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC).

En este trabajo encontramos que el ARNm de GalNAc-T11 constituye un nuevo potencial marcador de LLC, cuyo promedio de expresión es significativamente mayor en pacientes no mutados y progresores respecto a pacientes mutados e indolentes respectivamente. Además determinamos la ausencia de expresión de los antígenos de O-glicosilación incompleta Tn y sialil-Tn en células B-LLC. Por otro lado, mostramos que el proceso de metilación del promotor de *GALNT11* jugaría un rol importante en la regulación de la expresión de este gen, y finalmente generamos una línea estable inducible por tetraciclina capaz de sobre-expresar GalNAc-T11, la cual constituye una importante herramienta, que nos permitirá estudiar blancos de la enzima y alteraciones en la función de las células que puedan estar relacionadas con la malignidad de las mismas.

En resumen el trabajo realizado contribuye al entendimiento de las bases moleculares de los procesos de O-glicosilación en la LLC.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

En la mayoría de los tejidos animales, existe un balance entre proliferación y muerte celular, y gracias al mismo las células envejecidas o dañadas son renovadas y en condiciones normales, la cantidad de células de un mismo tipo suele permanecer constante [1]. Sin embargo, ocasionalmente algunas células pierden la capacidad de responder a mecanismos de control de crecimiento y adquieren características particulares que promueven su invasividad, dando lugar a la aparición del cáncer [2]. Cuando las células tumorales se propagan a distancia, mediante los vasos sanguíneos o linfáticos, y generan el crecimiento de nuevos tumores en distintas partes del organismo se produce el proceso denominado metástasis. Estas propiedades diferencian a los tumores malignos de los benignos, que son limitados y no invaden ni producen metástasis [3].

El cáncer es generalmente clasificado según el tejido a partir del cual las células tumorales se originan. Existen más de 100 diferentes tipos de cáncer, la mayoría forman tumores pero algunos como las leucemias, rara vez los forman. En su lugar estas células tumorales afectan la sangre, así como los órganos hematopoyéticos y circulan a través de otros tejidos en los cuales crecen [3].

El cáncer se presenta como la segunda causa de muerte en el mundo, tanto en países desarrollados, como en muchos en vías de desarrollo. En Uruguay, el cáncer también representa la segunda causa de muerte, situándose por debajo de las enfermedades cardiovasculares [4].

Entre todos los tipos de cáncer, se pueden identificar ciertas características en común que permiten que las células tumorales sobrevivan, proliferen y se diseminen: la evasión de la apoptosis, la autosuficiencia de señales de crecimiento, la insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento, la capacidad de proliferar indefinidamente, la capacidad de angiogénesis, y la posibilidad de invadir tejidos y generar metástasis [5] (Figura 1). Recientemente se han sugerido dos nuevas características generales del cáncer. Una de ellas está relacionada con la capacidad de las células de modificar o reprogramar su metabolismo energético con el fin de lograr una proliferación neoplásica más eficiente. La segunda permitiría a las células tumorales evadir el sistema inmune, en particular la respuesta generada por linfocitos T y B, macrófagos y células NK (*Natural Killer*) [6].

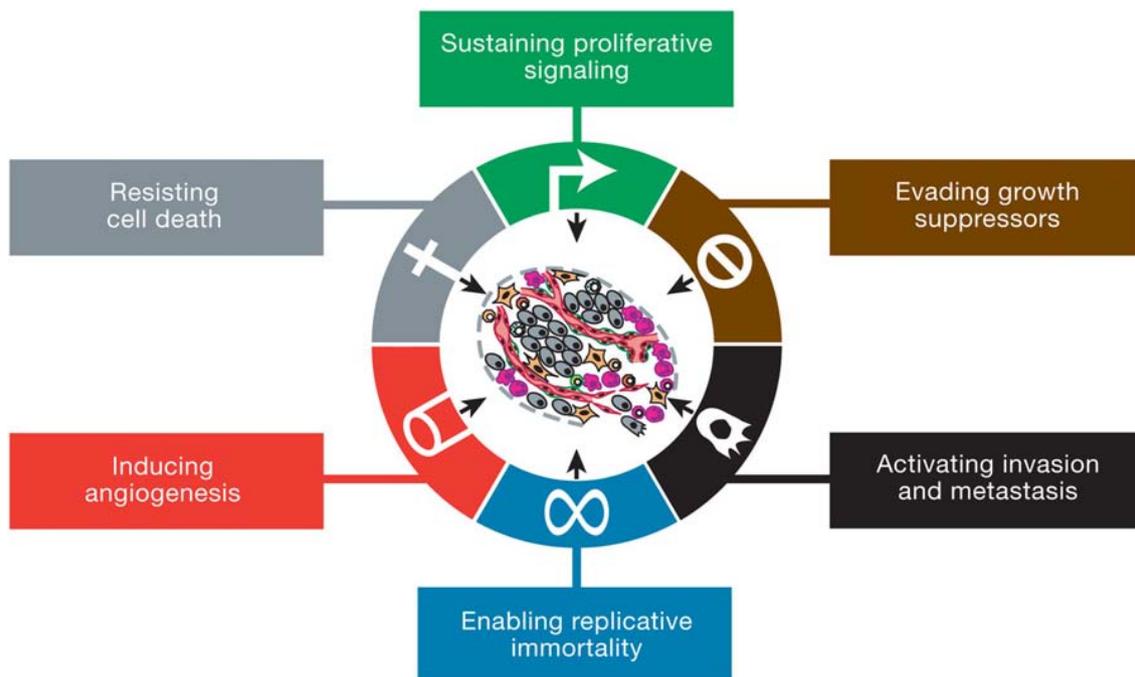


Figura 1. Seis características del cáncer. (Tomado de Hanahan et al., 2000 [5])

Las mismas son adquiridas generalmente durante el desarrollo tumoral, por mutación de genes relevantes.

Adquirir las características antes mencionadas depende en gran medida de que la célula tumoral genere determinadas mutaciones que le den una ventaja selectiva sobre el resto de las células, permitiendo que las mismas predominen en un microambiente tisular determinado, produciendo expansiones clonales características. Es importante considerar que algunos fenotipos tumorales, que pueden involucrar por ejemplo la eliminación de genes supresores de tumores, no se dan por mutaciones en el ADN, sino por mecanismos epigenéticos como ser la metilación del ADN y la modificación de histonas [7-9].

Cáncer y metilación

Dentro de los mecanismos de regulación de la expresión génica se encuentran los debidos a modificaciones epigenéticas. La metilación del ADN, llevada a cabo por ADN metiltransferasas (DNMTs), forma parte de estos mecanismos. Existen tres tipos de DNMTs, la DNMT1, la cual está involucrada en el mantenimiento del estado de metilación de las células, y las DNMT3a y DNMT3b, las cuales actúan metilando el ADN de *novo* [7]. Muchas enfermedades en humanos muestran alteraciones en distintos procesos epigenéticos, y la metilación aberrante del ADN es uno de los mecanismos mejor caracterizados en dichas enfermedades, entre ellas el cáncer [8].

Las células tumorales se caracterizan por una demetilación global del ADN, así como de una hipermetilación de promotores específicos [9-11].

En vertebrados el 70-80% de las citosinas de los dinucleótidos CpG están metiladas (5-metilcitosinas-5meC) excepto las que se encuentran dentro de islas CpG, las cuales tienen al menos 200pb, con un porcentaje de GC mayor de 50 y con un promedio de CpG observado/esperado mayor de 0,6. Estas islas se encuentran generalmente en los promotores del 60% de los genes y suelen contener el sitio de inicio de la transcripción [12, 13]. En particular, un trabajo reciente muestra que la metilación de islas CpG alrededor del sitio de inicio de la transcripción conteniendo el primer exón es crítico para lograr el silenciamiento génico [14]. En condiciones normales sólo un 2% de las islas CpG de los promotores se encuentran metiladas [15]. El silenciamiento génico causado por la metilación de islas CpG se logra ya sea porque las 5meC presentes puedan inhibir directamente la unión específica de factores de transcripción, o porque proteínas de unión a dominios metilados reconozcan el ADN metilado y recluten complejos de remodelación de la cromatina que repriman la expresión génica [16].

La metilación aberrante muchas veces se asocia con estadíos tempranos de la carcinogénesis, y los patrones de metilación parecen ser específicos tanto del tipo celular como del estadío tumoral [17, 18]. Por tal motivo los patrones de metilación del ADN ofrecen la posibilidad de identificar biomarcadores para la detección, diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta a tratamientos de distintos tipos de cáncer. Además la potencial capacidad de revertir las modificaciones epigenéticas representan un nuevo y potencial blanco de aproximaciones terapéuticas [9]. Específicamente, ya se ha mostrado que los procesos de metilación pueden ser revertidos *in vitro* e *in vivo* utilizando agentes que inhiban la actividad de ADN metiltransferasas. Inclusive drogas con estas características han mostrado actividad clínica en pacientes con leucemia [19].

LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA

La Leucemia Linfoide Crónica (LLC) es una enfermedad caracterizada por la proliferación y acumulación de linfocitos incompetentes de pequeño tamaño, aspecto maduro y fenotipo B. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se deben a la infiltración progresiva de médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos por dichas células, así como a las alteraciones inmunológicas que acompañan a la enfermedad [20].

La LLC ocurre principalmente en adultos mayores (mayor a 65 años), siendo la leucemia más común en ese grupo etario. En E.E.U.U tiene una incidencia de 3.5 pacientes cada 100000 al año (5.0 hombres, y 2.5 mujeres) [21]. Estudios recientes realizados en Uruguay y Argentina muestran que la tasa de incidencia es similar a la de Europa occidental oscilando entre 4-5/100.000 habitantes/año de la población adulta (media de edad 72 años y un rango entre 35-90 años) [22]. Si bien los tratamientos usados pueden generar remisión de la enfermedad, casi todos los pacientes finalmente recaen, por lo que la enfermedad continua siendo aún incurable [21].

Algunas características del linfocito B-LLC son que la mayoría expresa inmunoglobulinas (Ig) de superficie, IgM o IgM más IgD. Los genes de Ig se hallan reordenados con un patrón idéntico (reordenamiento monoclonal). El linfocito LLC tiene antígenos de superficie característicos de los linfocitos B (CD19, CD20, CD21, CD23) [23]. Los niveles de expresión de Ig de superficie, CD20, y CD79b son menores a los expresados por células B normales [24]. Otra característica es que el linfocito LLC presenta una baja expresión del receptor de células B [25]. Por último es importante resaltar la característica del linfocito B leucémico de presentar marcadores propios del linfocito T como CD5 y ZAP70 [26].

El curso de la enfermedad puede ser muy diferente, teniendo en un extremo una enfermedad fulminante y en el otro una enfermedad benigna. En general, más de la mitad de los casos de LLC se descubre de forma casual, en personas asintomáticas, al detectarse en un hemograma una leucocitosis con linfocitosis. En el resto de los casos, la astenia, la aparición de adenopatías y las infecciones repetidas son las manifestaciones que llevan al diagnóstico [11].

Diagnóstico y pronóstico

Las herramientas diagnósticas y pronósticas presentes hasta la fecha aportan al diagnóstico de la enfermedad y guían al clínico a predecir la evolución de la misma. Las herramientas diagnósticas utilizadas son en principio un examen de sangre, en donde se encuentre al menos 5×10^9 linfocitos B/L en sangre periférica, junto con un apropiado inmunofenotipo, el cual se determina mediante citometría de flujo (Figura 2) [27, 28]. Este último permite distinguir la LLC del linfoma del manto y del linfoma esplénico de la zona marginal, enfermedades que muy frecuentemente se confunden con la LLC [28]. En algunos individuos la enfermedad se presenta exclusivamente en los nodos linfáticos sin involucrar a la sangre o la médula. En estas personas, la enfermedad se denomina pequeño linfoma linfocítico: la histología y el inmunofenotipo

son idénticos a los de la LLC y el tratamiento a seguir es el mismo [29]. La morfología del linfocito B, es de un linfocito pequeño, de aspecto maduro, de citoplasma reducido al borde celular, y con un núcleo denso en el cual no se puede distinguir el nucléolo. Estas células se pueden encontrar junto a células más grandes o atípicas, prolinfocitos y centrocitos [24][30].

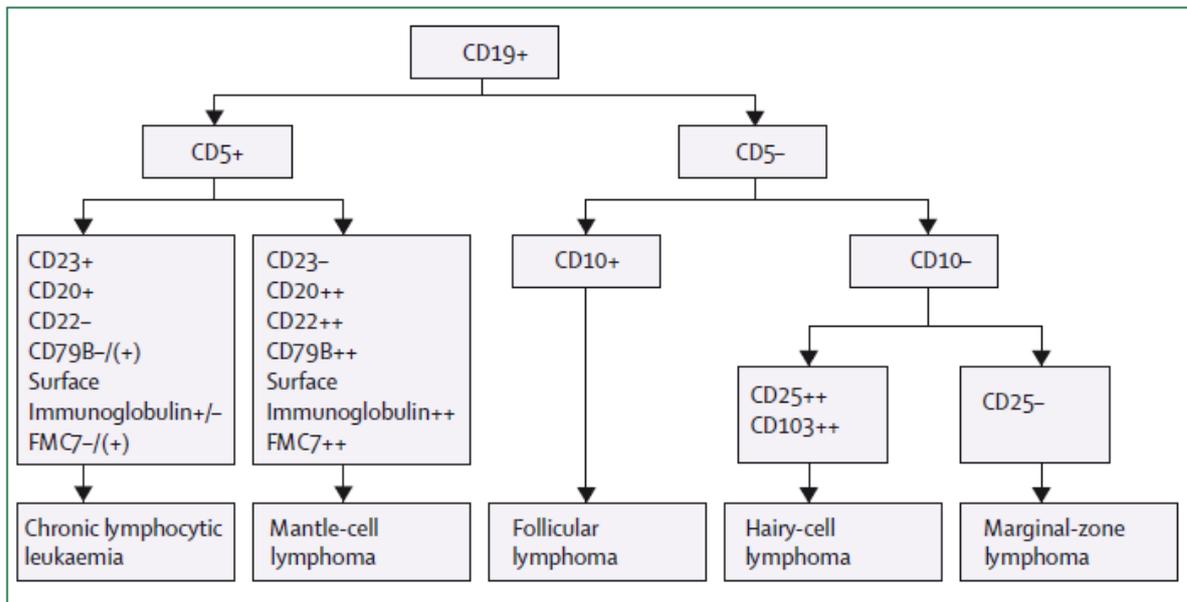


Figura 2. Diagnóstico diferencial de células CD19+.
(Tomado de Dighiero, G. et al., 2008 [21])

Las herramientas pronósticas más utilizadas son las estadificaciones clínicas de Rai o Binet, el estado mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (genes IgVH) y el análisis citogenético mediante FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). La expresión de algunos marcadores moleculares como ZAP-70 y CD38 también tienen cierto valor en el pronóstico de la enfermedad.

Estados de Rai y Binet

Existen diferentes estadios de la LLC que se clasifican según los criterios de Rai y/o de Binet [31, 32]. Los mismos permitieron clasificar a los individuos con LLC en tres grupos pronóstico: bueno (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I/II, Binet B) y malo (Rai III/IV, Binet C) (Tabla 1). En base a ellos los clínicos generaron distintas estrategias de tratamiento. Sin embargo, estos sistemas no permiten predecir qué pacientes con pronóstico bueno o intermedio terminarán desarrollando una enfermedad más agresiva [33].

Tabla 1. Estados de Rai y Binet.

Clasificación de la LLC según Rai (utiliza números para indicar categorías de bueno, intermedio y mal pronóstico) o Binet (utiliza letras para clasificar de acuerdo al número de órganos afectados y si presenta o no una disminución en los glóbulos rojos o en las plaquetas).

Clasificación	Estadío	Diagnóstico
Rai	0	Linfocitosis en sangre periférica
	I	Linfocitosis y adenopatías
	II	Linfocitosis y hepato y/o esplenomegalia
	III	Linfocitosis y anemia
	IV	Linfocitosis y trombopenia
Binet	A	<3 regiones afectadas sin anemia
	B	>3 regiones afectadas sin anemia
	C	Anemia y/o Trombopenia

Estado mutacional genes IgVH

Se han identificado marcadores moleculares y celulares para poder predecir la progresión de la enfermedad. En particular el estado mutacional de los genes IgVH, es uno de los que muestra el mayor valor pronóstico. De todas maneras estas diferencias no separan a la LLC en dos enfermedades diferentes; se sigue considerando una misma enfermedad con características heterogéneas [34].

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los linfocitos LLC expresan CD5 e IgM/IgD, y por lo tanto tienen un fenotipo de células virgen (*naive*) de la zona del manto, que en condiciones normales expresan los genes de inmunoglobulinas no mutados [35]. Sin embargo 50-70% de los pacientes con LLC muestra mutaciones somáticas en los genes IgVH [36], como si hubieran madurado en un folículo linfóide. Además la presencia o ausencia de mutaciones somáticas está relacionada con genes IgVH particulares [37-39].

Los pacientes que presentan mutaciones somáticas en los genes IgVH tienen mejor pronóstico que los que tienen dichos genes en configuración germinal (no mutados) [40, 41]. Por otro lado, el estado mutacional de estos genes es capaz de delinear grupos pronósticos entre todos los estados de Binet [42, 43]. El perfil mutacional tiene la ventaja de permanecer constante durante la evolución clonal, lo que no sucede con las aberraciones cromosómicas y marcadores serológicos. Dado que secuenciar los

genes de IgVH es costoso, consume tiempo y en general no se realiza de rutina en laboratorios médicos, la búsqueda de marcadores que puedan reflejar una relación significativa con el estado mutacional de genes IgVH continúa siendo un tema de gran interés.

Expresión de marcadores moleculares

Existen una serie de marcadores moleculares que tienen cierta relación con el estado mutacional de genes IgVH. A continuación comentaremos alguno de ellos.

El receptor asociado a la proteína tirosina quinasa ZAP-70, está usualmente presente en células T y NK (*Natural Killer*), pero no en linfocitos B normales de sangre periférica. Su expresión se asocia preferencialmente con pacientes no mutados de LLC [44, 45]. La expresión de ZAP-70 daría lugar a una señalización más efectiva a través de la IgM de las células B-LLC, permitiendo que las mismas logren una mayor supervivencia o proliferación, lo que podría derivar en un curso más agresivo de la enfermedad [46-48].

Otra molécula que mostró relación con el estado mutacional de los genes IgVH fue CD38, la cual normalmente se expresa durante el desarrollo de la célula B en los momentos en donde las interacciones célula – célula son cruciales [49], por ejemplo en células de centros germinales, y células plasmáticas [50]. Su expresión predomina en pacientes con los genes IgVH no mutados [41, 44]. En LLC CD38 favorece el crecimiento de la célula B-LLC y la supervivencia de la célula mediante interacciones secuenciales entre CD38 y CD31 y entre CD100 y plexin B1 [51].

LPL (Lipoproteína lipasa), es un marcador que se sobre-expresa en pacientes no mutados [52]. En particular su determinación por PCR en tiempo real parece ser el que tiene mejor correlación con la expresión de los genes IgVH no mutados [53].

Finalmente la enzima AID (enzima citidina deaminasa), la cual se expresa exclusivamente en células B, necesaria para dar lugar a los procesos de mutación somática y cambio de clase, se encuentra sobre-expresada en pacientes que presentan genes IgVH no mutados [54-56]. Esta sobre-expresión está relacionada a una pérdida de especificidad de la enzima generando mutaciones en genes distintos a las inmunoglobulinas como *BCL6*, *MYC*, *PAX5*, y *RHOH*, los cuales se asocian con una enfermedad más agresiva [57]. Finalmente recientemente se mostró que dentro de los pacientes no mutados existe un grupo de pacientes con alta expresión de AID que presentan cambio de clase, tienen muy mal pronóstico y su presencia podría estar indicando un reciente contacto del linfocito B-LLC con un microambiente activado. [58]

De todas maneras hasta el momento, ninguno de los marcadores moleculares descriptos son capaces de predecir completamente la progresión de la enfermedad y/o explicar los heterogéneos perfiles de progresión en el curso clínico de la LLC [59].

Continuar investigando marcadores diagnósticos y/o pronósticos en LLC para poder seleccionar aquellos de mayor impacto, contribuirá a la aplicación de los esquemas terapéuticos más apropiados en cada caso.

Análisis citogenético

Las aberraciones genéticas encontradas en LLC no aparecen en forma constante en los pacientes analizados, y tampoco está determinado si constituyen eventos iniciales de la enfermedad o si se producen durante la evolución de la misma. Además contrariamente a lo que sucede en otras enfermedades del linfocito B, las cuales muestran típicamente traslocaciones cromosómicas balanceadas, en la LLC las anomalías más frecuentes son mutaciones, deleciones o trisomías. Se pueden presentar traslocaciones pero en general no son balanceadas, resultando en pérdida del material genético [60].

Las alteraciones más frecuentes son: deleción 13q14 (55%), trisomía del cromosoma 12 (18%), deleción 11q22-q23 (16%), y menos frecuentemente la deleción 17p13 (7%) [61]. La observación de una deleción 17p13 o 11q se asocia con mal pronóstico y predomina en etapas avanzadas de la enfermedad y en pacientes con genes IgVH no mutados. En particular la deleción 17p13 es el marcador independiente más fuerte de mal pronóstico [21]. La deleción 13q14 o un cariotipo normal se asocian con buen pronóstico, etapas iniciales de la enfermedad y genes IgVH mutados. Respecto a la trisomía del cromosoma 12 existe aún controversia respecto a si tiene una relación con mal pronóstico y genes IgVH no mutados [42, 62].

Defectos de apoptosis y proliferación

Varios factores antiapoptóticos como BCL2 han sido encontrados sobre-expresados en LLC [63]. Además la enfermedad muestra una deregulación del ciclo celular que contribuye a la acumulación de células en fases tempranas del ciclo (G0/G1)[64]. Estos datos, clásicamente han llevado a pensar que la LLC se caracteriza principalmente por una acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales morfológicamente maduros pero incompetentes funcionalmente. Sin embargo estudios más recientes sugieren que la LLC es también una enfermedad linfoproliferativa [65]. Estudios relacionados a la influencia del microambiente de la LLC muestran la existencia de eventos de proliferación.

Microambiente en LLC

El microambiente en la LLC cumple un rol fundamental [66], el cual surge de forma clara al tener en cuenta el hecho de que los linfocitos de pacientes de LLC no son cultivables dado que se mueren a los pocos días, mientras que en el paciente que padece la enfermedad los mismos no sólo evaden mecanismos de apoptosis sino que también está reportada la existencia de un *pool* proliferante dentro de LLC [58, 65, 67, 68]. Se ha estudiado *in vitro* que la apoptosis puede ser inhibida por exponer a los linfocitos a interleuquina 4 y mediante la estimulación del receptor CD40. In vivo esta inhibición de la apoptosis puede suceder en pseudofolículos de nodos linfáticos y en *clusters* de células de la médula ósea [69]. Los pseudofolículos en contacto con células B proliferantes, aumentan el número de linfocitos T CD4 que expresan CD40 ligando. Estos linfocitos T CD4 activados pueden ser reclutados por linfocitos B-LLC, dado que expresan de forma constitutiva quimioquinas capaces de atraer linfocitos T: CCL17 y CCL22 [69, 70]. Además el microambiente en los nódulos linfáticos, bazo y médula ósea sería capaz de generar centros de proliferación para los linfocitos B-LLC. En estos microambientes los linfocitos LLC pasarían a expresar mayores cantidades de CD38, luego al salir hacia sangre periférica los niveles de marcadores de activación de las células descenderían hasta un nivel determinado por cualidades intrínsecas del linfocito. Aquellas células que mantengan cierto nivel de activación volverían a los tejidos atraídas por quimioquinas para volver a iniciar el ciclo. CD38 podría ser visto como un marcador que indica cuanto tiempo hace que una célula LLC visitó un centro de proliferación [21, 71, 72].

GLICOSILACIÓN

Generalidades

El proteoma humano, originado a partir de la expresión de los genes codificantes de proteínas, comprende aproximadamente 30.000 genes [73], un número sorprendentemente bajo considerando que el genoma de *C. elegans* comprende unos 20.000 genes [74]. Sin embargo, en humanos existe un orden mayor de complejidad de productos proteicos debido a eventos pretraduccionales como el *splicing* alternativo y a modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la glicosilación [75]. La glicosilación es la más común y más compleja modificación postranscripcional jugando un rol fundamental en la regulación de la biología de los organismos eucariotas. Su rol central en humanos se evidencia por la abundancia que existe de genes que participan en la biosíntesis de glicanos, aproximadamente 1% del genoma, y de glicoproteínas, aproximadamente 50% del proteoma [76, 77].

Debido a la amplia complejidad que presentan los glicanos, se empezó a manejar el término glicoma, el cual incluye a las glicoproteínas, los glicolípidos, los proteoglicanos y las anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas estructuras altamente diversas muestran una complejidad mucho mayor en comparación al proteoma [78, 79].

La información contenida en el glicoma es decodificada por proteínas de unión a glicanos que median diversas funciones en el organismo, incluyendo interacciones hospedero-patógeno, tráfico celular y señalización transmembrana [78]. Las lectinas forman parte de la familia más grande de proteínas de unión a glicanos (cerca de 70 miembros) [75, 80].

Mientras que en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos se utiliza un molde, en el caso de los glicanos, su síntesis depende únicamente de las glicosiltransferasas involucradas. En la base de datos *Carbohydrate-Active enZYme Database* (www.cazy.org) se encuentran miles de secuencias de glicosiltransferasas conocidas o putativas divididas en 94 familias. Todas estas enzimas presentan una importante especificidad por sus sustratos [81]. Las estructuras de carbohidratos que pueden formarse son muy numerosas y complejas, debido a la posibilidad de los carbohidratos de formar ramificaciones. Cada monosacárido tiene 3 o 4 sitios de unión para otros residuos de azúcar y pueden formar un enlace glicosídico en una configuración α o β [75]. Todas estas posibilidades dan lugar a formar una enorme diversidad de estructuras, lo cual hace complejo el estudio de glicanos.

Funciones

Los glicanos cumplen diversas funciones que abarcan desde roles básicos para la célula como ser moléculas portadoras de energía (glucosa y glucógeno) y como elementos estructurales, hasta otros más complejos y cruciales para el desarrollo de un organismo [75]. Algunas de las funciones de los glicanos son conferir mayor resistencia a proteasas, mayor estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio y contribuir con el correcto plegamiento de las proteínas. También son componentes importantes de la señalización célula-célula y célula-matriz y se encuentran involucrados en la transducción de señales [79, 82]. Como ejemplo, las estructuras de los antígenos que determinan las especificidades de los grupos sanguíneos ABO son oligosacáridos [83]. También se descubrió que los genes determinantes del grupo sanguíneo A y B sintetizan glicosiltransferasas [84].

Finalmente volver a destacar que son blancos terapéuticos difíciles de estudiar. Su estudio emplea el uso de anticuerpos y lectinas, y técnicas como la espectrometría de masa [82, 85].

Las modificaciones postraduccionales de la glicosilación se pueden clasificar en tres grandes grupos: los anclajes de glicofosfatidilinositol (GPI), los *N*-glicanos y los *O*-glicanos [75, 86].

***N*-glicosilación**

En la *N*-glicosilación los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina (o glutamina) [87]. La misma se da principalmente en el interior del Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), donde todos los *N*-glicanos comparten un linaje protein-glicano común y tienen una vía biosintética común, que luego diverge y culmina en el aparato de Golgi. De forma simplificada el primer paso involucra la transferencia en bloque de un oligosacárido común, compuesto de 14 residuos (2 *N*-acetilglucosaminas, 3 glucosas y 9 manosas), a un residuo de asparagina contenido en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, de la proteína en síntesis. Dicha unión se realiza a través de un residuo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Una vez transferido a la proteína, en el proceso de la "maduración" de la misma, este oligosacárido sufrirá algunas modificaciones: perderá las 3 glucosas y 1 manosa. Posteriormente, las glicoproteínas pasaran al aparato de Golgi, donde sufrirán modificaciones adicionales, finalizando con el *capping* de las ramas del oligosacárido con ácido siálico y fucosa [82, 88].

El estudio de alteraciones de la *N*-glicosilación es relativamente sencillo ya que existe una secuencia consenso para la adición del primer oligosacárido y existen endoglicosidasas como la *N*-glicanasa F, capaz de deglicosilar completamente las proteínas para el posterior análisis de los carbohidratos [75].

***O*-glicosilación**

Contrariamente a lo que sucede en la *N*-glicosilación, los *O*-glicanos se ensamblan en base a diferentes enlaces protein-glicano y tienen estructuras extremadamente diversas, además no existe una endoglicosidasa disponible que libere *O*-glicanos intactos [75]. Estas características hacen que su estudio sea muy complejo.

La biosíntesis de *O*-glicanos se puede dividir en tres etapas. En la primera, los azúcares son sintetizados en el citoplasma. En la segunda, los mismos son transportados al Retículo Endoplasmático (RE) o al Golgi. En la tercera,

glicosiltransferasas específicas unen al azúcar a la proteína o al glicano en el RE o en el Golgi. La ruta principal para la biosíntesis de O-glicanos (y también de N-glicanos) se localiza en los compartimientos del RE y Golgi, en la llamada vía secretoria. La glicosilación está restringida principalmente a proteínas que son sintetizadas y liberadas en la vía secretoria, las cuales incluye proteínas de RE, Golgi, lisosomas, membrana plasmática y proteínas secretorias. La biosíntesis de O-glicanos es iniciada luego del plegamiento y oligomerización de las proteínas, ya sea en el RE tardío o en uno de los compartimientos del Golgi [75]. Los carbohidratos se unen al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y/o treonina. Dichos carbohidratos pueden ser fucosa, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa, manosa, galactosa y xilosa [75, 77, 89].

De los diferentes tipos de O-glicosilación posibles vamos a centrarnos en la O-glicosilación tipo mucina.

Mucinas

Las mucinas son proteínas con un alto grado de O-glicosilación que se encuentran en secreciones y membranas mucosas de los tractos respiratorio, digestivo y reproductivo [75]. Se caracterizan por dominios de secuencias repetidas que tienen una alta frecuencia de residuos de Ser/Thr conteniendo una gran cantidad de glicanos próximos entre sí, en una distribución de repetidos en tándem [90].

El tipo de O-glicosilación más abundante es el de tipo mucina. Se encuentra en más del 10% de proteínas humanas y en más del 50% de proteínas que pasan por la vía secretoria [83, 91]. Se caracterizan por la unión covalente entre una N-acetilgalactosamina (GalNAc) al grupo hidroxilo de una Ser/Thr de la proteína. Este paso constituye el primer paso de la síntesis de mucinas y es mediado por una amplia familia de enzimas (20 en humanos) denominadas UDP-GalNAc-polipéptido- α -N-acetilgalactosaminiltransferasas (GalNAc-Ts), las cuales utilizan UDP-GalNAc como sustrato donador. El producto de esa reacción se denomina antígeno Tn. A partir de Tn y de forma secuencial se extiende la cadena de azúcares hasta formar las mucinas [83, 90].

Algunas características que distinguen a las mucinas del resto de proteínas O-glicosiladas es que, como se mencionó recientemente, en las mucinas el paso inicial de glicosilación se encuentra controlado por la familia de enzimas GalNAc-Ts, mientras que las otras formas de O-glicosilación requieren para su inicio la participación de una o dos enzimas solamente. Además, la síntesis de mucinas

comienza en el Golgi mientras la mayoría del resto de O-glicosilaciones, con excepción de la O-xilosa, comienzan en el RE (Figura 3 A y B) [92, 93].

Se pueden distinguir 8 estructuras glicosídicas tipo mucina, denominadas *cores*, dependiendo del segundo azúcar adicionado y del enlace glucosídico particular, de los cuales los *cores* 1-6 y el *core* 8 han sido descritos en humanos. De ellos los *cores* del 1-4 son los más frecuentes [75, 83]. (Figura 3A). Mientras en la N-glicosilación el *core* es siempre el mismo dado que en el primer paso siempre se transfiere en bloque el mismo oligosacárido, en la síntesis de mucinas, dado que la misma se lleva a cabo de forma secuencial, la complejidad de las cadenas oligosacarídicas es mucho mayor existiendo los ocho tipos de *cores*. En condiciones normales, a partir de los distintos *cores* se extiende luego la cadena de carbohidratos por la acción de distintas glicosiltransferasas [75].

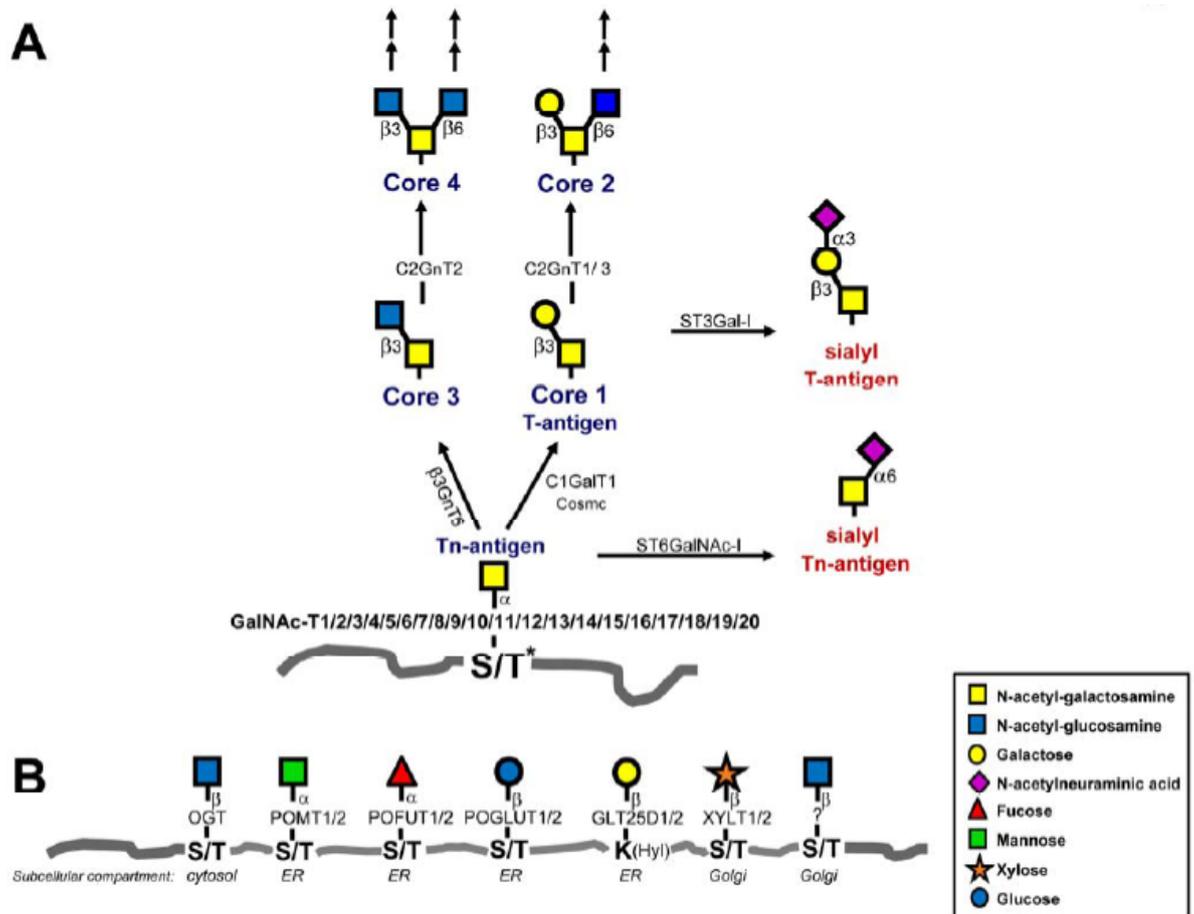


Figura 3. Vías de O-glicosilación de proteínas de mamíferos. (Tomado de Bennett EP et al., 2011 [93])

(A) Se muestra la vía biosintética de los cores más comunes (1 a 4). La O-glicosilación tipo mucina en humanos puede ser iniciada por la acción de hasta 20 GalNAc-Ts formando el antígeno Tn, el cual luego puede ser elongado por la core 1 sintasa C1Gal-T1 o la core 3 sintasa β3GnT6, y luego por la core 2 C2GnT1-3. Los distintos cores pueden luego seguir elongándose por la acción de otras glicosiltransferasas y ramificarse por cadenas de N-acetil-lactosamina y/o terminados por la acción de estructuras relacionadas al grupo sanguíneo ABH, fucosa y ácido siálico. La sialilación puede terminar la elongación de la cadena por la acción de ST3Gal-I utilizando el core 1 como sustrato, lo que produce el antígeno sialil-T. Una sialilación prematura del primer GalNAc agregado mediada por la ST6GalNAc-I da lugar al antígeno Sialil-Tn. Estudios recientes mostraron que GalNAc también puede unirse a Tyr [94, 95]. (B) Ilustra otros tipos de O-glicosilación de proteínas que se lleva a cabo en mamíferos y las enzimas que inician estas reacciones. Las glicosiltransferasas involucradas en la formación de las distintas proteínas O-glicosiladas están indicadas por su nombre oficial y los compartimentos generales en donde se llevan a cabo estas modificaciones se encuentran también indicados. (Adaptado de Bennett EP et al., 2011 [93])

Las mucinas así como muchas de las enzimas requeridas para su síntesis aparecen tempranamente en la evolución de los eumatozoos (comprende la totalidad de los animales con la excepción de las esponjas), lo que sugiere que la adquisición de barreras de mucus fue central para el desarrollo de los mismos [96, 97]. Cumplen distintas funciones, principalmente de protección de epitelios, bloqueando el acceso a

proteasas. Además pueden modular el tráfico intracelular de proteínas y la activación de receptores, así como también participan en procesos de adhesión célula-célula [83, 90]. Se las ha asociado a procesos fundamentales como la coagulación de la sangre, el desarrollo embrionario, el sistema inmune, la muerte celular y la interacción de los patógenos con las células huésped. También ha sido demostrado que son el blanco de reconocimiento de muchos anticuerpos de glicanos tumor específicos [98].

Los mecanismos que regulan la O-glicosilación tipo mucina son aún poco comprendidos. Hasta el momento los mecanismos de control descritos dependen principalmente de los niveles de expresión de las distintas glicosiltransferasas involucradas en el proceso de síntesis.

En este trabajo nos centraremos en estudiar uno de los miembros de las enzimas responsables de iniciar la O-glicosilación tipo mucina: las GalNAc-Ts.

GalNAc-Ts

Definición

Como se mencionó anteriormente las GalNAc-Ts son una familia de enzimas que catalizan el primer paso de la O-glicosilación tipo mucina mediante la transferencia de un residuo de GalNAc de un azúcar donador UDP- α GalNAc a un residuo de Ser o Thr formando un enlace α -anomérico dando GalNAc α 1-O-Ser/Thr (formación del antígeno Tn) [99] (Figura 4).

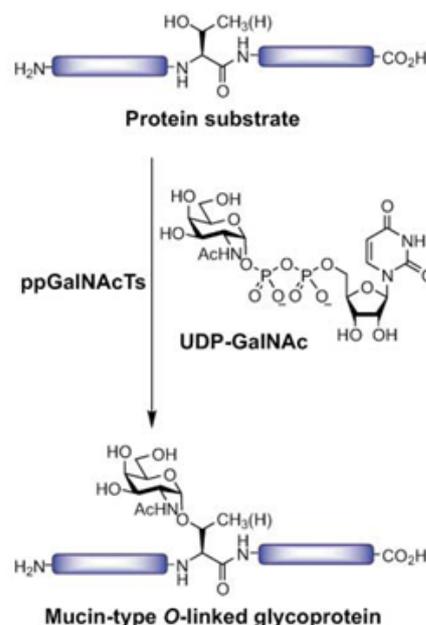


Figura 4. Inicio de la síntesis de la O-glicosilación tipo mucina. (Tomado de Pratt et al., 2004 [100])

Las GalNAc-Ts están clasificadas como la familia GT27 dentro de la clasificación de CAZY (www.cazy.org), la cual se basa en las similitudes entre secuencia y estructura, incluyendo 94 familias diferentes de glicosiltransferasas. Hay un total de 20 GalNAc-Ts humanas identificadas, de las cuales 17 han sido caracterizadas [99, 101, 102]. Las 3 isoformas que aún no tienen actividad demostrada, y por lo tanto se mantienen como putativas GalNAc-Ts son GalNAc-T19, -T20 y -T8 [101].

Esta familia de enzimas está muy conservada en la evolución de metazoos y aunque el número de miembros de la familia varía entre distintas especies, todos los genomas contienen una cantidad considerable de enzimas, siendo todas secuencias homólogas. A su vez los ortólogos entre eucariotas superiores tienen una homología de secuencia entre 90-98% [99]. Estos datos indican que la estructura y función de las GalNAc-Ts ha sido conservada [103, 104]. Se han llevado a cabo importantes esfuerzos para analizar las características y funciones de las GalNAc-Ts y algunas propiedades generales de las mismas son [93] :

1. Las distintas isoformas de GalNAc-Ts tienen distinta especificidad de sustratos.
2. La especificidad de sustrato por péptidos aceptores incluye tanto secuencias peptídicas sin modificar así como péptidos parcialmente glicosilados.
3. El dominio C-terminal lectina modula la especificidad de sustrato a partir de péptidos parcialmente glicosilados (Como se verá a continuación).
4. Las distintas isoformas de GalNAc-Ts se expresan de manera diferencial en células y tejidos durante el desarrollo y diferenciación, y se han encontrado marcados cambios en la expresión de GalNAc-Ts en distintas enfermedades, entre ellas el cáncer.

Como se menciona en la propiedad 2 descrita anteriormente, al analizar la reacción catalizada por esta familia, se puede realizar una subdivisión de la misma. Algunas de las isoformas pueden ser clasificadas como transferasas peptídicas ya que transfieren un residuo de GalNAc tanto a péptidos no modificados como a glicopéptidos, mientras otras enzimas como la GalNAc-T7 y -T10 de mamífero por ejemplo, requieren de la adición previa de GalNAc antes de poder transferir GalNAcs adicionales al péptido. Estas últimas enzimas se denominan transferasas glicopeptídicas [99, 105]. Algunos autores, en base a estudios *in vitro* definieron 3 niveles de preferencia de sustratos por estas enzimas: tempranas, glicosilan sustratos peptídicos sin previa glicosilación (-T1,

-T2), intermedias, glicosilan sustratos con una previa glicosilación, y tardías, glicosilan sustratos que presentan alto grado de glicosilación (-T10, -T17) [100, 101].

Estructura

Todas las isoformas son proteínas de membrana tipo II con un pequeño dominio N-terminal citoplasmático, una región transmembrana hidrofóbica, una región *stem* de tamaño variable (90-170 aa, excepción GalNAc-T5 con 470 aa)[93], un gran segmento situado en el lumen del Golgi compuesto por un dominio catalítico [106], y un dominio C-terminal tipo lectina (120 aa) (Figura 5A). La existencia del dominio lectina hace únicas a las glicosiltransferasas dentro de los eucariotas [107, 108].

El dominio N-terminal citoplasmático contiene residuos básicos que podrían estar involucrados en la interacción con complejos protéicos situados en la membrana periférica del Golgi [109]. Respecto a la región *stem*, se piensa que sirve para extender el dominio catalítico en el lumen del Golgi, pero funciones más específicas en base a la gran variabilidad que presenta esta región en las GalNAc-Ts aún no han sido descritas [93].

El dominio catalítico de aproximadamente 230 aa contiene un motivo GT1 [110], el cual interacciona con el sustrato donador UDP-GalNAc [111, 112]. Contiene también un motivo DXH de unión al ion Mn^{2+} muy conservado en todas las isoformas humanas. Interacciona con el grupo saliente UDP mediante la coordinación con el ion Mn^{2+} [113]. Finalmente contiene un motivo Gal-GalNAc-T el cual interacciona con GalNAc del sustrato donador (Figura 5 A y B). El dominio catalítico es el más conservado de toda la secuencia [113].

El dominio lectina pertenece a la familia de estructuras de tipo ricina [114]. Consiste en tres repetidos en tándem (α , β y γ), cada uno de ellos serían sitios putativos de unión a carbohidratos. (Figura 5 A y B). Este dominio se encuentra en general poco conservado. Su especificidad de unión a carbohidratos muestra alta especificidad de unión a GalNAc y glicopéptidos GalNAc [115], pero no a glicopéptidos que presenten una cadena de O-glicanos muy elongada [116]. El dominio lectina funciona modulando y mejorando la eficiencia catalítica de las GalNAc -Ts con sustratos que estén parcialmente glicosilados, y que contengan una alta densidad de sitios aceptores como los que se encuentran en las mucinas. Estudios preliminares sugieren que el dominio lectina sirve para mejorar la unión de las GalNAc-Ts a sus sustratos con el fin de completar el inicio de la O-glicosilación antes de que los O-glicanos sean

elongados, dado que esto podría interferir con próximas adiciones de residuos GalNAc [93].

Los dominios catalítico y lectina están conectados por una secuencia *linker* de 10-25 aa la cual, en base a datos estructurales es muy flexible [105]. Dicha flexibilidad podría tener la función de controlar la orientación relativa de ambos dominios y servir para dirigir la especificidad de sustrato del dominio lectina de las GalNAc-Ts.

Estudios recientes en base a *arrays* de glicopéptidos analizaron las propiedades de unión de los dominios lectinas de GalNAc-T1, -T2, -T3 y -T4, encontrando que se unen a distintos grupos de glicopéptidos. Este resultado muestra un nivel adicional de complejidad en el paso inicial de la O-glicosilación de las GalNAc-Ts [116].

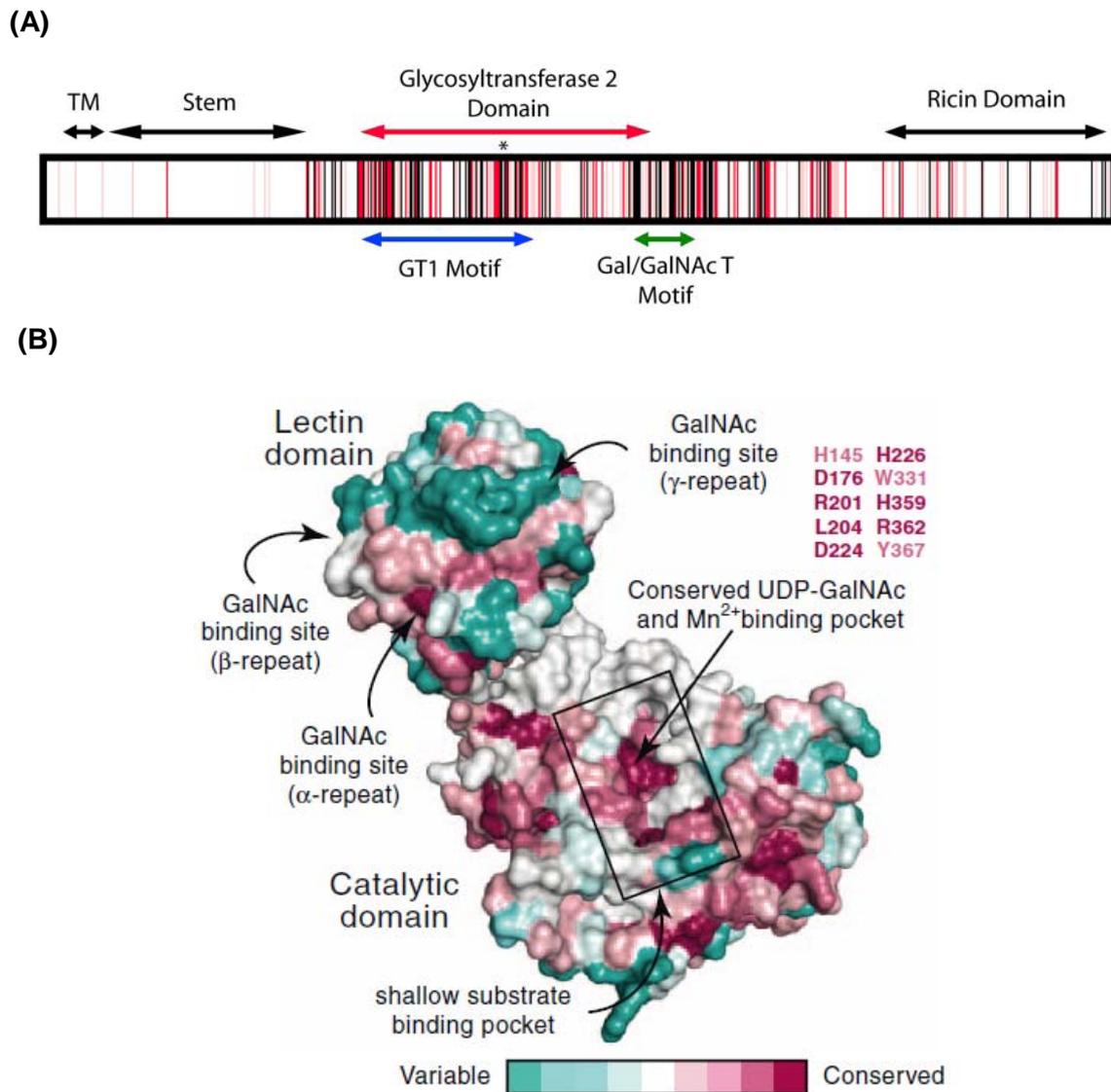


Figura 5. Dominios estructurales de las GalNAc-Ts.

(A) Diagrama consenso de variadas GalNAc-Ts con actividad demostrada. Las regiones en blanco, rosada, rojo y negro representan, $0\pm 29\%$, $30\pm 69\%$, $70\pm 99\%$, y 100% de identidad de secuencia respectivamente. La posición de la región transmembrana (TM), stem, dominio catalítico (dominio glicosiltransferasa 2, y motivos GT1 y Gal/GalNAc-T) y el dominio lectina (dominio ricina) se indican mediante las flechas de colores. El asterisco muestra la localización de dominio conservado DXH. (Modificado de Ten Hagen et al., 2003 [99]). (B) El dominio catalítico y el de lectina de las GalNAc-Ts funcionan juntos para seleccionar los potenciales sitios Ser/Thr de los polipéptidos blanco para la adición de GalNAc-T. La conservación de residuos entre las 20 GalNAc-Ts humanas fueron coloreados en la representación de la superficie de la GalNAc-T2 humana. Los residuos cuya función es unirse a UDP-GalNAc y al cofactor Mn^{2+} son altamente conservados entre las distintas isoformas humanas de las GalNAc-Ts, dado que su función es esencial para la actividad catalítica de las mismas. Los residuos de superficie ubicados en el dominio lectina son poco conservados. Los putativos sitios de unión GalNAc-Ser/Thr en el repetido α son más conservados que los sitios putativos GalNAc-Ser/Thr de los repetidos β y γ . (Modificado de Gill et al., 2010 [117])

Especificidad de sustratos

Contrariamente a lo que sucede en la *N*-glicosilación, en la cual existe una secuencia consenso aminoacídica, en la *O*-glicosilación tipo mucina no existe una secuencia consenso, esto hace que la especificidad de sustratos de péptidos y glicopéptidos de las GalNAc-Ts siga siendo aún un tema poco entendido. Recientemente, el uso de bibliotecas de sustratos de péptidos y glicopéptidos permitió cuantificar la preferencia por determinados residuos y motivos de secuenciasceptoras específicas para determinadas isoformas de GalNAc-Ts [118-121]. Estos estudios sugieren que el principal motivo de secuencia que determina la especificidad de sustrato de las GalNAc-Ts reside en los 3 residuos N y C-terminales que flanquean el sitio de glicosilación. Todas las GalNAc-Ts estudiadas excepto GalNAc-T10, muestran una alta similitud en las secuencias C-terminales, siendo las mismas de Pro, Gly/Ala, Pro para las posiciones +1 a +3 relativas al sitio de glicosilación. En el caso de secuencias hacia el N-terminal del sitio de glicosilación, se han observado preferencias para Pro, Val y Tyr siendo las más comunes en las posiciones -3 a -1 del sitio de glicosilación [118].

Recientemente se mostró que la preferencia hacia residuos cargados varía entre las distintas isoformas y esto se puede relacionar con la carga de superficie calculada de la GalNAc-T particular [118].

Patrones de expresión y distribución

Las GalNAc-Ts se expresan de forma diferencial en células y tejidos y cambios significativos en su expresión se han encontrado en diversos tipos de cáncer. Análisis por *Northern Blot* mostraron que distintas isoformas tienen distintos patrones de expresión en ratón y rata [122], y en distintos órganos humanos [123, 124]. Otros estudios también mostraron que algunas GalNAc-Ts se expresan de forma más ubicua, como por ejemplo GalNAc-T1 y T2, mientras que otras como GalNAc-T3, T4, T5, T7, T8 y T10, tienen un patrón de expresión más restringido [123-125]. Generalmente las células expresan múltiples GalNAc-Ts. Como ejemplo, podemos mencionar el transcriptoma de la línea celular CHO-K1 (hámster chino), el cual fue recientemente descrito y se encontró que expresan 4 GalNAc-Ts (GalNAc-T2, -T7, -T11, -T19) [126]. Otro ejemplo muestra la expresión de las GalNAc-Ts en células hematopoyéticas CD34+ purificadas de médula ósea de adultos humanos, encontrándose mediante RT-PCR que las mismas expresaban T1, T2, T3, T4, T6, T7, T10, T11 y T14, pero no las isoformas T8, T9, T12 y T13. Luego, al inducir las

células para diferenciarse a megacariocitos, los mismos mostraron un aumento en la expresión de T3, T8, T9, T10 y T13, pero T11 y T14 se vuelven indetectables [127].

Cada isoforma presenta una combinación única de patrones de expresión espacio-temporal durante el desarrollo y en tejidos adultos; así como especificidad de sustrato diferentes. Estos datos sugieren por un lado roles particulares para cada isoforma, y además sugieren que estas enzimas deben sufrir procesos de regulación que involucran un alto grado de complejidad [128].

El uso de anticuerpos ha permitido demostrar claramente que las distintas isoformas de GalNAc-Ts cambian también su expresión durante la transformación maligna [129].

Regulación de la expresión de las GalNAc-Ts

Resulta sorprendente que los eventos que regulan la expresión de los genes *GALNT* han sido muy poco estudiados. De hecho, hasta el momento el único estudio que existe sobre elementos regulatorios que controlen la expresión de estas enzimas, es un estudio sobre el gen *GALNT3*, realizado en 1999 [130]. En el mismo se estudió una secuencia de 1.6 Kb alrededor del primer exón. Mediante experimentos de *footprint* se mostró protección de dos sitios SP1 (-GGGCGG-), un sitio NRF1 (-CGCGCAGGCGCG-) y un AP-2 (CCCCTGCCG) en la línea MCF7, capaz de expresar GalNAc-T3, pero no se observó dicha protección en la línea KB (no expresa GalNAc-T3). Todos estos sitios se encuentran a no más de 170 pb hacia el 5' del sitio de inicio de la transcripción. Este trabajo también describe una estructura *stem loop*, contigua a los sitios de unión a los factores de transcripción, que parece regular la expresión de GalNAc-T3 *in vivo*.

Otros estudios muestran que la expresión de los genes *GALNT* también podría estar regulada por eventos epigenéticos que involucran la regulación por microRNAs. Por ejemplo un estudio propone que el *mir-378* involucrado en la diferenciación de osteoblastos, tiene como *target* el gen *GALNT7* [131].

La metilación aberrante del ADN es uno de los mecanismos mejor caracterizados presente en distintos tipos cáncer [8]. Por otro lado se ha mostrado la expresión alterada de diversas GalNAc-Ts en cáncer [132-139, 169-173]. Sin embargo aún no existen estudios enfocados a analizar el estado de metilación de los genes *GALNTs* en esta patología.

Localización

Hasta hace apenas dos años la localización de las GalNAc-Ts se le adjudicaba exclusivamente al Golgi. Particularmente, la localización de las mismas dentro de las distintas cisternas del Golgi es considerada una de las formas de regular la síntesis de mucinas. Esto es debido a que el proceso de síntesis de mucinas se genera en forma secuencial, mediante la participación de enzimas que compiten por agregar diferentes azúcares al mismo producto, y por lo tanto, regular la acción de las distintas enzimas es importante para controlar el tipo de O-glicano final que se va a obtener [117]. Existen evidencias que sugieren que la transformación maligna se asocia con una marcada desorganización del aparato de Golgi, y que estos cambios podrían ser en parte responsables de una localización anormal en el cáncer [140]. Por otro lado, se ha estudiado que existen un conjunto de señales que monitorean y controlan el tráfico vesicular en el Golgi. Estas señales incluyen a proteínas chaperonas, proteínas del citoesqueleto, y un *pool* de Src quinasas [141, 142]. Recientemente se mostró que las Src quinasas regulan específicamente el tráfico desde el Golgi hacia el RE ya sea de forma directa o mediante la activación de dinamina 2 GTPasa [143]. En particular, la activación de las Src quinasas inducen la relocalización de las GalNAc-Ts del Golgi al RE, y este proceso ocurre específicamente con las GalNAc-Ts y no con otras glicosiltransferasas [117, 141, 143].

La localización selectiva de las GalNAc-Ts al RE luego de la activación de Src quinasas, hace que las mismas tengan más tiempo disponible para interactuar con sus sustratos, dado que el resto de las glicosiltransferasas (por ejemplo las enzimas que generan el *core*1 y 3) se mantienen en el Golgi. A su vez, los residuos de Ser/Thr que normalmente se modificaban en el RE por O-manosas y otras enzimas competirían ahora con las GalNAc-Ts. Todos estos cambios podrían afectar drásticamente el repertorio de proteínas O-glicosiladas [117].

Estudios recientes sugieren que ciertas isoformas de las GalNAc-Ts se localizan en el RE durante los procesos de transformación maligna [144]. A su vez las quinasas constituyen proto-oncogenes conocidos que se encuentran sobre-expresados y/o activados en distintos tipos de cáncer [145]. En esta patología la actividad de las Src quinasas no sería necesaria para el crecimiento tumoral pero sí para los procesos de metástasis [146]. Como se dijo recientemente, la activación de las Src quinasas promueven la relocalización de las GalNAc-Ts desde el Golgi al RE, lo que aumentaría la densidad de modificaciones provocadas por las GalNAc-Ts. Una alta densidad de modificaciones provocadas por las GalNAc-Ts en los sustratos impide la actividad de

las enzimas C1GalT *in vivo* y C2GnT *in vitro* [147, 148], lo que resultaría en una síntesis aumentada de O-glicanos de cadena corta (ejemplo: Tn, Sialil-Tn, core1). Los glicanos de cadena corta se han observado en una cantidad importante de diferentes tipos de cáncer [149, 150].

Finalmente, cabe mencionar que en la LLC se ha encontrado sobre-expresada la quinasa Lyn la cual pertenece a la familia de las Src quinzasas [151]. Respecto a la expresión de antígenos de cadena corta como Tn y Sialil-Tn, los datos son contradictorios [152, 153], y por lo tanto no está claro si los mismos se expresan o no en pacientes con LLC.

La familia de los genes GALNT humanos

Los 20 genes humanos GALNT se localizan en distintos *loci* de cromosomas, excepto por dos *clusters* (Tabla 2). Un *cluster* contiene los genes de GALNT7/17, separados por 100kb. El otro *cluster*, GALNT11/20, está separado por 8.5 Kb. En ambos casos no hay ORFs entre los genes de los *clusters*. GALNT5 y T13 también se encuentran relativamente cercanos en el genoma (1.5 Mbp) pero esta región presenta múltiples ORFs de proteínas conocidas. El tamaño de los *loci* de los diferentes genes GALNTs varía entre 5kb para T4 hasta más de 1.2 MBp para T17. Todos los genes tienen múltiples exones (8-16) excepto GALNT4 que tiene un único exón. Análisis de las posiciones intrón/exón muestran que tres posiciones de intrones se encuentran conservadas en todos los genes: C1-3 (Tabla 2), y que otras están conservadas en un grupo de genes determinados [154]. Esto sugiere que todos los genes GALNT se originaron a partir de un ancestro común GALNT que contenía al menos los 3 intrones conservados en todas las GalNAc-Ts, y que el resto de los intrones fueron ganados durante la evolución de los parálogos. Para todas las GALNTs, los exones que codifican la unidad catalítica están flanqueados en su extremo 5' por el intrón C1 y en su extremo 3' por un intrón que está conservado en 16 genes GALNT. La mayoría de los intrones encontrados en el dominio lectina se encuentran idénticamente ubicados en 16 GALNTs [93].

Los genes de GALNTs también dieron lugar a una cierta cantidad de pseudogenes. Por ejemplo, pseudogenes de GALNT11 fueron identificados en un intrón de LEPR en el cromosoma 1. El mecanismo de retroposición parece ser el mecanismo por el cual se formó la vasta mayoría (72%) de los más de 20.000 pseudogenes humanos descritos [155].

Tabla 2. Genes GALNTs en humano y ratón. (Tomado de Bennett et al., 2011 [93])

Designación Alternativa	GALNTs humanas	Intrones en ORF	Locus cromosomal		Número de Acceso		Referencia
			humano	ratón	humano	ratón	humano
	<i>GALNT1</i>	10	18q12,1	18(B1)	X85018	U73820	White et al. 1995
	<i>GALNT2</i>	15	1q41-q42	8(E2)	X85019	BC007172	White et al. 1995
	<i>GALNT3</i>	9	2q24-q31	2 (C3)	X92689	U70538	Bennett et al. 1996
POC1B	<i>GALNT4</i>	0	12q21,33	10(C3)	Y08564	U73819	Bennett et al. 1998
	<i>GALNT5</i>	9	2q24,1	2(C1,1)	AJ245539	NM_172855	Bennett et al.1998
	<i>GALNT6</i>	9	12q13	15(F3)	Y08565	AJ133523	Bennett et al. 1999
	<i>GALNT7</i>	11	4q34,1	8(B3,2)	AJ002744	NM_144731	Bennett et al. 1999
	<i>GALNT8</i>	10	12p13,3	- ^a	AJ271385	- ^a	White et al. 2000
	<i>GALNT9</i>	10	12q24,33	5(F5)	AB040672	AK032568	Toba et al. 2000
	<i>GALNT10^b</i>	11	5q33,2	11(B1,3)	AJ505950	BC016585	Cheng et al. 2002
	<i>GALNT11</i>	10	7q36,1	5(A3)	Y12434	Y12435	Schwientek et al. 2002
	<i>GALNT12</i>	9	9q22,33	4(B1)	AJ132365	AK042133	Gou al. 2002
	<i>GALNT13</i>	10	2q24,1	2 C1,1	AJ505991	AB082928	Zhang et al. 2003
FLJ12691	<i>GALNT14</i>	12	2p23,1	17(E2)	Y09324	AK078292	Wang, 2003
GALNTL2	<i>GALNT15</i>	9	3p25,1	14(B1)	NM_054110	AK005605	Cheng, et al. 2004
GALNTL1	<i>GALNT16</i>	13	14q24,1	12(C3)	AJ505951	AB045325	Peng, et al. 2010
GALNTL6	<i>GALNT17^c</i>	11	4q34,1	8(B3)	AJ626725	AK015826	Raman et al. 2011
GALNTL4	<i>GALNT18</i>	10	11p15,3	7(F1)	AJ626724	AAH24988	Raman et al. 2011
GALNTL3	<i>GALNT19</i>	10	7q11,23	5(G2)	AJ626726	NM_145218	Nakamura, et al. 2005
GALNTL5	<i>GALNT20</i>	7	7q36,1	5A3	NM_145292	AK090330	Raman et al. 2011

a: No hay identificado un gen *GALNT8* en ratón.

b: Originalmente fue publicado como *Galnt9* en ratón (Ten Hagen et al., 2001), pero se redefinió como *GALNT10* (Schwientek et al., 2002).

c: *GALNT17* fue recientemente publicada como *GALNT20* por Peng et al. (Peng et al., 2010), pero los autores de este trabajo sugieren asignar a esta isoforma *GALNT17* de acuerdo a la clasificación y nomenclatura de CAZy (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/fr/CAZY/>).

Los genes *GALNTs* se pueden agrupar en dos grupos principales I y II por la especificidad de sustratos peptídicos y péptidos-GalNAc respectivamente. El grupo I contiene siete subfamilias y el grupo II dos subfamilias. La clasificación de las subfamilias se basa en características relacionadas con la similitud de secuencia y estructura genómica similar (intrones / exones) [156]. El grupo I comprende a las subfamilias *GALNT1/T13* (Ia), *GALNT2/T14/T16* (Ib); *GALNT3/T6* (Ic), *GALNT5* (Id), *GALNT8/T9/T18/T19* (Ie), *GALNT11/T20* (If). El grupo II comprende a las subfamilias *GALNT4/T12* (IIa) y *GALNT7/T10/T17* (IIb). En un análisis filogenético los genes

GALNT5 y *T15* no se agrupan en subfamilias y muestran posición única de sus intrones [93].

GALNT20 no presenta exones que codifiquen el dominio lectina, y se encuentra en el cromosoma 7q36 al igual que *GALNT11*, ambos separados por 8.5 Kb. Experimentos para buscar si existen eventos de *splicing* alternativos entre ambos genes parecen mostrar que los mismos no se dan [93]. La proteína GalNAc-T20 tampoco se pudo expresar hasta el momento ni se pudo demostrar su localización en el Golgi, por lo que GalNAc-T20 podría representar un gen funcional, con función y localización aún desconocida, un gen con potencial para convertirse en un gen funcional, o un pseudogen [157].

GalNAc-Ts y su relación con patologías

Un gran número de defectos congénitos de la glicosilación han sido descritos en los últimos años [77]. La mayoría se encontraron relacionados a la vía de la *N*-glicosilación y de la *O*-glicosilación distintas al tipo mucina [158, 159]. Dado que en estos casos generalmente el paso inicial de la glicosilación de proteínas está catalizado por uno o dos genes de glicosiltransferasas, no sorprende que defectos en ellos tengan efectos en la glicosilación de las proteínas y muestren fenotipos severos. Por otro lado, se espera que el gran número de genes *GALNTs* que controlan el primer paso de la *O*-glicosilación tipo mucina, resulte redundante entre los distintos miembros. Por lo tanto es de esperar que la pérdida de un solo gen *GALNT* produzca efectos discretos en el fenotipo celular. Los estudios realizados sobre ratones deficientes en distintos genes *GALNTs* confirmaron la redundancia esperada, mostrando en la mayoría de los casos fenotipos difíciles de detectar [160] [77]. Por ejemplo ratones deficientes en *galnt13* mostraron una menor expresión del antígeno Tn en tejido de cerebro pero no se vio un fenotipo particular [161]. Sin embargo un organismo *knock down* para el gen *pgant35A* en *Drosophila*, cuyo ortólogo en humano es *GALNT11*, generó un fenotipo letal en la mosca [162]. Este estudio muestra por primera vez que isoformas individuales de GalNAc-Ts cumplen funciones únicas y esenciales, y que la existencia de una familia de 14 miembros como en el caso de *Drosophila*, no provee redundancia genética y funcional completa [93].

Hasta el momento un solo gen *GALNT* humano, *GALNT3*, mostró generar un fenotipo de enfermedad [163]. El mismo se da debido a que la deficiencia de *GALNT3* genera una falta de *O*-glicosilación en una Thr particular de la proproteína convertasa, la cual procesa el factor FGF23, lo que lleva a un exceso del procesamiento e inactivación de FGF23 [164]. *GALNT3* también se asocia con la densidad mineral ósea y el riesgo de

fractura [165]. El gen *GALNT4* se asocia con la enfermedad aguda coronaria [166], y *GALNT14* se asocia con la resistencia a un receptor de muerte celular, el cual media apoptosis [167]. Finalmente, recientemente se vinculó a una delección poco común de un exón de *GALNT11* en una enfermedad congénita del corazón, con la heterotaxia causada por una asimetría izquierda-derecha (IR) [168]. Además de *GALNT11*, este estudio identifica otros 4 genes implicados en la IR, y se plantea que los 5 genes participan en la misma vía.

GalNAc-Ts y Cáncer

Varios estudios muestran una expresión alterada de las GalNAc-Ts en distintos tipos de cáncer [132-139, 169-173]. A continuación mencionaremos algunos ejemplos.

GalNAc-T6 no se expresa en colon normal, pero su expresión es alta en cáncer de colon. También se ha encontrado su expresión en el transcurso del cáncer gástrico [169]. Por otro lado, GalNAc-T6 se ha asociado con el estadio 1 de cáncer de mama [170], y fue sugerida como un nuevo marcador de este cáncer [171]. También en relación al cáncer de mama estudios recientes sugieren que la elevada expresión de GalNAc-T6 se correlaciona con un aumento en la glicosilación y expresión en la superficie celular de MUC1 [172].

Otro ejemplo son las isoformas GalNAc-T1 y -T2 las cuales fueron estudiadas en muestras de cáncer colorrectal y epitelio normal proveniente del mismo paciente observando una mayor expresión para T1 y T2 en el tejido maligno en relación al epitelio normal [132].

Para el caso de GalNAc-T3 se mostró que en el cáncer colorrectal, una mayor expresión de la enzima, lo que se correlaciona con una mayor sobrevida. En todos los casos, sin embargo, la expresión de GalNAc-T3 era menor que la encontrada en la mucosa colorrectal normal. Esta observación es concordante con reportes anteriores que afirman que los tejidos tumorales contienen menos carbohidratos que la mucosa normal, en donde las mucinas muestran una reducción en el número y largo de las cadenas de carbohidratos comparadas con las de mucosa normal [133]. GalNAc-T3 también fue encontrada con una expresión menor en tejidos tumorales de cáncer de pulmón respecto a los tejidos normales, mostrando mayor sobrevida aquellos pacientes con mayor expresión de GalNAc-T3 [136]. Contrariamente, se encontró que la expresión de GalNAc-T3 se encuentra incrementada en los diferentes estadios de la invasión del cáncer de vejiga, y su mayor expresión se relaciona con una mayor agresividad [137]. Finalmente, recientemente también se mostró que la sobre-

expresión de GalNAc-T3 promueve el crecimiento de células pancreáticas tumorales [173]. Por qué este comportamiento aparentemente opuesto ocurre entre distintos tipos de tumores no es fácil de explicar debido a la falta de conocimiento de la función que cumple esta enzima en cáncer.

Por otro lado, para el caso de GalNAc-T13 se encontró la expresión del mensajero en médula ósea de pacientes con neuroblastoma, la cual se correlaciona con una mala evolución [170].

Glicobiología y LLC

Finalmente, se pretende brindar un resumen de las distintas investigaciones que vinculan a la LLC con glicosilación aberrante.

Como se mencionó anteriormente, una de las alteraciones de mayor relevancia en células tumorales es la alteración de los patrones de O-glicosilación, existiendo en muchos casos antígenos de O-glicosilación incompleta como Tn, y sialil-Tn. Sorprendentemente, en LLC no se han realizado estudios en profundidad en este aspecto, excepto estudios realizados hace más de 15 años que muestran resultados contradictorios: mientras Aller et al. (1996) [152] encontraron la expresión del antígeno Tn en 6 pacientes de LLC, Muroi et al., (1994) encontraron que dicho antígeno no se expresaba en 3 pacientes con LLC [153].

El receptor de células B (BCR) es una molécula fundamental para la supervivencia del linfocito B normal y para la mayoría de los linfocitos B relacionados a patologías. Se ha mostrado que el receptor BCR, el cual consiste en la inmunoglobulina de superficie expresada por el linfocito B asociada al heterodímero CD79a/CD79b, presenta una falta de glicosilación (*N*-glicosilación) y *fold*ing de CD79a en LLC. Esto se asocia con una baja expresión de IgM de superficie [25].

Dado que existe un uso particular, no al azar de los genes VH y VL en LLC [174, 175] se ha dado un rol importante a la interacción del antígeno con la IgM de superficie en el linfocito LLC. La síntesis de IgM involucra la adición de glicanos a la cadena pesada de la Ig [176]. Este proceso comienza en el RE, donde se inicia la *N*-glicosilación en la cual un *core* con alto grado de manosas se agrega a un residuo de asparagina dentro de una secuencia consenso. Normalmente, la *N*-glicosilación prosigue en el Golgi, dando los productos finales de glicosilación. Es por esto que la forma inmadura de glicosilación de IgM se asocia al RE, mientras que la madura se expresará preferentemente en la superficie celular o será IgM secretada. La IgM de superficie en

LLC existe en 2 formas con patrones de *N*-glicosilación diferente. Una forma se parece a la expresada en el linfocito B normal y sería la forma madura, la otra presenta un alto grado de manosas, lo cual concuerda con una IgM inmadura. Sorprendentemente ambas formas son capaces de llegar a la superficie celular y mediar una transducción de señal. La forma inmadura puede ser generada en el linfocito B normal luego de una persistente estimulación de la IgM, lo cual sugiere que el cambio en la glicosilación es consecuencia de la exposición al antígeno. Por lo tanto en LLC la unión del antígeno a la IgM podría favorecer la expresión de la forma inmadura de IgM. El hecho de que esta glicofoma particular de IgM se exprese principalmente en pacientes LLC no mutados, podría indicar que la misma es beneficiosa para la célula tumoral [177].

Finalmente, en los últimos años se reportó que TOSO, el receptor Fc μ de IgM [178] [179] se encuentra sobre-expresado en LLC. Altos niveles de expresión de TOSO se correlacionaron con una enfermedad más agresiva, mayor recuento leucocitario, estado de Binet avanzado, necesidad de quimioterapia, y pacientes con los genes IgVH no mutados. También los pacientes CD38+ con actividad proliferativa mostraron mayor expresión de TOSO. La estimulación del receptor de células B aumenta la expresión de TOSO, mientras que la señal producida por la interacción de CD40-CD40ligando reduce la expresión de TOSO [180]. Un trabajo reciente mostró que TOSO se encuentra *O*-glicosilado en su dominio extracelular, y se identificaron los principales sitios de *O*-glicosilación. En células B normales TOSO presenta baja expresión y el mismo siempre se observa *O*-glicosilado, mientras que en pacientes LLC la expresión es mayor y se presenta glicosilado y también sin *O*-glicosilar. Se mostró que el mismo se localiza en la membrana celular pero también en el trans-Golgi. La interacción de TOSO con IgM provoca la internalización de ambas moléculas. TOSO luego transporta la IgM hacia los lisosomas donde es degradada. Si bien se ha reportado que la expresión de TOSO aumenta luego de la activación del receptor de células B, BCR, la activación de TLRs (*Toll-like receptor*) disminuye la expresión tanto del mensajero como de la proteína TOSO [181]. Se necesitan más estudios para poder clarificar el potencial rol de la señalización mediada por TOSO y los TLRs en la patogenia de la LLC.

ANTECEDENTES

Aunque diversos estudios muestran expresión alterada de las GalNAc-Ts en diferentes tipos de cáncer, existe poca información respecto a la expresión de estas enzimas en leucemias y particularmente en la LLC. Además, como se mencionó anteriormente hay algunos estudios que muestran glicosilación aberrante en células LLC. Por tales motivos, en nuestro laboratorio, se decidió analizar la expresión a nivel de ARN (mediante RT-PCR) de 14 isoenzimas pertenecientes a la familia de las GalNAc-Ts en células de 10 pacientes de LLC y células B y T de donantes sanos. También se estudió su expresión en la línea celular Daudi (células B), la cual derivan de un linfoma de Burkitt, y la línea celular Jurkat (células T), la cual deriva de una leucemia linfoblástica aguda-LLA.

Como resultado se encontró una importante sobre-expresión del gen que codifica para GalNAc-T11 en células mononucleares de sangre periférica de muestras de pacientes LLC, PBMC-LLC, en relación a las células B de donantes sanos (Tabla 3A y Figura 6A). Este gen también se expresa en linfocitos T de donantes sanos y en la línea celular Jurkat, mientras que no se expresa en la línea celular Daudi y su expresión es mínima en células B de donantes sanos. (Tabla 3A y B y Figura 6B). Estos resultados proponen una línea interesante de trabajo pues sería la primera descripción de una GalNAc-T, que se expresa como marcador específico de células LLC. Además vale destacar que la expresión de GalNAc-T11 en células T y B-LLC, coincide con el hecho de que varios marcadores propios de las células T se presentan en el linfocito LLC, como ser CD5 y ZAP-70 [26].

Tabla 3. (A) Análisis por RT-PCR de la expresión de 14 genes GALNTs.

(A) Análisis por RT-PCR de 14 GALNTs en células LLC, y en linfocitos B y T de donantes sanos, y (B) en las líneas celulares Jurkat y Daudi. En rojo se resalta la expresión encontrada para el gen GALNT11.

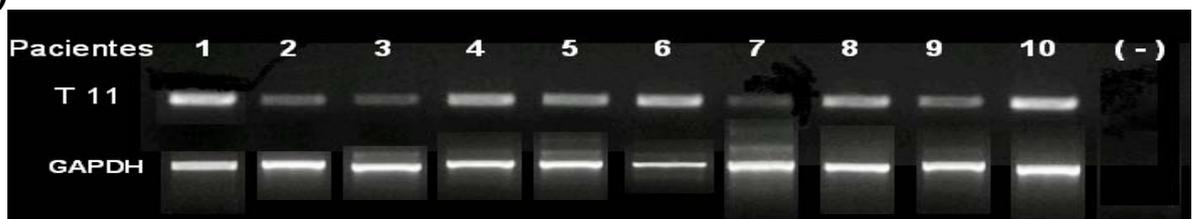
(A)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
B	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
T	+	+	±	+	-	±	+	-	+	+	+	-	+	-
LLC 1	+	+	+	-	-	-	+	-	±	+	+	-	+	-
LLC 2	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
LLC 3	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
LLC 4	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
LLC 5	+			±						+		-		-
LLC 6	+			+						+		-		-
LLC 7	+			+						+		-		-
LLC 8	+			+						+		-		-
LLC 9	+			-						+		-		-
LLC10	+			+						+		-		-

(B)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
Daudi	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	±
Jurkat	+	+	±	+	-	±	+	-	+	+	+	-	+	+

(A)



(B)

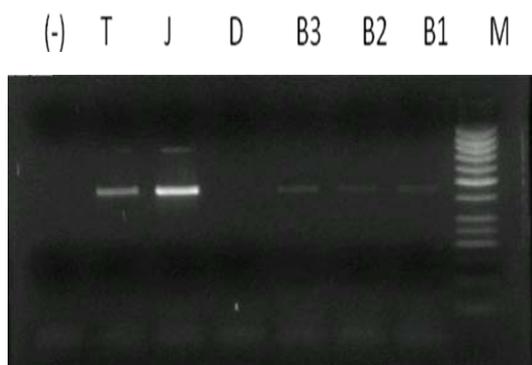


Figura 6. Análisis por RT-PCR de la expresión de GALNT11.

(A) Análisis por RT-PCR en células B-LLC, (B) en células T (T), Jurkat (J), Daudi (D), y células B de donantes sanos (B1, B2, B3).

Dentro de la familia de las GalNAc-Ts, GalNAc-T11 parece ser una enzima con un número de sustratos discretos y exclusivos, no redundantes, como otros miembros de la familia [100]. Su expresión en órganos humanos sería selectiva, encontrándose principalmente expresada en hígado y riñón [93, 182]. La expresión de su gen también fue encontrada (junto con otros genes de la familia) en células hematopoyéticas CD34+ purificadas de médula ósea de adultos humanos, pero su expresión pasa a ser indetectable al inducir las células a diferenciarse a megacariocitos [183]. Esta enzima tendría especificidad por sustratos peptídicos sin previa glicosilación. Su gen, *GALNT11* según la clasificación de la revisión de Bennett et al 2011 [93] se agruparía dentro del grupo I, ubicándose en el cromosoma 7q36, y formando un *cluster* con el gen (o pseudogen) *GALNT20* (subfamilia If) el cual se encuentra a tan solo 8.5 kb, sin existir ORFs entre ambos genes. Una particularidad destacable de *GALNT11* es que su ortólogo en *D. melanogaster* (*pgant35A*) es necesario para el desarrollo, pues los organismos *knock out* para este gen no logran completar el mismo. Sin embargo, sorprendentemente se mostró que *GALNT11* humano no es capaz de sustituir la función de *pgant35A*, lo que indicaría que ambos ortólogos cumplen funciones celulares específicas características de cada especie [184]. Finalmente, como ya se mencionó, se vinculó a una delección poco común de un exón de *GALNT11* en una enfermedad congénita del corazón, con la heterotaxia causada por una asimetría izquierda-derecha [168].

Teniendo en cuenta que existen indicios de que la alteración de la expresión de una sola GalNAc-T podría estar involucrada en el proceso de transformación maligna [185], entendemos que puede ser de gran valor comenzar a investigar el rol que GalNAc-T11 pueda tener en la transformación maligna del linfocito B en la LLC. Estudiar aspectos relacionados con la regulación de su expresión, así como más particularmente evaluar esta enzima como marcador molecular diagnóstico y/o factor pronóstico, puede resultar en un aporte respecto al entendimiento y tratamiento de esta enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

GENERAL

El objetivo general del trabajo es profundizar en la glicobiología de la Leucemia Linfocítica Crónica. Particularmente, estudiamos aspectos relacionados con la expresión de GalNAc-T11 en linfocitos LLC, evaluando su utilidad como marcador molecular diagnóstico y/o pronóstico, estudiando aspectos relacionados a su regulación y analizando la existencia de eventos de O-glicosilación aberrante en esta enfermedad.

ESPECÍFICOS

1. Estudiar la expresión de *GALNT11* en 50 pacientes LLC, y en las líneas tumorales Jurkat y Daudi, por PCR en tiempo real.
2. Analizar si existe alguna correlación entre la expresión de *GALNT11* y el estado mutacional de los genes IgVH de los pacientes, y entre pacientes progresores e indolentes.
3. Estudiar mediante un anticuerpo policlonal anti GalNAcT-11, la expresión de la proteína en células B-LLC, células B de donantes sanos, y las líneas celulares Jurkat y Daudi.
4. Estudiar la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en células B-LLC, y en las líneas celulares Jurkat y Daudi.
5. Obtener una línea estable Daudi capaz de expresar GalNAcT-11 al ser inducida con tetraciclina, y estudiar la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en dicha línea al inducir la expresión de la enzima.
6. Analizar si existen islas CpG en el promotor de *GALNT11* y estudiar su estado de metilación en las líneas celulares Daudi y Jurkat, células B de donantes sanos, y células LLC.

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE PACIENTES LLC Y DONANTES SANOS

Se obtuvo sangre periférica de 50 pacientes con diagnóstico de B-LLC, de los cuales 25 tenían los genes IgVH No mutados y 25 Mutados. Dentro de los Mutados 20 corresponden con el estado A, 3 al estado C, uno al estado B, y uno no está determinado. En el grupo No mutado, 12 pacientes presentan el estado A, 9 el estado B, 3 el estado C, y uno no fue determinado. Todos los pacientes fueron seguidos en el Hospital Maciel de Montevideo, y dieron su consentimiento informado, de acuerdo a las regulaciones éticas de Uruguay y a la declaración de Helsinki. El diagnóstico de LLC se basó en un estudio citológico de los linfocitos maduros y en características fenotípicas (CD5+, CD23+, baja expresión de CD79b e Inmunoglobulinas de superficie). El estado mutacional de los pacientes fue determinado por la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo.

Las muestras de donantes sanos fueron conseguidas a través del Banco Nacional de Sangre de Montevideo, luego de obtener consentimiento informado de acuerdo a las regulaciones locales.

PURIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES

Purificación de células PBMC de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes LLC y donantes sanos, fueron purificadas a partir de sangre heparinizada por centrifugación mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Sigma) [186]. Las células obtenidas fueron resuspendidas en PBS, centrifugadas y congeladas en suero bovino fetal con 10% DMSO, a una concentración de 5×10^6 células/mL.

Purificación de linfocitos B y T

Los linfocitos B fueron aislados a partir de PBMC de donantes sanos utilizando perlas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen) conjugadas al anticuerpo monoclonal CD20 (Dako) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a la purificación se calculó el porcentaje de linfocitos B de la muestra utilizando el anticuerpo anti-CD19+ conjugado a PE-Cy5.5 (Caltag). Para la purificación de linfocitos B se utilizaron 25 μ L de Dynabeads cada 1×10^7 PBMC y 10 μ L anti-CD20 cada 2×10^6 células B. Todas las incubaciones fueron realizadas a 4°C. Luego de la purificación se determinó el porcentaje de linfocitos B CD19+ mediante el anticuerpo anti-CD19+ conjugado a PE-

Cy5.5 (Caltag) comprobando una pureza pos-purificación del 75-80%. Las células B purificadas fueron homogeneizadas en 1mL de Trizol (Sigma) para la posterior extracción de ARN. El material no unido a las perlas fue utilizado como la población de linfocitos T.

CMLTIVOS CELULARES

Todas las células fueron cultivadas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. Las líneas celulares de linfocitos B: Daudi y linfocitos T: Jurkat – derivadas de un Linfoma de Burkitt humano y de una leucemia linfoblástica aguda humana – respectivamente, fueron crecidas en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado durante 40 minutos a 56°C. La línea A549 (células epiteliales de un adenocarcinoma pulmonar humano) fue crecida en medio *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM) suplementada con 10% de SBF.

ARN Y PROTEÍNAS

Tabla 4. Oligonucléotidos utilizados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sitio de restricción	Tamaño de inserto (pb)
T11Fpl	CCTTGCTAGCCGCCACCATGGGAAG	Nhe	1794
T11Rpl	ATAGCGGCCGCCAAATGCCACTGCTGTGAAG	Not	
T111000F	ATCCCCGTTTCACTCGAG		1056
T111000R	CCAACCAGACATGTGCCA		
T11440F	GACCTGAAGACGAAAAGC		440
T11440R	TTCCCAAAGGTCCACTGCTGGG		
T11137F	ATCTGGATGTGTGGCGGTAAGCTCTTC		137
T11137R	CAGACATGTGCCAGCCGC		
T11650F	CACCATGACACACAACCTC		650
T11650R	CTTAACCTTCCAAATGCCACT		
CD3F	CCC ACG AGG AAT ATA TAG GTG		283
CD3R	GTA CTG AGC ATC ATC TCG ATC		
PepT11F	CCGGATCCAGTGAAGTGACTCAGCCACTTAAG	BamHI	
PepT11R	CCAAGCTTATCTCTGTGGTAGCCCAAGCG	HindIII	
RepTetF	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG		
RepTetR	TAGAAGGCACAGTCGAGG		
BSP2F	TAGGTAGGGTATTTGTTATTAATGGGG		252
BSP2R	CCTCAAACCCAAAACCCT		

Extracción y cuantificación de ARN y ADN

El ARN y ADN genómico de células B, T, Jurkat, Daudi, PBMC de pacientes LLC, y linfocitos B de donantes sanos fue aislado utilizando Trizol (Sigma) a partir de $1-5 \times 10^6$ células, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó mediante la medida de la absorbancia a 260nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 (Thermo).

Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de 0.5-1 μ g de ARN utilizando oligo-dT y la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney murin leukemia virus*) (Fermentas) según indicaciones del fabricante.

PCR en tiempo real

Para cuantificar la expresión del ARNm de GalNac-T11, y de CD3 se realizaron ensayos de PCR en tiempo real, utilizando el equipo Corbette Rotor Gene 6000 mediante el kit *SYBR Green I dye* (Applied Biosystem). Los oligos utilizados para amplificar *GALNT11* fueron los T11137 F y R (ver Tabla 4), los cuales amplifican un fragmento de 137pb. Los oligos utilizados para amplificar CD3 fueron CD3F y R los cuales amplifican un fragmento de 283pb. El ADNc generado a partir de células PBMC-LLC, células B, T, Jurkat y Daudi, fue diluido 1/10, y un μ L fue utilizado para la reacción de real time PCR. Los oligos fueron usados en una concentración final de 100nM en 10 μ L de volumen final de reacción. *GAPDH* fue usado como gen *housekeeping* (gen de referencia).

La reacción de amplificación consistió de 40 ciclos a 95°C 15 segundos; 55°C 30 segundos; 72°C 30 segundos. Todas las reacciones fueron hechas por duplicado.

La expresión relativa de *GALNT11* normalizada con *GAPDH* fue calculada mediante la ecuación de Pfaffl [187], utilizando el programa REST (*Relative Expression Software Tool*), y expresada como n-veces más o menos cantidad de *GALNT11* en células LLC respecto a un *pool* de células B de tres donantes sanos (control). La eficiencia para cada gen fue calculada de la pendiente de la curva obtenida de 5 diluciones seriadas del ADNc de acuerdo a la fórmula $E=10/(-1/\text{pendiente})$. La especificidad de la PCR se chequeó por las curvas de *melt* y se verificó mediante la secuenciación del producto de PCR de muestras de dos pacientes de LLC.

Para estudiar la expresión de *GALNT11* y *CD3* en células PBMC de 4 pacientes LLC con diferente linfocitosis, la cantidad relativa de *CD3* y *GALNT11* se expresó como *n* veces la variación de estos genes en las muestras PBMC-LLC y el *pool* de células B respecto a su expresión en linfocitos T.

Análisis estadístico

El test de Mann-Whitney fue usado para calcular la significancia estadística (*p-value*) de las diferencias de expresión de *GALNT11* entre grupos de pacientes mutados y no mutados, y entre progresores e indolentes. Para hacer los cálculos se utilizó el programa GraphPad Prism 3.0. Los cálculos de expresión relativa de PCR en tiempo real de *GALNT11* y *CD3*, y la significancia estadística de los valores se realizaron utilizando el programa REST (*Relative Expression Software Tool*).

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Anticuerpos

Para analizar la expresión de la proteína GalNac-T11 se generó el anticuerpo policlonal anti-GalNac-T11. Para ello un péptido correspondiente a la región *Stem* de la proteína (KIDDVIDSRVEDPEC), específico (por alineamientos con BLAST) de esta proteína y no de otra GalNac-T, fue sintetizado y conjugado a KLH (*Keyhole-limpet hemocyanin*) por la empresa GenScript, la cual luego lo utilizó para inmunizar conejos. El suero obtenido fue luego purificado por cromatografía de afinidad utilizando como ligando el péptido sintético.

Los anticuerpos 83D4 (IgM) y B72.3 se unen específicamente a los antígenos Tn y sialil-Tn respectivamente [188, 189]. Ambos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Eduardo Osinaga. El anticuerpo 83D4 se utilizó para determinar la expresión de Tn en PBMC de donantes sanos y de pacientes LLC, en células Jurkat y Daudi y en la línea estable Daudi-T11 al ser inducida con tetraciclina. El anticuerpo B72.3 se utilizó para determinar la expresión de sialil-Tn en PBMC de pacientes LLC, en la línea A549 y en la línea estable Daudi-T11 inducible por tetraciclina.

Extracción de Proteínas

Para la extracción de proteínas totales de PBMC de donantes sanos y pacientes LLC, de células Jurkat y Daudi y Daudi-T11, las células fueron resuspendidas en *buffer* PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4), centrifugadas y luego resuspendidas en 100-200µL de *buffer* de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% Chaps, 40mM Tris, 1mM PMSF), junto con un coctel de inhibidores de proteasas libre de

EDTA (Roche). A continuación el lisado se incubó en agitación en un orbital durante 1 hora y posteriormente se centrifugó 30 minutos a 12.000g a 4°C. El sobrenadante fue alicuotado y conservado a -80°C. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el ensayo del ácido Bicinconínico - BCA - (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

SDS-PAGE

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con el detergente aniónico dodecilsulfato – SDS-PAGE-. Para ello 30 µg de proteína de células Jurkat, Daudi, PBMC-LLC y células B de donantes sanos fueron corridas en geles de acrilamida al 12%. La corrida electroforética se realizó a 25mA por gel, durante 2 horas aproximadamente, con refrigeración. Para la visualización de proteínas los geles fueron teñidos con *Coomasie blue* G250 (Sigma).

Western Blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa Hybond-C (GE-Healthcare) utilizando la técnica de la electrotransferencia húmeda durante 3 horas a 300mA y 90V en buffer de transferencia (Tris 48mM, Glicina 38mM, SDS 0.0375% y EtOH 20%).

La membrana fue bloqueada con albúmina sérica bovina - BSA - 5% o leche en polvo descremada al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente (TA) o toda la noche a 4°C. Luego de dos lavados con PBS-Tween 0.2%, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario: anti-GalNac-T11 1:500 en PBS-BSA1% -Tween 0.1% durante una hora. Luego las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.5% durante 10 minutos a TA y con agitación para luego incubarlas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa 1:5000 (Sigma) en PBS-BSA1%-Tween 0.1% durante una hora a TA. A continuación se vuelven a lavar la membrana 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween 0.5%. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando placas autoradiográficas (KODAK) y el reactivo ECL o ECL plus *Western Blotting Detection Reagents* (GE, Healthcare). Finalmente, sobre la misma membrana, luego de remover el anticuerpo anti-GalNac-T11 con un *buffer* (Tris pH 6.7, 62.5mM, 2%SDS, 100mM beta –mercaptoetanol), el anticuerpo anti-GAPDH (Sigma) diluido 1:5000 en PBS-BSA1%-Tween 0.1% fue utilizado para normalizar la carga de proteínas del *Western*. La normalización mediante cuantificación por densitometría fue realizada utilizando el programa *GeneTools* de *Syngene*.

Inmunofluorescencia Indirecta – IFI

Células Jurkat, Daudi, Daudi-T11, A549, y PBMC-LLC y de donantes sanos fueron lavadas 2 veces con PBS frío y fijadas durante 15 minutos con paraformaldehído 4%

en PBS a TA. Posteriormente, las células fueron centrifugadas e incubadas con glicina 0,1M por 5 minutos a TA. A continuación se realizaron dos lavados con PBS y se resuspendieron las células a una concentración aproximada de 1×10^6 células / pocillo. Se colocaron las células en una lámina pretratada con polilisina 0.1% (Sigma), y se dejaron adherir a la misma durante toda la noche a 4°C. Las células fueron luego permeabilizadas con Tritón 0,5% en PBS durante 5 minutos y luego se lavaron 2 veces con PBS. El bloqueo se realizó con PBS-BSA5%-Tween0.1% durante 30 minutos a TA, y se lavaron una vez con PBS. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-GalNAc-T11 (1/50), diluido en PBS-BSA1%-Tween 0.1%, o con los anticuerpo anti-Tn o antisialil-Tn durante una hora a TA. Se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.5% con agitación durante 10 minutos, y luego se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo anti-Inmunoglobulina G de conejo o de ratón conjugado a ALEXA 488 (Invitrogen) diluido 1/1000. A continuación se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 0.2% durante 5 minutos, y se montaron los preparados con *Prolong antifade* DAPI (Invitrogen). En el caso de las células PBMC de donantes sanos y pacientes LLC antes de ser montadas se incubaron con el anticuerpo anti-CD19 conjugado a PE-Cy5.5 (1/100) (Caltag Laboratories) durante 30 minutos, y se lavaron una vez con PBS 1x. Finalmente los preparados se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia Olympus IX 81 acoplado a una cámara Hamamatsu Orca-ER (Diagnostic Instruments).

Para probar la especificidad del anticuerpo anti-GalNAc-T11 se hicieron ensayos de competencia sobre células Jurkat y Daudi. Para ello el péptido utilizado para la generación del anticuerpo fue incubado en un exceso de 80 molar junto con el anticuerpo durante 30 minutos, continuando luego con la IFI como se menciona anteriormente. También se realizó un control utilizando inmunoglobulinas de conejo (DAKO) en una concentración de 1 µg/mL.

Citometría de Flujo

Los análisis se hicieron usando el equipo Cyan ADP (Beckman Coulter). Todas las incubaciones se realizaron en tubos eppendorf de 1.5mL. Las células Jurkat, Daudi, PBMC-LLC y de donantes sanos fueron lavadas con PBS en frío y fijadas con PBS-paraformaldehído 2% y permeabilizadas con tween 0.2% v/v en PBS. El bloqueo se realizó con PBS-BSA 5%-Tween 0.1% durante 30 minutos a TA. 100 µL del anticuerpo

anti-Tn fue incubado durante una hora y luego lavado con 1mL de PBS-Tween 0.5%. El anticuerpo secundario usado fue un anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (Invitrogen) en una dilución 1/1000. La fluorescencia fue colectada en un *gate* de 5000 linfocitos.

GENERACIÓN DE VECTORES Y SOBRE-EXPRESIÓN DE GaINAc-T11

Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima *Taq* ADN polimerasa (Fermentas) o *Pfu* ADN polimerasa (Invitrogen) en el *buffer* correspondiente con MgCl₂ 1,5 mM. La concentración de oligonucleótidos utilizada fue de 250 nM final. En general la amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización (30 segundos 95°C), hibridización (30 segundos a 3-5°C por debajo de la T_m de los oligonucleótidos utilizados), extensión (a 72°C durante 1 minuto por cada Kpb a amplificar). Finalmente se realiza una extensión final de 3-10 minutos a 72°C.

Ligación de los producto de PCR

Los productos de PCR se purificaron utilizando el *kit PCR cleanup kit* (Qiagen). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas). El volumen final de las reacciones fue 10 µL en el *buffer* de la enzima y se utilizó 1U/µg de ADN con una relación molar inserto:vector de 3:1. La reacción se realizó durante 1 hora a TA, o toda la noche a 4°C.

Transformación en E.coli

Las bacterias electrocompetentes *E. coli* de la cepa XL1 Blue, fueron transformadas con 3µL de la mezcla de ligación, mediante electroporación utilizando el equipo ECM 830 (BTX) en cubetas de 1mm, aplicando 1 µLso de 500V durante 8mseg. Luego del pulso, las bacterias fueron resuspendidas en 1mL de medio Luria Bertani - LB - precalentado a 37°C e incubadas durante 1 hora a 37°C. Luego de este período, 200µL de la suspensión de bacterias fueron sembradas en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente junto con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido – IPTG - 0.5 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido - X-Gal - 80 µg/mL.

Clonado, expresión y purificación de un polipéptido de GalNAc-T11

A partir de un plásmido Topo-T11, el cual contiene la secuencia codificante entera de GalNAc-T11, se amplificó con la Taq polimerasa y los oligonucleótidos PepT11 F y R (ver Tabla 4), un fragmento que se corresponde con 101 aminoácidos de la zona stem de la proteína, entre los residuos 31 y 132. La correcta secuencia del fragmento fue confirmada por secuenciación. Luego el mismo fue clonado en el vector pGEM-Teasy (Promega) (Figura 7) y el producto clonado fue liberado del plásmido utilizando las enzimas BamHI y HindIII (Roche), para ser nuevamente clonado en el vector de expresión pQE30 (Qiagen) (Figura 8).

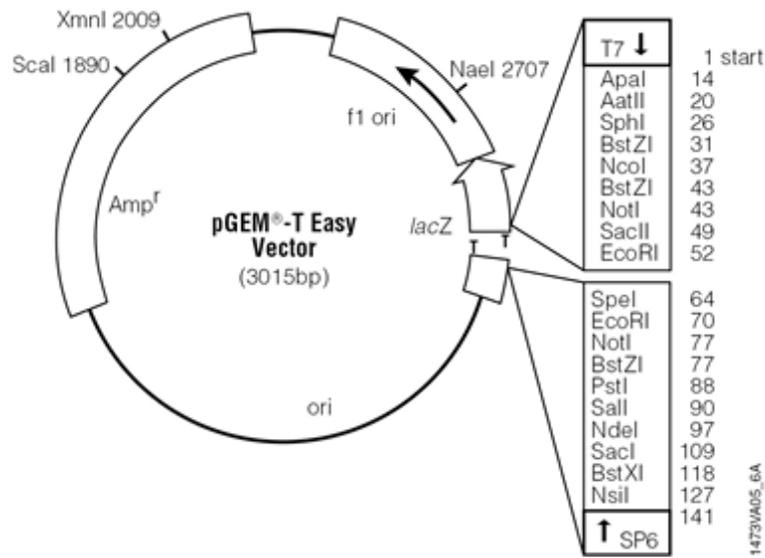


Figura 7. Mapa del vector pGEM-Teasy (Promega)

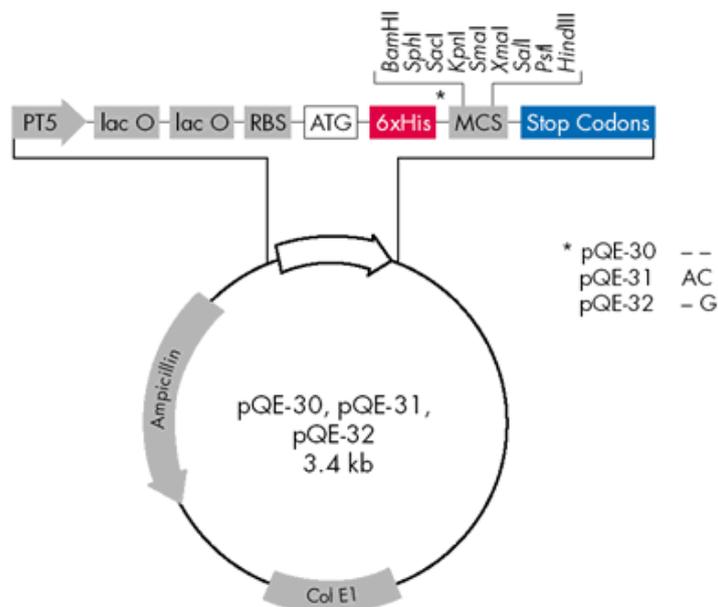


Figura 8. Mapa de Vector pQE30 (Qiagen)

Bacterias de la cepa M15 de *E. coli* fueron transformadas por electroporación con las construcciones pQE30-T11. Dicha cepa contiene un plásmido pREP4 que confiere resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente el represor *lac*.

La expresión del polipéptido recombinante fue inducida mediante la adición de 0.5 mM IPTG durante 5 horas a 37°C. La purificación del polipéptido fue realizada en condiciones desnaturalizantes.

Luego de la inducción con IPTG, el *pellet* de bacterias se resuspendió en solución de lisis (NaH₂PO₄ 100mM, Tris-Cl 10mM, Urea 8M, pH 8) y se agitó hasta que la solución se encontró traslúcida. El lisado se centrifugó a 10.000g durante 30 minutos y el sobrenadante se utilizó para la purificación. La purificación fue llevada a cabo en “batch” bajo condiciones desnaturalizantes, utilizando una resina de Níquel-NTA (Qiagen).

En un tubo Falcon se colocó 1mL de la resina de Níquel-NTA con 4 mL del lisado de bacterias y se agitó por rotación durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 700 g por 3 minutos y se colectó el sobrenadante denominado “material no unido”. La resina se lavó tres veces con solución de lavado (NaH₂PO₄100mM, Tris-Cl 10mM, Urea 8M, pH 6,3). La elución se realizó con 12 mL de solución de elución 1 (100mM Tris-Cl 10mM, Urea 8M, pH 5,9) recolectando fracciones de 2mL de eluido. Luego se usaron 12mL de solución de elución 2 (100mM, Tris-Cl 10mM, Urea 8M, pH 4,5) y nuevamente se recolectaron fracciones de 2mL de eluido. La pureza de los eluidos fue evaluada por SDS-PAGE.

Clonado de GalNAc-T11 en PGEM-T y pCDNA4

Con los oligos T11pl F y R (ver Tabla 4) se amplificó la secuencia codificante de GalNAc-T11 del plásmido Topo-T11. Se ligó en el vector pGEM-T easy (Promega) (Figura 6) y se transformó en *E.coli* XLI Blue como se explicó anteriormente. El plásmido pGEM-Teasy-T11 fue luego purificado por el método de lisis alcalina y el secuenciado fue realizado por el servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

Una vez verificada la correcta secuencia, la misma se digirió con la enzima NotI (Invitrogen), en 20µL reacción durante una hora a 37°C. De esta manera se liberó el fragmento del plásmido pGEM-T. Luego se purificó de un gel de agarosa usando el *kit* PCR DNA and Gel Band purification Kit (GE) y se clonó en el vector pCDNA4 del sistema T-REx de Invitrogen (Figura 9) previamente digerido con NotI. Se

transformaron bacterias XL1 *blue* con la nueva construcción, y a partir de colonias aisladas de placas de cultivo conteniendo ampicilina se purificó el ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Finalmente mediante secuenciación se seleccionó un vector que tuviera clonado el inserto de tal forma que el ATG de iniciación estuviera a continuación del promotor CMV.

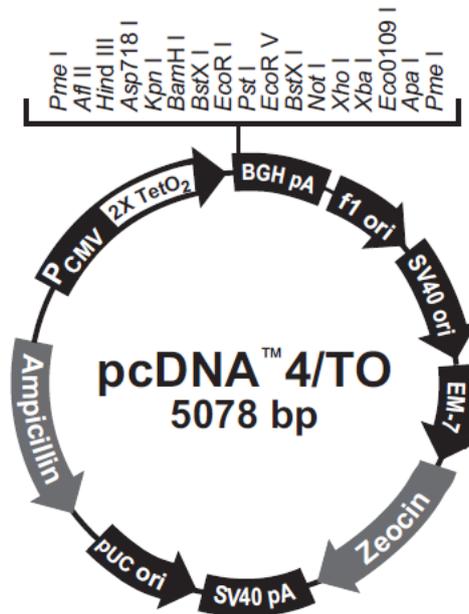


Figura 9. Mapa del vector pcDNA4 del sistema T-Rex de Invitrogen.

Generación de la línea estable Daudi-PcDNA6

Con el fin de generar una línea estable Daudi capaz de sobre-expresar GalNAc-T11 al ser inducida con tetraciclina, primero es necesario generar la línea Daudi capaz de expresar el represor de tetraciclina. Para ello es necesario transformar a la línea Daudi con el plásmido pcDNA6 del sistema TReX de Invitrogen (Figura 10).

2x10⁶ células Daudi se transformaron con 30g del plásmido pcDNA6, en 40µL de medio RPMI por electroporación con el equipo ECM 830 (BTX) utilizando cubetas de 4mm a 250V con 2 pulsos de 5mseg, y con un intervalo entre pulsos de 1 segundo. La selección se realizó con blasticidina a una concentración final de 5-10µg/mL. Una vez lograda la selección, se clonó por dilución límite. Se extrajo ARN de 10 clones, y se sintetizó el ADNc con oligo-dT como se explica anteriormente, para luego testear la expresión del represor de tetraciclina con los oligos RepTet F y R (ver Tabla 4). Se seleccionaron los clones con mayor expresión del represor y se almacenaron.

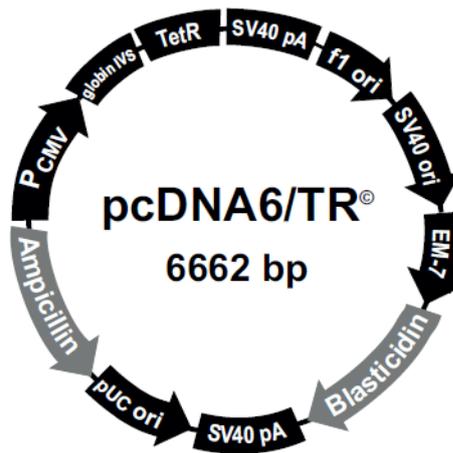


Figura 10. Mapa del plásmido pcDNA6 del sistema TREx de Invitrogen.

Generación de la línea estable Daudi-T11

Uno de los clones Daudi-pcDNA6 que presentó una elevada expresión del represor de tetraciclina fue nuevamente transformado con 30µg del vector pcDNA4-T11 linealizado con la enzima eam 1105I (Promega). La selección se realizó comenzando con 100µg/mL de Zeocina durante una semana, y luego se subió la concentración a 250µg/mL. Una vez lograda la selección se clonó por dilución límite en placa de 96 pocillos. Finalmente se testearon los clones por RTPCR para verificar la expresión del ARNm de GalNAc-T11 al inducir dichos clones con tetraciclina a una concentración final de 1µg/mL durante 24 horas. Los oligos utilizados para verificar la expresión de *GALNT11* fueron T111000 F y R, T11440 F y R y T11650 F y R (ver Tabla 4). Para verificar la expresión de la proteína GalNAc-T11 por IFI, los clones fueron inducidos con 1µM de tetraciclina durante 24 horas.

ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *GALNT11*

Análisis de islas CpG en el promotor de *GALNT11*

Se buscó en el *Genbank* el gen *GALNT11* humano: *NCBI Reference Sequence*: NC_000007.13. El mismo contiene un primer exón de la base 1-192, luego contiene un gran intrón y en la base 68536 comienza el ATG de la secuencia codificante. Para buscar islas CpG en el promotor del gen se tomó un fragmento de 6000pb conteniendo 5000 pb hacia 5', y 1000 bases hacia el 3' de la primer base del primer exón. Esta secuencia fue analizada con el programa de *EMBOSS CpG plot* (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cpgplot>) usando los siguientes parámetros: zonas mayores a 200pb, con una relación CG observada/esperada mayor

a 0.6 y %GC mayor a 50. Se encontró una isla CpG de 852pb conteniendo la primer base del primer exón.

Análisis del estado de metilación del ADN del promotor GALNT11

En base a la isla CpG encontrada y utilizando el software *Methyl Primer Express Software* de Applied Biosystem, se diseñaron oligonucleótidos BSP (*Bisulfite Primers*) abarcando toda la isla. Se continuó trabajando con los oligonucleótidos BSP2, los cuales amplifican un fragmento de 252pb conteniendo la primer base del primer exón.

Se determinó el estado de metilación del fragmento de interés mediante análisis de PCR, utilizando ADN genómico tratado con bisulfito de sodio. Este tratamiento provoca una desaminación de las citosinas no metiladas convirtiéndolas en timinas, mientras que las citosinas metiladas no sufren la conversión.

Utilizando Trizol (Sigma), y siguiendo las indicaciones del fabricante se purificó ADN genómico de las líneas celulares Jurkat, Daudi, células B de donantes sanos y células PBMC de pacientes LLC.

Mediante el uso del *Kit Methylcode Bisulfite Conversión Kit* (Invitrogen), 500 ng de ADN genómico fueron tratados. Brevemente, los 500ng de ADN junto con el reactivo de conversión se incuban a 98°C 10 min para desnaturalizar el ADN y luego 2,5 horas a 64°C donde se da la reacción de conversión. Se purifican las reacciones y 2µL de las mismas son usadas en la reacción de PCR. Se utilizó una concentración 10uM de los oligonucleótidos BSP2, 2µL dNTPs 2mM, 2 µL *Buffer* 10X, 0,8µL de MgCl₂ 50mM y 0.5 µL de enzima Taq (Invitrogen), en 20µL de volumen final. El ciclo utilizado fue 5 min a 95°C, y 40 ciclos de 30`` a 95°C, 30`` a 51°C, 30`` a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. En estas condiciones se observa el fragmento de interés de 252pb. El producto de PCR fue purificado y clonado en PGEMT-easy, y transformado por electroporación en células XL1-blue. Mediante *colony PCR* utilizando los oligos universales T7 y SP6 se amplificaron colonias para identificar cuales contenían el inserto de interés. A partir de 3-7 colonias, conteniendo inserto, se llevaron a cabo lisis alcalinas para purificar el plásmido, y luego secuenciarlo con el equipo *ABI Prism 3100 DNA sequencer* (Applied Biosystems) de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur.

Finalmente las secuencias fueron analizadas con el programa BioQ Analyzer del instituto Max Planck: <http://big-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>.

Búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción en la isla CpG de GALNT11

Mediante el programa TFSEARCH - <http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch> - se buscó si la isla CpG presentaba sitios de unión a distintos factores de transcripción humanos.

Búsqueda de islas CpG en las 20 GalNAc-Ts humans

En base a las secuencias del *Genebank* de los 20 genes *GALNTs* humanos, se buscaron para cada caso las zonas comprendidas entre 5000 pb hacia el 5´ y 1000pb hacia 3´ de la primer base del primer exón de cada gen. Todas las secuencias fueron luego analizadas con el programa *EMBOSS CpG plot* (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cpgplot>), en busca de islas CpG.

RESULTADOS

RESULTADOS

EXPRESIÓN DEL ARNm DE GalNAc-T11.

El ARNm de GalNAc-T11 se expresa en linfocitos B-LLC.

La determinación de marcadores moleculares de uso clínico para diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, debería ser realizada de forma simple, rápida y económica. La purificación de linfocitos B a partir de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) es costosa y consume una importante cantidad de tiempo. En la LLC se da una proliferación clonal maligna de linfocitos B maduros, y en las formas típicas de la enfermedad, esta población es la predominante y constituye más del 80% de los linfocitos circulantes [190]. Considerando los datos anteriores y que el ARNm de GalNAc-T11 se expresa en linfocitos T normales, y en PBMC-LLC, quisimos estudiar si su expresión en PBMC-LLC se debe principalmente a su expresión en linfocitos B. En el caso de células PBMC de donantes sanos, las mismas presentan un porcentaje muy bajo de linfocitos B: entre un 2-20% [191], mientras que en LLC ese porcentaje es de aproximadamente 80%. Por tal motivo, la purificación de linfocitos B de PBMC normales se vuelve imprescindible para constituir un control adecuado en la determinación de la expresión relativa de GalNAc-T11. Se estudió, mediante PCR en tiempo real, la expresión de los ARNm de GalNAc-T11 y CD3 (marcador de linfocitos T) en PBMC de 4 pacientes LLC (pacientes) con distintos niveles de linfocitosis: bajo (50%), medio, alto y muy alto (95%). También se analizó la expresión de estos genes en un *pool* de linfocitos B purificados (75-80% pureza) de 3 donantes sanos (control) y en todos los casos se comparó con la expresión de dichos genes en linfocitos T.

En la Figura 11 se observa que los niveles de expresión de *CD3* en todos los pacientes y en el control disminuye de forma muy significativa respecto a su expresión en los linfocitos T. Esto indica que en todas las muestras analizadas el porcentaje de linfocitos T es muy bajo. Por otro lado, todas las muestras analizadas (pacientes y control) presentan una expresión de *GALNT11* significativamente mayor a la expresión de *CD3* (Figura 11).

Expresión Relativa del ARNm de CD3 y GalNAc-T11

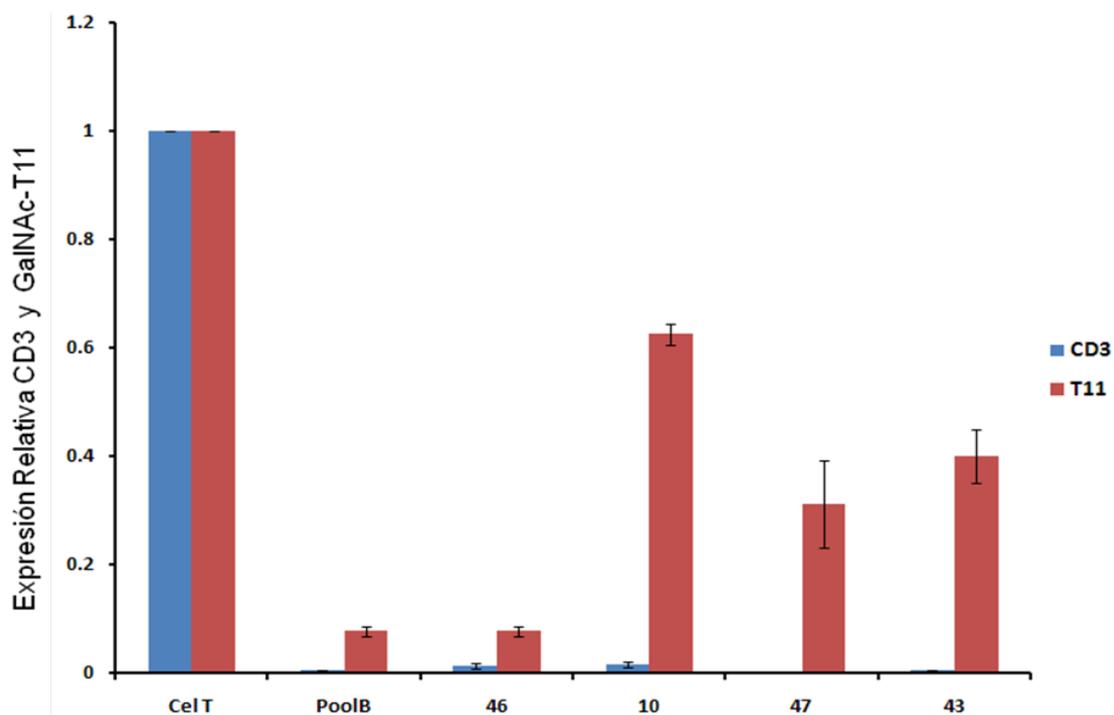


Figura 11. Expresión de *CD3* y *GALNT11* en células PBMC-LLC y linfocitos B y T de donantes sanos.

Determinación mediante PCR en tiempo real, de la expresión de *CD3* y *GALNT11* en PBMC de 4 pacientes LLC con distintos niveles de linfocitosis: bajo:(paciente 46), medio: (paciente 10), alto: (paciente 47) y muy alto: (paciente 43). Su expresión también se determinó en un *pool* de linfocitos B y linfocitos T de 3 donantes sanos. *GAPDH* fue utilizado como gen de referencia. Se graficó la expresión relativa de *CD3* y *GALNT11* en los pacientes y control respecto a su expresión en linfocitos T.

En base a estos resultados podemos concluir que la expresión de *GALNT11* en PBMC-LLC, se debe principalmente a su expresión en linfocitos B-LLC.

GALNT11: potencial nuevo marcador de LLC.

Para determinar si GalNAc-T11 podría ser un potencial marcador de LLC, se decidió estudiar la expresión de su mensajero en un grupo de células de 50 pacientes cuyas características clínicas y moleculares se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características clínicas y moleculares de los pacientes LLC analizados.

(a) Expresión relativa de *GALNT11*, determinada por PCR en tiempo real, de 50 muestras PBMC-LLC en relación a un pool de células B normales. (b) Diferencias en la secuencia de nucleótidos menor o igual al 2% de la línea germinal se consideran pacientes No Mutados (NM), y diferencias mayores o igual a 2% se definen como pacientes Mutados (M).ND: No hay dato.

Paciente LLC	Evolución Clínica	Estadio Binet	Expresión GALNT11(a)	Estado Mutacional (b)
1	Progresor	B	14,9	NM
2	Progresor	C	24,7	NM
3	Progresor	C	16,0	NM
4	Progresor	B	3,1	NM
5	Indolente	B	8,3	NM
6	Indolente	A	8,5	NM
7	Progresor	A	17,4	NM
8	Progresor	A	13,3	NM
9	Progresor	B	6,5	NM
10	Indolente	B	8,3	NM
11	Indolente	A	9,1	NM
12	Indolente	A	8,1	NM
13	Indolente	A	8,9	NM
14	Progresor	A	16,8	NM
15	Indolente	A	3,5	NM
16	ND	A	11,1	NM
17	Progresor	B	48,3	NM
18	Indolente	A	4,0	NM
19	ND	A	22,2	NM
20	Progresor	A	2,2	NM
21	Progresor	B	2,0	NM
22	Progresor	C	24,6	NM
23	Progresor	B	39,7	NM
24	Progresor	B	13,3	NM
25	ND	ND	62,0	NM
26	Indolente	A	6,2	M
27	Indolente	A	2,5	M
28	Indolente	A	8,4	M
29	ND	A	1	M
30	Progresor	A	11,7	M
31	Indolente	A	6,1	M
32	Indolente	A	2,6	M
33	Indolente	A	6,2	M
34	Indolente	A	6,7	M
35	Indolente	A	1,3	M
36	Indolente	A	3,5	M
37	ND	C	10,4	M
38	Indolente	A	2,8	M
39	Indolente	A	6,6	M
40	Indolente	A	4,8	M
41	Indolente	A	7,1	M
42	Indolente	A	4,6	M
43	Progresor	C	5,3	M
44	ND	ND	5,9	M
45	Indolente	A	1,5	M
46	Indolente	A	1,0	M
47	Progresor	B	4,0	M
48	Progresor	C	2,7	M
49	Indolente	A	1,3	M
50	Indolente	A	1,6	M

La expresión de *GALNT11* en estos pacientes se comparó con un pool de células B de 3 donantes sanos que fueron usados como control. Sorprendentemente, 96% de los pacientes estudiados mostraron mayor expresión que el control, y ninguno de los pacientes mostró niveles de expresión menores al control. Además la sobre-expresión observada en la mayoría de los casos (44 de 50 pacientes) fue significativamente mayor al control: un mínimo del doble de expresión respecto al control y hasta 62 veces más que el mismo.

También se cuantificó la expresión de *GALNT11* en linfocitos T de donantes sanos, en la línea de linfocitos T Jurkat, y en la línea de linfocitos B Daudi, y se comparó su expresión con el control de linfocitos B normales. Se encontró que los linfocitos T provenientes de donantes sanos y la línea celular Jurkat presentan una significativa sobre-expresión de *GALNT11* respecto al control: 10 y 13 veces más expresión respectivamente. Por otro lado, la expresión de *GALNT11* en los linfocitos B de línea celular Daudi fue prácticamente indetectable (Figura 12A).

Estos resultados muestran a *GALNT11* como un potencial nuevo marcador de LLC, dado que el mismo se sobre-expresa en un porcentaje muy alto (96%) de estos pacientes. Además como el gen se expresa en linfocitos T (ya sean linfocitos T normales o linfocitos T de la línea celular Jurkat) y su expresión en células B es muy baja o prácticamente indetectable, la expresión de *GALNT11* también se presenta como un nuevo marcador diferencial entre linfocitos B y T. Ambos resultados son muy interesantes dado que plantean a *GALNT11* como un gen cuyo producto probablemente cumpla un rol tanto en la patogenia de la LLC, como en la diferenciación de linfocitos T y B.

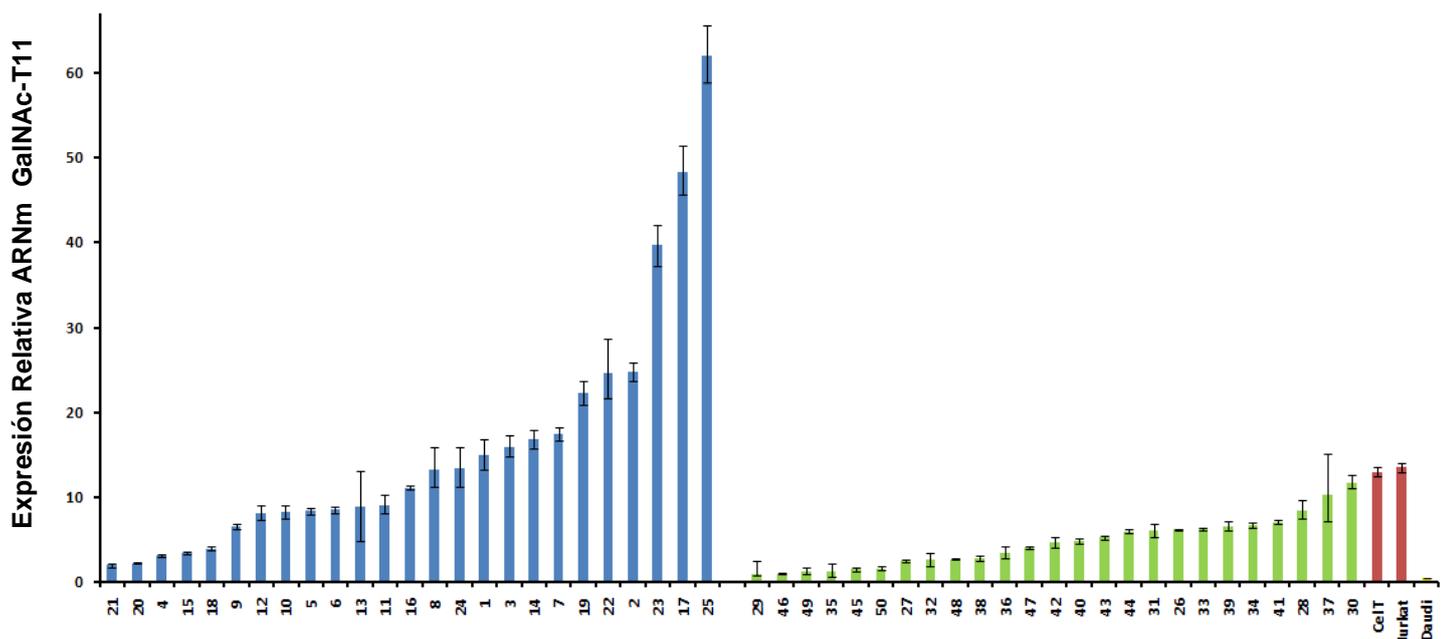
Como se mencionó anteriormente la LLC es una enfermedad heterogénea cuya evolución clínica puede variar ampliamente de un paciente a otro. Esto ha llevado a la búsqueda de diferentes marcadores que permitan predecir el curso de la enfermedad y el tratamiento más adecuado en cada caso.

El estado mutacional de los genes IgVH es uno de los marcadores moleculares que muestra mayor valor pronóstico. Dado que su determinación es costosa y consume tiempo no suele hacerse de rutina en laboratorios clínicos. Por lo tanto es de interés encontrar nuevos marcadores moleculares que se relacionen con el estado mutacional de estos genes. Un ejemplo es la correlación que existe entre pacientes con genes IgVH no mutados y la expresión de ZAP-70 y CD38 aunque esta correlación no es absoluta [59]. Para evaluar si existe alguna relación entre los niveles de expresión de *GALNT11* y el estado mutacional de los genes IgVH se llevó a cabo el test de Mann Withney[192] para comparar diferencias entre grupos de datos. En este análisis encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.0001$) en la expresión de *GALNT11* entre los pacientes con genes IgVH no mutados

en comparación a los mutados. Los pacientes no mutados presentaron una media de expresión relativa de *GALNT11* de 15.9 ± 2.9 , y los mutados una media de expresión relativa de 4.6 ± 0.6 . (Figura 12B). Como puede verse en la Tabla 5, dentro de los pacientes no mutados todos expresaron al menos 2 veces más *GALNT11* respecto al control, mientras que en los pacientes mutados, 2 presentaron igual expresión de *GALNT11* respecto al control, y 4 expresaron solo entre 1.3 y 1.6 veces más que el control. Además también determinamos si existe una relación entre los niveles de expresión de *GALNT11* y la evolución clínica de los pacientes, considerando pacientes progresores e indolentes. Para ello, se llevó a cabo nuevamente el test no paramétrico de Mann Withney [192]. En este caso también se encontró una diferencia significativa respecto a la expresión de *GALNT11* en pacientes progresores en comparación a pacientes indolentes ($p = 0.0054$). Los pacientes progresores mostraron una media de expresión relativa de 14.8 ± 3.0 y los indolentes una media de 5.1 ± 0.5 .

Estos resultados además de presentar la expresión relativa de *GALNT11* como un nuevo potencial marcador de LLC, indican que el promedio de expresión relativa de *GALNT11* en pacientes no mutados y progresores es significativamente mayor al encontrado en pacientes mutados e indolentes respectivamente.

(A) Expresión Relativa del ARNm de GalNAc-T11



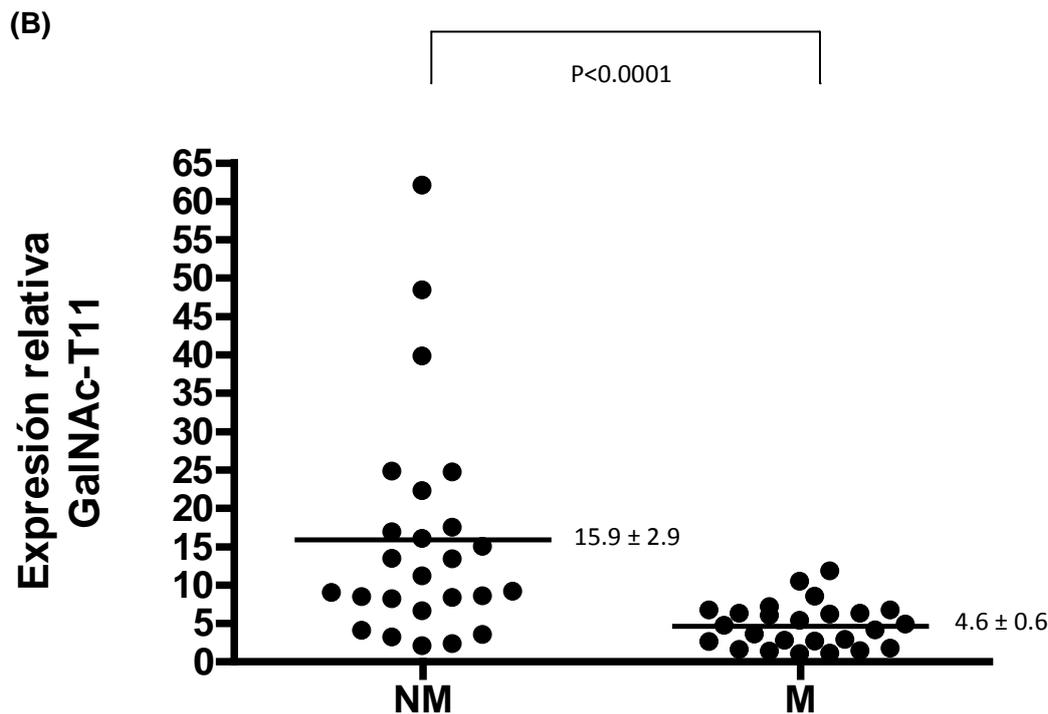


Figura 12. Expresión relativa del ARNm de GalNAc-T11 en pacientes mutados y no mutados de LLC.

(A) Reacciones de PCR en tiempo real de *GALNT11*. *GAPDH* fue usado como gen de referencia. Las reacciones fueron llevadas a cabo en células PBMC de pacientes LLC No mutados (barras azules) y mutados (barras verde), linfocitos T de donantes sanos y de la línea celular Jurkat (barras rojas) y linfocitos B de la línea Daudi (barra amarilla). Como control se utilizó un pool de células B de tres donantes sanos (muestra control). La expresión relativa respecto al control fue calculada con el método de Pfaffl [187] (B) Diferencias muy significativas ($p < 0.0001$, test Mann-Whitney) fueron encontradas en la expresión de *GALNT11* entre pacientes no mutados (NM) y mutados (M). La barra horizontal corresponde a la media de los pacientes NM (15.9) y M (4.6). Los cálculos y gráficas fueron realizados con el programa GraphPad InStat 3.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GalNAc-T11

Producción y caracterización de un Anticuerpo anti GalNAc-T11

Con el fin de estudiar la expresión de la proteína GalNAc-T11, se decidió generar un anticuerpo específico para ello. Dada la alta similitud de secuencias aminoacídicas de GalNAc-T11 entre distintas especies, es difícil lograr generar respuesta inmune con un péptido recombinante ya sea en conejo o ratón. La proteína KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), es ampliamente usada para lograr una respuesta inmune en la producción de anticuerpos de péptidos poco inmunogénicos [193]. Por tal motivo, se seleccionó una región entre los aa 31 y 132 de la proteína GalNAc-T11, perteneciente a su región *Stem* (Figura 5A). La misma según alineamientos realizados con BLAST, es específica de GalNAc-T11,

no encontrándose homología con otras GalNAc-Ts. Dentro de dicha región se seleccionó por un lado un péptido de 15 aa, el cual fue sintetizado y conjugado a KLH por la empresa GenScript para generar el anticuerpo policlonal en conejos, y por otro lado se expresó la región de 101 aa en *E. coli* para ser usada en la caracterización del anticuerpo (Figura 13).

```
MGSVTVRYFCYGCLFTSATWTVLLFVYFNFSEVTQPLKNVPVKGSGPHGSPKKFYPRFT
RGPSRVLEPQFKANKIDDVIDSRVEDPEEGHLKFSELGMIFNERDQELRDLGYQKHAFN
MLISDRLGYHRDVPDTRNAACKEKFYPPDLPAASVVICFYNEAFSALLRTVHVIDRTPAHL
HEIILVDDSDFDLKGELDEYVQKYLPGKIKVIRNTKREGLIRGRMIGAAHATGEVLVFLDSH
CEVNMWLQPLLAIREDRHTVVCVIDIISADTLAYSSSPVVRGGFNWGLHFKWDLVPLSE
LGRAEGATAPIKSPTMAGGLFAMNRQYFHELQYDSGMDIWGGENLEISFRIWMCGGKLFII
PCSRVGHIFRKRPPYGSPEGQDTMTHNSLRLAHVWLDEYKEQYFSLRPDLKTKSYGNISER
VELRKKLGCKSFKWYLDNVPEMQISGSHAKPQQPIFVNRGPKRPKVLQGRGLYHLQTNK
CLVAQGRPSQKGLVVLKACDYSDPNQIWIYNEEHVLSLLCLDMSETRSSDPPRLMKC
HGSGGSQQWTFGKNNRLYQVSVGQCLRAVDPLGQKGSVAMAICDGSSSQWHLEG
```

Figura 13. Secuencia aminoacídica de GalNAc-T11 humana.

Se muestra la secuencia aminoacídica de GalNAc-T-11 humana. En color rojo se marca la secuencia del polipéptido expresado en *E.coli*, y en verde la secuencia seleccionada para ser conjugada a KLH para generar un anticuerpo policlonal.

La secuencia nucleotídica correspondiente al polipéptido de 101 aa se clonó en el vector pQE30. La construcción pQE30-T11 expresa el polipéptido junto con 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo que permite su posterior purificación en una columna de Niquel-agarosa. Con IPTG se logró inducir la expresión del polipéptido, expresándose el mismo en la fracción insoluble del lisado de bacterias, probablemente en cuerpos de inclusión.

Purificación del polipéptido de GalNac-T11 recombinante

Dado que el polipéptido recombinante de GalNac-T11 se expresa en la fracción insoluble de los lisados de *E. coli*, y el mismo no se necesita en su conformación nativa, la purificación se realizó en condiciones desnaturizantes (8M urea), las cuales permiten solubilizar los cuerpos de inclusión.

Para la purificación se utilizó una resina Ni-NTA y el procedimiento fue realizado en “batch”. Los lavados y las eluciones se realizaron por cambio de pH y en presencia de urea como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Las distintas fracciones de la purificación fueron separadas por SDS-PAGE para determinar su pureza.

En la Figura 14 se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida con distintas fracciones de la purificación del polipéptido. Se puede observar que su masa molecular

teórica es de aproximadamente 15kDa. Este valor es muy próximo a la masa molecular deducida de su secuencia primaria (13.5 kDa), y la diferencia observada está dentro del error experimental.

Como se muestra en la Figura 14 los eluidos a pH 5,9, y 4,5 muestran al polipéptido con alto grado de pureza. Los eluidos a pH 4,5 mostraron una mayor concentración de proteína recombinante. En particular el eluido 8 es el más puro y el que presenta mayor concentración. La concentración aproximada se determinó por densitometría en gel de poliacrilamida comparando con distintas diluciones de Lizosima de concentración conocida.

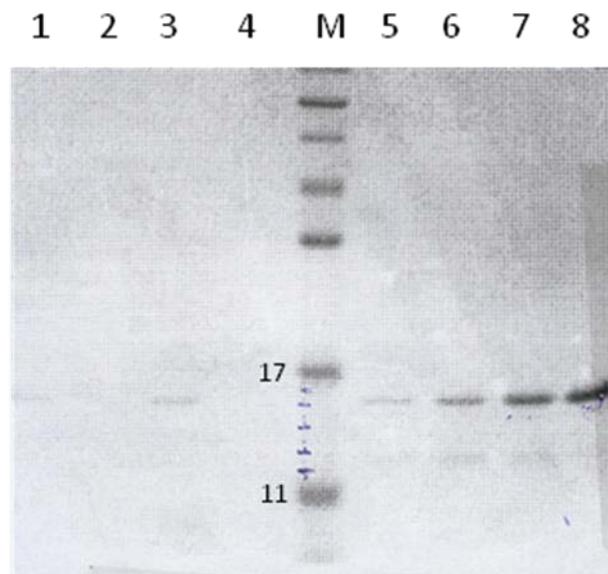


Figura 14. Purificación del polipéptido recombinante GalNAc-T11

1, 2, 3, 4: eluidos a pH 5.9; 5,6,7 y 8: eluidos a pH 4.5. M: Peso molecular en Kda

El polipéptido desnaturalizado se utilizó para caracterizar el anticuerpo policlonal de GalNAc-T11. Para ello se llevó a cabo un *Western Blot* con distintas cantidades del polipéptido. Como se muestra en la Figura 15, el anticuerpo reconoce al polipéptido, observándose una banda de aproximadamente 15 kDa, de concentración relativa a la cantidad de polipéptido sembrado.

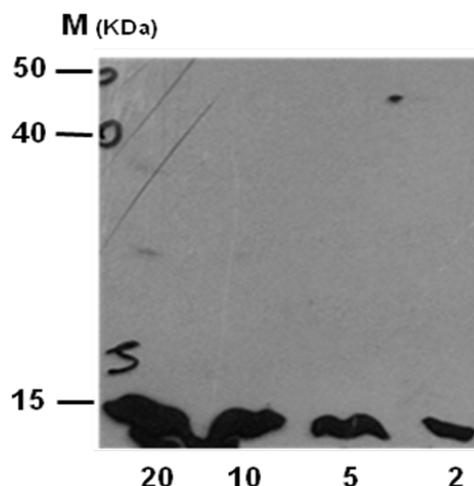


Figura 15. *Western blot* usando el anticuerpo anti-GalNAc-T11 sobre el polipéptido recombinante

Western Blot con distintas cantidades (20, 10, 5, 2 ng) del polipéptido recombinante de GalNAc-T11. El anticuerpo utilizado fue anti-GalNAc-T11.

Determinación de la expresión de la proteína GalNAc-T11

Western blot

Como se mostró anteriormente, mediante PCR en tiempo real se encontró una importante sobre-expresión del ARNm de GalNAc-T11 en células de pacientes LLC respecto a células B de donantes sanos. Quisimos entonces estudiar utilizando el anticuerpo anti-GalNAc-T11, si la expresión de la proteína podía ser detectada en pacientes LLC.

Para ello se realizaron extractos proteicos de PBMC-LLC y de células B de donantes sanos para su posterior análisis mediante *western blot* utilizando el anticuerpo policlonal anti-GalNAc-T11. De acuerdo con los datos obtenidos de las secuencias anotadas en la base de datos, la masa molecular de GalNAc-T11 es de 68 kDa. Como se observa en la Figura 16 el análisis por *western blot* mostró una banda entre 55 y 70 kDa en las células LLC mientras la misma no se observó en el pool de células B de donantes sanos. El *western blot* fue normalizado con un anticuerpo anti-GAPDH (Figura 16).

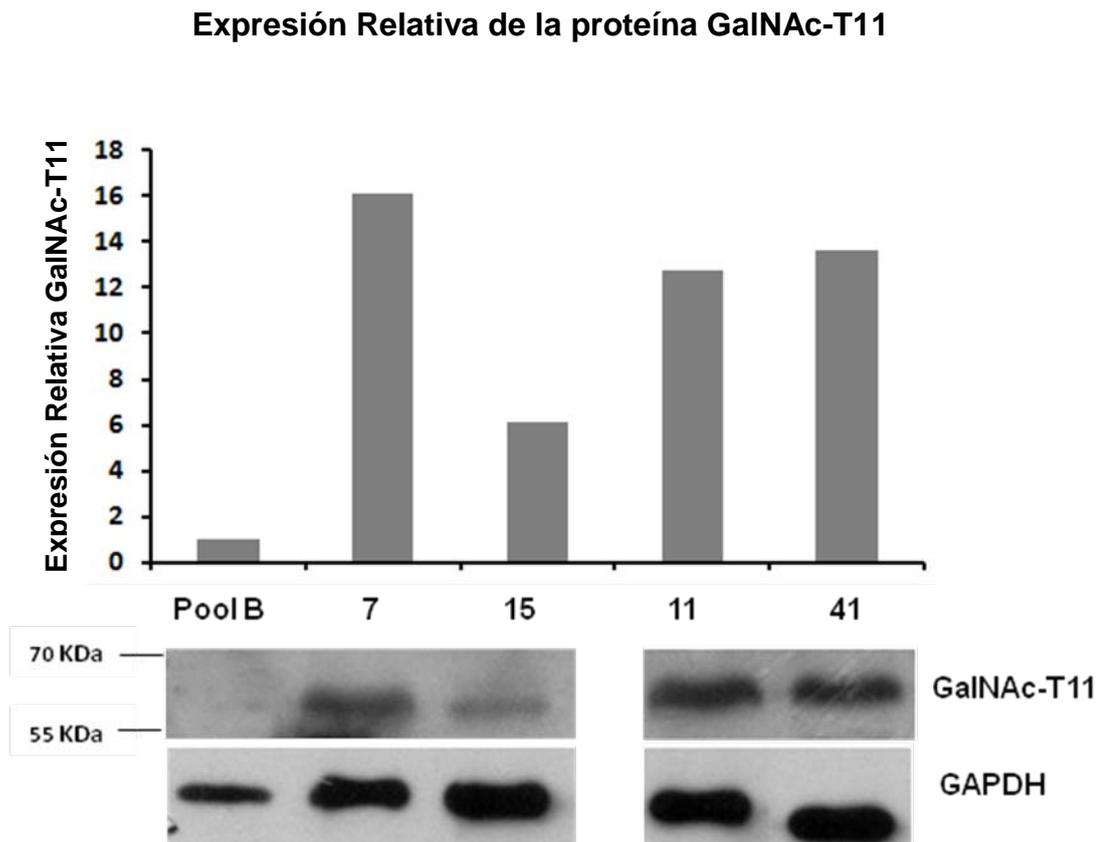


Figura 16. Western Blot en pacientes LLC y donantes sanos.

Western blot con 30µg de proteínas totales de un *pool* de células B de donantes sanos y PBMC de los pacientes 7, 15, 11 y 41 usando el anticuerpo anti-GalNAc-T11 y anti-GAPDH para normalizar. La cuantificación de las bandas para realizar la normalización fue llevada a cabo por densitometría, utilizando el programa Gene Tools de Syngene.

Estos resultados muestran que la proteína GalNAc-T11 se expresa en los pacientes de LLC analizados, mientras su expresión no se observa en células B normales.

Immunofluorescencia Indirecta – IFI

Para estudiar la expresión de la proteína mediante otra aproximación experimental, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta en células de pacientes LLC con distinta expresión relativa de *GALNT11*, linfocitos de las líneas celulares Jurkat y Daudi, y células B de donantes sanos. En la Figura 17 se observa que GalNAc-T11 se expresa en células Jurkat, mientras su expresión es prácticamente nula en células Daudi. Este resultado es concordante con los resultados de expresión del ARNm de la enzima en ambos tipos celulares. En las células Jurkat se muestra que tiene una localización relativamente uniforme alrededor del núcleo (el cual ocupa la mayoría del espacio celular), en el citoplasma. Con el fin de evaluar la especificidad de la señal observada con el anticuerpo GalNAc-T11, se llevaron a cabo dos estudios. Por un lado, se utilizó como anticuerpo primario Inmunoglobulinas (Ig) totales de conejo sobre células Jurkat y Daudi, y se comparó esta

señal con la obtenida con el anticuerpo GalNAc-T11. Por otro, se llevaron a cabo ensayos de competencia incubando las células con una mezcla del anticuerpo anti-GalNAc-T11 junto con el péptido usado para la síntesis del mismo (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 17 la señal obtenida utilizando las Ig de conejo sobre células Jurkat y Daudi es similar a la obtenida utilizando el anticuerpo GalNAc-T11 sobre células Daudi. Además la señal de expresión obtenida sobre las células Jurkat con el anticuerpo anti GalNAc-T11 es claramente más intensa que la obtenida con las Ig de conejo en las mismas células. Finalmente se observa, tanto para las células Jurkat como Daudi, que el ensayo de competición resultó en una pérdida total de señal. Estos resultados indican que el marcado obtenido en células Jurkat con el anticuerpo anti-GalNAc-T11 se debe a una reacción específica del mismo con el antígeno, permitiendo afirmar que las células Jurkat expresan la proteína GalNAc-T11, mientras que las células Daudi no la expresan.

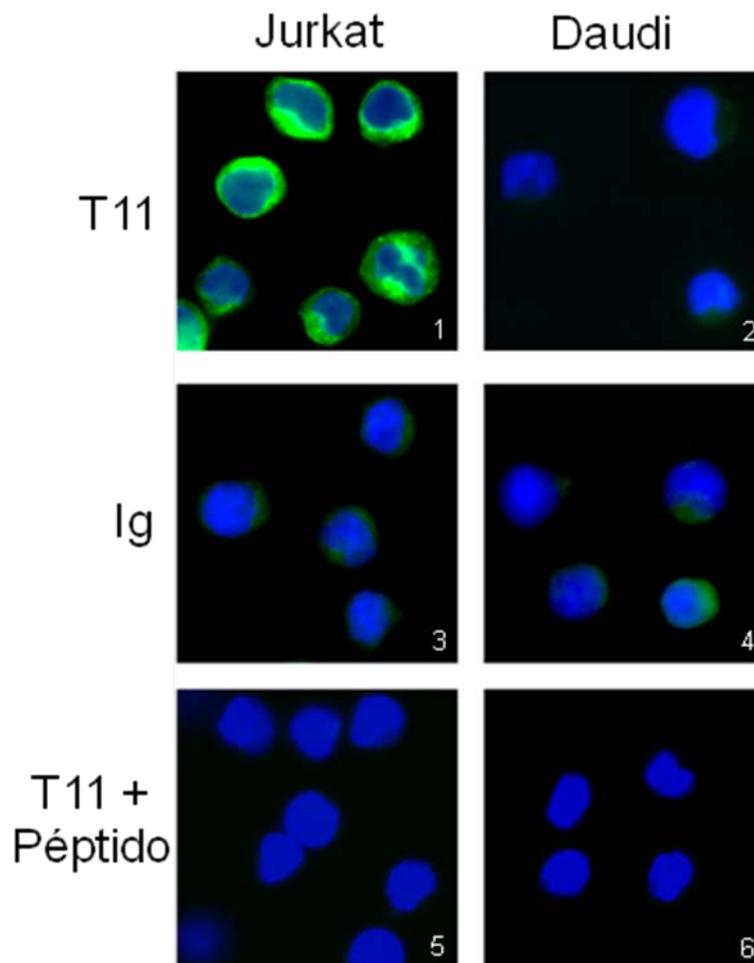


Figura 17. IFI sobre células Jurkat y Daudi.

Inmunofluorescencia Indirecta-IFI sobre células Jurkat y Daudi teñidas con DAPI (azul) utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo anti-GalNAc-T11 (1,2), Ig totales de conejo (3, 4) o anti-GalNAc-T11 junto con el péptido (ensayo de competencia) (5, 6). Como anticuerpo secundario se usó un anti-conejo IgG conjugado a Alexa 488 (verde).

Para profundizar en el análisis de expresión de GalNac-T11 por IFI, se seleccionaron dos pacientes de LLC (24 y 50) que presentan alta y baja expresión relativa del ARNm de la enzima: 13.3 y 1.6 respectivamente.

Para el caso del paciente 24 (expresa 13.3 veces más *GALNT11* respecto al control) se puede observar en la Figura 18 un marcado citoplasmático con el anticuerpo anti GalNac-T11. En estas células la mayoría del espacio celular está ocupado por el núcleo, quedando el citoplasma restringido al borde celular.

Por otro lado para el paciente 50, (expresa 1.6 veces más *GALNT11* respecto al control) no se detecta la proteína, posiblemente debido a la baja sensibilidad del anticuerpo en comparación a la sensibilidad de la PCR en tiempo real.

Por otra parte, con el objetivo de determinar si las células PBMC-LLC de estos pacientes son linfocitos B, se utilizó junto con el anticuerpo anti GalNac-T11, un anticuerpo anti-CD19, el cual marca específicamente linfocitos B. Como se puede observar en la Figura 17 las células PBMC de ambos pacientes muestran marcado con el anticuerpo anti-CD19, lo que indica que se trata en ambos casos de linfocitos B. Para el caso del paciente 24, las mismas células que muestran un marcado con el anticuerpo anti GalNac-T11 también lo muestran con el anticuerpo anti-CD19.

Este resultado confirma, ahora a nivel proteico, el estudio inicial presentado en este trabajo, que muestra que la expresión del ARNm de GalNac-T11 de células PBMC-LLC se debe a su expresión en los linfocitos B.

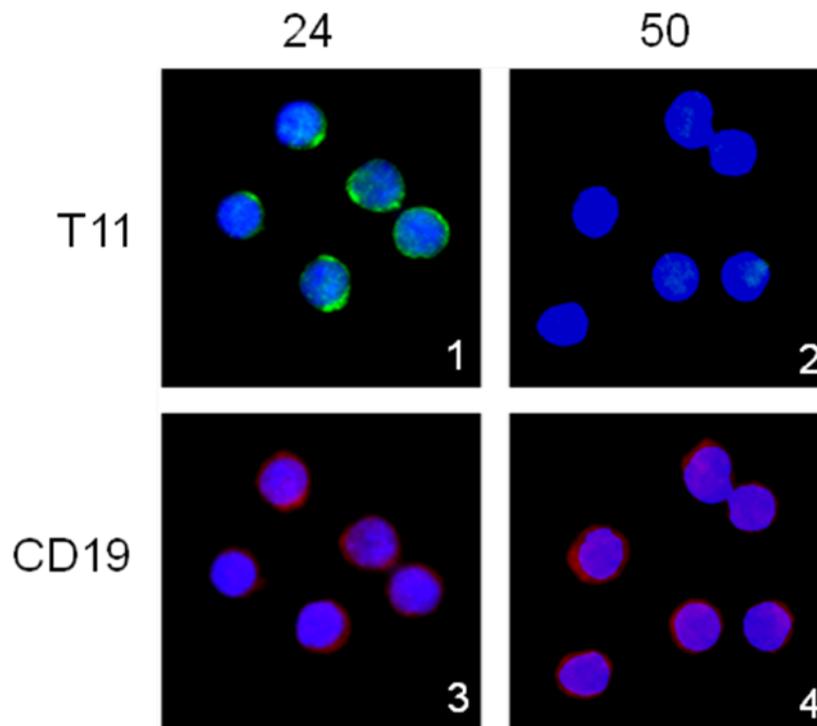


Figura 18. IFI sobre células PBMC-LLC utilizando los anticuerpos anti-GalNAc-T11 y anti-CD19. IFI sobre células PBMC de dos pacientes LLC: 24 y 50 con alta (13.3) y baja (1.6) expresión relativa del gen *GALNT11* respectivamente. Se muestran las células teñidas con DAPI utilizando el anticuerpo anti-GalNAc-T11 (1,2) y anti-CD19-PECy5.5 (rojo) (3,4).

Finalmente se estudió la expresión de GalNAc-T11 en células PBMC de donantes sanos. Nuevamente se utilizó el anticuerpo anti-CD19 para identificar linfocitos B. En este caso, estos linfocitos representan entre un 2-20% de las PBMC [191]. En la Figura 19 se observa expresión de GalNAc-T11 en células PBMC CD19 negativas, mientras que no se observa expresión de la enzima en células CD19 positivas. Este resultado indica que la proteína GalNAc-T11 no se expresa en linfocitos B de donantes sanos, mientras sí se expresa en otras células de las PBMC. Teniendo en cuenta los resultados de PCR en tiempo real, los cuales mostraban que el ARNm de GalNAc-T11 se expresa en linfocitos T, y considerando que aproximadamente el 75% de las células PBMC normales son linfocitos T, es probable que la expresión de GalNAc-T11 observada en estas PBMC se deba a la expresión de la proteína en los linfocitos T.

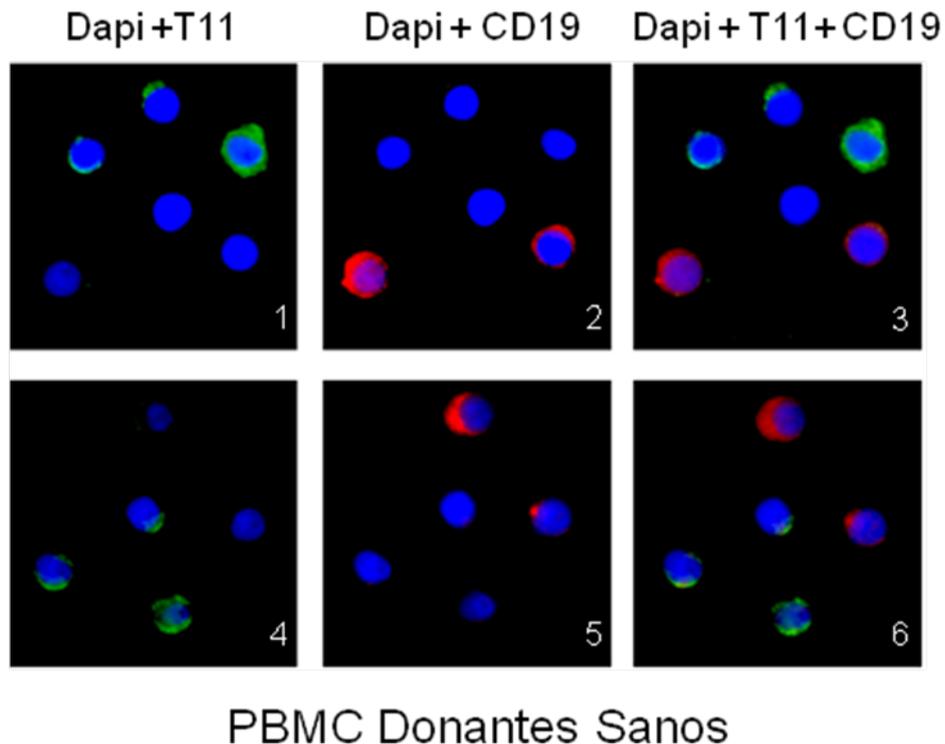


Figura 19. IFI sobre células PBMC de donantes sanos utilizando los anticuerpos anti GalNAc-T11 y anti-CD19.

IFI de PBMC de donantes sanos teñidas con DAPI y marcadas con anti-GalNAc-T11 (1 y 4), anti-CD19-PE-Cy5.5. (2,5) y anti-GalNAc-T11 junto con anti-CD19 (3, 6).

EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS Tn Y SIALIL-Tn

Durante el desarrollo y progresión del cáncer ocurren cambios importantes en la expresión de carbohidratos. Las alteraciones en la glicosilación pueden resultar tanto en la pérdida de antígenos normales y/o en la formación de nuevos antígenos asociados al tumor. Muchos de estos cambios ocurren en la superficie celular o en glicoproteínas secretadas, lo cual las convierte en potenciales biomarcadores y también han sido consideradas para el desarrollo de nuevas terapias. Dado que variados antígenos de O-glicosilación incompleta se expresan únicamente en células malignas, anticuerpos monoclonales anti-Tn, -T, -sialil-Tn, entre otros, han sido evaluados en ensayos clínicos como vacunas antigénicas [194]. Uno de los antígenos asociados a tumor mejor caracterizado es el antígeno Tn. El antígeno Tn es el primer producto de la acción de las GalNAc-Ts (Figura 3), y si bien el mismo está presente en la mayoría de los O-glicanos, normalmente se encuentra enmascarado por la adición de nuevos carbohidratos. Sin embargo su expresión se ha encontrado en el 70 - 90% de los carcinomas humanos, y se suele relacionar con mal pronóstico [195]. En LLC existen 2 trabajos de hace más de 15 años, en los cuales se estudia la expresión del antígeno Tn en LLC, pero ambos trabajos muestran resultados contradictorios [152, 153]. Considerando que

el antígeno Tn se expresa en células Jurkat, las cuales también expresan *GALNT11*; teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados y que en LLC encontramos la sobre-expresión de *GALNT11*, decidimos analizar si Tn podría estar expresándose en células LLC. Para ello, se estudió mediante citometría de flujo e IFI, la expresión de Tn en 5 pacientes con LLC presentando distintos niveles de expresión de *GALNT11*. Su expresión también fue estudiada en células PBMC de donantes sanos y en células Daudi. La línea celular Jurkat fue utilizada como control positivo [196].

Estudio de expresión del antígeno Tn por citometría de flujo

Por citometría de flujo utilizando el anticuerpo 83D4 [188], se encontró expresión de Tn en células Jurkat en el 95.6% de las células analizadas. Por otro lado las células Daudi y los linfocitos de donantes sanos mostraron 7.9% y una media de 0.3% de expresión respectivamente. En los linfocitos de los 5 pacientes de LLC estudiados, el rango de porcentaje de expresión fue de 0.1 a 9.8% (Tabla 6). Teniendo en cuenta los valores del control positivo, 95.6%, se podría considerar que todos los pacientes estudiados, los linfocitos de donantes sanos y las células Daudi, resultan negativos para el marcado del anticuerpo anti-Tn 83D4. En la Figura 20 se muestran los histogramas obtenidos para células Jurkat, Daudi, linfocitos de donantes sanos, y linfocitos de un paciente de LLC.

Tabla 6. Expresión de Tn en linfocitos de pacientes de LLC, células Jurkat, Daudi y linfocitos de donantes sanos.

Muestra	Anti Tn (% de células positivas)	Expresión realtiva del ARNm de GalNAc-T11
Jurkat	95.6	13
Daudi	7.9	0.4
Donante sano 1	0.4	1
Donante sano 2	0.2	1
47	9.8	4.0
40	0.1	4.8
41	0.5	7.1
19	0.1	22.2
50	0.3	1.6

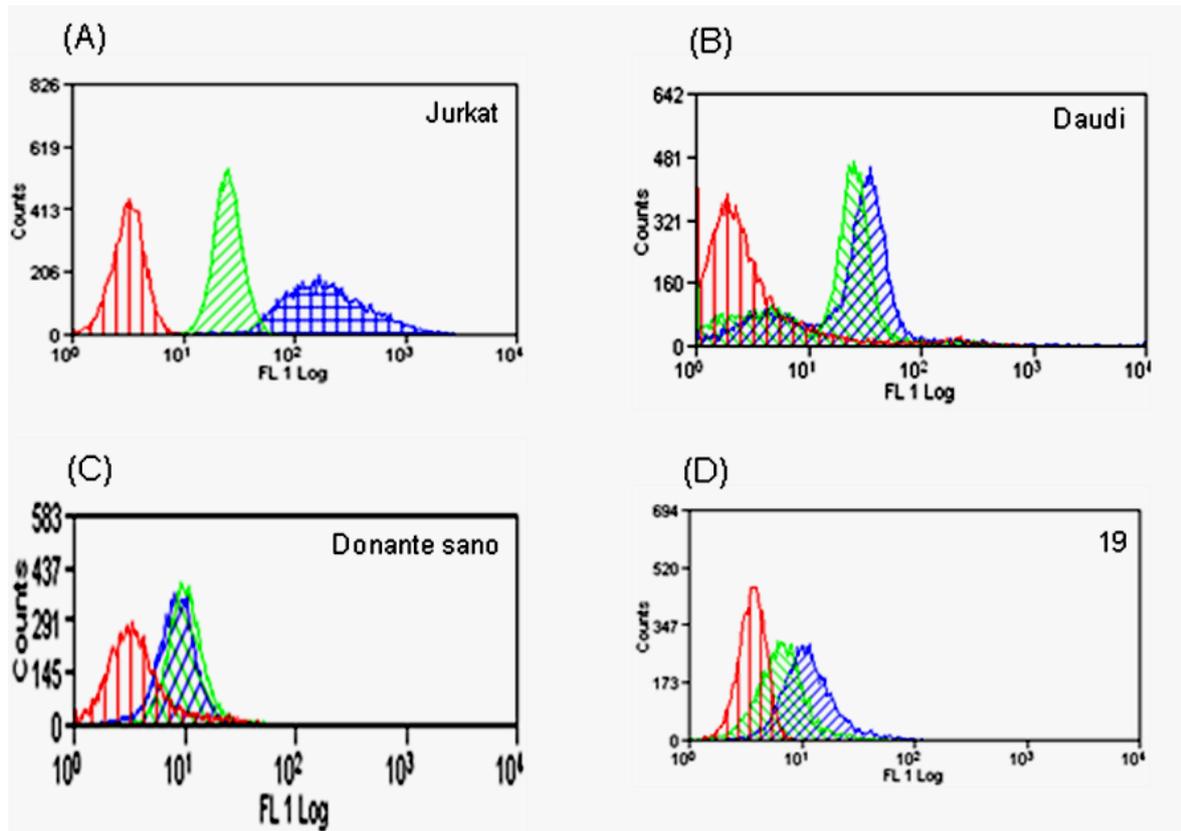


Figura 20. Análisis por citometría de flujo de la expresión de Tn en linfocitos de LLC y donantes sanos, células Jurkat y Daudi.

(A) Expresión de Tn en células Jurkat, (B) Daudi, (C) linfocitos de un donante sano y (D) linfocitos de un paciente con LLC. En todos los casos se llevó a cabo un control de células sin teñir: células sin anticuerpo primario, y sin anticuerpo secundario (rojo), un control de anticuerpo secundario: sin anticuerpo primario, y con anticuerpo secundario (verde), y células incubadas con el anticuerpo primario 83D4 y con el anticuerpo secundario -anti inmunoglobulinas de ratón conjugado a Alexa 488- (azul).

Estudio de expresión del antígeno Tn y sialil-Tn por IFI

Los ensayos de IFI sobre células Jurkat mostraron un marcado en el citoplasma de las mismas con variaciones de intensidades entre célula y célula, consistente con el histograma de citometría de flujo de la misma línea celular (pico ancho). Para el caso de células Daudi, no se observó marcado lo cual es concordante con el resultado de citometría de flujo (Figura 21)

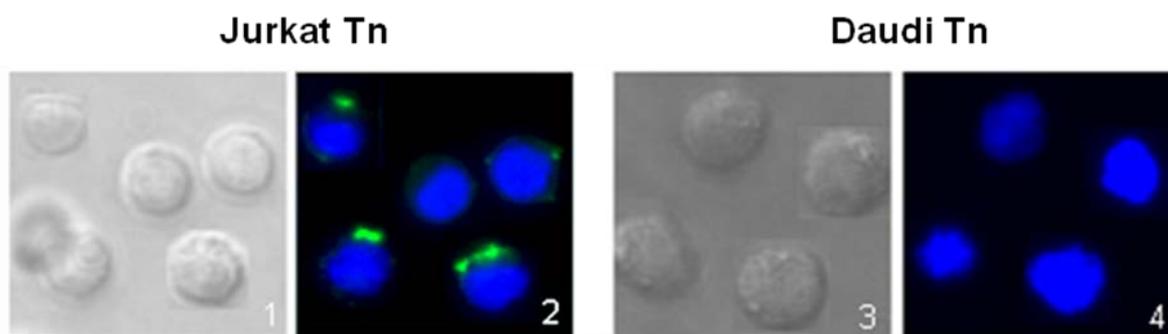


Figura 21. Análisis por IFI de la expresión de Tn en células Jurkat y Daudi.

IFI de células Jurkat (2) y Daudi (4), teñidas con DAPI (azul), y marcadas con anti-Tn (83D4). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (verde). También se muestran las imágenes de contraste de fases (1,3)

Estos resultados muestran que no se observa expresión del antígeno Tn utilizando el anticuerpo anti 83D4, en linfocitos LLC, linfocitos de donantes sanos, ni en células Daudi.

Como se mencionó anteriormente la forma sialilada de Tn, el antígeno sialil-Tn, también se relaciona con diversos tipos de carcinomas humanos [149]. Un aspecto a considerar, es que el antígeno sialil-Tn es una estructura terminal (Figura 3), y por lo tanto no puede ser usado como sustrato para nuevas reacciones de glicosilación. Esto podría estar enmascarando la expresión del antígeno Tn.

Para estudiar la expresión del antígeno sialil-Tn se llevó a cabo la técnica de IFI utilizando el anticuerpo B72.3[189] en 5 pacientes LLC con distintos niveles de expresión de GalNAc-T11. Como control positivo se utilizó la línea celular A549.

Se observó una importante expresión de sialil-Tn en el citoplasma de las células A549 (control positivo), mientras que en las células de los pacientes LLC no se observó, para ningún caso, expresión del antígeno (Figura 22).

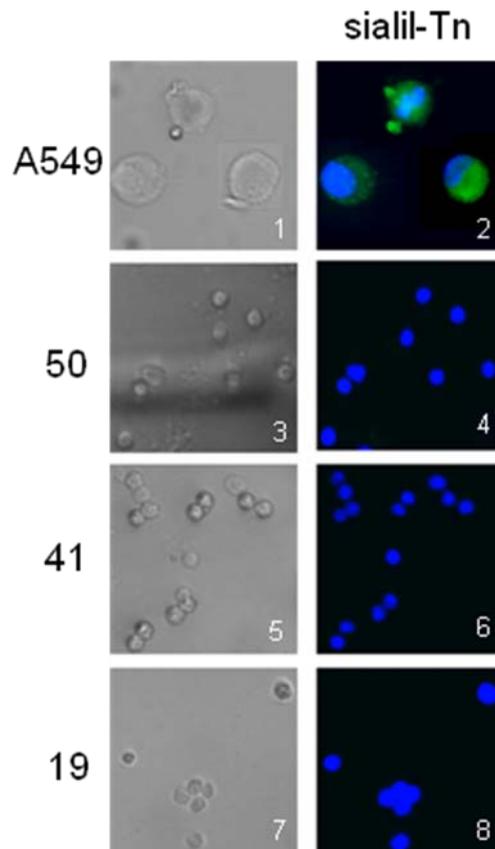


Figura 22. Análisis por IFI de la expresión de Sialil-Tn en células A549 y PBMC de pacientes LLC.

IFI de la línea celular A549 (2), y células PBMC de 4 pacientes LLC (4,6,8) teñidas con DAPI (azul) y anti-sialil-Tn (B72.3). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (verde). También se muestran las imágenes de contraste de fases (1, 3, 5, 7).

Los resultados obtenidos con el anticuerpo B72.3, muestran que el antígeno sialil-Tn no se expresa en células de pacientes LLC.

Por lo tanto, aunque Tn y sialil-Tn son antígenos de *O*-glicosilación simple, presentes en una importante cantidad de carcinomas, [195, 197-199], los mismos parecen no expresarse en linfocitos B-LLC.

GENERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DAUDI-T11

Contrariamente a lo que sucede en la *N*-glicosilación, el estudio de los blancos de *O*-glicosilación supone un importante desafío. Esto se debe a que no existe una secuencia consenso que permita predecir e identificar *O*-glicoproteínas. Además tampoco existe una endoglicosidasa universal capaz de liberar los *O*-glicanos de la proteína [85]. Por tal motivo generar herramientas que ayuden a identificar los blancos de las GalNAc-Ts son de gran de utilidad.

Por otro lado cambios en la O-glicosilación durante la transformación maligna de las células pueden influir en el crecimiento celular, la diferenciación, la adhesividad y la inmunogenicidad de las células [200]. Particularmente ya se ha visto alteraciones de la expresión de las GalNAc-Ts en distintos tipos de cáncer [132-139].

Por los motivos antes expuestos, decidimos crear a partir de la línea celular Daudi, la cual no expresa GalNAc-T11, una línea Daudi estable e inducible capaz de sobre-expresar GalNAc-T11 (Línea Daudi-T11). La misma servirá para estudiar los blancos de glicosilación de la enzima mediante estudios glicoproteómicos. Además esta línea celular podrá luego ser utilizada para analizar si la sobre-expresión de la enzima podría estar relacionada con características asociadas a la transformación maligna como ser cambios en la proliferación, migración y adhesión celular entre otros.

Para generar la línea celular Daudi-T11, decidimos trabajar con el sistema T-REx de Invitrogen. El mismo es un sistema de expresión de células de mamíferos inducible por tetraciclina. Los principales componentes del sistema son el vector pCDNA6 el cual es capaz de expresar altos niveles del gen represor de tetraciclina (represor Tet) bajo el control del promotor de citomegalovirus – CMV - humano. Además se utiliza el vector inducible pCDNA4, en el cual es necesario clonar el gen de interés. La expresión del mismo también es regulada por el promotor CMV, y depende del operador de tetraciclina (TetO2), al cual, en ausencia de tetraciclina, se une con gran afinidad un homodímero del represor Tet producido por el vector pCDNA6. Esto inhibe la expresión del gen. Al agregar tetraciclina, la misma se unirá al represor Tet, provocando un cambio conformacional en el represor que inhibe su unión al operador de tetraciclina, habilitando la expresión del gen de interés.

Generación de la línea Daudi-pcDNA6

En base a lo explicado anteriormente se transformó mediante electroporación la línea celular Daudi con el vector pcDNA6, capaz de expresar el represor de tetraciclina, seleccionándose las células que incorporaron el vector utilizando el antibiótico blasticidina. Una vez finalizada la selección, se llevó a cabo una PCR con oligonucleótidos específicos para el represor de tetraciclina con el fin de analizar la expresión del mismo. Luego de corroborar su expresión, se clonó por dilución límite y se analizaron nuevamente algunos clones para elegir uno que sea capaz de expresar importantes cantidades del represor (Figura 23). De esta manera se logró generar la línea Daudi-pcDNA6.

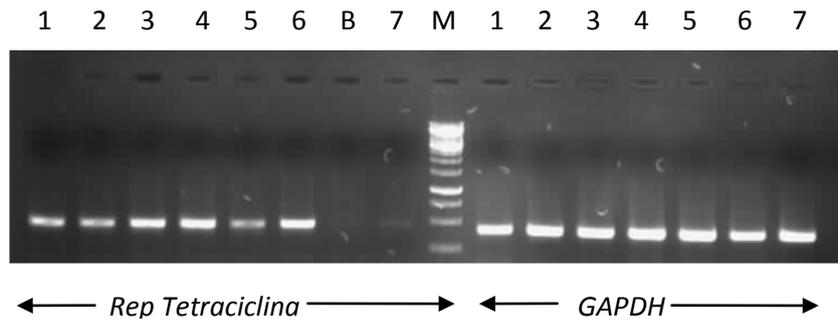


Figura 23. Evaluación de la expresión del represor de tetraciclina en Daudi-pcDNA6. RT-PCR del represor de tetraciclina y *GAPDH* en clones Daudi-pcDNA6 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; B: blanco.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que se logró obtener clones capaces de expresar el represor de tetraciclina. Como se observa en la Figura 23 no todos los clones expresan la misma cantidad del represor. Se seleccionó el clon 6 para seguir trabajando, dado que el mismo es uno de los que expresa mayor cantidad del represor.

Generación de la línea Daudi-T11

La secuencia codificante de GalNAc-T11 se clonó en el vector pGEM-T-easy (Promega) y luego se subclonó en el vector pcDNA-4 como se describió en Materiales y Métodos. Dicho vector se transformó por electroporación en el clon 6 Daudi-pcDNA6. Las células que incorporaron el vector fueron seleccionadas utilizando el antibiótico fleomicina. Luego de finalizada la selección se clonó nuevamente por dilución límite. Los clones se indujeron con tetraciclina 1 μ M durante 24 horas, y se analizaron por RT-PCR para evaluar la sobre-expresión de GalNAc-T11. Finalmente se seleccionó un clon capaz de expresar GalNAc-T11 al ser inducido con tetraciclina.

En la Figura 24 se puede observar reacciones de RT-PCR del clon seleccionado, sin y con inducción por tetraciclina. Las reacciones fueron llevadas a cabo con distintos oligonucleótidos capaces de amplificar productos de variados pares de bases del ARNm de GalNAc-T11.

La Figura 24A muestra la amplificación de un producto de 1000pb, correspondiente a la expresión de *GALNT11* de un clon inducido con tetraciclina, mientras su expresión no se observa sin inducción. Con el fin de verificar ausencia de contaminación por ADN genómico en las muestras de ADNc, se llevó a cabo la amplificación del ARN del clon (control sin agregado de transcriptasa reversa). No se observó expresión de *GALNT11* en ningún caso, por lo que el ADNc no está contaminado con ADN genómico. Como controles positivos se utilizó ADNc de la línea celular Jurkat y linfocitos T, así como del plásmido pGEM-T11, observándose expresión del gen en todos los casos. Como control negativo se amplificó *GALNT11* en el pool de células B de donantes sanos, no observándose su expresión.

En la Figura 24B se observan reacciones de RT-PCR realizadas con oligonucleótidos que amplifican un producto de 650pb de *GALNT11*. Se puede ver a partir del clon que fue inducido con tetraciclina una fuerte banda de 650pb, mientras que en el que no fue inducido prácticamente no se observa expresión. Además se observa, por la reacción de PCR realizada con los oligonucleótidos para *GAPDH*, que la cantidad de ADNc en ambas muestras es similar.

Finalmente utilizando oligonucleótidos que amplifican un producto de 440pb de *GALNT11*, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR, observándose nuevamente expresión de *GALNT11* en el clon inducido con tetraciclina, mientras no se observa expresión en los clones sin inducir. (El experimento fue hecho sobre dos muestras independientes). Se normalizó con el gen *GAPDH* (Figura 24C).

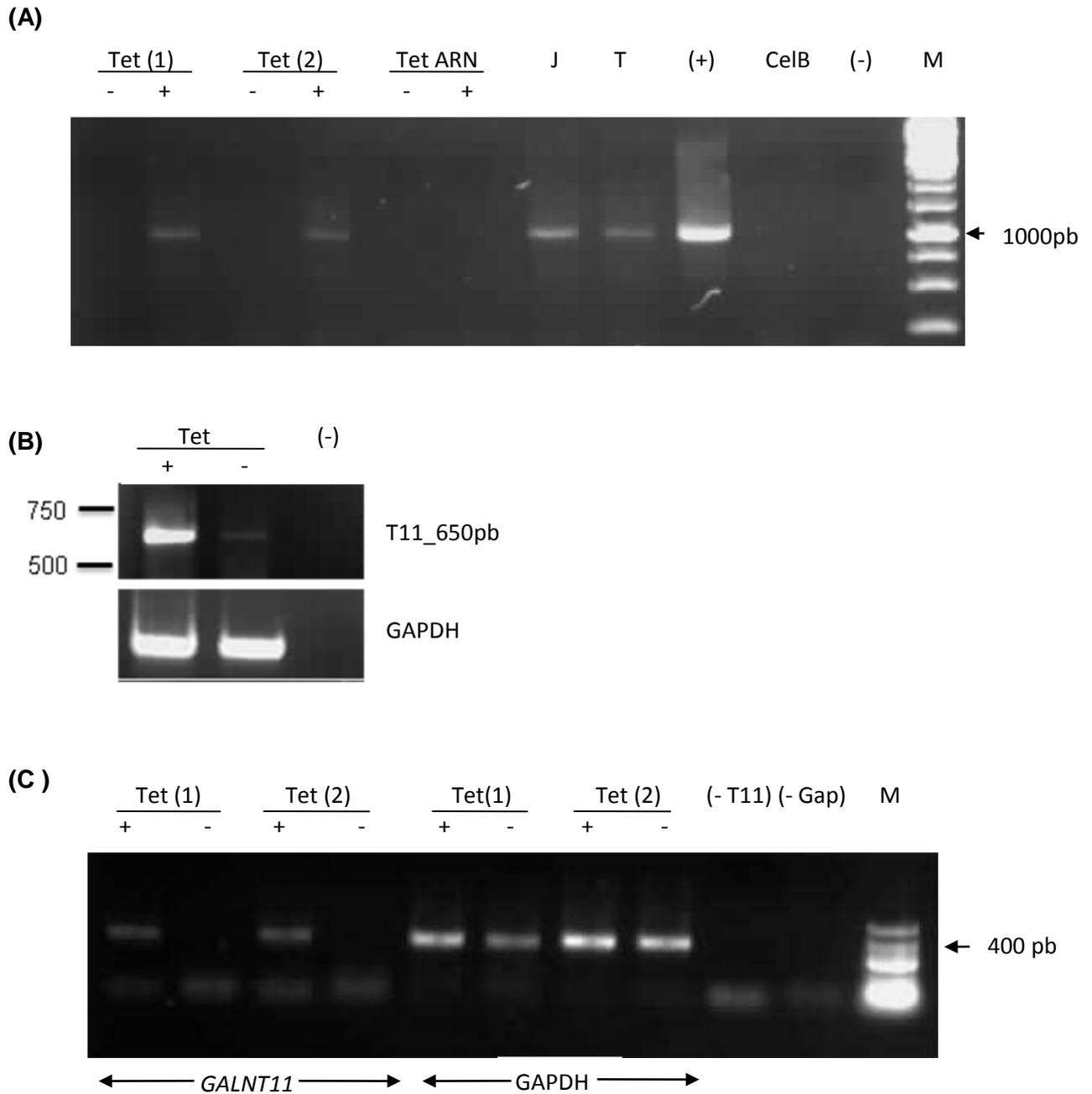


Figura 24. RT-PCR de la expresión de *GALNT11* en clones pcDNA4-T11.

(A) Amplificación por RT-PCR de un producto de 1000pb de *GALNT11* (oligonucleótidos T111000F y R). Tet 1 y 2: clones con y sin inducción de tetraciclina (+ y – respectivamente); Tet ARN: muestras en las cuales se usó como molde ARN, con el fin de descartar contaminación del ADNc con ADN genómico, con y sin inducción de tetraciclina, (J): células Jurkat, (T): células T, (+): plásmido pGEM-T easy conteniendo *GALNT11*, CelB: células B de donantes sanos, (-): blanco, M: marcador. (B) Amplificación por RT-PCR de un producto de 650pb de *GALNT11* utilizando los oligonucleótidos T11650 F y R, y amplificación de *GAPDH* con y sin inducción de tetraciclina (+ y – respectivamente), (-): blanco. (C) Amplificación por RT-PCR de un producto de *GALNT11* de 440pb y amplificación de *GAPDH*. Tet 1 y 2: clones con y sin inducción de tetraciclina (+ y – respectivamente); (- T11): blanco T11; (- Gap): blanco *GAPDH*.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que se logró obtener la línea celular Daudi-T11 capaz de sobre-expresar el ARNm de GalNAc-T11 al ser inducida con tetraciclina.

Expresión de la proteína GalNAc-T11 en la línea Daudi-T11

Dado que se mostró la expresión del ARNm de GalNAc-T11 en la línea Daudi-T11 al ser inducida con tetraciclina, se decidió investigar si la proteína también se sobre-expresa en estas condiciones. Para ello se llevaron a cabo estudios con el anticuerpo anti-T11 por inmunofluorescencia indirecta, luego de inducir la expresión de GalNAc-T11 con tetraciclina. La Figura 25 muestra que las células inducidas con tetraciclina expresan GalNAc-T11 y su distribución es de tipo granular, localizándose principalmente en el citoplasma celular.

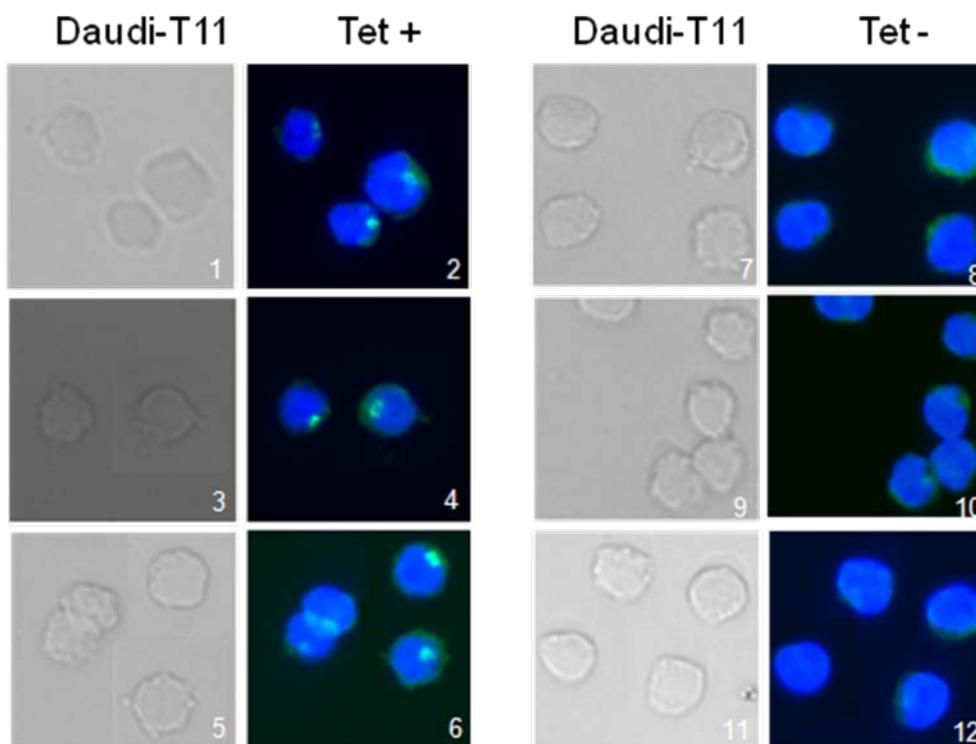


Figura 25. IFI de la línea Daudi-T11 con y sin inducción de tetraciclina.

En la figura se muestra células Daudi-T11 teñidas con Dapi y marcadas con el anticuerpo anti-T11 inducidas con tetraciclina (Tet +) (2, 4, 6), y sin inducir (Tet -) (8, 10, 12). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488 (verde). También se muestran las imágenes de contraste de fases (1, 3, 5, 7, 9, 11).

En base a estos resultados podemos concluir que la proteína GalNAc-T11 se expresa en la línea celular Daudi-T11 al ser inducida con tetraciclina.

La sobre-expresión de GalNAc-T11 no se asocia con la expresión de Tn ni sialil-Tn

Si bien no se encontró expresión de los antígenos Tn ni sialil-Tn en los pacientes LLC estudiados con diferentes niveles de sobre-expresión de *GALNT11*, decidimos estudiar si la línea Daudi-T11 al ser inducida con tetraciclina y sobre-expresar GalNAc-T11 producía un aumento en la expresión de estos antígenos.

Como se observa en la Figura 26 las células Daudi-T11 no expresan Tn ni sialil-Tn al inducir la expresión de GalNAc-T11 en las mismas. En base a estos resultados, podemos concluir que la sobre-expresión de GalNAc-T11 no provoca una expresión de Tn ni de sialil-Tn en la línea Daudi-T11.

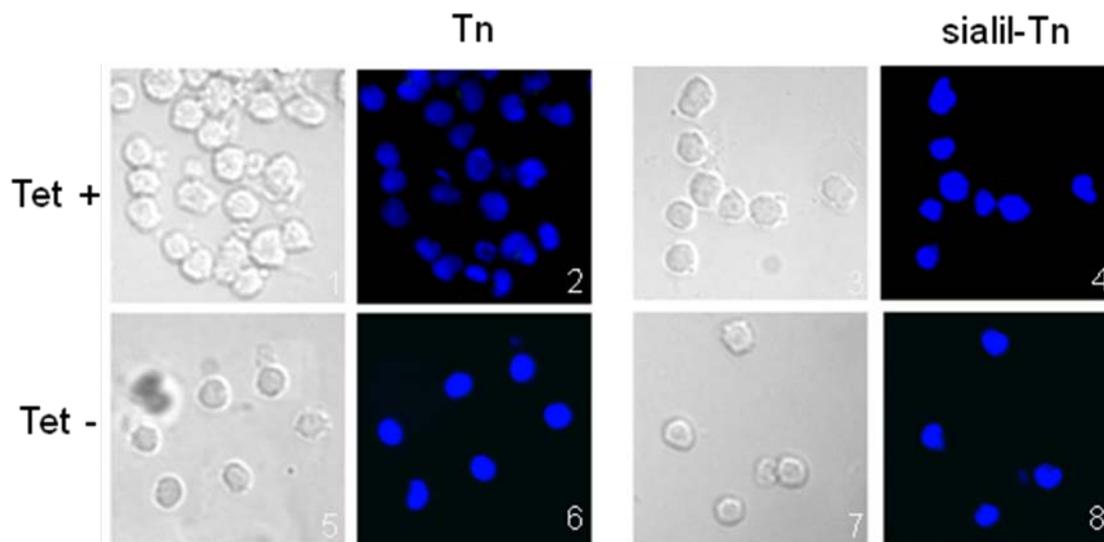


Figura 26. IFI de Tn y sialil-Tn en células Daudi-T11 con y sin inducción de tetraciclina.

En la figura se muestra células Daudi-T11 teñidas con Dapi y marcadas con anti-Tn o anti-Sialil-Tn al ser inducidas con tetraciclina (Tet +) (2 y 4 respectivamente), y sin inducción (Tet -) (6 y 8 respectivamente). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488 (verde). También se muestran las imágenes de contraste de fases (1,3,5,7).

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *GALNT11* POR METILACIÓN DEL ADN

Como mencionamos anteriormente, los mecanismos de regulación de la expresión de GalNAc-Ts han sido muy poco estudiados. Existe sólo un trabajo del año 1999 que analiza elementos regulatorios en base a una secuencia de 1.6Kb alrededor del primer exón de *GALNT3* [156]. Las leucemias, como prácticamente todos los tipos de cáncer, presentan patrones de metilación aberrante. En particular en la LLC se han encontrado algunos genes, cuya expresión se encuentra regulada por metilación del ADN, y además el estado de metilación presenta una correlación con el estado mutacional de los genes IgVH. Entre ellos se puede nombrar a los genes *ZAP70*, *TWIST2*, *HOXA4*, *BTG4* y *CD38* [201-204].

Una manera de estudiar la metilación del ADN es mediante tratamiento con bisulfito de sodio, capaz de desaminar citosinas no metiladas convirtiéndolas a uracilo. Si la citosina esta metilada queda protegida contra el tratamiento, permaneciendo como tal. Mediante la secuenciación se puede luego analizar cuales citosinas estaban o no metiladas dependiendo si en la secuencia hay una C (Citosina) o una T (Timina) [205].

Para comenzar a estudiar si la expresión de *GALNT11* se encuentra regulada por metilación de su promotor, se buscaron islas CpG en el entorno del mismo. Para ello se tomaron 5.000 pb hacia 5' y 1.000 pb hacia el 3' de la primer base del primer exón del ARNm de *GALNT11*. El fragmento se analizó mediante el programa EMBOSS CpG *plot*, usando los siguientes parámetros: zonas mayores a 200pb, con una relación GC observada/esperada mayor a 0.6 y un porcentaje de GC mayor a 50. Se encontró una sola isla de 856 pb, la cual contiene al primer exón. (Desde el nucleótido -368 hasta el +488, considerando la primer base del primer exón +1) (Figura 27). Un trabajo reciente muestra que la metilación del ADN hacia el 3' del sitio de inicio de la transcripción, en la región en la cual se encuentra el primer exón, se asocia más con el silenciamiento génico que la metilación del ADN en la región ubicada hacia el 5' respecto al promotor [14]. Dado que la isla CpG encontrada incluye el primer exón de *GALNT11*, es probable que este gen sea un candidato a presentar regulación de su expresión por metilación de la isla CpG. Algunos autores sugieren que una definición de isla CpG más estricta, es la de una región mayor a 500pb con un porcentaje de GC igual o mayor a 55, y una relación GC observada/esperada mayor a 0.65 [206]. Cabe destacar que dentro de la isla CpG anteriormente encontrada, se puede definir una zona de 598pb conteniendo al primer exón (desde -168 hasta +430) que presenta un % GC mayor a 70% y una relación observada/esperada de GC mayor a 0.7.

Con el fin de estudiar el estado de metilación de la isla CpG de *GALNT11*, se llevaron a cabo reacciones con bisulfito a partir de ADN genómico de las líneas celulares Jurkat y Daudi, para posteriormente amplificar un fragmento de 252 pb (-225, +27) conteniendo parte del primer exón, utilizando los ologonucleótidos BSP2 (ver Materiales y Métodos) (Figura 27).

```
CCTGGTGGTCCCTGCTCCCGGGAGGTCACCACACCGATGCGGAACACAGATGCGTGTCGCCGCGCAATGGG
CACAGCGCATAACAGCGCAGAGCTCCCGGGCTCAAGCGCTGCTCCCGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCCGGGGCC
ACAGGCAGGGCATTGTCTTAATGGGGTCTTTTGAGACCGCGGGTGACAGACAACAGGAGCCAGGCCACG
CGCGGCGCCTCTGCGGAACGCTAGGGAGGACTCAGCGCGCGGGCGGCCGGTGACGTAGGGCAGCGAGAG
GTTTCGTCACCGCGGCGGGGGCGGGGCCCTGTACGCGGCGCGGGCGGACGCGGGCGCTGGGCGG
AGGCAGCGGCTCGGGGACTGGGCGAGGGCCCTGGGCCTGAGGAGGCGCGGCCCGCCACTGCGCCCAGCGCC
TGCGCGACGCTGGCTGCTGGGCCCCGGGGCAGTTCAGCCCGCGCCGCTCCTGCGGGTGGACTGGGGCTG
TGCGGGGAGAGAAGATGCCGAGCCCGAGTCCCAGAAGGCGGCGATCCTGGGCTGCGGGCAAGGCGGTG
AGTACCCTCTAGGCGGCGGCTCCCGGCGTCCCTCAGCACCTCGAGAGCTGCGGGCGGCGGCGCGCGGG
```

```
GCCTGGGCAGGCTGGGGGCGGGCGGGGCGGGGAGCGCCTGGCTCCCCGCGGGTCCTGGGCTCCCGCACGCCCC
CTGGGCGAGGCTCGTGTCTCCGGGAGACGCCGCTGCCCCGCGCTCCCCAGCGTCTCCTGAGGCTTGTTCCG
CGGGCGTGGGGGCGAGGACCAGGGCGCTGGCCTCGTTTTCGCGTATTTAGGACGGAGGCACACCTGATCCT
GCAGCC
```

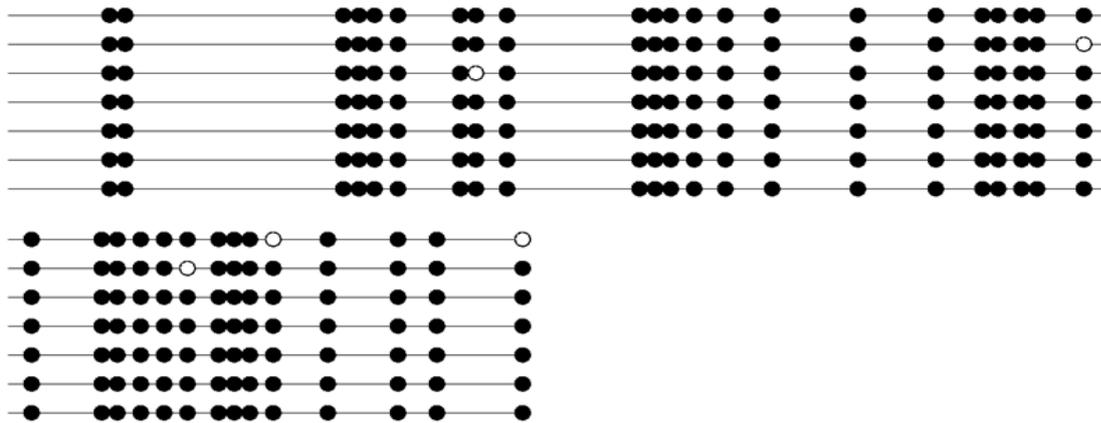
Figura 27. Isla CpG en el entorno del primer exón de *GALNT11*

En azul se muestra la isla CpG de 856 pb. La G marcada en rojo corresponde a la primer base del primer exón, en verde se muestra el primer exón de *GALNT11*, y subrayados se muestran los sitios correspondientes a los oligonucleótidos BSP2.

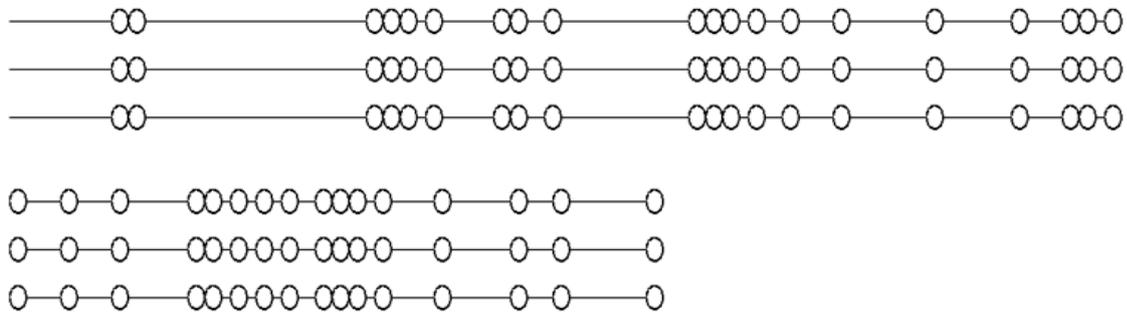
Los fragmentos amplificados se clonaron en pGEM-Teasy (Promega) y distintos clones de células Jurkat y Daudi fueron secuenciados. Comparando el estado de metilación de ambas líneas celulares, se encontró para el caso de células Jurkat (expresan GalNAc-T11) que los 36 dinucleótidos CpG contenidos en el fragmento, están prácticamente todos demetilados. Por el contrario en los clones estudiados de la línea celular Daudi (no expresa GalNAc-T11) los 36 dinucleótidos CpG se encuentran metilados (Fig 28 A y B). En base a este resultado podemos concluir que es posible que la metilación este jugando un rol en la expresión génica de *GALNT11* en las líneas celulares Jurkat y Daudi.

Realizando el mismo estudio en células B de un donante sano y en células LLC de dos pacientes con distintos niveles de expresión relativa de *GALNT11* (paciente 50 y 19, con una expresión relativa de *GALNT11* de 1,6 y 22.2 respecto a células B de donantes sanos respectivamente), se encontró sorprendentemente para todos los clones analizados, que prácticamente un 100% de los dinucleótidos CpG están demetilados. (Figura 28 C, D y E). Por un lado estos resultados sugieren que para expresar mínimas cantidades de *GALNT11* (como es el caso de células B de donantes sanos, y el paciente LLC con expresión relativa de *GALNT11* de 1.6) la secuencia analizada debe estar completamente demetilada. Por otro lado, los resultados indican que no hay correlación entre la expresión de *GALNT11* y el estado de metilación del gen en LLC y en el linfocito B normal.

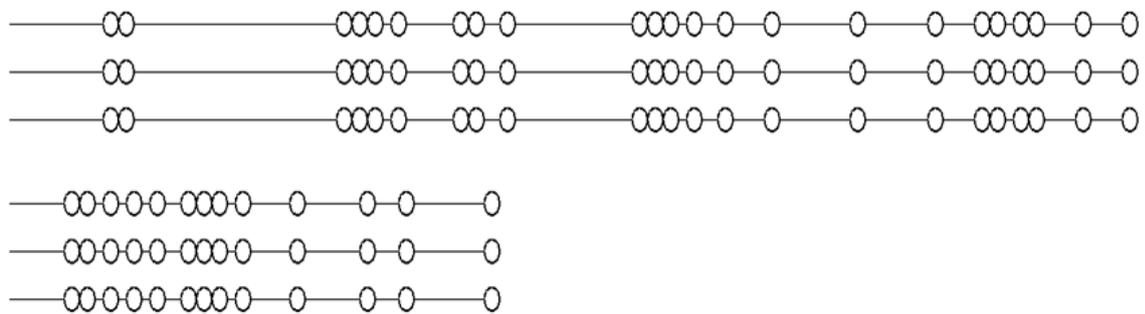
(A) Daudi



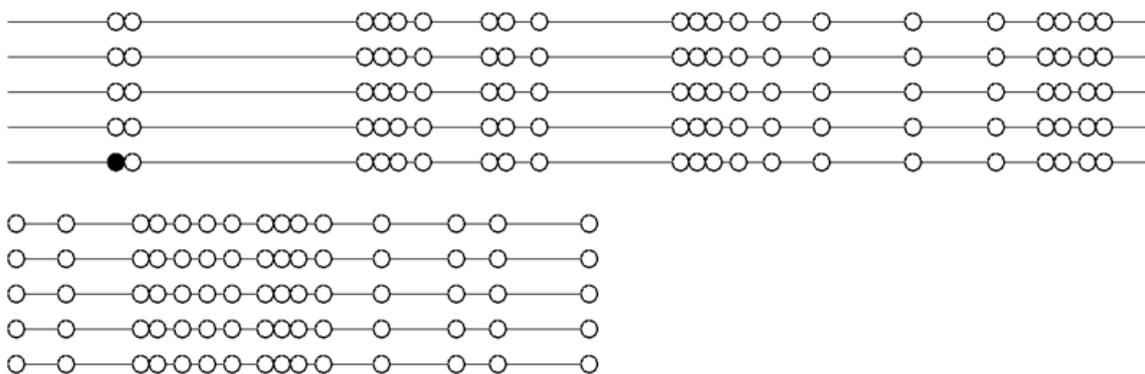
(B) Jurkat



(C) Células B de un donante sano



(D) Paciente 50 con expresión relativa de GALNT11 de 1.6



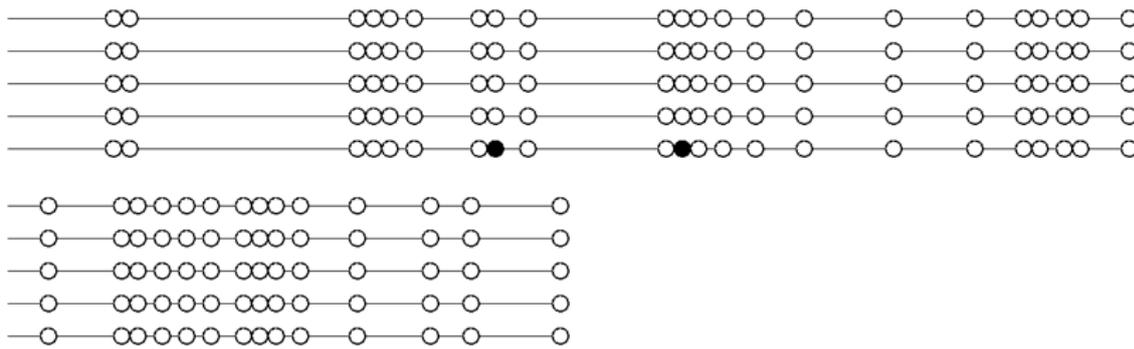
(E) Paciente 19 con expresión relativa de *GALNT11* de 22.2

Figura 28. Estados de metilación de clones del fragmento de 252pb correspondiente a la isla CpG de *GALNT11*.

(A) Diagramas del estados de metilación de 7 clones en células Daudi, (B) 3 clones en células Jurkat, (C) 3 clones en células B de un donante sano, (D) y (E) 5 clones de células LLC con expresión relativa de *GALNT11* de 1,3 y 22.2 respectivamente. Los diagramas fueron obtenidos con el programa *BioQ Analyzer bisulphite sequence*. Cada línea representa un clon, cada círculo representa un dinucleótido CpG; si el mismo es blanco representa que la citosina está demetilada, y si es negro que está metilada.

La metilación puede regular la expresión génica ya sea por impedir la unión de factores de transcripción al ADN metilado, o por unión de proteínas que recluten complejos de remodelación de la cromatina, los cuales finalmente reprimirían la expresión génica [16]. Con el fin de comenzar a estudiar si podrían estar uniéndose factores de transcripción humanos a la isla CpG, se buscó si la misma presenta putativos sitios de unión a dichos factores utilizando el programa TFSEARCH.

Se encontró dentro de la isla CpG, siete putativos sitios de unión a factores de transcripción: tres sitios de unión al factor de transcripción SP1, un sitio de unión al factor de transcripción CREB, un sitio de unión al factor de transcripción AML1, un sitio de unión al factor GATA-2, y un sitio de unión al factor E2F. Dentro de la secuencia estudiada por bisulfito con los oligonucleótidos BSP2 se encuentran 4 de los 7 sitios (uno para AML1, uno para CREB, y dos para SP1) (Figura 29). Cabe destacar que los factores SP1 y CREB contienen dinucleótidos CpG susceptibles de sufrir cambios en su estado de metilación.

```

CCTGGTGGTCCCTGCTCCCGGGAGGTCACCACACCGATGCGGAACACAGATGCGTGTGCCCGCGCAATGGGC
ACAGCGCATACAGCGCAGAGCTCCCGGGCTCAAGCGCTGCTCCCGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCCGGGGCCA
CAGGCAGGGCATTGTCATTAATGGGGTCTTTTGGAGACCGCGGGTGACAGACAACAGGAGCCAGGCCACGC
GCGGGCCTCTGCGCGAACGCTAGGGAGGACTCAGCGCGCGGGCCGGTGACGTCAGGGCAGCGAGAGG
TTTCGTACCCGCGGCGCGGGGGCGGGGCCGCCTGTACGCGGCGCCGGCGGACGCGCGGCGCTGGGCGG
AGGCAGCGGCTCGGGGACTGGGCGAGGGCCCTGGGCTGAGGAGGCAGCGGCCGCACTGCGCCCAGCGCCT
GCGCGACGCTGGCTGCTGGGCCCCGGGGCAGTTCAGCCCAGCGCCGCTCCTGCGGGTCGGACTGGGGCTGTG
GCGGGAGAGAAGATGCCCGAGCCCCGAGTCCCAGAAGGCGGCGATCCTGGGCTGCGGGCAAGGCGGTGAGT
ACCCTTAGGCGGCGGCCTCCCGGCGTCCCTCAGCACCTCGAGAGCTGCGGCGGCGGCGGCGCGGGGCCT
GGGCAGGCTGGGGGCGGCGGCGGGGACGCGCCTGGCTCCCCGCGGGTCTGGGCTCCCGCACGCCCCCTG
GGCGAGGCTCGTGTCTCCGGGAGACGCGGCTGCCCCGCGCCTCCCCAGCGTCTCCTGAGGCTTGTTGCGGG
GCGTGGGGGCGAGGACCAGGGCGCTGGCCTCGTTTTGCGGTATTTAGGACGGAGGCACACCTGATCCTGCA
GCC

```

Figura 29. Putativos sitios de unión a factores de transcripción en la isla CpG de GALNT11.

Se muestra la secuencia correspondiente a la isla CpG de *GALNT11*. Subrayados se indican los oligos correspondientes a BSP2, en verde se muestra sitio de unión a AML1a con un score de 87.4, en naranja se muestra el sitio de unión al factor CREB con un score de 100, en rosado se muestran los sitios de unión al factor de transcripción SP1 con un score de 94.5, 87.7, y 86.3 de acuerdo al orden de aparición, en celeste se muestra el sitio de unión al factor GATA-2 con un score de 87.7, y finalmente en violeta se muestra el sitio de unión al factor E2F con un score de 87.4. Para localizar los sitios se utilizó el programa TFSEARCH, en el cual el máximo score es 100, y el *threshold score* utilizado fue 85.

Estos resultados alientan a seguir investigando la unión, dentro de la isla CpG, a determinados factores de transcripción que podrían estar regulando la expresión de *GALNT11*.

Búsqueda de islas CpG en la familia de las 20 GalNAc-Ts humanas.

Con el fin de estudiar la existencia de islas CpG en las 20 GalNAc-Ts humanas se analizó mediante el programa CpG Plot, sitios ubicados 5.000 pb hacia el 5' y 1.000 pb hacia el 3' de la primer base del primer exón de los ARNm de las distintas GalNAc-Ts. (Los parámetros utilizados fueron tamaño mayor a 200pb, porcentaje de GC mayor 50, relación GC observada/esperada mayor a 0.6).

Como se observa en la Tabla 7, 16 de las 20 GalNAc-Ts (80%) contienen islas CpG. Se encontraron en todos los casos una o dos islas, las cuales en su mayoría incluyen al menos parte del primer exón. Las que no lo contienen, presentan las islas CpG muy cercanas al mismo. Las 4 GalNAc-Ts que no contienen islas CpG en la zona analizada fueron GalNAc-T1, -T5, -T8, y -T15.

En resumen estos resultados muestran que un alto porcentaje (80%) de los genes *GALNTs* humanos presentan una o dos islas CpG conteniendo al menos parte del primer exón.

Tabla 7. Resumen de las islas CpG de las 20 GalNAc-Ts humanas.

GalNAc-T Humanas	Cantidad de islas CpG	Tamaño (pb) y ubicación relativa respecto a la primer base del primer exón -PBPE(+1)	Incluye PBPE(+1)
1	0		
2	1	1210(-476,+734)	Si
3	1	657 (-167,+490)	Si
4	2	209 (-1364, -1155) 676 (-1013, -337)	No No
5	0		
6	2	295 (-1141,-846) 612 (-655,-43)	No No
7	2	329 (-226, +103) 775 (+170, +945)	Si No
8	0		
9	1	319 (-376,-57)	No
10	2	255 (-766,-511) 780 (-455,+325)	No Si
11	1	856 (-368, +488)	Si
12	1	564 (-176, +388)	Si
13	1	281(-421, -142)	No
14	2	844 (-159,+685) 242 (+704, +946)	Si No
15	0		
16	2	212 (-582, -370) 538 (-336,+202)	No Si
17	2	249 (-818,-569) 374 (-197,+177)	No Si
18	2	314 (-134, +180) 327 (+619, +946)	Si No
19	1	2009 (-1606, +403)	Si
20	1	268 (-545,-277)	No

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

EXPRESIÓN DEL ARNm de GalNAc-T11

Identificación de GalNAc-T11 como un potencial nuevo marcador de Leucemia Linfocítica Crónica

Las GalNAc-Ts son una familia de enzimas que participan del primer paso de O-glicosilación tipo mucina. En humanos hay descritas 20 GalNAc-Ts. Las distintas isoformas se expresan de manera diferencial en células y tejidos durante el desarrollo y diferenciación, y se han encontrado marcados cambios en su expresión en distintas enfermedades [93]. Varios trabajos muestran una expresión alterada de las GalNAc-Ts en distintos tipos de cáncer [2-9]. En la LLC hay reportados algunos estudios que muestran patrones de N u O-glicosilación aberrantes de proteínas particulares [25] [177] [181]. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios que identifiquen patrones alterados de expresión de las GalNAc-Ts en leucemias, y particularmente en LLC.

Los antecedentes de este trabajo, basados en el estudio de expresión del ARNm de 14 GalNAc-Ts en 10 pacientes LLC, muestran que GalNAc-T11 es la única GalNAc-T analizada que se sobre-expresa en todos los pacientes en comparación a células B de donantes sanos. En base a estos resultados en este trabajo estudiamos la expresión del ARNm de GalNAc-T11 en células LLC de 50 pacientes mediante PCR en tiempo real, encontrando una sobre-expresión en el 96% de los pacientes analizados, en comparación con donantes sanos (control). De estas muestras, el 88% presentaron una sobre-expresión mayor a 2 hasta un máximo de 62 respecto al control. Además pudimos confirmar la expresión de la proteína en los pacientes mediante ensayos de *western blot* e IFI. Estos resultados indican que GalNAc-T11 constituye un potencial nuevo marcador de LLC. Este sería el primer reporte que muestra la alteración de una GalNAc-T en una leucemia.

El curso de la LLC puede ser muy diferente, teniendo en un extremo una enfermedad agresiva y de rápida progresión y en el otro una enfermedad indolente. Desde el punto de vista clínico, una de las características más importantes de los pacientes, es si los mismos son indolentes o progresores. Encontrar factores pronóstico que permitan predecir cuáles pacientes permanecerán indolentes y cuales se volverán progresores, es un importante desafío de la LLC. El estado mutacional de los genes IgVH, es uno de los marcadores de LLC que muestra mayor valor pronóstico. Los pacientes que presentan mutaciones somáticas en los genes IgVH tienen mejor pronóstico que los que tienen dichos genes en configuración germinal (no mutados) [40, 41]. Con el fin de evaluar si la expresión del ARNm de GalNAc-T11 se correlaciona con factores pronósticos de la enfermedad, analizamos la

relación entre los valores de expresión de *GALNT11* con la presencia de mutaciones en los genes IgVH, así como con pacientes progresores e indolentes. Encontramos que los pacientes que tienen los genes IgVH no mutados (mal pronóstico) tienen un promedio de expresión de *GALNT11* significativamente mayor ($p < 0.0001$) a aquellos pacientes con los genes IgVH mutados. Por otra parte, los pacientes progresores presentan niveles de expresión del ARNm de GalNAc-T11 significativamente mayores a los encontrados en pacientes indolentes ($p=0.0054$). Estos resultados son muy alentadores dado que muestran a la expresión del ARNm de GalNAc-T11 no sólo como un nuevo potencial marcador de LLC, sino también indican que el promedio de expresión relativa de *GALNT11* en pacientes no mutados y progresores es significativamente mayor al encontrado en pacientes mutados e indolentes respectivamente.

Si bien es más significativa la relación de expresión de *GALNT11* entre pacientes mutados y no mutados ($p<0.0001$) en comparación a pacientes indolentes y progresores ($p=0.0054$), es importante mencionar que mientras el estado mutacional permanece sin cambios durante el transcurso de la enfermedad, es posible que muchos de los pacientes indolentes, con el tiempo se vuelvan progresores. Esto tal vez cambie los valores y la significancia estadística de la expresión de *GALNT11* entre los pacientes. Por tal motivo sería importante realizar el estudio comparativo entre ambas poblaciones dentro de unos años, con el fin de volver a evaluar el valor de *GALNT11* como posible factor pronóstico.

Dado que secuenciar los genes IgVH es costoso, consume tiempo y en general no se realiza de rutina en laboratorios médicos, se han buscado marcadores que puedan reflejar significativa relación con el estado mutacional de estos genes. Alguno de los marcadores ya descritos en este sentido son ZAP70, CD38 y LPL [44, 45], cuya expresión en LLC se asocia con pacientes no mutados, y por lo tanto con un mal pronóstico. Es importante destacar que en todos los casos esta correlación no es absoluta [59]. En este trabajo encontramos que la expresión de *GALNT11* es mayor en pacientes no mutados, por lo cual resulta interesante el estudio de su expresión en conjunto con los otros marcadores, y es una de las perspectivas que surge de este trabajo.

Una de las características del linfocito B-LLC es la presencia de marcadores del linfocito T tales como CD5 y ZAP70 [26]. Sorprendentemente GalNAc-T11 cumple también con esta característica dado que su expresión se observa en linfocitos T de donantes sanos y de la línea celular Jurkat, y en linfocitos B-LLC, mientras que su expresión es basal en linfocitos B de donantes sanos y prácticamente indetectable en linfocitos B de la línea celular Daudi. Para el caso de la expresión de ZAP70, algunos trabajos plantean que su expresión en linfocitos de sangre periférica de LLC, es reflejo de que dicho linfocito es un linfocito

activado, dado que los linfocitos normales activados expresan ZAP70 [207]. Por tal motivo sería interesante estudiar los niveles de expresión de *GALNT11* en el linfocito B normal activado y en el de LLC activado. Además se podría evaluar si los niveles de expresión de *GALNT11* dependen del tipo de activación del linfocito. La misma puede darse por mecanismos que sean T dependientes (por ejemplo usando CD40 e interleuquina 4), o por mecanismos que sean T-independientes, por ejemplo mediante la activación de receptores *Toll-like*. Respecto a este último tipo de activación, tanto los receptores *Toll* como las mucinas brindan a las células, mediante distintos mecanismos, protección frente a patógenos, y ambos han sido encontrados deregulados durante la carcinogénesis. Además un estudio reciente plantea que puede existir una regulación cruzada entre ellos en el cáncer [208]. Finalmente, se ha visto que el linfocito LLC expresa TLR1, 2 y 6, y que su estimulación mediante lipopéptidos bacterianos activa al linfocito LLC y lo protege frente a la apoptosis [209].

La importancia del microambiente en la LLC ha sido ampliamente reportada [66]. Para el caso de ZAP70, existen estudios en los cuales se muestra que su expresión es menor en sangre periférica comparado a ganglio, médula ósea y bazo. En ganglio (principalmente) y médula habría un microambiente particular que promueve la activación y proliferación del linfocito B. También existe expresión diferencial en los distintos microambientes de LLC de moléculas de adhesión (integrinas, inmunoglobulinas, selectinas), receptores de quemoquinas, CD38 y marcadores de proliferación y apoptosis (Ki67, entre otros) [67]. En este trabajo se determinó la expresión de *GALNT11* en linfocitos provenientes de sangre periférica. En base a los datos anteriores es probable que *GALNT11* también presente expresión diferencial entre médula, ganglio y sangre periférica.

Finalmente, otro dato a evaluar, respecto a la expresión de *GALNT11* en pacientes LLC como posible factor pronóstico, es si su expresión no varía durante el transcurso de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente las células LLC circulan por distintos compartimientos, expuestas a diferentes microambientes celulares: sangre periférica, ganglio, médula, bazo, etc. En ellos las señales e interacciones celulares son muy variables [66]. Las GalNAc-Ts son las enzimas que participan en el primer paso de la síntesis de mucinas. Las mucinas son moléculas de adhesión, las cuales son de vital importancia para la interacción entre células [210] Durante el transcurso de la enfermedad es posible que cambien las interacciones celulares que sufra el linfocito LLC al menos en alguno de los microambientes por donde circula. Por lo tanto sería importante evaluar si el repertorio de expresión de mucinas, y de GalNAc-Ts, cambia con el transcurso de la enfermedad conforme a las distintas interacciones celulares que sufra el linfocito.

GALNT11 como marcador diferencial de linfocitos B y T

Los linfocitos B y T se originan en médula ósea a partir de un progenitor linfoide común. La diferenciación hacia linfocitos B se produce en la médula ósea, pasando por distintos estadios (célula pro-B, célula pre-B, célula B inmadura, linfocito B maduro), los cuales se caracterizan por presentar una expresión diferencial de moléculas de membrana. Los linfocitos T maduran en el timo, y al igual que los linfocitos B, pasan por distintos estadios caracterizados por una expresión diferencial de marcadores típicos [211].

Los carbohidratos son moléculas capaces de modular la fisiología linfocitaria a través de la interacción específica con lectinas endógenas como selectinas y galectinas. Estas lectinas endógenas son capaces de reconocer estructuras glucídicas localizadas en glicoproteínas de la superficie celular y regular procesos tan diversos como proliferación, diferenciación y ciclo celular [212][213]. Por ejemplo, durante la diferenciación tímica, el estado de O-glicosilación de los linfocitos T se modifica a medida que las células se transforman de timocitos inmaduros corticales a timocitos maduros medulares [214].

En este trabajo, al focalizar nuestra investigación en *GALNT11* como un nuevo marcador de LLC, encontramos que el mismo constituye además un marcador diferencial entre linfocitos B y T normales, dado que se expresa en linfocitos T de donantes sanos y de la línea celular Jurkat, mientras que su expresión es basal en linfocitos B normales y prácticamente indetectable en linfocitos B de la línea celular Daudi. Por lo tanto, este resultado genera la perspectiva de indagar con mayor profundidad el papel de la O-glicosilación mediada por *GALNT11* en la ontogenia de los linfocitos T en particular, y en forma más general, su relevancia en la hematopoyesis, a través del estudio de la expresión de *GALNT11* en células madres hematopoyéticas y en células correspondientes a los distintos estadios de maduración linfocitaria. En este sentido un antecedente muy interesante es que la expresión de *GALNT11* fue encontrada (junto con la de otros genes de la familia) en células hematopoyéticas CD34+ purificadas de médula ósea de adultos humanos, pero luego su expresión pasa a ser indetectable al inducir las células a diferenciarse a megacariocitos [183]. Variados mecanismos pueden regular la diferencia de expresión de *GALNT11* entre linfocitos B y T. Uno de ellos podría ser la metilación del ADN (como se verá más adelante). En relación a la regulación por metilación del ADN de la diferenciación de células hematopoyéticas, un estudio reciente mostró que la ADN metiltransferasa Dnmt3a, responsable de la metilación *de novo*, es esencial para lograr el silenciamiento epigenético de genes de células madres hematopoyéticas, lo que permite luego una eficiente diferenciación de las mismas [215].

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GalNAc-T11

Los resultados obtenidos muestran que la proteína GalNAc-T11 se expresa en pacientes LLC y la línea celular Jurkat, mientras no se expresa en la línea celular Daudi, ni células B de donantes sanos.

Si bien se mostró que la expresión de la enzima se localiza en el citoplasma, no se determinó en cual organelo. La localización más probable puede ser en el aparato de Golgi o en el Retículo Endoplasmático (RE). El Golgi es el organelo en donde comunmente se localizan estas enzimas [117], y por lo tanto existe una alta probabilidad de que la enzima se localice en el mismo. Otra posibilidad es que se localice en el RE. En los últimos años se demostró que la activación o sobre-expresión de Src quinasas pueden regular específicamente el tráfico de estas enzimas desde el Golgi hacia el RE[141, 142]. En algunos tipos de cáncer ya se ha visto su localización en el RE[144]. En la LLC se ha encontrado sobre-expresada la quinasa Lyn la cual pertenece a la familia de las Src quinasas [151], y esto podría provocar la relocalización de GalNAc-T11 desde el Golgi hacia el RE. Por tales motivos, resulta interesante determinar con exactitud la localización de GalNAc-T11 en LLC.

EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS Tn y SIALIL-Tn

Como mencionamos previamente las GalNAc-Ts son las enzimas responsables de catalizar el primer paso de O-glicosilación tipo mucina formando el antígeno Tn, el cual se encuentra expresado en distintos tipos de células tumorales. Por otra parte, la línea celular Jurkat, la cual expresa importantes niveles de GalNAcT11, es frecuentemente usada como control positivo de expresión del antígeno Tn [196]. En base a ello, decidimos estudiar si la sobre-expresión de esta enzima en células B-LLC tiene como consecuencia un aumento de expresión de este antígeno. Si bien existen dos reportes en los cuales se estudia la presencia de Tn en LLC, ambos son contradictorios, reportando su expresión en un caso [152] y su ausencia en el otro [153]. Mediante citometría de flujo analizamos la presencia del antígeno Tn en células de cinco pacientes LLC que presentaron distintos niveles de expresión de *GALNT11*, y encontramos que ninguno expresa el antígeno. La forma sialilada de Tn, el antígeno sialil-Tn, también se relaciona con diversos tipos de carcinomas humanos [149]. Un aspecto a considerar, es que el antígeno sialil-Tn es una estructura terminal, y por lo tanto no puede ser usado como sustrato para nuevas reacciones de glicosilación. Esto podría estar enmascarando la expresión del antígeno Tn. Por tal motivo, estudiamos también la expresión del antígeno sialil-Tn en las células LLC de los cinco pacientes y en ningún caso encontramos la expresión de este antígeno. Finalmente, analizamos si al sobre-

expresar GalNAc-T11 en la línea celular Daudi-T11, se comenzaban a expresar estos antígenos, y en ningún caso detectamos la expresión de los mismos. Por lo tanto la sobre-expresión de GalNAc-T11 no se asocia con un aumento de la expresión de estos antígenos.

Para determinar con certeza si la expresión de estos antígenos en LLC no constituyen marcadores moleculares de esta enfermedad, es necesario aumentar el número de muestras a analizar, teniendo en cuenta distintas características clínicas de los pacientes, además de analizar si otros antígenos de O-glicosilación incompleta como por ejemplo el antígeno T, y sialil-T, se están expresando en dichos pacientes. Particularmente, respecto a la expresión del antígeno T en LLC, existe un estudio reciente en el cual se utilizó una lectina de plantas (Morniga G) unida a una porfirina, para lograr una mayor eficiencia en terapias fotoquímicas contra el cáncer. Esta lectina reconoce al antígeno Tn y al antígeno T. En particular pudieron ver que el compuesto era efectivo al ser usado sobre células de pacientes LLC [216]. Por lo tanto si las células LLC no expresan el antígeno Tn, es muy probable que sí expresen el antígeno T. Por último es importante considerar respecto a la expresión del antígeno Tn, un estudio reciente, en el cual utilizan un panel de distintos anticuerpos monoclonales IgM o IgG- anti Tn para evaluar la expresión de este antígeno en células Jurkat (positivas para Tn dada la baja actividad de la enzima T-sintasa y mutaciones en la chaperona Comsc) [217]. El estudio muestra que la capacidad de unión de los anticuerpos está determinada por el contexto peptídico del antígeno Tn, la especificidad antigénica del anticuerpo y la clase de inmunoglobulina. Por lo tanto no es raro encontrar que distintos estudios, hechos con diferentes anticuerpos anti-Tn, muestren resultados diferentes en los pacientes LLC estudiados.

GENERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DAUDI-T11

Dentro de la familia de las GalNAc-Ts, GalNAc-T11 parece ser una enzima con un número de sustratos discretos y exclusivos, la cual cumpliría funciones específicas y no redundantes como otros miembros de la familia [100]. Su expresión en órganos humanos sería selectiva, encontrándose principalmente expresada en hígado y riñon [93, 182]. Además la enzima tendría especificidad por sustratos peptídicos sin previa glicosilación [93]. En particular el ortólogo de GalNAc-T11 en *Drosophila melanogaster* (pgant35A) es esencial para la embriogénesis y el desarrollo de este organismo [162]. Es probable que sus blancos sean *targets* que cumplan importantes funciones biológicas. Inclusive quizás la expresión anormal de GalNAc-T11 en LLC y los productos específicos de glicosilación producidos por esta enzima, podrían estar induciendo cambios celulares incluyendo cambios en la migración, adhesión y proliferación de las células. Estos cambios finalmente, podrían contribuir a generar células malignas y quizás el hecho de que GalNAc-T11 se exprese en mayor

cantidad en pacientes que presentan una enfermedad agresiva, (progresores y no mutados) en comparación a pacientes indolentes y mutados, pueda ser una causa, entre muchas otras, que explique el mal pronóstico asociado con los pacientes progresores y no mutados.

Por todos estos motivos decidimos generar a partir de la línea celular Daudi, la cual no expresa GalNAc-T11, una línea inducible mediante el sistema T-REX de Invitrogen, capaz de expresar GalNAc-T11 al ser inducida con tetraciclina (Línea Daudi-T11). Se logró generar dicha línea, verificándose la sobre-expresión del ARNm y de la proteína GalNAc-T11 en condiciones de inducción. La línea Daudi-T11, constituye una importante herramienta de trabajo, ya que la misma nos permitirá estudiar los blancos de la enzima mediante aproximaciones glicoproteómicas, utilizando geles 2D y espectrometría de masa. Si bien la sobre-expresión de GalNAc-T11 no mostró cambios evidentes en la morfología celular, ni se observaron cambios significativos en la viabilidad de las mismas, esta nueva herramienta nos permitirá estudiar otras diferencias funcionales de las células al sobre-expresar *GALNT11*, que podrían estar vinculadas con la malignidad del linfocito LLC como ser cambios en los patrones de migración, adhesión y proliferación celular, entre otros.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *GALNT11* POR METILACIÓN DEL ADN

Sorprendentemente los mecanismos de regulación de la expresión de las GalNAc-Ts han sido muy poco estudiados. Existe sólo un trabajo del año 1999 que analiza elementos regulatorios en base a una secuencia de 1.6Kb alrededor del primer exón de *GALNT3*. Por lo tanto estudiar aspectos relacionados a su regulación es un tema que presenta gran interés y su estudio puede significar un importante avance en esta temática.

En el cáncer se han visto diversas alteraciones epigenéticas, entre ellas las relacionadas a la metilación del ADN [8]. La inactivación de la transcripción de genes mediada por la hipermetilación es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados, que muestran el silenciamiento génico en diversos tumores humanos [218-220]. Las leucemias, como prácticamente todos los tipos de cáncer, presentan patrones de metilación aberrante [221]. En el caso particular de la LLC, un trabajo reciente utilizando la tecnología de microarrays, mostró 64 genes con diferencias en el estado de metilación entre los pacientes mutados y no mutados [222]. Otro trabajo también utilizando la tecnología de microarrays, mostró 280 potenciales genes que podrían sufrir metilación aberrante en 2 pacientes LLC que presentaban la delección 17p (asociada con mal pronóstico) en comparación a linfocitos B de donantes sanos. El estudio indica que en esta enfermedad se dan frecuentemente procesos de metilación aberrante [223]. Es importante destacar que dentro de los 280 genes encontrados hipermetilados, se encontró metilación en el promotor de *GALNT18*, y en el

promotor de *GALGT2* (beta 1,4 N-acetilgalactosaminiltransferasa) [223], lo que indica que genes relacionados a procesos de glicosilación pueden sufrir procesos de hipermetilación en LLC.

En base a estos antecedentes, decidimos estudiar el estado de metilación del promotor de *GALNT11* en linfocitos de las líneas celulares Jurkat y Daudi, en linfocitos B de donantes sanos, y en células LLC. Para ello lo primero que hicimos fue buscar en el entorno del promotor, 5.000 pb hacía el 5' y 1.000 pb hacia el 3' de la primer base del primer exón de *GALNT11*, la existencia de islas CpG. Se encontró una isla de 856pb (-368,+487) conteniendo al primer exón (definimos la primer base del primer exón como +1). Los estudios de metilación se realizaron luego sobre una región de la isla de 252pb (-225, +26), que cumple con criterios más exigentes respecto a la definición de una isla CpG, presentando un alto porcentaje de GC: mayor a 70%, y una relación GC observada /esperada mayor a 0.7, lo que indica una alta densidad de nucleótidos CpG (36 CpG en la secuencia analizada). Un trabajo reciente muestra que la metilación de islas CpG conteniendo al primer exón es crucial para lograr el silenciamiento génico, inclusive presenta una mayor correlación con el silenciamiento génico que islas CpG ubicadas hacia el 5' del sitio de inicio de la transcripción [14]. Por otro lado, el grado de dinucleótidos CpG dentro de la isla se asocia fuertemente con el grado de silenciamiento génico provocado por la metilación de los mismos [224-226].

En el caso de los linfocitos B de la línea celular Daudi, que no expresan *GALNT11*, los mismos muestran una metilación prácticamente del 100% de los 36 dinucleótidos CpG analizados. Por el contrario los linfocitos T de la línea celular Jurkat, que expresan importante cantidad de *GALNT11*, mostraron una demetilación casi absoluta de la secuencia analizada, lo cual era esperable debido a la importante expresión del gen en esta línea celular. Esta marcada y contundente diferencia de metilación de *GALNT11* entre ambas líneas celulares podría explicar las diferencias de expresión del gen observadas entre dichas líneas. Resulta muy interesante el hallazgo de que en los pacientes LLC analizados, la región estudiada se encontró totalmente demetilada, al igual que en la línea celular Jurkat. Si bien al estudiar células B de donantes sanos encontramos que dicha región también estaba demetilada, cabe recordar que dichas células presentan una expresión mínima de *GALNT11*, mientras que las células B Daudi prácticamente no expresan el gen. Los patrones de demetilación y metilación observados en todos los casos son casi absolutos, e involucran una región dentro de la isla CpG que contiene parte del primer exón y además contiene una alta densidad de dinucleótidos CpG: 36 CpG. En conjunto, estos resultados llevan a proponer que el balance entre metilación/demetilación juega un papel importante en la regulación de la expresión de este gen en las líneas tumorales analizadas, sin embargo

no habría una correlación entre el estado de metilación del gen y el grado de expresión de *GALNT11* en muestras de pacientes LLC y células B normales.

Dado que las GalNAc-Ts presentan diferentes patrones de expresión según el tejido estudiado, quizás la metilación sea uno de los mecanismos que colabora en regular cuales GalNAc-Ts se expresarán o no en determinados tipos celulares. Aproximadamente el 60% de los promotores de genes humanos presentan islas CpG [11]. Estudiando las islas CpG, de las 20 GalNAc-Ts descritas hasta el momento, encontramos que el 80% de las mismas presentan 1 o 2 islas CpG, la mayoría incluyendo la primer base del primer exón o muy cercanas al mismo. Este hecho es alentador, ya que el alto porcentaje de islas encontradas en la familia, parece no ser un hecho al azar, y podría estar indicando que la metilación del ADN participa en la regulación de esta familia de genes. Inclusive como se discutió anteriormente, el gen *GALNT18* mostró metilación diferencial entre pacientes LLC que presentan la delección 17p respecto a donantes sanos [223]. Finalmente, los cuatro genes *GALNTs* que no contienen islas CpG en la zona analizada fueron *GALNT1*, el cual es de expresión ubicua, *GALNT8* el cual codifica para una enzima sin actividad demostrada [101], *GALNT5* y *GALNT15*, que no se agrupan en ninguna subfamilia dentro de la clasificación de la familia de los genes *GALNTs* realizada por Bennett et al 2011[93], debido a que contienen posiciones únicas de sus intrones.

El hecho de encontrar que la demetilación de la isla CpG parece ser una condición necesaria para la expresión de *GALNT11*, nos llevó a analizar la existencia de secuencias consenso de unión a factores de transcripción en la isla, que puedan explicar la regulación fina de dicho gen. Una posibilidad es que las muestras con similares perfiles de demetilación pero con diferentes niveles de expresión de *GALNT11*, (como por ejemplo células B de donantes sanos y células T Jurkat), expresen diferentes cantidades de algún factor de transcripción que este interactuando con la secuencia analizada, regulando de esta manera los distintos niveles de expresión del gen. La isla CpG del promotor de *GALNT11*, mostró la existencia de al menos siete sitios de unión a factores de transcripción (tres Sp1, un CREB, un AML1, un GATA, y un E2F), de los cuales cuatro se encuentran dentro de la zona analizada con los primers BSP2: AML1, CREB, y dos sitios SP1. Es probable que alguno de estos factores de transcripción sea fundamental para lograr expresar el ARNm de *GALNT11*, y los niveles de expresión de estos factores regulen a su vez los niveles de expresión del gen. Uno de los mecanismos por el cual la metilación del ADN inhibe la expresión génica es por impedir la unión de factores de transcripción [16]. En particular los factores de transcripción SP1 y CREB contienen dinucleótidos CpG, los cuales podrían ser susceptibles a la metilación. Existen variados reportes que muestran como la metilación de promotores de distintos genes, impiden la unión de los factores de transcripción. Por ejemplo, se mostró

que la metilación del promotor del receptor de dioxina silencia su expresión por impedir la unión de SP1 (factor de expresión ubicuo) en leucemia linfoblástica aguda [227]. Otro estudio muestra que metilaciones específicas en el promotor de neurofibromatosis (NF1), interfiere con la unión de los factores de transcripción CREB y SP1 [228]. Respecto al factor de transcripción CREB, un estudio reciente sugiere que metilación específica del ADN del virus BLV, causante de la leucemia bovina (patología de características muy similares a la LLC humana) reprime la unión del factor de transcripción CREB, lo que colaboraría con generar un estado latente en el virus [229]. Otro trabajo muestra que el factor de transcripción FoxP3, el cual regula la expresión de células T reguladoras CD4+, contiene una isla CpG en el primer intrón, cuya metilación impide la unión del factor de transcripción CREB, disminuyendo la expresión de FoxP3 [230]. Finalmente el factor de transcripción AML1 (factor de leucemia mieloide aguda), es un factor de transcripción con patrones de expresión específicos, que regula la expresión de diversos genes relacionados con la hematopoyesis [231]. Existe un trabajo que muestra que forma complejos con una metiltransferasa de histona (SUV39H1), lo cual inhibe la capacidad de AML1 de unirse al ADN [232]. Es probable que alguno de los factores de transcripción antes descritos sea fundamental para lograr la regulación y expresión de *GALNT11*, y profundizar sobre esta temática permitirá comprender mejor este fenómeno.

La regulación de la expresión génica por metilación de islas CpG de distintos promotores génicos es uno de los eventos de regulación por metilación del ADN más estudiados. Sin embargo existen otros importantes eventos relacionados con la regulación génica y la metilación del ADN que no incluye únicamente a las islas CpG. Por ejemplo, una posibilidad es que la regulación de la expresión de *GALNT11* en los casos en los cuales la demetilación de la isla CpG es similar pero los niveles de expresión de *GALNT11* son diferentes, sea producto de diferencias en la metilación en regiones adyacentes a las islas CpG (*CpG-shores*). Estudios recientes muestran la importancia en la regulación de la expresión mediante metilación de *CpG-shores* [233, 234]. Estas regiones se pueden encontrar a 2000pb del promotor y están fuera de las islas CpG. Distintos estudios indican que de las diferencias en metilación que existen entre distintos tejidos, un 76% se da en las *CpG-shores* [233, 234]. Inclusive también existen trabajos que muestran la importancia de la metilación dentro de la secuencia del gen [235-237]. Todo esto hace notar que la regulación por metilación del ADN, no sólo se limita al estudio de las islas CpG, sino que fuera de ellas también existen importantes eventos relacionados con la regulación y tenerlos en cuenta pueden ayudar a comprender mejor los distintos fenómenos de metilación del ADN que regulan la expresión génica [8].

Finalmente las diferencias de expresión de *GALNT11* también podrían darse por regulación mediada por otros mecanismos epigenéticos, como puede ser expresión diferencial de microRNAs y pequeños ARN reguladores, o inclusive por metilación y/o acetilación de histonas, entre otros. Además de estos mecanismos epigenéticos, la regulación podría estar dada por distintos mecanismos de regulación no epigenéticos postranccripcionales y postraduccionales.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Algunas perspectivas que surgen de este trabajo son las siguientes:

- Estudiar las propiedades de adhesión, migración y proliferación celular al sobre-expresar GalNAc-T11 en la línea celular Daudi-T11 con y sin inducción de tetraciclina.
- Determinar los blancos moleculares de GalNAc-T11, utilizando la línea celular Daudi-T11 inducible por tetraciclina, por aproximaciones glicoproteómicas.
- Estudiar niveles de expresión de GalNAc-T11 en células B-LLC de sangre periférica, médula y ganglio.
- Determinar en LLC y en la línea celular Jurkat mediante microscopía electrónica la localización de GalNAc-T11 dentro del citoplasma. (Para definir si se localiza en el Golgi o en el RE).
- Estudiar si los linfocitos B-LLC activados (de manera T dependiente e independiente), muestran cambios en la expresión de *GALNT11* respecto a un control de activación con linfocitos B normales.
- Analizar si el uso de un agente demetilante (5-aza-2'-deoxycitidina) en la línea celular Daudi promueve la expresión de *GALNT11*.
- Determinar por inmunoprecipitación en las líneas celulares Daudi y Jurkat, utilizando anticuerpos anti-SP1, anti-CREB y anti AML-1, si alguno de estos factores de transcripción está interaccionando con la isla CpG de *GALNT11*.
- Estudiar el estado de metilación de la isla CpG de *GALNT11*, en otras líneas celulares leucémicas, y correlacionar el estado de metilación con los niveles de expresión de *GALNT11* en dichas líneas.
- En base a la Tabla 3B presentada en los antecedentes de este trabajo, GalNAc-T10, y -T12 se expresan en la línea celular Jurkat, y por el contrario no se expresan en la línea Daudi. Además ambas presentan islas CpG conteniendo la primer base del primer exón (ver Tabla 7). En base a estos datos, estudiar el estado de metilación de las islas CpG de *GALNT10*, y *T12* en las líneas celulares Jurkat y Daudi.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El trabajo realizado permitió caracterizar al ARNm de GalNAc-T11 como un nuevo potencial marcador molecular de LLC, cuyo promedio de expresión es significativamente mayor en pacientes no mutados y progresores respecto a pacientes mutados e indolentes respectivamente.

Por otro lado la expresión de *GALNT11* parece ser un marcador diferencial entre linfocitos T y B, dado que su ARNm se expresa en linfocitos T, pero su expresión en linfocitos B es mínima o prácticamente indetectable.

Se determinó la ausencia de expresión en LLC de los antígenos de O-glicosilación incompleta más caracterizados en diversos tipos de cáncer: Tn y sialil-Tn, mostrando que no se corresponde la sobre-expresión de GalNAc-T11 con la expresión de estos antígenos.

Se comenzó a estudiar mecanismos de regulación de *GALNT11* por metilación del ADN, encontrando que dicho proceso es de relevancia en la regulación del gen.

Se desarrolló una línea Daudi capaz de expresar GalNAc-T11 al ser inducida con tetraciclina. La misma constituye una valiosa herramienta que permitirá responder importantes preguntas relacionadas con los blancos de la enzima y la funcionalidad de la misma en células cancerígenas.

De manera general, dada la poca bibliografía que existe en torno a la glicobiología de la LLC, este trabajo contribuye al entendimiento de las bases moleculares de los procesos de O-glicosilación de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Baehrecke, E.H., *How death shapes life during development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(10): p. 779-87.
2. Kumar, V., Abbas A.K., Fausto, N. & Mitchell, R., *Robbins Basic Pathology (8va Ed.)*, Editorial Saunders, 2007 Capítulo 6: Neoplasia, pp. 173-224
3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2012
4. Registro Nacional de Cáncer. *Informe 2010 y síntesis de los últimos datos estadísticos*. Programa Vigilancia Epidemiológica. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
7. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. 99(3): p. 247-57.
8. Ndlovu, M.N., H. Denis, and F. Fuks, *Exposing the DNA methylome iceberg*. Trends Biochem Sci, 2011. 36(7): p. 381-7.
9. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. 128(4): p. 683-92.
10. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. 8(4): p. 286-98.
11. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. 28(10): p. 1057-68.
12. Illingworth, R.S. and A.P. Bird, *CpG islands--'a rough guide'*. FEBS Lett, 2009. 583(11): p. 1713-20.
13. Strausman, R., et al., *Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome*. Nat Struct Mol Biol, 2009. 16(5): p. 564-71.
14. Brenet, F., et al., *DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing*. PLoS One, 2011. 6(1): p. e14524.
15. Maunakea, A.K., et al., *Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters*. Nature, 2010. 466(7303): p. 253-7.
16. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. 31(2): p. 89-97.
17. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Hum Mol Genet, 2007. 16 Spec No 1: p. R50-9.
18. Baylin, S.B., *DNA methylation and gene silencing in cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. 2 Suppl 1: p. S4-11.
19. Silverman, L.R., et al., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. J Clin Oncol, 2002. 20(10): p. 2429-40.
20. Sans, J., Besses, C., Vives, J.L. Hematología Clínica. Quinta edición. Editorial Elsevier, Capítulo 24: Leucemia Linfática Crónica, pp. 491-500.
21. Dighiero, G. and T.J. Hamblin, *Chronic lymphocytic leukaemia*. Lancet, 2008. 371(9617): p. 1017-29.
22. Bezares, F., Slavutsky, I., et al. Leucemia Linfática Crónica. Las Neoplasias Linfoides. Buenos Aires, 2009: p. 24-48
23. Ginaldi, L., et al., *Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias*. J Clin Pathol, 1998. 51(5): p. 364-9.
24. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. 111(12): p. 5446-56.

25. Vuillier, F., et al., *Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains.* Blood, 2005. 105(7): p. 2933-40.
26. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med, 2005. 352(8): p. 804-15.
27. Binet, J.L., et al., *Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2006. 107(3): p. 859-61.
28. Matutes, E., et al., *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL.* Leukemia, 1994. 8(10): p. 1640-5.
29. Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Harris NL. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001: p.127-30
30. Melo JV, Catovsky D, Galton DAG. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia: IV. Analysis of survival and prognostic features. Br J Haematol. 1986;63:377-387
31. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 1975. 46(2): p. 219-34.
32. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis.* Cancer, 1981. 48(1): p. 198-206.
33. Dighiero, G., et al., *Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia.* N Engl J Med, 1998. 338(21): p. 1506-14.
34. Hamblin, T., *Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two?* Ann Hematol, 2002. 81(6): p. 299-303.
35. Pascual, V., et al., *Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil.* J Exp Med, 1994. 180(1): p. 329-39.
36. Schroeder, H.W., Jr. and G. Dighiero, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire.* Immunol Today, 1994. 15(6): p. 288-94.
37. Kipps, T.J. and D.A. Carson, *Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases.* Blood, 1993. 81(10): p. 2475-87.
38. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor.* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 841-94.
39. Tobin, G., et al., *Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2002. 99(6): p. 2262-4.
40. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 1999. 94(6): p. 1848-54.
41. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 1999. 94(6): p. 1840-7.
42. Oscier, D.G., et al., *Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IG VH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors.* Blood, 2002. 100(4): p. 1177-84.
43. Vasconcelos, Y., et al., *Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.* J Clin Oncol, 2003. 21(21): p. 3928-32.
44. Moreno, C. and E. Montserrat, *New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia.* Blood Rev, 2008. 22(4): p. 211-9.
45. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia.* J Exp Med, 2001. 194(11): p. 1639-47.
46. Chen, L., et al., *ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2005. 105(5): p. 2036-41.

47. Gobessi, S., et al., *ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells*. *Blood*, 2007. 109(5): p. 2032-9.
48. Richardson, S.J., et al., *ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. *Blood*, 2006. 107(9): p. 3584-92.
49. Malavasi, F., et al., *Human CD38: a glycoprotein in search of a function*. *Immunol Today*, 1994. 15(3): p. 95-7.
50. Deaglio, S., K. Mehta, and F. Malavasi, *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors*. *Leuk Res*, 2001. 25(1): p. 1-12.
51. Deaglio, S., et al., *CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival*. *Blood*, 2005. 105(8): p. 3042-50.
52. Oppezzo, P., et al., *The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2005. 106(2): p. 650-7.
53. van't Veer, M.B., et al., *The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2006. 91(1): p. 56-63.
54. McCarthy, H., et al., *High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2003. 101(12): p. 4903-8.
55. Oppezzo, P., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation*. *Blood*, 2003. 101(10): p. 4029-32.
56. Oppezzo, P., et al., *Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Blood*, 2005. 105(6): p. 2495-503.
57. Sahota, S.S., et al., *Somatic mutation of bcl-6 genes can occur in the absence of V(H) mutations in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2000. 95(11): p. 3534-40.
58. Palacios, F., et al., *High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease*. *Blood*, 2010. 115(22): p. 4488-96.
59. Grever, M.R., et al., *Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(7): p. 799-804.
60. Dicker, F., et al., *Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression*. *Blood*, 2006. 108(9): p. 3152-60.
61. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2000. 343(26): p. 1910-6.
62. Krober, A., et al., *V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2002. 100(4): p. 1410-6.
63. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, *B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather*. *J Clin Oncol*, 1999. 17(1): p. 399-408.
64. Vrhovac, R., et al., *Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1998. 91(12): p. 4694-700.
65. Chiorazzi, N., *Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. 20(3): p. 399-413.
66. Burger, J.A., *Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. 2011: p. 96-103.
67. Jaksic, O., I. Kardum-Skelin, and B. Jaksic, *Chronic lymphocytic leukemia: insights from lymph nodes & bone marrow and clinical perspectives*. *Coll Antropol*, 2010. 34(1): p. 309-13.
68. Deaglio, S. and F. Malavasi, *Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation*. *Haematologica*, 2009. 94(6): p. 752-6.

69. Granziero, L., et al., *Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. 97(9): p. 2777-83.
70. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. 103(12): p. 4389-95.
71. Pepper, C., et al., *Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin*. Leukemia, 2007. 21(4): p. 687-96.
72. Willimott, S., et al., *Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4*. Haematologica, 2007. 92(10): p. 1359-66.
73. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. 291(5507): p. 1304-51.
74. *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science, 1998. 282(5396): p. 2012-8.
75. Wopereis, S., et al., *Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review*. Clin Chem, 2006. 52(4): p. 574-600.
76. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1473(1): p. 4-8.
77. Lowe, J.B. and J.D. Marth, *A genetic approach to Mammalian glycan function*. Annu Rev Biochem, 2003. 72: p. 643-91.
78. Papulson, J.C., O. Blixt, and B.E. Collins, *Sweet spots in functional glycomics*. Nat Chem Biol, 2006. 2(5): p. 238-48.
79. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*. Cell, 2006. 126(5): p. 855-67.
80. Irazoqui, F.J., et al., *Fine carbohydrate recognition of Euphorbia milii lectin*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 336(1): p. 14-21.
81. Breton, C., J. Mucha, and C. Jeanneau, *Structural and functional features of glycosyltransferases*. Biochimie, 2001. 83(8): p. 713-8.
82. Dove, A., *The bittersweet promise of glycobiology*. Nat Biotechnol, 2001. 19(10): p. 913-7.
83. Hang, H.C. and C.R. Bertozzi, *The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation*. Bioorg Med Chem, 2005. 13(17): p. 5021-34.
84. Palcic, M.M., N.O. Seto, and O. Hindsgaul, *Natural and recombinant A and B gene encoded glycosyltransferases*. Transfus Med, 2001. 11(4): p. 315-23.
85. Jensen, P.H., D. Kolarich, and N.H. Packer, *Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together*. FEBS J, 2009. 277(1): p. 81-94.
86. Fuster, M.M. and J.D. Esko, *The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(7): p. 526-42.
87. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. 12(4): p. 43R-56R.
88. Helenius, A. and M. Aebi, *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science, 2001. 291(5512): p. 2364-9.
89. Luther, K.B. and R.S. Haltiwanger, *Role of unusual O-glycans in intercellular signaling*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. 41(5): p. 1011-24.
90. Brockhausen, I., *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1473(1): p. 67-95.
91. Hanish, L.D. and P.H. Tolan, *Patterns of change in family-based aggression prevention*. J Marital Fam Ther, 2001. 27(2): p. 213-26.
92. Gotting, C., J. Kuhn, and K. Kleesiek, *Human xylosyltransferases in health and disease*. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(12): p. 1498-517.
93. Bennett, E.P., et al., *Control of Mucin-Type O-Glycosylation - A Classification of the Polypeptide GalNAc-transferase Gene Family*. Glycobiology.

94. Halim, A., et al., *Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(29): p. 11848-53.
95. Steentoft, C., et al., *Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines*. Nat Methods, 2011. 8(11): p. 977-82.
96. Lang, T., G.C. Hansson, and T. Samuelsson, *Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(41): p. 16209-14.
97. Hashimoto, K., et al., *Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional characterization of glycans*. Carbohydr Res, 2009. 344(7): p. 881-7.
98. Devine, P.L., et al., *The use of mucin-specific monoclonal antibodies and lectins in the detection of tumor-associated serum markers in gynecological cancer*. Cancer Biochem Biophys, 1993. 13(4): p. 221-38.
99. Ten Hagen, K.G., T.A. Fritz, and L.A. Tabak, *All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. Glycobiology, 2003. 13(1): p. 1R-16R.
100. Pratt, M.R., et al., *Deconvoluting the functions of polypeptide N-alpha-acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate profiling*. Chem Biol, 2004. 11(7): p. 1009-16.
101. Raman, J., et al., *UDP-N-Acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases: Completion of the Family Tree*. Glycobiology, 2011.
102. Peng, C., et al., *Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 402(4): p. 680-6.
103. Sorensen, T., et al., *UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. Identification and separation of two distinct transferase activities*. J Biol Chem, 1995. 270(41): p. 24166-73.
104. Wandall, H.H., et al., *Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3*. J Biol Chem, 1997. 272(38): p. 23503-14.
105. Fritz, T.A., et al., *The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-T1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(43): p. 15307-12.
106. Papulson, J.C. and K.J. Colley, *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. J Biol Chem, 1989. 264(30): p. 17615-8.
107. Hazes, B., *The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold*. Protein Sci, 1996. 5(8): p. 1490-501.
108. Imberty, A., et al., *Fold recognition and molecular modeling of a lectin-like domain in UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. Protein Eng, 1997. 10(12): p. 1353-6.
109. Smith, R.D. and V.V. Lupashin, *Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation*. Carbohydr Res, 2008. 343(12): p. 2024-31.
110. Bourne, Y. and B. Henrissat, *Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules*. Curr Opin Struct Biol, 2001. 11(5): p. 593-600.
111. Fritz, T.A., J. Raman, and L.A. Tabak, *Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-2*. J Biol Chem, 2006. 281(13): p. 8613-9.
112. Kubota, T., et al., *Structural basis of carbohydrate transfer activity by human UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10)*. J Mol Biol, 2006. 359(3): p. 708-27.
113. Hagen, F.K., et al., *Structure-function analysis of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. Essential residues lie in a predicted active site cleft resembling a lactose repressor fold*. J Biol Chem, 1999. 274(10): p. 6797-803.

114. Dodd, R.B. and K. Drickamer, *Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity*. *Glycobiology*, 2001. 11(5): p. 71R-9R.
115. Wandall, H.H., et al., *The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation*. *Glycobiology*, 2007. 17(4): p. 374-87.
116. Pedersen, J.W., et al., *Lectin domains of polypeptide GalNAc transferases exhibit glycopeptide binding specificity*. *J Biol Chem*, 2011. 286(37): p. 32684-96.
117. Gill, D.J., H. Clausen, and F. Bard, *Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation*. *Trends Cell Biol*, 2010. 21(3): p. 149-58.
118. Gerken, T.A., et al., *Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases*. *J Biol Chem*, 2011. 286(16): p. 14493-507.
119. Gerken, T.A., et al., *Identification of common and unique peptide substrate preferences for the UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferases T1 and T2 derived from oriented random peptide substrates*. *J Biol Chem*, 2006. 281(43): p. 32403-16.
120. Gerken, T.A., K.G. Ten Hagen, and O. Jamison, *Conservation of peptide acceptor preferences between Drosophila and mammalian polypeptide-GalNAc transferase ortholog pairs*. *Glycobiology*, 2008. 18(11): p. 861-70.
121. Perrine, C.L., et al., *Glycopeptide-preferring polypeptide GalNAc transferase 10 (ppGalNAc T10), involved in mucin-type O-glycosylation, has a unique GalNAc-O-Ser/Thr-binding site in its catalytic domain not found in ppGalNAc T1 or T2*. *J Biol Chem*, 2009. 284(30): p. 20387-97.
122. Hagen, F.K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase*. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13843-8.
123. Bennett, E.P., H. Hassan, and H. Clausen, *cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3*. *J Biol Chem*, 1996. 271(29): p. 17006-12.
124. Bennett, E.P., et al., *Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat*. *J Biol Chem*, 1998. 273(46): p. 30472-81.
125. Bennett, E.P., et al., *A novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates*. *FEBS Lett*, 1999. 460(2): p. 226-30.
126. Xu, X., et al., *The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line*. *Nat Biotechnol*, 2011. 29(8): p. 735-41.
127. Cheng, L., et al., *Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15*. *FEBS Lett*, 2004. 566(1-3): p. 17-24.
128. Tian, E. and K.G. Ten Hagen, *Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation*. *Glycoconj J*, 2009. 26(3): p. 325-34.
129. Mandel, U., et al., *Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family*. *Glycobiology*, 1999. 9(1): p. 43-52.
130. Nomoto, M., et al., *Structural basis for the regulation of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-3 gene expression in adenocarcinoma cells*. *Cancer Res*, 1999. 59(24): p. 6214-22.
131. Kahai, S., et al., *MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7*. *PLoS One*, 2009. 4(10): p. e7535.
132. Kohsaki, T., et al., *Expression of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozymes T1 and T2 in human colorectal cancer*. *J Gastroenterol*, 2000. 35(11): p. 840-8.
133. Shibao, K., et al., *Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma*. *Cancer*, 2002. 94(7): p. 1939-46.

134. Yamamoto, S., et al., *Expression of uridine diphosphate N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 in adenocarcinoma of the pancreas*. Pathobiology, 2004. 71(1): p. 12-8.
135. Ishikawa, M., et al., *The expression pattern of UDP-N-acetyl-alpha-d-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in early gastric carcinoma*. J Surg Oncol, 2004. 86(1): p. 28-33.
136. Gu, C., et al., *Low expression of polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in lung adenocarcinoma: impact on poor prognosis and early recurrence*. Br J Cancer, 2004. 90(2): p. 436-42.
137. Miyahara, N., et al., *Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozyme 3 in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder*. Clin Cancer Res, 2004. 10(6): p. 2090-9.
138. Landers, K.A., et al., *Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer*. Int J Cancer, 2005. 114(6): p. 950-6.
139. Inoue, T., et al., *Expression of GalNAc-T3 and its relationships with clinicopathological factors in 61 extrahepatic bile duct carcinomas analyzed using stepwise sections - special reference to its association with lymph node metastases*. Mod Pathol, 2007. 20(2): p. 267-76.
140. Kellokumpu, S., R. Sormunen, and I. Kellokumpu, *Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-Golgi pH*. FEBS Lett, 2002. 516(1-3): p. 217-24.
141. Bard, F., et al., *Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2003. 278(47): p. 46601-6.
142. Pulvirenti, T., et al., *A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway*. Nat Cell Biol, 2008. 10(8): p. 912-22.
143. Gill, D.J., et al., *Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes*. J Cell Biol, 2010. 189(5): p. 843-58.
144. Li, X., et al., *Characterization of ppGalNAc-T18, a member of the vertebrate-specific Y subfamily of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. Glycobiology, 2011.
145. Guarino, M., *Src signaling in cancer invasion*. J Cell Physiol, 2010. 223(1): p. 14-26.
146. Yeatman, T.J., *A renaissance for SRC*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(6): p. 470-80.
147. Gerken, T.A., C.L. Owens, and M. Pasumarthy, *Site-specific core 1 O-glycosylation pattern of the porcine submaxillary gland mucin tandem repeat. Evidence for the modulation of glycan length by peptide sequence*. J Biol Chem, 1998. 273(41): p. 26580-8.
148. Brockhausen, I., T. Dowler, and H. Paulsen, *Site directed processing: role of amino acid sequences and glycosylation of acceptor glycopeptides in the assembly of extended mucin type O-glycan core 2*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1790(10): p. 1244-57.
149. Brockhausen, I., *Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions*. EMBO Rep, 2006. 7(6): p. 599-604.
150. Springer, G.F., *T and Tn, general carcinoma autoantigens*. Science, 1984. 224(4654): p. 1198-206.
151. Contri, A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis*. J Clin Invest, 2005. 115(2): p. 369-78.
152. Aller, C.T., et al., *Flow cytometric analysis of T and Tn epitopes on chronic lymphocytic leukemia cells*. Am J Hematol, 1996. 52(1): p. 29-38.
153. Muroi, K., et al., *Expression of sialosyl-Tn in colony-forming unit-erythroid, erythroblasts, B cells, and a subset of CD4+ cells*. Blood, 1994. 83(1): p. 84-91.
154. Bennett, E.P., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of three members of the UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family*. Glycobiology, 1998. 8(6): p. 547-55.

155. Torrents, D., et al., *A genome-wide survey of human pseudogenes*. *Genome Res*, 2003. 13(12): p. 2559-67.
156. Bennett, E.P., et al., *Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy*. *J Biol Chem*, 1999. 274(36): p. 25362-70.
157. Balakirev, E.S. and F.J. Ayala, *Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA?* *Annu Rev Genet*, 2003. 37: p. 123-51.
158. Schachter, H. and H.H. Freeze, *Glycosylation diseases: quo vadis?* *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1792(9): p. 925-30.
159. Jaeken, J., *Congenital disorders of glycosylation*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1214: p. 190-8.
160. Marth, J.D., *Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. *Glycobiology*, 1996. 6(7): p. 701-5.
161. Zhang, Y., et al., *Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen*. *J Biol Chem*, 2003. 278(1): p. 573-84.
162. Schwientek, T., et al., *Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in Drosophila, Caenorhabditis elegans, and mammals. One subfamily composed of I(2)35Aa is essential in Drosophila*. *J Biol Chem*, 2002. 277(25): p. 22623-38.
163. Topaz, O., et al., *Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis*. *Nat Genet*, 2004. 36(6): p. 579-81.
164. Kato, K., et al., *Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation*. *J Biol Chem*, 2006. 281(27): p. 18370-7.
165. Duncan, E.L., et al., *Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk*. *PLoS Genet*, 2011. 7(4): p. e1001372.
166. O'Halloran, A.M., et al., *Genetic polymorphisms in platelet-related proteins and coronary artery disease: investigation of candidate genes, including N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GALNT4) and sialyltransferase 1A1/2 (SMLT1A1/2)*. *J Thromb Thrombolysis*, 2009. 27(2): p. 175-84.
167. Wagner, K.W., et al., *Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL*. *Nat Med*, 2007. 13(9): p. 1070-7.
168. Fakhro, K.A., et al., *Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(7): p. 2915-20.
169. Gomes, J., et al., *Expression of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 in gastric mucosa, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma*. *J Histochem Cytochem*, 2009. 57(1): p. 79-86.
170. Berois, N., et al., *ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma*. *Clin Chem*, 2006. 52(9): p. 1701-12.
171. Freire, T., et al., *UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2006. 119(6): p. 1383-8.
172. Park, J.H., et al., *Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2010. 70(7): p. 2759-69.
173. Taniuchi, K., et al., *Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth*. *Oncogene*, 2011. 30(49): p. 4843-54.

174. Murray, F., et al., *Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis*. Blood, 2008. 111(3): p. 1524-33.
175. Widhopf, G.F., 2nd, et al., *Nonstochastic pairing of immunoglobulin heavy and light chains expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells is predicated on the heavy chain CDR3*. Blood, 2008. 111(6): p. 3137-44.
176. Arnold, J.N., et al., *Human serum IgM glycosylation: identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin*. J Biol Chem, 2005. 280(32): p. 29080-7.
177. Krysov, S., et al., *Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engagement of antigen in vivo*. Blood, 2010. 115(21): p. 4198-205.
178. Kubagawa, H., et al., *Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans*. J Exp Med, 2009. 206(12): p. 2779-93.
179. Shima, H., et al., *Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM*. Int Immunol, 2010. 22(3): p. 149-56.
180. Pallasch, C.P. and C.M. Wendtner, *Overexpression of the Fas-inhibitory molecule TOSO: a novel antiapoptotic factor in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2009. 50(3): p. 498-501.
181. Vire, B., A. David, and A. Wiestner, *TOSO, the Fc micro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation*. J Immunol, 2011. 187(8): p. 4040-50.
182. Young, W.W., Jr., et al., *Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isoforms in murine tissues determined by real-time PCR: a new view of a large family*. Glycobiology, 2003. 13(7): p. 549-57.
183. Cheng, L., et al., *Expression of polypeptide GalNAc-transferases in hematopoietic stem/progenitor cells*. Cell Biol Int, 2004. 28(8-9): p. 635-40.
184. Bennett, E.P., et al., *Rescue of Drosophila Melanogaster I(2)35Aa lethality is only mediated by polypeptide GalNAc-transferase pgant35A, but not by the evolutionary conserved human ortholog GalNAc-transferase-T11*. Glycoconj J, 2010. 27(4): p. 435-44.
185. Iwai, T., et al., *Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(12): p. 4572-7.
186. Berthold, F., *Isolation of human monocytes by Ficoll density gradient centrifugation*. Blut, 1981. 43(6): p. 367-71.
187. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
188. Osinaga, E., et al., *Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy*. FEBS Lett, 2000. 469(1): p. 24-8.
189. Ching, C.K., et al., *Comparison of two sialosyl-Tn binding monoclonal antibodies (MLS102 and B72.3) in detecting pancreatic cancer*. Gut, 1993. 34(12): p. 1722-5.
190. Cordone, I., E. Matutes, and D. Catovsky, *Monoclonal antibody Ki-67 identifies B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity*. Leukemia, 1992. 6(9): p. 902-6.
191. Wiesner, M., et al., *Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation*. PLoS One, 2008. 3(1): p. e1464.
192. Wilcoxon, F., *Individual comparisons of grouped data by ranking methods*. J Econ Entomol, 1946. 39: p. 269.
193. Kantele, A., et al., *Humoral immune response to keyhole limpet haemocyanin, the protein carrier in cancer vaccines*. Clin Dev Immunol, 2011. 2011: p. 614383.
194. Slovin, S.F., S.J. Keding, and G. Ragupathi, *Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer*. Immunol Cell Biol, 2005. 83(4): p. 418-28.

195. Li, Q., et al., *Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines*. Mol Cancer Ther, 2009. 8(4): p. 971-9.
196. Nakada, H., et al., *Expression of the Tn antigen on T-lymphoid cell line Jurkat*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. 179(2): p. 762-7.
197. Itzkowitz, S.H., et al., *Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps*. Gut, 1992. 33(4): p. 518-23.
198. Itzkowitz, S.H., et al., *Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer*. Cancer Res, 1989. 49(1): p. 197-204.
199. Werther, J.L., et al., *Mucin-associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome*. Br J Cancer, 1994. 69(3): p. 613-6.
200. Baldus, S.E., K. Engelmann, and F.G. Hanisch, *MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2004. 41(2): p. 189-231.
201. Corcoran, M., et al., *ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2005. 90(8): p. 1078-88.
202. Raval, A., et al., *TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. 23(17): p. 3877-85.
203. Irving, L., et al., *Methylation markers identify high risk patients in IGHV mutated chronic lymphocytic leukemia*. Epigenetics, 2010. 6(3): p. 300-6.
204. Strathdee, G., et al., *Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL*. Leukemia, 2006. 20(7): p. 1326-9.
205. Fraga, M.F. and M. Esteller, *DNA methylation: a profile of methods and applications*. Biotechniques, 2002. 33(3): p. 632, 634, 636-49.
206. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(6): p. 3740-5.
207. Cutrona, G., et al., *B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo*. Eur J Immunol, 2006. 36(3): p. 558-69.
208. Tarang, S., S. Kumar, and S.K. Batra, *Mucins and Toll-like receptors: Kith and kin in infection and cancer*. Cancer Lett, 2012.
209. Rozkova, D., et al., *Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation*. Int J Cancer, 2009. 126(5): p. 1132-43.
210. Fukuda, M., *Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1573(3): p. 394-405.
211. E. Fernández Mastache, A. González Fernández, S. Lorenzo Abalde. *Enfermedades del sistema inmune (VI). Inmunofisiología e implicaciones patológicas del sistema inmune (I)* Medicine, ISSN 0304-5412 Serie 9, N°. 33, 2005 , págs. 2162-2173
212. Marta.A.Toscano, Juan M. Ilarregui, German A.Bianco, Natalia Rubinstein, Gabriel A.Rabinovich. *Interacciones entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T*. MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66:357-362.
213. Ley, K. and G.S. Kansas, *Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(5): p. 325-35.
214. Marta.A.Toscano, Juan M. Ilarregui, German A.Bianco, Natalia Rubinstein, Gabriel A.Rabinovich. *Interacciones entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T*. MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66:357-362.
215. Challen, G.A., et al., *Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation*. Nat Genet, 2011. 44(1): p. 23-31.
216. Poiroux, G., et al., *Targeting of T/Tn antigens with a plant lectin to kill human leukemia cells by photochemotherapy*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23315.
217. Blixt, O., et al., *Analysis of Tn-antigenicity with a panel of new IgM and IgG1 monoclonal antibodies raised against leukemic cells*. Glycobiology, 2011.
218. Esteller, M., *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. Oncogene, 2002. 21(35): p. 5427-40.

219. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. 349(21): p. 2042-54.
220. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet, 1999. 21(2): p. 163-7.
221. Florean, C., et al., *Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications*. Epigenomics, 2011. 3(5): p. 581-609.
222. Kanduri, M., et al., *Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2009. 115(2): p. 296-305.
223. Tong, W.G., et al., *Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact*. Epigenetics, 2010. 5(6): p. 499-508.
224. Chevalier-Mariette, C., et al., *CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes*. Genome Biol, 2003. 4(9): p. R53.
225. Hsieh, C.L., *Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density*. Mol Cell Biol, 1994. 14(8): p. 5487-94.
226. Lorincz, M.C., et al., *DNA methylation density influences the stability of an epigenetic imprint and Dnmt3a/b-independent de novo methylation*. Mol Cell Biol, 2002. 22(21): p. 7572-80.
227. MϋLero-Navarro, S., et al., *The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding*. Carcinogenesis, 2006. 27(5): p. 1099-104.
228. Mancini, D.N., et al., *Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors*. Oncogene, 1999. 18(28): p. 4108-19.
229. Pierard, V., et al., *DNA cytosine methylation in the bovine leukemia virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line: potential involvement of direct inhibition of cAMP-responsive element (CRE)-binding protein/CRE modϋLator/activation transcription factor binding*. J Biol Chem, 2010. 285(25): p. 19434-49.
230. Kim, H.P. and W.J. Leonard, *CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation*. J Exp Med, 2007. 204(7): p. 1543-51.
231. Okuda, T., et al., *AML1, the target of ϋLiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis*. Cell, 1996. 84(2): p. 321-30.
232. Chakraborty, S., et al., *SUV39H1 interacts with AML1 and abrogates AML1 transactivity. AML1 is methylated in vivo*. Oncogene, 2003. 22(34): p. 5229-37.
233. Irizarry, R.A., et al., *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. Nat Genet, 2009. 41(2): p. 178-86.
234. Doi, A., et al., *Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts*. Nat Genet, 2009. 41(12): p. 1350-3.
235. Cokus, S.J., et al., *Shotgun bisϋLphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning*. Nature, 2008. 452(7184): p. 215-9.
236. Hellman, A. and A. Chess, *Gene body-specific methylation on the active X chromosome*. Science, 2007. 315(5815): p. 1141-3.
237. Rauch, T.A., et al., *A human B cell methylome at 100-base pair resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(3): p. 671-8.